

SAMUEL INÁCIO DA SILVA PAIVA

**EFEITO DO INIBIDOR DE *Serine Arginine Protein kinases* (SRPKs) SRPIN340 E
DERIVADOS EM CÉLULAS MURINAS DE CÂNCER DE MAMA METASTÁTICO**

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

Orientador: Gustavo Costa Bressan

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2022**

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

T

P149e
2022

Paiva, Samuel Inácio da Silva, 1990-

Efeito do inibidor de *serine arginine protein kinases*
(SRPKs) SRPIN340 e derivados em células murinas de câncer
de mama metastático / Samuel Inácio da Silva Paiva. – Viçosa,
MG, 2022.

1 dissertação eletrônica (75 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexo.

Orientador: Gustavo Costa Bressan.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2022.

Referências bibliográficas: f. 62-74.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.428>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Quinases - Inibidores. 2. Enzimas - Regulação. 3. Mamas
- Câncer. 4. Metástase. I. Bressan, Gustavo Costa, 1983-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 612.0151553

SAMUEL INÁCIO DA SILVA PAIVA

**EFEITO DO INIBIDOR DE *Serine Arginine Protein Kinases* (SRPKs) SRPIN340 E
DERIVADOS EM CÉLULAS MURINAS DE CÂNCER DE MAMA METASTÁTICO**

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

APROVADA: 24 de junho de 2022.

Assentimento:



Samuel Inácio da Silva Paiva
Autor



Gustavo Costa Bressan
Orientador

Trabalho dedicado a todos os pacientes que sofrem ou sofreram de câncer de mama. Para Rita de Cássia Sant'ana Alvarenga (*in memoriam*), um anjo que o céu ganhou. Para Deus, meus pais, minha família e amigos (as). Juntos em todas as horas.

AGRADECIMENTOS

Durante essa trajetória, a presença de muitas pessoas foi de extrema importância.

Agradeço a Deus, o mentor de toda a minha vida e que me proporcionou e proporciona saúde. Certamente o bem mais valioso que temos.

Aos meus pais, Maria e Pedro, por todo o apoio, pelo consolo nos momentos em que tudo parecia sem sentido, pelas infindáveis conversas e compreensões nos momentos de ausência, de estresse, de tristeza e por nunca medirem esforços para poder contribuir na minha formação como ser humano. Meu amor e agradecimento a vocês é imensurável!

Ao meu querido orientador Gustavo Costa Bressan, que me acolheu de modo esplendoroso e que mesmo diante da insegurança inicial, acreditou no trabalho e em mim. Se não fosse pelo senhor, eu não estaria chegando aqui. Sou e serei eternamente grato por toda a orientação, apoio, paciência, confiança e contribuições acadêmicas. O senhor é uma inspiração enorme! Gratidão!

À professora Maria Goreti de Oliveira, do departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/UFV, que sem dúvida alguma foi um ser de luz que despertou o meu interesse acadêmico. A senhora tem parte imensa nesta conquista. Muito obrigado!

Ao professor Robson Ricardo Teixeira, do departamento de Química/UFV. Pelo fornecimento dos compostos, pelas conversas, incentivos, por acreditar no trabalho, pelas vibrações com os resultados e por sempre estar solícito às demandas.

Ao professor Sérgio Oliveira de Paula, do departamento de Biologia Geral/UFV, e a pós-doutoranda Vanessa Pecini. Que não mediram esforços para que o trabalho com os animais no biotério de experimentação pudesse ser realizado.

Ao professor Abelardo Silva Júnior, e aos técnicos Marquinhos, Nívea e Alex, do departamento de Medicina Veterinária/UFV, pelo auxílio prestado.

À professora Mariana Machado Neves, do departamento de Biologia Geral/UFV, e ao doutorando Luís Otávio, pelo fornecimento de reagentes.

Ao professor Tiago Antônio de Oliveira Mendes, do departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/UFV, por todo o aconselhamento ao longo da pós-graduação e pelo fornecimento de materiais.

Ao professor Eduardo de Almeida Marques, do departamento de Biologia Geral/UFV, e a doutoranda Sabrina Emerick, pelo auxílio no experimento com os animais.

Às queridíssimas amigas e companheiras, e ao amigo e companheiro do Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos. Ju Ribeiro, Ju Leopoldo, Laís, Letícia, Luana, Larissa,

Flávia, Janine, Joice, Sabrina e Elói, pelos momentos de diversão, pelos trabalhos e auxílios experimentais, por deixarem o trajeto mais leve e por me ensinaram além de ciência, a ser uma pessoa melhor. Vocês são demais!

Aos estagiários (as) Bárbara, Samya, Arthur e Lucas pela imprescindível ajuda e pelos momentos de descontração.

Ao Marcel Arruda, por todo o companheirismo, conselhos, desabafos e palavras de consolo. “Tamo junto”, amigo!

Aos queridos amigos e amigas de Viçosa, por estarem presentes nos momentos de diversão e por entenderem os momentos de ausência.

Aos amigos e amigas do programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, por sempre estarem solícitos nas demandas laboratoriais e pelos momentos de diversão.

Ao Victor e ao Raoni bem como à Gabriela e à Graziela, por estarem disponíveis para trocas de informações sobre os experimentos.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite e por contribuírem com o trabalho.

Ao Edu, ao Marco e à secretaria do programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. Por todo o auxílio prestado.

À Dayse e aos demais técnicos de laboratório do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/UFV por todo o serviço essencial de vocês.

Ao funcionário do Biotério Central da UFV, Juliano, pelo fornecimento dos animais e por toda a alegria e prosas.

À CAPES, FAPEMIG e CNPq, pelo suporte financeiro.

À UFV, pela oportunidade de crescimento.

RESUMO

PAIVA, Samuel Inácio da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2022. **Efeito do inibidor de *Serine Arginine Protein Kinases* (SRPKs) SRPIN340 e derivados em células murinas de câncer de mama metastático.** Orientador: Gustavo Costa Bressan.

Globalmente, o câncer de mama é o câncer mais comum e a segunda principal causa de mortalidade e morbidade em mulheres. No Brasil, dados INCA mostram que esse câncer é o mais incidente no público feminino, além de ser a principal causa de morte por câncer neste gênero. Diversos fatores são responsáveis pela alta taxa de mortalidade do câncer de mama, onde a metástase para órgãos vitais é identificada como o principal dentre eles. Um crescente número de evidências tem associado o *splicing* alternativo disfuncional de genes e as atividades e/ou expressões alteradas de moléculas chaves deste processo a fenótipos metastáticos e carcinogênicos. Nesse sentido, as *serine/arginine protein kinases* (SRPKs), que atuam fosforilando fatores de *splicing* da família SR, têm sido encontradas superexpressas em diferentes tipos de câncer, incluindo o câncer de mama metastático. Neste estudo foi investigada a atividade biológica de um conjunto de novas moléculas derivadas de um inibidor de SRPKs (SRPIN340) sobre células de câncer de mama e de outros tumores cuja expressão de SRPKs já foi demonstrada. A substância MR48 foi identificada por apresentar atividade citotóxica nos ensaios de viabilidade e por apresentar efeitos antimetastáticos em linhagem de célula de câncer de mama metastático 4T1, este composto também prejudicou a atividade de SRPK1 intracelularmente. Adicionalmente, foi também realizado estudo piloto visando estabelecer um modelo murino de câncer de mama metastático baseado na inoculação da linhagem 4T1 em camundongos. Para tal, animais BALB/c fêmeas foram inoculadas com suspensões das células 4T1 em diferentes densidades na 4^a glândula mamária. O curso da doença foi monitorado, no entanto, os animais não foram capazes de gerar tumores de forma satisfatória. Novos ensaios devem ser realizados visando otimizar o estabelecimento deste modelo de câncer de mama. Em suma, este trabalho identificou uma molécula promissora que deve ser melhor avaliada em futuros estudos *in vitro* e *in vivo*.

Palavras-chave: *Serine Arginine Protein kinases*. Células murinas. Câncer de mama metastático.

ABSTRACT

PAIVA, Samuel Inácio da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2022. **Effect of the Serine Arginine Protein kKinases (SRPKS) inhibitor sRPIN340 and derivatives on murine cells of metastatic breast cancer.** Advisor: Gustavo Costa Bressan.

Globally, breast cancer is the most common cancer and the second leading cause of mortality and morbidity in women. In Brazil, INCA data show that this cancer is the most common among women, besides being the main cause of death by cancer in this gender. Several factors are responsible for the high mortality rate of breast cancer, where metastasis to vital organs is identified as the main one among them. A growing body of evidence has associated dysfunctional alternative gene splicing and altered activities and/or expressions of key molecules in this process with metastatic and carcinogenic phenotypes. In this regard, serine/arginine protein kinases (SRPKs), which act by phosphorylating SR family splicing factors, have been found to be overexpressed in different types of cancer, including metastatic breast cancer. In this study, the biological activity of a set of novel molecules derived from an inhibitor of SRPKs (SRPIN340) on breast cancer cells and other tumors whose expression of SRPKs has already been demonstrated was investigated. The substance MR48 was identified as showing cytotoxic activity in viability assays and antimetastatic effects in 4T1 metastatic breast cancer cell line, this compound also impaired SRPK1 activity intracellularly. In addition, a pilot study was also conducted to establish a murine model of metastatic breast cancer based on the inoculation of the 4T1 cell line in mice. For this purpose, female BALB/c animals were inoculated with suspensions of the 4T1 cells at different densities in the 4th mammary gland. The course of the disease was monitored, however, the animals were not able to generate tumors satisfactorily. New assays should be performed in order to optimize the establishment of this breast cancer model. In summary, this work identified a promising molecule that should be further evaluated in future *in vitro* and *in vivo* studies.

Keywords: Serine Arginine Protein kinases. Murine cells. Breast câncer metastatic.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estrutura química dos compostos citados no texto.....	15
Figura 2 - a) Incidência de câncer no Brasil no púbico feminino, mostrando que o câncer de mama ocupa a primeira posição em mulheres. b) Mortalidade por câncer de mama em mulheres no Brasil, apontando o câncer de mama como a principal causa de mortalidade neste gênero	16
Figura 3 – Splicing alternativo e fatores de Splicing.....	19
Figura 4- Desregulação de splicing alternativo e câncer.....	20
Figura 5- Desregulação de Splicing alternativo em câncer e elementos-trans.	21
Figura 6 - Esquema estrutural das proteínas SR.....	22
Figura 7 - Proteínas SR e intensificadores de splicing exônicos (ESEs).	23
Figura 8 - Anormalidade de proteínas SR no câncer de mama.	24
Figura 9 – Esquema estrutural de SRPK1.	25
Figura 10 - Fosforilação de proteínas SR por SRPK1.....	26
Figura 11 - SRPK1 e oncogênese.....	28
Figura 12 - Triagem citotóxica dos compostos MRs contra a linhagem células tumorais 4T1..	42
Figura 13 - Triagem citotóxica dos compostos MRs realizada contra a linhagem de células tumorais HepG2.....	43
Figura 14 - Triagem citotóxica dos compostos MRs realizada contra a linhagem de células tumorais HeLa.	43
Figura 15 - Triagem citotóxica de MR48 contra células tumorais 4T1 e não tumorais VERO	46
Figura 16 - Efeito do composto MR48 no fechamento do risco de células de câncer de mama 4T1.....	47
Figura 17 - Efeito do composto MR48 na formação de colônias de células de câncer de mama.	48
Figura 18 - Efeito do composto MR48 na localização subcelular de SRPK1.....	50
Figura 19 - O gráfico acima mostra os volumes tumorais dos grupos de camundongos BALB/c fêmeas inoculadas com diferentes densidades celulares 10^5 de células 4T1.	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Série de 22 compostos MR inspirados no SRPIN340.....	33
Tabela 2 - Valores da metade da concentração inibitória máxima (IC50) para os compostos MR.....	45
Tabela 3 - Peso corporal (PC) inicial, PC final e massa absoluta e relativa dos órgãos camundongos BALB/c fêmeas inoculadas com densidades 104 de células 4T1.....	50
Tabela 4 - Peso corporal (PC) inicial, PC final e massa absoluta e relativa dos órgãos camundongos BALB/c fêmeas inoculadas com densidades 105 de células 4T1.....	51
Tabela 5 - Número de animais apresentando tumores palpáveis e percentual de incidência tumoral em camundongos BALB/c fêmeas inoculadas com diferentes densidades de 105 de células 4T1.....	52

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	Câncer de mama.....	16
2.2	<i>SPLICING</i> alternativo e câncer.....	17
2.3	Desregulação das proteínas sr e a contribuição para o processo oncológico	21
2.4	SRPK1 e seu papel no câncer	24
2.5	Inibição farmacológica de SRPKS como alternativa no tratamento do câncer .	28
2.6	Modelo 4T1 e relevância pré-clínica	31
3	OBJETIVOS	32
3.1	Objetivo geral	32
3.2	Objetivos específicos.....	32
4	METODOLOGIA	33
4.1	Metodologia <i>IN VITRO</i>	33
4.1.1	Compostos	33
4.1.2	Cultivo celular	37
4.1.3	Triagem citotóxica dos compostos pelo método do MTT.....	37
4.1.4	Determinação do IC50 dos compostos pelo método do MTT.....	37
4.1.5	Ensaio de Migração Celular	38
4.1.6	Ensaio de Formação de Colônias.....	39
4.1.7	Ensaio de Imunofluorescência	39
4.2	Metodologia <i>IN VIVO</i>	40
4.2.1	Animais e Comitê de Ética	40
4.2.3	Grupos experimentais	40
4.2.4	Mensuração do volume tumoral e pesagem dos animais	41
4.2.5	Eutanásia e determinação das massas relativas e absolutas dos órgãos.....	41
4.2.6	Análise estatística.....	41

5	RESULTADOS	42
5.1	Triagem citotóxica dos compostos MRs contra células tumorais	42
5.2	Determinação da metade da concentração inibitória máxima (IC50) de MRs em células tumorais mamárias 4T1 e não tumorais e triagem citotóxica do MR48	44
5.3	Efeito antimetastático <i>in vitro</i> do composto MR48.....	46
5.4	Efeito do composto MR48 na localização subcelular de SRPK1	49
5.5	Peso corporal e massas relativa e absoluta dos animais	50
5.6	Tumores palpáveis, incidência, volume e rejeição tumoral.....	51
6	DISCUSSÃO	54
7	CONCLUSÕES	60
	PERSPECTIVAS FUTURAS	61
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
	ANEXOS	75
	ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS	75

1 INTRODUÇÃO

Em todo o mundo, o câncer de mama é o câncer mais comum e a segunda principal causa de mortalidade e morbidade em mulheres (COUGHLIN, 2019; LI *et al.*, 2014). Para o Brasil, a estimativa do triênio 2020-2022 aponta que o câncer de mama será o segundo mais incidente, sendo o mais frequente em mulheres em todas as regiões brasileiras (Instituto Nacional do Câncer - INCA, 2019). Também, de acordo com os números de câncer do INCA, o carcinoma mamário no Brasil é a principal causa de morte por câncer em mulheres.

Está estabelecido que os eventos de perturbação de *splicing* alternativo, um processo que gera vários produtos de mRNAs maduros que podem ser traduzidos em diferentes proteínas a fim de manter a diversidade proteica e a homeostasia celular, estão associados ao aparecimento e a agressividade do câncer de mama, onde a quinase SRPK1 parece estar envolvida (LIN *et al.*, 2014; MARTÍNEZ-MONTIEL *et al.*, 2017; NIKAS *et al.*, 2020; SILIPO; GAUTREY; TYSON-CAPPER, 2015; YANG *et al.*, 2019).

SRPK1 é uma proteína-quinase que atua fosforilando fatores de *splicing* ricos em domínios serina/arginina, destacando-se as proteínas SR (GIANNAKOUROS *et al.*, 2011; NIKAS *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2021). A expressão dessa quinase é elevada no câncer de mama (HAYES; CARRIGAN; MILLER, 2007; LI *et al.*, 2014; LIN *et al.*, 2014; MALVI *et al.*, 2020; NIKAS *et al.*, 2019; van ROOSMALEN *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2020), assim como há também o aumento da expressão de algumas proteínas SR (MARTÍNEZ-MONTIEL *et al.*, 2017; PARK *et al.*, 2019; SILIPO; GAUTREY; TYSON-CAPPER, 2015), como por exemplo, a proteína SR SRSF1, que é altamente expressa e tem seu gene ampliado neste câncer. Esses eventos, por consequência, acarretam na desregulação do processo de *splicing* de genes chave no tumor e, dessa forma, há geração de proteínas alteradas que exercem atividades pró-câncer, contribuindo com a carcinogênese mamária (ANCZUKÓW *et al.*, 2012; PARK *et al.*, 2019; SILIPO; GAUTREY; TYSON-CAPPER, 2015).

De fato, estudos mostram que o *splicing* alternativo perturbado está envolvido no processo da carcinogênese, já que esta perturbação gera isoformas aberrantes de mRNAs maduros que podem resultar na síntese de proteínas com atividades relevantes ao tumor (NARO; SETTE, 2013; GROSSO; MARTINS; CARMO-FONSECA, 2008). Essas proteínas alteradas no contexto do câncer de mama estão associadas, dentre outros eventos, a evasão da apoptose celular (LIN *et al.*, 2014), migração celular (van ROOSMALEN *et al.*, 2015) e progressão metastática (MALVI, *et al.*, 2020). A título de exemplo, o estudo de Wang *et al.* (2020) mostrou que SRPK1 tem um impacto significativo no *splicing* dos principais

reguladores da apoptose em células de carcinoma mamário, favorecendo a evasão da apoptose e a resistência citotóxica dessas células ao tratamento com o quimioterápico cisplatina.

Em conformidade com o parágrafo acima, outros estudos mostraram que o aumento da expressão de SRPK1 leva a perturbações nos eventos de *splicing* que se correlacionam com o aumento da incidência de metástases e mortes em pacientes com câncer de mama (LIN *et al.*, 2014; MALVI *et al.*, 2020; NIKAS *et al.*, 2019). A elevada expressão de SRPK1 se correlaciona com o grau e a agressividade do tumor mamário (HAYES; CARRIGAN; MILLER, 2007; van ROOSMALEN *et al.*, 2015), além de estar associada com a redução do tempo de sobrevida em pacientes (LI *et al.*, 2014).

Por estar envolvida na patogênese do câncer de mama e de vários outros tipos de cânceres (BULLOCK; OLTEAN, 2017), a SRPK1 vem sendo considerada um potencial alvo terapêutico de drogas (LI *et al.*, 2014; van ROOSMALEN *et al.*, 2015). Diferentes estudos visaram a inibição farmacológica de SRPK1 em diferentes tipos de cânceres (GAMMONS *et al.*, 2014; MAVROU *et al.*, 2015; TZELEPIS *et al.*, 2018) e em câncer de mama (LIN *et al.*, 2014; MALVI *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2020), obtendo resultados promissores.

A substância *N*-(2-(piperidin-1-yl)-5-(trifluoromethyl)phenyl) isonicotinamide, denominada SRPIN340 (figura 1, a), é um inibidor de SRPKs que vem sendo demonstrado biologicamente ativo em diversos modelos de câncer, incluindo o de mama (MALVI *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2020). No entanto, suas solubilidades e atividade inibitória baixas têm motivado a busca por derivados com melhores propriedades farmacológicas (DA SILVA *et al.*, 2015). Nessa linha de raciocínio, diferentes análogos têm sido desenvolvidos (SIQUEIRA *et al.*, 2017). Como os compostos SRVICs (Trifluorometil arilamidas) que se mostraram promissores em diferentes células de leucemia, além de melanoma (MOREIRA *et al.*, 2018; SIQUEIRA *et al.*, 2017; VALE *et al.*, 2020). Além disso, outros compostos inspirados em SRPIN340, como SPHINX e SPHINX31 tiveram significativas atividades anticâncer (BELALI *et al.*, 2020; SUPRADIT *et al.*; 2022).

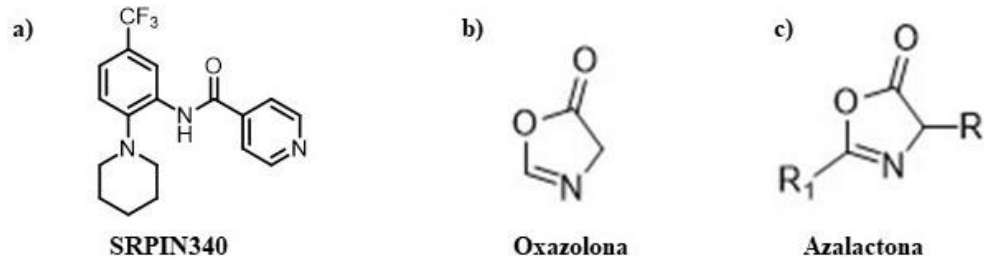
Nesse painel, vinte e dois compostos análogos a SRPIN340 foram desenvolvidos a fim de avaliar o potencial anticâncer. SRPIN340 é um exemplo de amida - um grupo funcional contendo uma carbonila ligada a um nitrogênio - presente em diversos produtos farmacêuticos (ACOSTA-GUZMÁN; MATEUS-GÓMEZ; GAMBA-SÁNCHEZ, 2018; FUKUHARA *et al.*, 2006; LANIGAN; SHEPPARD, 2013; LI; SZOSTAK, 2018). De fato, esse grupo é encontrado em medicamentos registrados além de novos candidatos a fármacos (ACOSTA-GUZMÁN; MATEUS-GÓMEZ; GAMBA-SÁNCHEZ, 2018; LI; SZOSTAK, 2018).

Já foi relatado que amidas possuem um potencial efeito antiproliferativo contra células de câncer de mama, além de atuarem como potentes agentes antitumorais contra diversos tipos de tumores (DI MARZO *et al.*, 2001; SUPURAN, 2012). Por isso, esforços vêm sendo empregados na tentativa de obter amidas de auto rendimento. Assim, metodologias como a de Pereira *et al.* (2014) demonstraram que a abertura do anel de azalactonas (figura 1, c) pode implicar na obtenção de amidas de alta eficácia. As azalactonas são caracterizadas por terem porção de oxazolona (figura 1, b) – um intermediário importante para a síntese de vários compostos, como amidas (KHAN *et al.*, 2006; MOHAMED *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2014). Tendo como base essa metodologia, foram sintetizadas novas amidas inspiradas em SRPIN340.

No cenário da busca por tratamentos promissores contra o câncer, os estudos pré-clínicos em modelos experimentais se destacam, constituindo a base dos estágios iniciais para o desenvolvimento e triagem de potenciais drogas com propriedades anticancerígenas (HERTER-SPRIE; KUNG; WONG, 2013; PAN *et al.*, 2020). Em vista disso, o modelo 4T1 de câncer de mama metastático é um modelo relevante, pois, ainda que haja uma alta semelhança entre o genoma de murinos de laboratório *Mus musculus* e os de *Homo sapiens*, há incertezas na tradução dos resultados de modelos de camundongos para prever desfechos no tratamento clínico (HERTER-SPRIE; KUNG; WONG, 2013; PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2001). Por exemplo, há modelos de xenoenxertos que apresentam problemas na replicação da metástase tumoral (TAO *et al.*, 2008). No entanto, problemas assim como esse podem ser superados com o uso de modelos experimentais que melhor retratem a biologia da doença. É o caso de 4T1, que é mimético ao estágio IV do câncer de mama humano, onde há metástases distantes. Esse modelo é capaz de representar fielmente o processo metastático como ocorre *in vivo*, exibindo características metastáticas mais semelhantes às observadas em pacientes com câncer além de melhor retratar a biologia da doença (HERTER-SPRIE; KUNG; WONG, 2013; PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2001; TAO *et al.*, 2008). Destaca-se, também, que células 4T1 se assemelham transcricionalmente às células de câncer de mama triplo negativo humano, que não apresentam receptores hormonais e não são capazes de superexpressar HER2 (DE RUIJTER *et al.*, 2011; IRVIN JR; CAREY, 2008; SCHRÖRS *et al.*, 2020). Essas características elevam o valor preditivo de ensaios pré-clínicos nesse modelo.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos farmacológicos de análogos ao inibidor de SRPKs (SRPIN340) *in vitro* bem como realizar estudos piloto visando estabelecer o modelo murino 4T1 de câncer de mama metastático.

Figura 1- Estrutura química dos compostos citados no texto.

Fonte: (RODRIGUES *et al.* No prelo)

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer de mama

O câncer de mama é uma das doenças malignas mais comuns entre mulheres em todo o mundo e é a principal causa da maioria das mortes relacionadas ao câncer (LIANG *et al.*, 2020). As estatísticas globais de câncer mostram que o carcinoma mamário ultrapassou o câncer de pulmão, tornando-se a malignidade mais comumente diagnosticada (SUNG *et al.*, 2021). No Brasil, esse câncer ocupa a primeira posição de incidência em mulheres (Figura 2, a), além de ser a principal causa de mortalidade por câncer neste público (Figura 2, b). (INCA, 2019; INCA, 2021)

Figura 2 - a) Incidência de câncer no Brasil no público feminino, mostrando que o câncer de mama ocupa a primeira posição em mulheres. b) Mortalidade por câncer de mama em mulheres no Brasil, apontando o câncer de mama como a principal causa de mortalidade neste gênero

a)	Localização Primária	Casos Novos	%	b)	Localização Primária	Óbitos	%
	Mama feminina	66.280	29,7		Mama	18.068	16,4
	Cólon e Reto	20.470	9,2		Traqueia, Brônquios e Pulmões	12.621	11,4
	Colo do útero	16.710	7,5		Cólon e Reto	10.385	9,4
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.440	5,6		Colo do útero	6.596	6,0
	Glândula Tireoide	11.950	5,4		Pâncreas	5.893	5,3
	Estômago	7.870	3,5		Estômago	5.475	5,0
	Ovário	6.650	3,0		Sistema Nervoso Central	4.663	4,2
	Corpo do útero	6.540	2,9		Fígado e Vias biliares intrahepáticas	4.584	4,2
	Linfoma não-Hodgkin	5.450	2,4		Ovário	4.123	3,7
	Sistema Nervoso Central	5.230	2,3		Leucemias	3.356	3,0
	Todas as Neoplasias, exceto pele não melanoma	223.110	100,0		Todas neoplasias	110.344	100,0
	Todas as Neoplasias	316.280					

Fonte: Figuras extraídas de: INCA. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil; INCA. Números de câncer, 2021.

Diversos fatores são responsáveis pela alta taxa de mortalidade do câncer de mama, onde a metástase para órgãos vitais é identificada como o principal dentre eles. De fato, o câncer de mama metastático é responsável por mais de 90% das mortes relacionadas ao câncer. Isso se dá devido a heterogeneidade metastática desse câncer, tendo metástases disseminadas para ossos, pulmão, fígado e cérebro, o que leva a diferentes desfechos no tratamento da doença (LIANG *et al.*, 2020; WANG, L.; ZHANG, S.; WANG, X., 2021).

No contexto metastático e terapêutico, destaca-se o câncer de mama em estágio IV (quando há disseminação de metástases para além do tumor primário) e o câncer de mama triplo negativo. Esse câncer é altamente maligno, metastático, carente de receptores hormonais, não superexpressa HER2 e é tradicionalmente incurável, sendo alvo de diversos

estudos a fim de encontrar potenciais tratamentos para melhores desfechos (DE RUIJTER *et al.*, 2011; TESHOME, 2018)

Um crescente corpo de evidências tem associado o *splicing* alternativo disfuncional de genes e as atividades e/ou expressões alteradas de moléculas-chaves deste processo, como as proteínas SR e SRPK1, a fenótipos metastáticos e oncogênicos em câncer de mama e no câncer em geral. Essas disfunções estão intimamente relacionadas com progressões metastáticas e tumorais, sendo potenciais alvos-chave terapêuticos antimetastáticos e anticancerígenos. (HAN *et al.*, 2021; SILIPO; GAUTREY; TYSON-CAPPER, 2015; van ROOSMALEN *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2021).

2.2 *SPLICING* alternativo e câncer

O *splicing* alternativo é um evento de modificação pós-transcricional de um RNA mensageiro imaturo (pre-mRNA), sendo fundamental para a geração de diversificadas isoformas de RNAs mensageiros (mRNAs) maduros que serão traduzidas em diferentes proteínas. Através desse processo, um único pre-mRNA pode resultar em vários mRNAs e, dessa maneira, gerar diferentes proteínas que podem ter distintas funções em diversos contextos biológicos (PAJARES *et al.*, 2007).

A variedade de isoformas mRNAs maduros gerada a partir de um único pre-mRNA imaturo no processo de *splicing* alternativo, está relacionada à remoção de íntrons (partes/sequências não codificadoras de proteínas) e junção de éxons (partes/sequências codificadoras de proteínas) em múltiplas combinações, onde essas diferentes combinações acarretam na produção de diferentes mRNAs. Esses podem vir a ser traduzidos em proteínas variadas que atuam em importantes episódios biológicos, como vias de sinalização celular, interações proteína-proteína, além de inúmeros outros eventos que resultam em uma ampla gama de funções celulares. Alguns processos de *splicing* alternativo de RNA incluem: inclusão de éxons, retenção de éxons, exclusão de íntrons, dentre outros (DONG; CHEN, 2020; DU *et al.*, 2021).

O *splicing* alternativo é realizado pelo *spliceossomo* além de outros componentes, no qual incluem-se os fatores de *splicing* – que são denominados elementos-trans, bem como os elementos-cis. O *spliceossomo* é um complexo macromolecular composto por cinco pequenas ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs, U1, U2, U4, U6 e U5) e uma ampla diversidade de proteínas acessórias. Ele é o responsável por catalisar os eventos de *splicing*, sendo montado nos sítios de *splicing* (3' e/ou 5') possuidores de sequências consenso, que são sequências

conservadas presentes no pre-mRNA importantes para o correto reconhecimento dos sítios pelo *spliceossomo*. Esse reconhecimento se dá mediante interações entre proteínas, como as que ocorrem entre as snRNPs e o RNA (DONG; CHEN, 2020; PAJARES *et al.*, 2007).

Em apoio ao parágrafo anterior, o processamento de *splicing* tem início com o correto reconhecimento das sequências consenso do sítio 5' pela ribonucleoproteína U1 snRNP, onde após ocorre sua ligação. Além disso há também o reconhecimento do sítio 3' por U2-snRNP e posterior ligação, no qual após o tri-snRNP (U4/U6-U5) é recrutado ocorrendo, finalmente, a montagem do complexo *spliceossomo*. Após a montagem, esse complexo cataliticamente ativo processa as reações necessárias para a remoção de íntrons do pre-mRNA e junção de éxons. (CHEN; MOORE, 2015; DENG *et al.*, 2021; WILKINSON *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2017; LEE; DONALD, 2015).

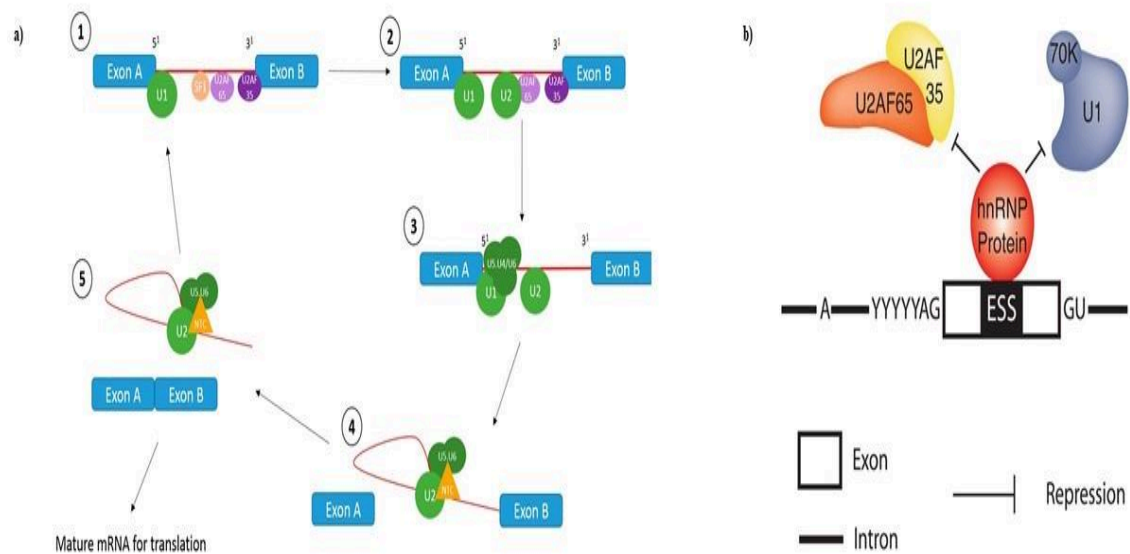
Há sequências consenso tanto em íntrons quanto em éxons no pre-mRNA, entretanto apenas estas sequências não proveem toda a informação necessária para a regulação do evento de *splicing*, sendo requeridos mais elementos para tal finalidade. Esses incluem os elementos-cis (presentes no pre-mRNA) que atuam como intensificadores/promotores ou silenciadores/repressores de *splicing*, além dos elementos-trans - que são compostos pelos fatores de *splicing* (SONG *et al.*, 2018).

Os elementos-cis são encontrados tanto nos íntrons quanto nos éxons, e geralmente estão localizados próximos aos sítios de *splicing* no pre-mRNA. Os elementos-cis classificados como intensificadores/promotores de *splicing* exônicos e intrônicos (ESEs e ISEs), atuam estimulando a montagem do *spliceossomo* e o reconhecimento dos sítios de *splicing* pelo mesmo. Já os elementos-cis silenciadores/repressores de *splicing* exônicos e intrônicos (ESSs e ISSs) têm o efeito oposto. Destaca-se que esses elementos são importantes na regulação do uso de diferentes sítios de *splicing* no pre-mRNA durante o *splicing* alternativo, já que apresentam funções antagônicas (PAJARES *et al.*, 2007).

Os elementos-trans são fatores de *splicing* que estão envolvidos na montagem ou repressão do *spliceossomo* (Figura 3. a, b), portanto têm um papel importante no controle do *splicing* alternativo de uma célula. Por exemplo, dentre esses fatores destaca-se as proteínas SR, que constituem uma família de fatores reguladores de *splicing* onde, nos éxons, geralmente se ligam a ESEs (elementos-cis intensificadores/promotores) para promoverem o *splicing* através do auxílio na montagem do *spliceossomo*. Sob outra perspectiva há também as hnRNPs - ribonucleoproteínas de núcleo heterogêneo, que são igualmente fatores reguladores de *splicing*, atuando de modo oposto às SR. Deveras, as hnRNPs se ligam a ESSs (elementos-cis silenciadores/repressores) para reprimirem a montagem do *spliceossomo*,

atuando como supressoras de *splicing* (Figura 3, b). Por consequência, as interações entre fatores de *splicing* e elementos-cis promotores/repressores formam uma complexa rede de interação que pode ser responsável pela diversidade da regulação de eventos de *splicing*, uma vez que sob diferentes condições celulares o nível e a atividade de cada fator de *splicing* variam significativamente, implicando em diferentes resultados de *splicing* – que é o *splicing* alternativo - do mesmo pre-mRNA (BUSCH; HERTEL, 2012; PAJARES *et al.*, 2007; SONG *et al.*, 2018). Em outras palavras, acarretando na produção de diferentes mRNAs a partir do mesmo pre-mRNA.

Figura 3 – Splicing alternativo e fatores de splicing. a) Um fator de splicing (SF), como uma proteína SR, associa-se ao pré-mRNA e atua na montagem do spliceossomo. (1) Após a associação de um SF, há início da montagem do spliceossomo. (2) e (3) Após o início da montagem, outros componentes spliceossomais se associam ao pre-mRNA. (4) e (5) Finalizada a montagem, o spliceossomo cataliticamente ativo promove a remoção de um íntron. b) A ribonucleoproteína de núcleo heterogêneo (hnRNP) atua reprimindo a montagem do spliceossomo impedindo a ligação dos componentes spliceossomais ao pre-mRNA.

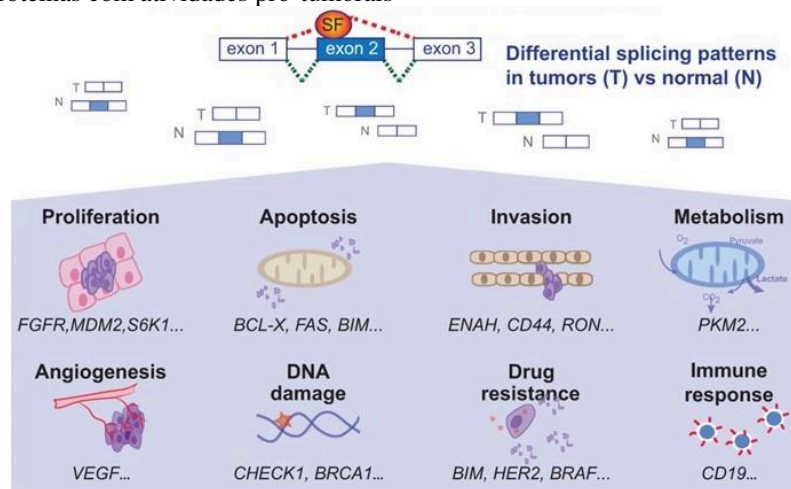


Fonte: (BOWLER; OLTEAN, 2019); BUSCH; HERTEL, 2012).

A desregulação do processo de *splicing* alternativo é uma marca de vários cânceres, incluindo o de mama. Esse evento desregulado leva a geração de isoformas de mRNAs não existentes previamente e/ou modificações em isoformas de mRNAs de tecidos específicos. Com efeito, essas isoformas advindas de mecanismos de *splicing* alternativo desregulados levam a produção de proteínas com funções biológicas alteradas que contribuem com fenótipos tumorigênicos em diversos cânceres. Isso é exemplificado pela figura 4 abaixo, ilustrando essas isoformas geradas/alteradas no contexto de células cancerígenas e suas

relações com alterações na regulação do ciclo celular e aumento da proliferação, indução de angiogênese, transição epitélio-mesenquimal, aumento da migração celular, invasão, metástase e colonização, evasão da morte celular por apoptose, além de escape da destruição mediada pelo sistema imunológico. Importante destacar também que essa desregulação está relacionada à resistência de células cancerígenas aos tratamentos anticâncer (ANCZUKÓW; KRAINER, 2016; DUTERTRE; VAGNER; AUBOEUF, 2010; PAJARES *et al.*, 2007).

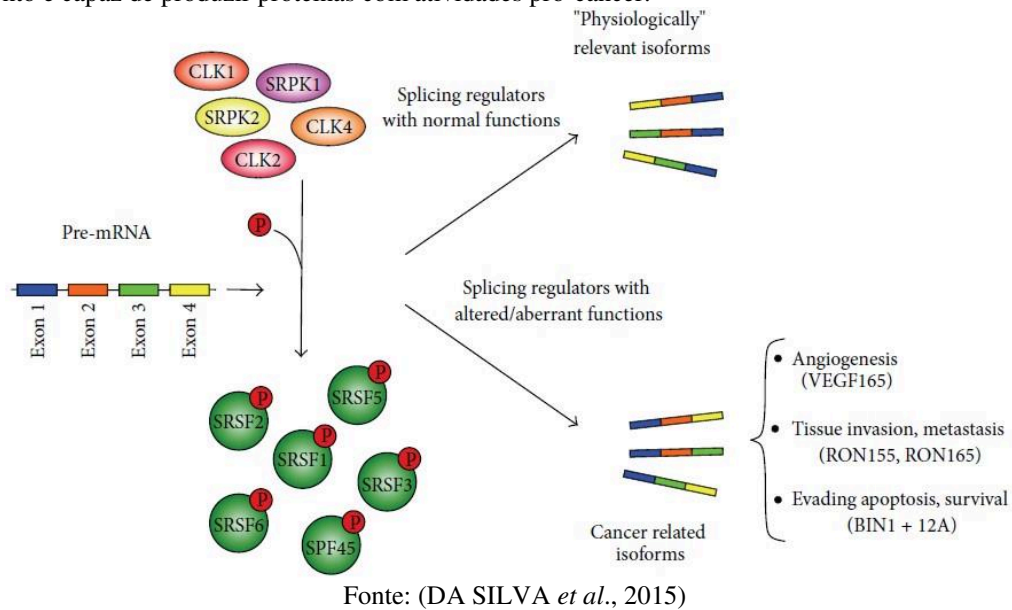
Figura 4- Desregulação de splicing alternativo e câncer. A desregulação do processo de splicing alternativo leva a geração e/ou modificação de isoformas de mRNA. Na figura abaixo, essas isoformas aberrantes são exemplificadas com a letra T e diferem das isoformas normais exemplificadas pela letra N. Isoformas aberrantes levam a produção de proteínas com atividades pró-tumorais



Fonte: (ANCZUKÓW; KRAINER, 2016).

Os mecanismos que levam a defeitos de *splicing* alternativo em câncer estão sendo identificados, entretanto destaca-se duas principais causas: mutações em elementos-cis e mudanças em elementos-trans (fatores de *splicing*) - aqui em particular destacando o papel das proteínas SR e das quinases SRPK - que possuem atividades oncogênicas em determinados contextos (Figura 5) (CZUBATY; PIEKIELKO-WITKOWSKA, 2017; PAJARES *et al.*, 2007).

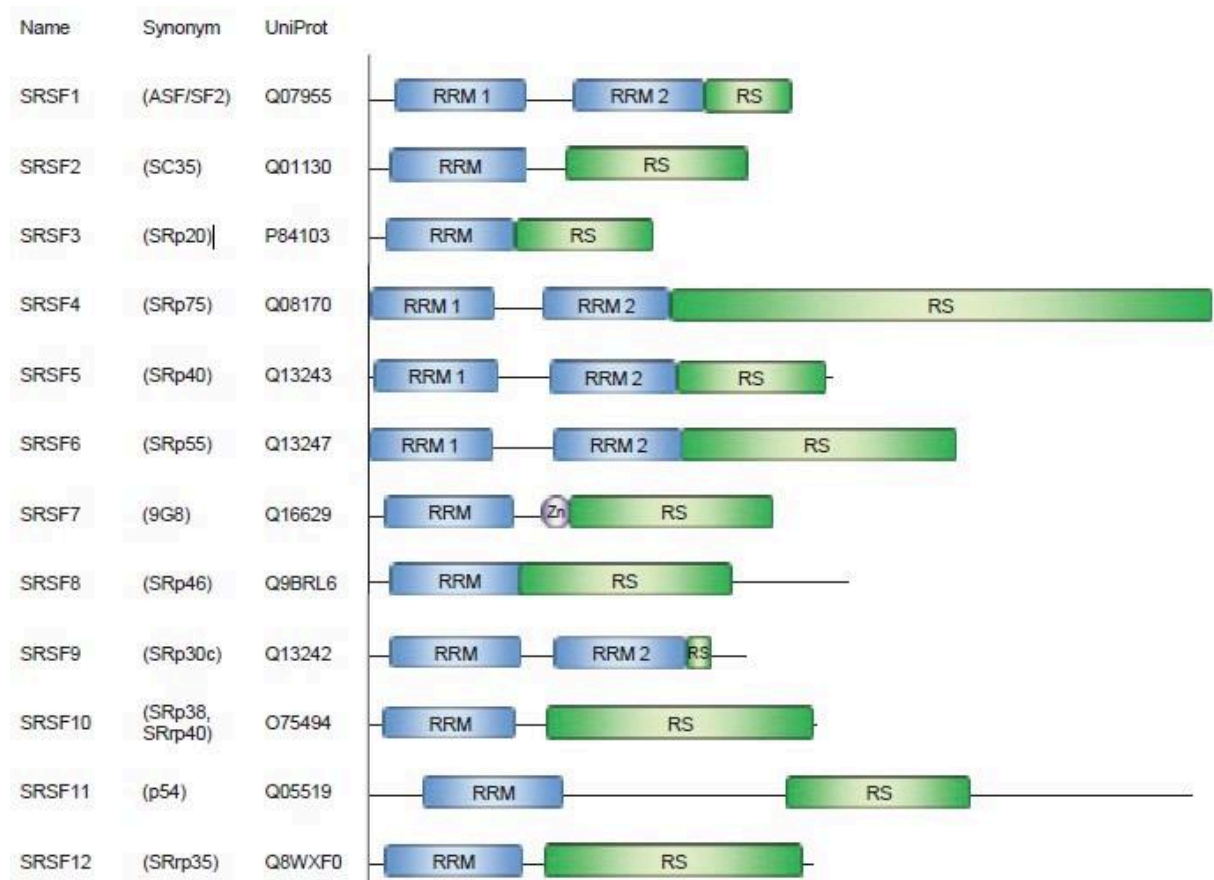
Figura 5- Desregulação de splicing alternativo em câncer e elementos-trans. A desregulação de elementos-trans (fatores de splicing) como das proteínas SR e SRPKs, pode implicar na formação de isoformas de mRNAs não existentes previamente e/ou modificações de isoformas de mRNAs em tecidos específicos no contexto do câncer. Esse evento é capaz de produzir proteínas com atividades pró-câncer.



2.3 Desregulação das proteínas sr e a contribuição para o processo oncológico

As proteínas SR (SRs) são uma família constituída de 12 proteínas (SRSFs 1-12) consideradas fatores de *splicing* que desempenham papéis no metabolismo do RNA. Essas proteínas possuem uma estrutura bipartida contendo um ou dois motivos de reconhecimento de RNA (RRMs) na sua região amino-terminal (N) e um domínio RS enriquecido em repetições de serina/arginina na região carboxi-terminal (C) (Figura 6). Elas estão envolvidas tanto no *splicing* constitutivo quanto no alternativo, além de participarem de outros eventos de processamento de RNA, como exportação de mRNA maduro para tradução de proteínas (GRAVELEY, 2004; LIN *et al.*, 2005; PANDIT *et al.*, 2013; TWYFFELS; GUEYDAN; KRUYSS, 2011).

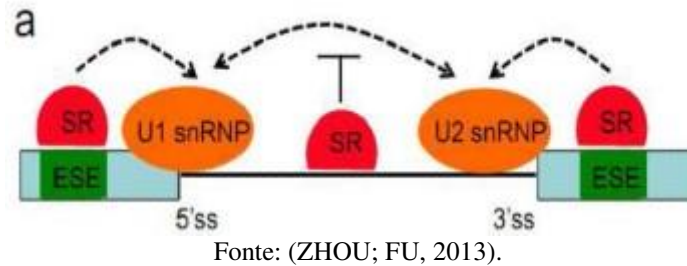
Figura 6 - - Esquema estrutural das proteínas SR. As proteínas SR são uma família constituída por 12 proteínas, contendo uma estrutura bipartida possuindo um ou dois motivos de reconhecimento de RNA (RRM) na sua região amino-terminal (N) e um domínio RS rico em em serina/arginina na região carboxi-terminal (C)



Fonte: (TWYFFELS; GUEYDAN; KRUY, 2011).

No contexto específico do *splicing*, essas proteínas atuam ao receberem sinais biológicos ativadores, onde então as mesmas podem desempenhar importantes contribuições para a montagem do complexo *spliceossomo* – uma etapa crucial e um pré-requisito para o processamento de emenda (*splicing*) de um pré-mRNA. Destaca-se nesse processo de sinalização biológica ativadora o papel das proteínas quinases, como as SRPKs, que atuam fosforilando e ativando as SRs. Uma vez ativadas, as proteínas SR atuam reconhecendo elementos-cis específicos presentes no pré-mRNA, denominados intensificadores/promotores de *splicing* exônicos (ESEs), onde então se ligam através de seus motivos de reconhecimento de RNA (RRM) e estabelecem os sítios de *splicing* onde ocorrerá a montagem do *spliceossomo* durante o *splicing* alternativo (Figura 7). Em resumo, as proteínas SR ligadas a ESEs ativam os sítios de *splicing* e recrutam componentes spliceossomais para o pré-mRNA (BUSCH; KLEMENS, 2012; CHEN *et al.*, 2021; DU *et al.*, 2021; JEONG, 2017; ZHONG *et al.*, 2009).

Figura 7 - Proteínas SR e intensificadores de splicing exônicos (ESEs). Proteínas SR atuam reconhecendo ESEs, onde após estabelecem sítios de splicing onde ocorrerá a montagem do spliceossomo



Uma variedade robusta de evidências tem relatado que as proteínas SR podem ter características oncogênicas quando desreguladas (SHILO; SIEGFRIED; KARNI, 2015; SHKRETA *et al.*, 2013; GAUTREY; TYSON-CAPPER, 2012). A desregulação de tais proteínas pode estar relacionada a modificações de suas atividades bem como no aumento de sua expressão através de mutações em genes codificadores de fatores de *splicing* (DVINGE *et al.*, 2016).

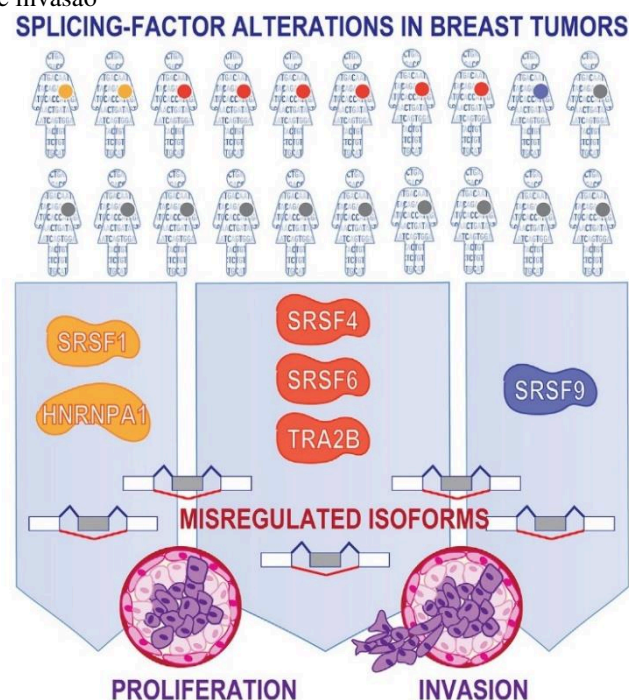
Há associações entre a expressão alterada e/ou atividade de fatores de *splicing*, como as proteínas SR, com o *splicing* alternativo desregulado relacionado ao câncer e a transformação celular. Em diversos casos essas proteínas orquestram eventos alterados de *splicing* alternativo que levam ao aumento de proteínas com atividades pró-oncogênicas. Nesse contexto, SRSF1 é frequentemente superexpresso em células de câncer e atua como um proto-oncogene. Esse fator de *splicing* age na desregulação de centenas de eventos de *splicing* alternativo, além disso, também está implicado na ativação direta da via da quinase mTOR promovendo assim crescimento e proliferação celular (DVINGE *et al.*, 2016; SHILO; SIEGFRIED; KARNI, 2015; SONG *et al.*, 2018).

Outros SRSFs disfuncionais também contribuem com processos oncogênicos. A título de exemplo, SRSF2 foi encontrado altamente expresso em tumores pulmonares, tendo relação direta na estimulação de células cancerosas a entrarem na fase S do ciclo celular, estimulando a progressão deste. Além de que, interferiu na atividade de genes supressores de tumor, como por exemplo o KLF6, um gene supressor de tumor que perde sua capacidade supressora devido a retirada de seu domínio de ligação do DNA resultante de evento aberrante de *splicing* alternativo mediado por SRSF2 desregulado (SHILO; SIEGFRIED; KARNI, 2015).

SRSF3 está superexpresso em câncer de ovário, isso leva a prevenção da apoptose celular e induz a transição da fase G2/M no ciclo celular, estando portanto relacionado à proliferação celular (JIA *et al.*, 2010).

No câncer de mama, SRSFs estão anormalmente expressos e com atividades alteradas. Um percentual significativo dos tumores de mama tem uma alteração em, pelo menos, um membro da família de proteínas SR (LIU; RABADAN, 2021; MARTÍNEZ-MONTIEL *et al.*, 2017; PARK *et al.*, 2019; SILIPO; GAUTREY; TYSON-CAPPER, 2015; SUNGHEE *et al.* 2019). É o caso da proteína SR SRSF1, que estimula a proliferação celular e a inibição da morte celular por apoptose, contribuindo, dessa maneira, para a tumorigênese (ANCZUKÓW *et al.*, 2012; PARK *et al.*, 2019; SILIPO; GAUTREY; TYSON-CAPPER, 2015). As proteínas SRSF3, SRSF4, SRSF5, SRSF6 e SRSF10 também têm sido relacionadas ao crescimento celular, invasão e metástase (Figura 8). Cabe citar também que SRSF11 está implicada na resistência a drogas anticâncer (DU *et al.*, 2021; PARK *et al.*, 2019; READ; NATRAJAN, 2018; SILIPO; GAUTREY; TYSON-CAPPER, 2015).

Figura 8 - Anormalidade de proteínas SR no câncer de mama. Um percentual significativo dos tumores de mama tem uma alteração em pelo menos um membro da família de proteínas SR, levando a fenótipos carcinogênicos como proliferação celular e invasão

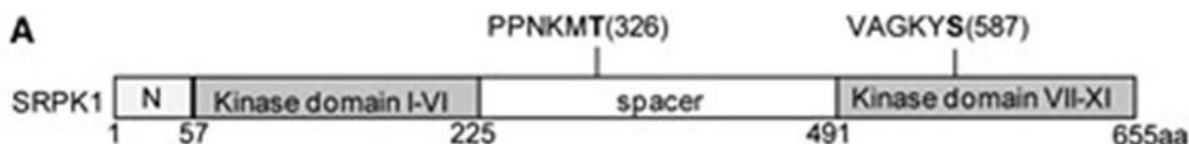


2.4 SRPK1 e seu papel no câncer

SRPK1 é um membro pertencente à família de serina-treonina quinases. Essa proteína contém dois domínios de quinase bifurcados por uma região espaçadora (Figura 9), sendo um domínio N-terminal contendo o sítio ativo ligado a um domínio C-terminal, que forma uma ranhura de encaixe que reconhece domínios RS ricos em repetições de dipeptídeos

serina-arginina. Destaca-se que, na lista de proteínas contendo esses domínios, as proteínas SR prevalecem (GIANNAKOUIROS *et al.*, 2011; GHOSH; ADAMS, 2011; KOUTROUMANI *et al.* 2017; TUNNICLIFFE *et al.*, 2019).

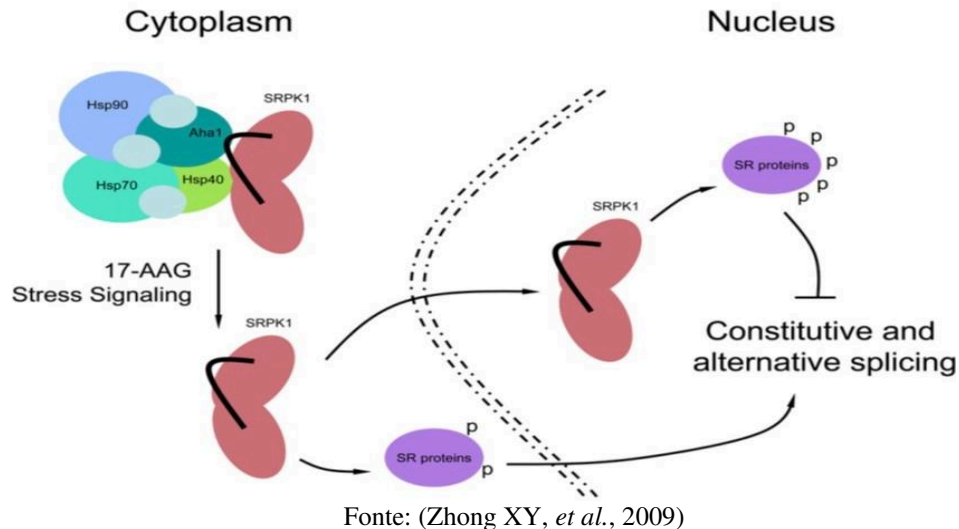
Figura 9 – Esquema estrutural de SRPK1. SRPK1 é uma serina-arginina proteína quinase composta por dois domínios de quinase bifurcados por uma região espaçadora.



Fonte: (ZHOU *et al.* 2012).

Sabe-se que SRPK1 atua regulando a atividade de proteínas SR através da fosforilação das mesmas no citoplasma e no núcleo celular. Isso está relacionado com a regulação do *splicing* alternativo, já que as SRs fosforiladas estão implicadas nesse evento (Figura 10). De certo, a fosforilação de SRs altera sua atividade e implica no tráfego dessas proteínas do citoplasma para o núcleo celular, onde então são novamente fosforiladas para assim atuarem em processos regulatórios de *splicing* alternativo. Por exemplo, uma vez que SRPK1 fosforila SRs no núcleo celular, estas entram em atividade e podem atuar modulando a montagem do *spliceossomo* em diferentes sítios de *splicing* em um pre-mRNA. Cabe salientar também que a ligação de SRs fosforiladas a intensificadores de *splicing* exônicos (ESEs) acarreta no reconhecimento e retenção de éxons em mRNAs. Esse ciclo implica em reter éxons de variadas maneiras (*splicing* alternativo), gerando assim uma diversidade de isoformas de mRNAs maduros através de um mesmo pre-mRNA (ABOU-OUF *et al.*, 2020; HAN *et al.*, 2011; LONG; CÁCERES, 2009; TUNNICLIFFE *et al.*, 2019).

Figura 10 - Fosforilação de proteínas SR por SRPK1. SRPK1 atua regulando a atividade de proteínas SR através da fosforilação das mesmas, acarretando no tráfego de proteínas SR do citoplasma para o núcleo celular, onde então são novamente fosforiladas por SRPK1 e, dessa forma, poderão atuar em processos regulatórios de *splicing* alternativo.



O papel principal desempenhado por SRPKs, incluindo SRPK1, no *splicing* alternativo de mRNA é particularmente aparente em estudos sobre condições patológicas, como infecção viral e desenvolvimento tumoral (GIANNAKOUROS *et al.*, 2011, HAYES; CARRIGAN; MILLER, 2007; MOLE *et al.*, 2020).

Suportando o parágrafo anterior, as desregulações em eventos de *splicing* alternativo associadas a alterações de SRPK1 e ao favorecimento de cânceres já foram mostradas em leucemia (TZELEPIS *et al.*, 2018), câncer de próstata (MAVROU; OLTEAN, 2016), melanoma (GAMMONS *et al.*, 2014), câncer colorretal (GONÇALVES *et al.*, 2020) além de câncer mama (WANG *et al.* 2020).

A expressão elevada de SRPK1 e sua desregulação foi encontrada variados tipos de cânceres. Essa proteína está elevada em câncer de pulmão e isso foi associado ao crescimento celular e tumorigênese (GONG *et al.*, 2016). No mesmo sentido, em câncer de estômago e fígado, o aumento de SRPK1 se relacionou com o aumento da proliferação celular (LI, Y. *et al.*, 2019; ZHOU *et al.*, 2013). Em leucemia, a desregulação dessa quinase foi relacionada a proliferação celular, resistência a apoptose e crescimento tumoral (TZELEPIS *et al.*, 2018).

Destaca-se que SRPK1 tem um papel expressivo em processos oncológicos no câncer de mama, onde se destaca a resistência a agentes anticâncer. A título de exemplo, SRPK1 é anormalmente expressa em células de cancro mamário e tem sua atividade aumentada, isto está significativamente associado a um mau prognóstico da doença, já que a expressão elevada dessa quinase e o aumento de sua ação favorecem a geração de isoformas de mRNAs

advinda de *splicing* alternativo desregulado, como MCL-1L e Bcl-xL, acarretando na produção de proteínas anti-apoptóticas, o que beneficia a fuga da morte celular por apoptose, onde este evento está implicado em resistência ao tratamento quimioterápico (LIN *et al.*, 2014; YI *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2020).

SRPK1 tem relação com diversos fenótipos metastáticos. A metástase é um processo de múltiplos passos, onde a disseminação de células tumorais e colonização de novos sítios envolve a infiltração ou invasão local de células tumorais no tecido primário, migração para os vasos sanguíneo e linfático, sobrevivência no sistema circulatório, extravasamento para um novo tecido secundário e, por fim, proliferação e crescimento levando à colonização metastática (GUI; BIVONA, 2022; HAPACH *et al.* 2019; van ZIJL; KRUPITZA; MIKULITS, 2011; van ROOSMALEN *et al.*, 2015).

Nessa ideia, a elevada expressão de SRPK1 no câncer gástrico foi associada ao aumento da invasão de células tumorais. No mesmo sentido, em câncer de próstata, o aumento da expressão dessa proteína foi relacionado a invasão e estágio avançado da doença (BULLOCK *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2017).

No carcinoma basocelular, um dos tipos mais comuns de câncer de pele humano, foi demonstrado que a superexpressão de SRPK1 promoveu migração de células cancerosas (LI, Z.R. *et al.*, 2019). Em câncer colorretal humano, SRPK1 também tem impacto na migração celular, já que está relacionada com a capacidade migratória neste câncer (YI *et al.*, 2018).

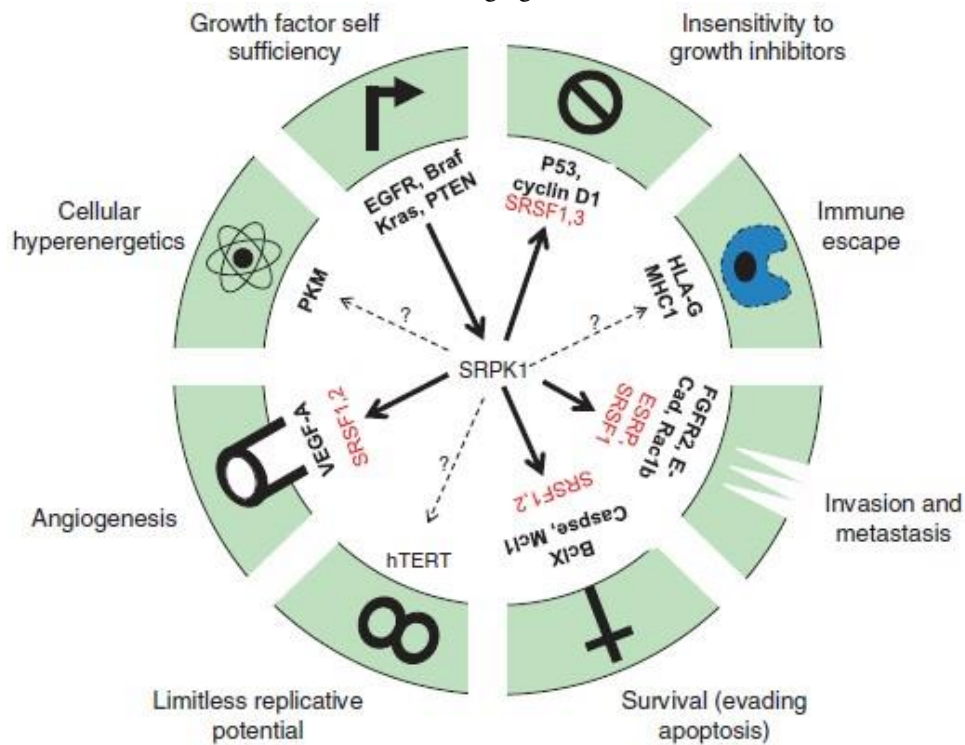
Foi demonstrado o efeito de SRPK1 em adenocarcinoma de cólon, onde teve correlação significativa com capacidade aumentada de formação de colônias e proliferação celular. Na mesma via, essa quinase tem associação com a formação clonogênica de células de câncer gástrico (LI, Y. *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2021).

No contexto do câncer de mama, a expressão elevada de SRPK1 bem como sua atividade desregulada estão associados à progressão metastática. Em destaque, o aumento de SRPK1 em pacientes com câncer de mama tem relação com metástases preferenciais para os pulmões e cérebro, migração celular, agressividade, progressão e grau tumoral, além de resistência à terapia anticâncer e pior sobrevida livre de metástases (BULLOCK; OLTEAN, 2017; MALVI *et al.*, 2020; van ROOSMALEN *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2020).

Em face do exposto, o acúmulo de evidências sugere que a desregulação de SRPK1 está implicada na carcinogênese através da perturbação do *splicing* alternativo, o que resulta em alterações fenotípicas pro-câncer (figura 11), onde esse evento é documentado como um mecanismo-chave que está relacionado ao favorecimento do desenvolvimento de vários cânceres, além de ter implicação em resistência a terapias e metástases, destacando essa

quinase como um potencial alvo terapêutico para o tratamento do câncer (BULLOCK; OLTEAN, 2017; NIKAS *et al.*, 2020).

Figura 11 - SRPK1 e oncogênese. A expressão/atividade desregulada de SRPK1 está diretamente implicada em desregulação de *splicing* alternativo em células tumorais, isto está relacionado a carcinogênese via produção de proteínas com atividades biológicas pró-tumora levando a fenótipos cancerosos como evasão da apoptose, invasão e metástases, crescimento celular e angiogênese.



Fonte: (OLTEAN; BATES, 2014)

2.5 Inibição farmacológica de SRPKs como alternativa no tratamento do câncer

As proteínas-quinases são uma família de enzimas amplamente estudadas como alvos terapêuticos no desenvolvimento de novos fármacos, sendo de grande importância no que diz respeito a biologia do câncer, evidenciando a importância das SRPKs (KURIMCHAK *et al.*, 2020).

Um efeito muito estudado de SRPKs na mudança de padrão de *splicing* alternativo diz respeito a angiogênese. Esse processo modificado é importante para o crescimento e metástase de tumores primários. Um importante regulador da angiogênese é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que pode ser pró ou antiangiogênico. SRPK1 mostrou regular positivamente a expressão de VEGF pró-angiogênico em melanoma, um tipo agressivo de câncer de pele através de modificação de *splicing* alternativo. Em contraste, a inibição de SRPKs por SRPIN340 demonstrou uma redução significativa no VEGF pró-

angiogênico, e, também, um aumento significativo em VEGF antiangiogênico. Esses efeitos também foram vistos em um modelo *in vivo* de melanoma, onde adicionalmente houve redução do crescimento tumoral. Resultados semelhantes em redução do tamanho tumoral e aumento de VEGF antiangiogênico foram também observados em um modelo de câncer de próstata tratado com um fármaco inibidor de SRPK1 chamado SPHINX (GAMMONS *et al.*, 2014; MAVROU *et al.*, 2015).

Em leucemia, SRPK1 atua a favor da proliferação e sobrevivência celular. Em outra via, a inibição dessa enzima leva a eventos opostos. Um estudo utilizando outro inibidor farmacológico de SRPKs denominado SPHINX31 reduziu o crescimento de linhagens de células de leucemia mieloide aguda, isso foi associado à parada do ciclo celular. Além disso, um outro composto capaz de inibir SRPK1, cuja denominação é C02, desencadeou a morte por apoptose em células Jurkat – uma linhagem celular leucêmica (CHANDRA *et al.*, 2020). No mesmo sentido, o tratamento de células de leucemia linfóide e mieloide com SRPIN340 trouxe redução da viabilidade celular além de apoptose tardia e precoce (NIKAS *et al.* 2019; SIQUEIRA *et al.*, 2015; TZELEPIS *et al.*, 2018).

SRPK1 tem associação íntima com diversos fenótipos cancerígenos em câncer de mama, como resistência à terapia anticâncer, resistência à apoptose, migração celular, metástases e características clínicas desfavoráveis. A expressão mais alta, além da maior atividade dessa quinase, acarreta na resistência de células de câncer de mama a compostos quimioterápicos; em sentido inverso o tratamento com SRPIN340 é capaz de ressensibilizar a resposta ao tratamento com o quimioterápico cisplatina (WANG *et al.*, 2020).

Essa proteína também está associada a modulação da resistência a morte celular por apoptose em células de câncer de mama. De fato, foi demonstrado que a depleção e inibição de SRPK1 exerceram um efeito substancial na indução de apoptose em células MCF-7, uma linhagem celular de carcinoma mamário agressiva. Além do mais, a inibição da quinase também resulta em aumento da morte celular após o tratamento com os agentes quimioterápicos gencitabina e cisplatina em células tumorais mamárias (HAYES; CARRIGAN; MILLER, 2007; LIN *et al.*, 2014).

Já foi relatado que SRPK1 é essencial para fenótipos metastáticos em células de carcinoma mamário. Por exemplo, essa proteína está associada à migração de células de câncer de mama. Em sentido inverso, o silenciamento de SRPK1 teve como desfecho a diminuição do fenótipo migratório. Ademais, o tratamento de células de câncer de mama com SRPIN340 (um inibidor de SRPKs) reduziu o potencial metastático das mesmas, acarretando

em redução da capacidade invasiva. (KOEDOOT *et al.*, 2019; MALVI *et al.*, 2020; van ROOSMALEN *et al.*, 2015).

Sustentando o parágrafo anterior, os níveis elevados de SRPK1 causam a disseminação tumoral para diferentes órgãos a partir do tumor primário em um modelo experimental de metástase de câncer de mama. A valer, SRPK1 está associada a metástases pulmonares e cerebrais. O esgotamento de SRPK1 em uma linhagem celular de carcinoma mamário metastático murino (4T1) foi capaz de erradicar quase completamente o potencial de metástases dessas células em colonizar os pulmões (van ROOSMALEN *et al.*, 2015). Além disso, a inibição farmacológica da quinase LIMK2 teve como desfecho o bloqueio da progressão metastática em um modelo *in vivo* de carcinoma mamário, via bloqueio da fosforilação e atividade de SRPK1 (MALVI *et al.*, 2020).

As relações entre a expressão de SRPK1 e características clínicas em carcinoma mamário já foram demonstradas. Os níveis dessa quinase estão elevados em tecidos de pacientes de câncer de mama quando comparados com tecidos mamários normais bem como tecidos normais adjacentes. Esse aumento de expressão foi significativamente correlacionado com maior grau tumoral e mau prognóstico, alto grau de estágio clínico (IV), além de menor tempo de sobrevida. Em contraste, a redução de SRPK1 leva a um maior tempo de sobrevida. (LI *et al.*, 2014)

Tomados em conjunto, o papel de SRPK1 no desenvolvimento de cânceres é relevante, tornando essa proteína-quinase um alvo terapêutico. Entretanto, ainda que a inibição farmacológica de alguns inibidores da maquinaria de *splicing* para a terapêutica do câncer seja promissora, a baixa capacidade farmacológica de SRPIN340, um inibidor de SRPKs, já foi observada. As classes existentes de inibidores de SRPKs apresentam baixa potência, portanto, é oportuno encontrar inibidores mais eficientes (BATSON *et al.*, 2017; CHANDRA *et al.*, 2020; DA SILVA *et al.*, 2015).

Nesse raciocínio, visando uma maior inibição de SRPKs, esforços vêm sendo feitos no desenvolvimento de compostos, como as trifluorometil arilamidas – que são análogos ao SRPIN340. Essas já apresentaram efeitos expressivos anticâncer via inibição de SRPKs em linhagens de células de leucemia e melanoma *in vitro*, além de terem apresentado efeitos antimetastáticos e anticancerígenos *in vivo* em modelos experimentais de melanoma (VALE *et al.*, 2020; MOREIRA *et al.*, 2018; SIQUEIRA *et al.*, 2017). Assim, tendo em vista o papel das SRPKs em câncer de mama, em especial a SRPK1, serão abordados neste trabalho os efeitos de novos compostos derivados do inibidor de SRPKs SRPIN340.

2.6 Modelo 4T1 e relevância pré-clínica

O câncer de mama é globalmente o mais incidente (SUNG *et al.*, 2021). Nesse contexto, diversos tratamentos potenciais para essa malignidade, como os tratamentos combinados, vêm tomando relevantes proporções devido às possibilidades de prolongamento da sobrevivência de pacientes (FISUSI; AKALA, 2019).

No cenário da busca por tratamentos promissores contra o câncer, os estudos pré-clínicos em modelos experimentais se destacam, constituindo a base dos estágios iniciais para o desenvolvimento e triagem de potenciais drogas com propriedades anticancerígenas. A título de exemplo, os modelos experimentais murinos podem ser bons preditivos de respostas a drogas anticâncer bem como de resistências que são observadas na clínica (HERTER-SPRIE; KUNG; WONG, 2013; PAN *et al.*, 2020).

Contudo, há incertezas na tradução dos resultados de modelos de camundongos para prever desfechos no tratamento clínico. No entanto, essas contradições podem ser superadas com o uso de modelos experimentais que melhor retratem a biologia da doença, elevando dessa maneira o valor preditivo dos ensaios pré-clínicos (HERTER-SPRIE; KUNG; WONG, 2013).

Nesse sentido, o modelo 4T1 de câncer de mama metastático é um modelo relevante que possui diversas características biológicas que os tornam um modelo animal experimental adequado para câncer de mama humano. Em destaque, as células 4T1 de câncer de mama murino são inoculadas na glândula mamária a fim de que o tumor primário cresça no local anatomicamente correto, além disto, assim como no câncer de mama humano, a doença metastática de 4T1 se desenvolve de maneira espontânea a partir do tumor primário, tendo disseminação progressiva de metástases para os linfonodos, pulmão, fígado, cérebro e ossos (PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2001).

Cabe destacar também que as células 4T1 se assemelham em nível transcricional ao câncer de mama humano triplo-negativo, um câncer altamente metastático e maligno que possui falta de terapias direcionadas (IRVIN JR; CAREY, 2008; SCHRÖRS *et al.*, 2020). De fato, as células 4T1 quando comparadas às de câncer de mama triplo-negativo humano, possuem uma relevante semelhança em nível de genes diferencialmente expressos, como a alta expressão de genes associados a metástases, bem como de genes relacionados à proliferação e sobrevivência celular (SCHRÖRS *et al.*, 2020).

Dada a relevância do modelo experimental 4T1 para futuras investigações envolvendo potenciais tratamentos anticâncer, este estudo testará a padronização de um modelo experimental de câncer de mama metastático a partir de diferentes densidades celulares 4T1.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar os possíveis efeitos da inibição farmacológica de SRPKs, em especial SRPK1, em células de câncer de mama no contexto antimetastático *in vitro* e estabelecer o modelo murino 4T1 de câncer de mama metastático.

3.2 Objetivos específicos

1. Realizar a triagem citotóxica dos compostos SRPIN340 e derivados MRs em diferentes linhagens de células tumorais;
2. Determinar valor da metade da concentração inibitória máxima (IC50) dos compostos MRs em células tumorais mamárias e não tumorais através do ensaio de MTT;
3. Avaliar o efeito do composto MR48 na migração celular de células tumorais mamárias;
4. Avaliar o efeito do composto MR48 na formação de colônias celulares em células tumorais mamárias;
5. Verificar o efeito do composto MR48 na localização subcelular de SRPK1 em células tumorais mamárias;
6. Estabelecer o modelo murino 4T1 de câncer de mama metastático através da inoculação diferentes densidades de células.

4 METODOLOGIA

4.1 Metodologia *IN VITRO*

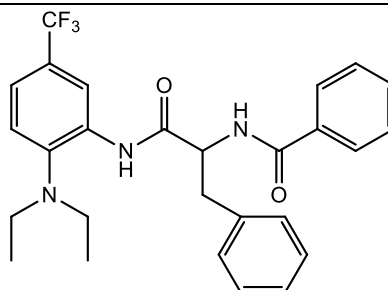
4.1.1 Compostos

Na tabela abaixo é apresentada a série de vinte e dois compostos MR inspirados no SRPIN340. Essa série foi cedida pelo Professor Dr. Robson Ricardo Teixeira, do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

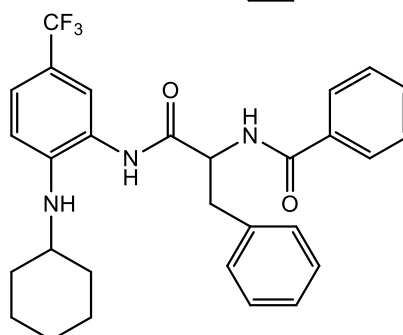
Tabela 1 - Série de 22 compostos MR inspirados no SRPIN340.

Código	Estrutura
MR-05	
MR-08	
MR-10	
MR-15	

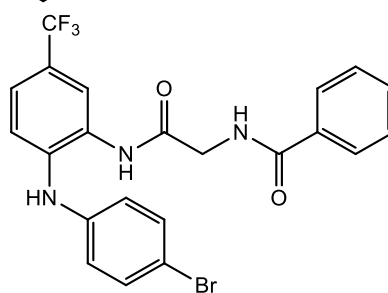
MR-19



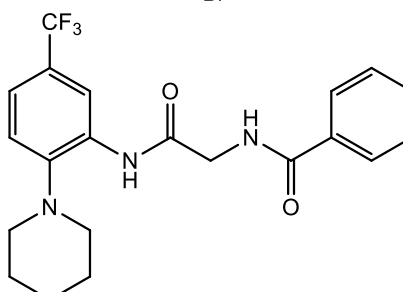
MR-22



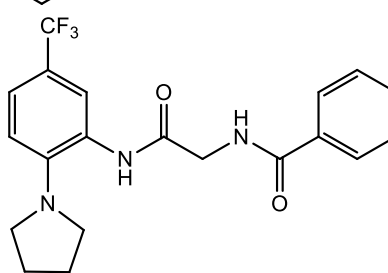
MR-24



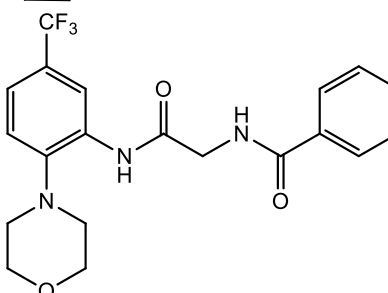
MR-25



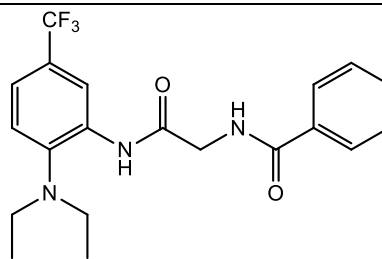
MR-26



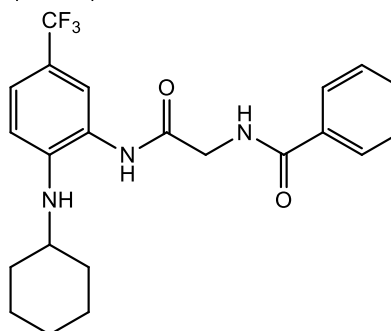
MR-28



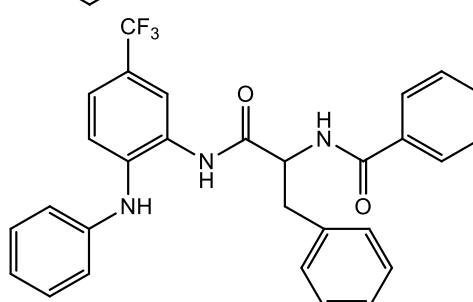
MR-29



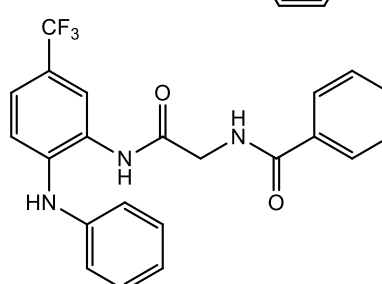
MR-30



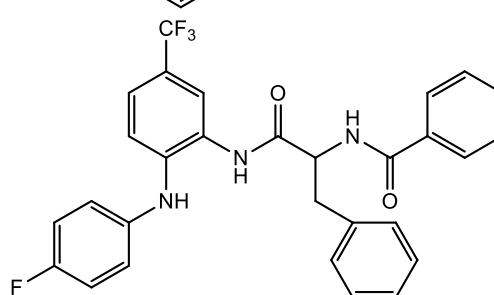
MR-35



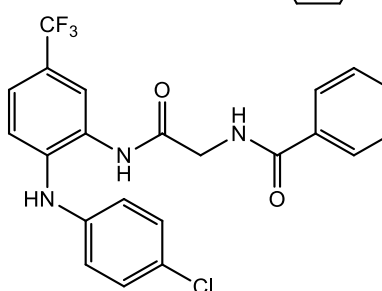
MR-38



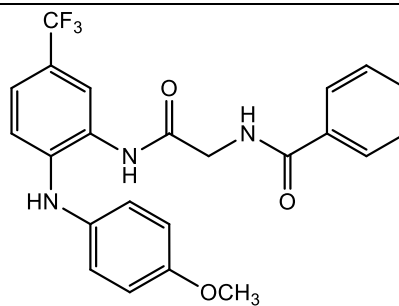
MR-42



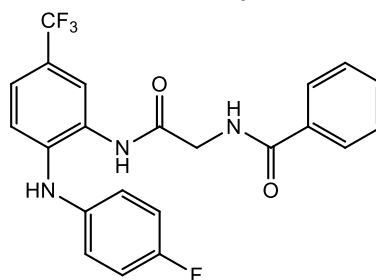
MR-45



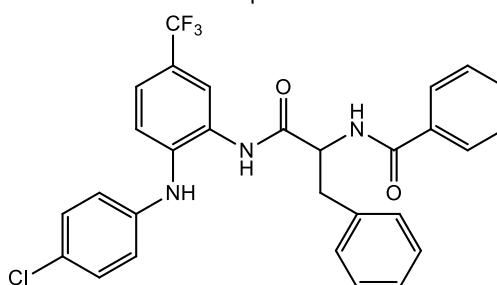
MR-46



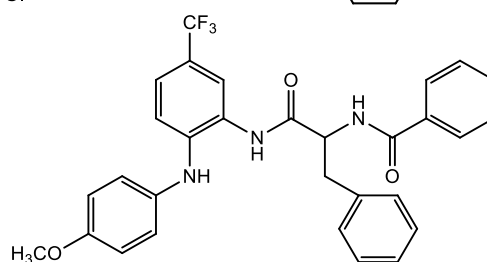
MR-48



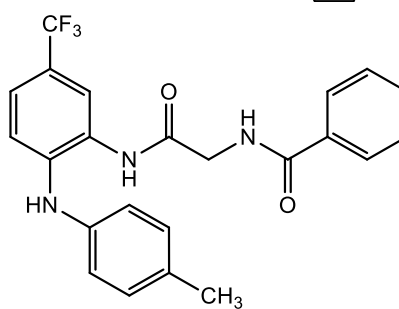
MR-49



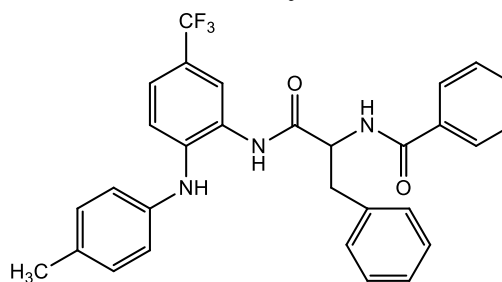
MR-50



MR-51



MR-52



4.1.2 Cultivo celular

As linhagens celulares utilizadas neste trabalho foram: 4T1 (carcinoma mamário metastático murino) HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), HeLa (carcinoma cervical humano) e VERO (rim de macaco verde). A linhagem celular 4T1 foi gentilmente doada pela professora Vanessa Carla Furtado Mosqueira, da Escola de Farmácia – Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Para o cultivo utilizou-se meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute Medium*, Sigma), pH 7,2, suplementado com 100 U/mL de penicilina (Sigma), 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma) e 10% V/V de soro fetal bovino (SFB, GIBCO). As células foram crescidas utilizando garrafas de 25, 75 e 182 cm², mantidas em atmosfera com 95% de umidade, a 37°C e 5% de CO₂.

4.1.3 Triagem citotóxica dos compostos pelo método do MTT

Para a triagem da atividade citotóxica dos compostos, as células foram contadas em câmaras de Neubauer, ressuspensas em meio RPMI 1640 (10% V/V SFB, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) e incubadas em placa de 96 poços de fundo chato, na densidade de 1×10^4 células/poço para linhagem 4T1, HeLa e HepG2 por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂ para adaptação e adesão das células. Os compostos foram avaliados na concentração de 100 µM ($\mu\text{mol L}^{-1}$) por 48 horas de incubação a 37°C e 5% de CO₂. Como controle negativo foi utilizado o composto SRPIN340. Para verificação do efeito citotóxico, foi adicionado a cada poço 10 µL do reagente MTT (brometo de 3-(4,5 dimetiliazol-2-il)-2,5 difenil tetrazólio, Sigma) na concentração 5 mg/mL e incubou-se novamente a placa a 37°C por 3 horas. Posteriormente, o sobrenadante foi removido, o formazan foi ressuspensado em 100 µL de DMSO e a placa foi incubada por 10 minutos a 37°C e 5% de CO₂, então a leitura de absorbância no comprimento de onda de 540 nm foi realizada em leitora automática de microplacas (*Biotek Sinergy HT*). Para os cálculos da viabilidade e preparo dos gráficos utilizou-se os programas *Microsoft Excel* e *GraphPad Prism*.

4.1.4 Determinação do IC₅₀ dos compostos pelo método do MTT

Para a determinação do IC₅₀ dos compostos, as células foram contadas em câmaras de Neubauer, ressuspensas em meio RPMI 1640 (10% V/V SFB, 100 U/mL de penicilina e 100

$\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina) e incubadas em placa de 96 poços de fundo chato, na densidade de 1×10^4 células/poço para linhagem 4T1 e 3×10^4 células/poço para linhagem VERO, por 24 horas a 37°C e 5% de CO_2 para adaptação e adesão das células, onde então foram tratadas com concentrações aumentadas de 0-200 μM ($\mu\text{mol L}^{-1}$) dos compostos por 48 horas. Como veículo controle foi utilizado o solvente orgânico dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração 0,4% V/V.

Após 48 horas de tratamento foi adicionado a cada poço 10 μL do reagente MTT (brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazólio), *Sigma*) na concentração 5 mg/mL e incubou-se novamente a placa a 37°C por 3 horas. Posteriormente, o sobrenadante foi removido, o formazan foi ressuspensionado em 100 μL de DMSO e a placa foi incubada por 10 minutos a 37°C e 5% de CO_2 , após a leitura de absorbância no comprimento de onda de 540 nm foi realizada em leitora automática de microplacas (*Biotek Sinergy HT*). Os cálculos da metade da concentração inibitória máxima (IC50) foram realizados conforme previamente publicado (SIQUEIRA *et al.*, 2015) utilizando-se os programas *Microsoft Excel* e *GraphPad Prism*.

4.1.5 Ensaio de Migração Celular

O ensaio de fechamento do risco foi realizado para avaliar a capacidade do composto MR48 em inibir a migração celular. Células 4T1 foram incubadas em placas de 24 poços na concentração 1×10^5 células/poço por 24 horas em um volume total de 1 mL de meio de cultura/poço a 37°C e 5% de CO_2 para adaptação e adesão. Após esse período, as monocamadas de células foram riscadas usando uma ponta de pipeta estéril de 200 μL . Para isso, o meio de cultura foi removido e as células lavadas duas vezes com PBS para remover as células destacadas onde, então, foram riscadas fazendo-se um risco vertical na monocamada. Após o risco, as células foram tratadas com o composto MR48 nas concentrações de 5,75; 11,5 e 17,25 μM ($\mu\text{mol L}^{-1}$) por 24 horas diluídos em meio de cultura. O tratamento com veículo DMSO (0,4% v / v) foi usado como controle. As fotos dos riscos foram tiradas em foto microscópio EVOS fl (*Life Technologies*). As taxas de fechamento dos riscos foram calculadas quantitativamente como a diferença entre a largura do risco em 0 hora e 24 horas. As zonas riscadas não preenchidas foram quantificadas pelo programa *ImageJ*. Os resultados foram expressos como uma porcentagem da migração celular.

4.1.6 Ensaio de Formação de Colônias

A capacidade do composto MR48 para inibir a formação de colônias foi avaliada de acordo com o ensaio previamente descrito (CUI *et al.*, 2016) com adaptação. Células 4T1 foram semeadas em placas de 6 poços na densidade de 1×10^3 células /poço em um volume total de 2 mL de meio de cultura/poço. Então, foram incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂ para adaptação e adesão. Após o período de incubação, as células foram tratadas com o composto MR48 nas concentrações 5,75; 11,5 e 17,25 μM ($\mu\text{mol L}^{-1}$) por 24 horas. O tratamento com veículo DMSO (0,4% v/v) foi usado como controle. Decorrido o período de tratamento, o meio foi trocado e as células foram cultivadas por 9 dias. Após, as colônias formadas foram fixadas e coradas utilizando-se solução de azul de toluidina (0,5% v/v) e metanol (20% v/v) por 30 minutos, então foram finalmente contadas. A determinação do percentual de formação de colônias foi calculada comparando-se o número total de colônias nos poços controle e nos poços tratados.

4.1.7 Ensaio de Imunofluorescência

As células 4T1 foram semeadas na densidade de 4×10^4 por poço em placas de 24 poços contendo lamínulas em um volume total de 1 mL de meio de cultura e incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂ para adaptação e adesão. O regime de tratamento foi escolhido conforme descrito anteriormente (MOREIRA *et al.*, 2018), onde as células foram tratadas com MR48 na concentração de 100 μM ($\mu\text{mol L}^{-1}$) por 2 horas. As células tratadas com o veículo DMSO (0,4% v/v) e meio RPMI foram utilizadas como controle. Decorrido o período de tratamento, o meio foi removido dos poços e os mesmos foram lavados com PBS. Após, as lamínulas foram fixadas com 4% v/v de paraformaldeído por 20 minutos, lavadas com PBS e, em seguida, permeabilizadas e bloqueadas em 0,5% v/v de Triton X-100 e 3% de Albumina do Soro Bovino (BSA) por 1 hora. As células foram então incubadas com anticorpos primários anti-SRPK1 (BD Biosciences; 1:400) durante 2 horas. Então, as células foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG-Alexa Fluor 488 de camundongo (Invitrogen; 1:500) por 2 horas. O composto 4', 6-diamidino-2-fenilindole (DAPI, Invitrogen) foi usado como um contra corante nuclear. A fluorescência foi registrada usando um microscópio invertido de fluorescência (EVOS FL).

4.2 Metodologia *IN VIVO*

4.2.1 Animais e Comitê de Ética

Em um primeiro momento, camundongos BALB/c fêmeas (n = 22, 8 semanas), oriundos do Biotério Central da UFV, foram mantidos no Biotério de Experimentação de Immunovirologia Molecular de Departamento de Biologia Geral (UFV) alojados em gaiolas (30 cm x 20 cm x 13 cm) e em condições controladas de temperatura ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade relativa do ar (60-70%) e luminosidade (12 - 12h claro/escuro). Os animais receberam comida e água ad libitum. Em um segundo momento, camundongos BALB/c fêmeas (n = 30, 8 semanas), oriundos do Biotério Central da UFV, foram mantidos no Biotério de Experimentação do Laboratório de Virologia Animal, do Departamento de Medicina Veterinária (UFV), alojados em gaiolas (30 cm x 20 cm x 13 cm) e em condições controladas de temperatura ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade relativa do ar (60-70%) e luminosidade (12 - 12h claro/escuro). Os animais receberam comida e água ad libitum. Os procedimentos experimentais seguiram os critérios apresentados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, sendo o projeto submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFV (CEUA, número de protocolo 54/2021).

4.2.3 Grupos experimentais

Em um primeiro momento, para a formação de massa tumoral, os animais foram divididos aleatoriamente em grupos de acordo com a densidade celular, sendo grupo 2×10^4 (n = 8) 1×10^4 (n = 7) e controle (n = 7). Suspensões celulares nas densidades 2×10^4 e 1×10^4 foram preparadas em meio RPMI isento de soro de acordo com o protocolo descrito anteriormente (PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2001), sendo que dessas suspensões 50 μL foram inoculados na 4^a glândula mamária de 15 animais. Como controle, 50 μL meio RPMI isento de soro foram inoculados na 4^a glândula mamária de 7 animais.

Em um segundo momento, visando formar massa tumoral, os animais foram divididos aleatoriamente em grupos de acordo com a densidade celular, sendo grupo 4×10^5 (n = 8), 2×10^5 (n = 8), 1×10^5 (n=7) e controle (n = 7). Suspensões celulares nas densidades 4×10^5 , 2×10^5 , e 1×10^5 , foram preparadas em meio RPMI isento de soro de acordo com o protocolo descrito anteriormente (YANG; ZHANG; HUANG, 2012), sendo que dessas suspensões 100

μL foram inoculados na 4^a glândula mamária de 23 animais. Como controle, 100 μL meio RPMI isento de soro foram inoculados na 4^a glândula mamária de 7 animais.

4.2.4 Mensuração do volume tumoral e pesagem dos animais

Da data em que o a glândula mamária do animal apresentou nódulo tumoral palpável, o mesmo teve seu volume mensurado a cada três dias utilizando-se paquímetro, em um total de 30 dias. O volume tumoral foi calculado utilizando-se a fórmula Volume (V) = $0,52 \times D \times d^2$, onde D e d correspondem ao maior e menor diâmetro do tumor, respectivamente (FIGUEIREDO *et al.*, 2015). O peso corporal do animal também foi aferido a cada três dias em balança digital.

4.2.5 Eutanásia e determinação das massas relativas e absolutas dos órgãos

A eutanásia ocorreu no dia 30 após inóculo das células 4T1 nos animais. Os animais foram pesados e sedados utilizando cloridrato de xilazina (10 mg/kg/intraperitoneal) e anestesiados com cloridrato de quetamina em alta dose (150 mg/kg/intraperitoneal). Após, realizou-se o deslocamento cervical. Posteriormente, procedeu-se com a abertura da cavidade abdominal e os órgãos fígado, pulmão, baço foram removidos e pesados a fim de se obter suas massas absolutas e relativas. Para a determinação das massas relativas, utilizou-se a seguinte fórmula: Massa relativa (g/100g) = Massa do órgão (g) X 100/ Massa corporal final do animal (g) (VALE, 2017). Posteriormente, os órgãos foram imersos em solução de paraformaldeído 4% para futuras análises histológicas.

4.2.6 Análise estatística

Para as análises estatísticas, foram utilizados os programas *Microsoft Excel* (*Microsoft Office Software*), *GraphPad Prism* (*GraphPad Software Inc.*) e *ImageJ*. Os resultados *in vitro* apresentados aqui são média \pm desvio padrão de experimentos independentes repetidos duas vezes em triplicata (n = 6). Os resultados *in vivo* aqui apresentados são média \pm desvio padrão de n = 7 animais. A significância estatística foi avaliada por ANOVA de uma via seguida de testes *post hoc* de *Dunn's* ou *Dunnnett's* ou teste *t*. *, **, *** indicam p<0,05, p<0,01 e p<0,001 em relação aos controles.

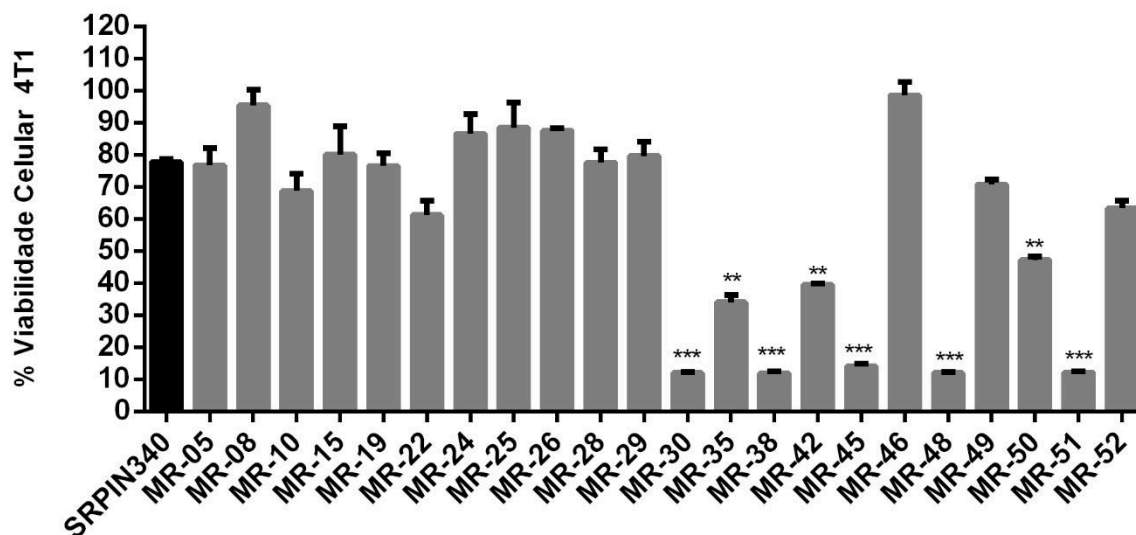
5 RESULTADOS

5.1 Triagem citotóxica dos compostos MRs contra células tumorais

A triagem citotóxica foi realizada contra células tumorais de carcinoma mamário metastático murino 4T1, carcinoma humano hepatocelular HepG2 e carcinoma cervical humano HeLa, todas com expressão de SRPK1 (AUBOL *et al.*, 2016; van ROOSMALEN *et al.*, 2015; WANG, Q; Wang, G.T.; LU, 2021), a fim de verificar se há diferenças de efeitos citotóxicos entre o inibidor de SRPKs SRPIN340 e os vinte e dois compostos análogos ao mesmo, denominados MR. Para isso, foi utilizado o método do MTT para verificar as diferenças de valores de viabilidade celular.

Os resultados indicaram que entre os vinte e dois compostos análogos, oito foram significativamente mais citotóxicos (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$), apresentando maior percentual de redução de viabilidade celular em células tumorais 4T1 quando comparados com SRPIN340 (Figura 12).

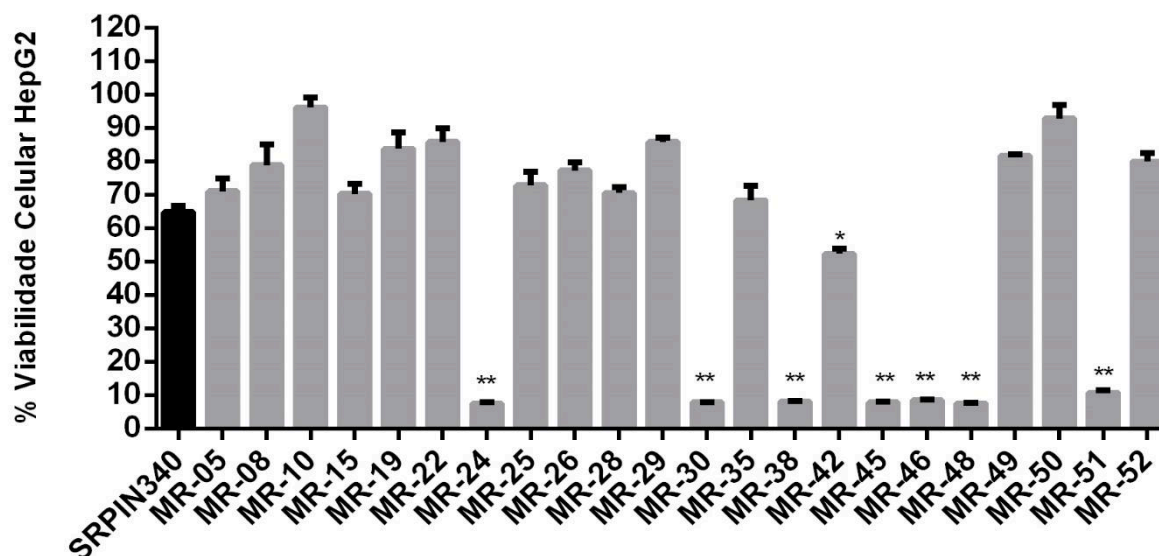
Figura 12 - Triagem citotóxica dos compostos MRs contra a linhagem células tumorais 4T1. As células foram expostas a 100 μM dos compostos por 48 h. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão por ANOVA e teste pos hoc de Dunnet's. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus SRPIN340.



Fonte: (Elaborada pelo autor.)

Para a linhagem celular tumoral HepG2 (figura 13), oito compostos foram significativamente mais citotóxicos (** $p < 0,01$) quando comparados com SRPIN340.

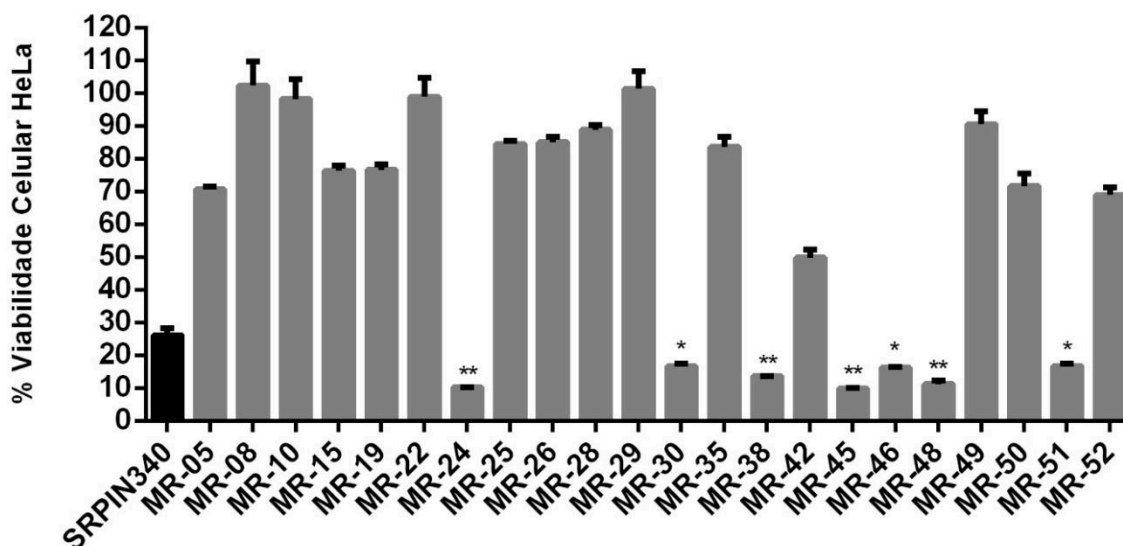
Figura 13 - Triagem citotóxica dos compostos MRs realizada contra a linhagem de células tumorais HepG2. As células foram expostas a 100 μ M dos compostos por 48 h. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão por ANOVA e teste post hoc de Dunnett's. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ versus SRPIN340.



Fonte: (Elaborada pelo autor.)

Contra as células tumorais HeLa (figura 14), sete compostos apresentaram significância citotóxica (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) quando comparados com SRPIN340.

Figura 14 - Triagem citotóxica dos compostos MRs realizada contra a linhagem de células tumorais HeLa. As células foram expostas a 100 μ M dos compostos por 48 h. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão por ANOVA e teste post hoc de Dunnett's. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ versus SRPIN340.



Fonte: (Elaborada pelo autor.)

Baseados nesses resultados, selecionamos os compostos MR que melhor apresentaram resultados citotóxicos para serem levados em ensaios posteriores a fim de estudar seus efeitos em células metastáticas mamárias.

5.2 Determinação da metade da concentração inibitória máxima (IC50) de MRs em células tumorais mamárias 4T1 e não tumorais e triagem citotóxica do MR48

Para a determinação da metade da concentração inibitória máxima (IC50) foram selecionados, além do composto inibidor de SRPKs SRPIN340, outros compostos MR análogos ao SRPIN340. A seleção desses compostos foi baseada em resultados anteriores de triagem citotóxica contra células tumorais 4T1 (figura 12), HepG2 (figura 13) e HeLa (figura 14), onde houve atividade citotóxica significativa dos compostos selecionados.

Neste ensaio, incluíram-se além de células tumorais metastáticas de câncer de mama 4T1, também células não tumorais VERO. As células foram tratadas em diferentes concentrações de cada composto (0-200 μ M) por 48 horas através do método do MTT. A tabela 1 abaixo apresenta os valores da metade da concentração inibitória máxima (IC50) para as células tumorais mamárias (4T1) e não tumorais (VERO).

De acordo com a tabela 1, foi observado que os seis compostos análogos ao SRPIN340 apresentaram capacidade moderada de inibir pela metade a viabilidade celular de células tumorais 4T1 de carcinoma mamário, mas ainda assim mostraram valores superiores aos de SRPIN340. Além disso, cinco análogos (MR-30; MR-38; MR-42; MR-45; MR-51) apresentaram uma maior capacidade em inibir pela metade a viabilidade celular de linhagem de células não tumorais VERO, quando comparados com células tumorais 4T1.

O composto MR48 apresentou maior capacidade de reduzir pela metade a viabilidade celular de células tumorais 4T1 (tabela 1, superior) e menor capacidade em células não tumorais VERO (tabela 1, inferior). Além disso, mostrou melhores resultados de inibição contra células tumorais 4T1 quando comparado com SRPIN340 (tabela 1, superior). Além do mais, a fim de ratificar os resultados obtidos pelo IC50, o composto MR48 foi selecionado para triagem citotóxica onde as células tumorais metastáticas 4T1 e não tumorais VERO foram expostas a concentração de 100 μ M do composto por 48 horas. Conforme figura 15 abaixo, o composto MR48 foi significativamente mais citotóxico para a linhagem 4T1 cancerígena em comparação com a linhagem VERO não cancerígena. A partir desses valores, esse composto foi selecionado para os demais ensaios fenotípicos do presente estudo.

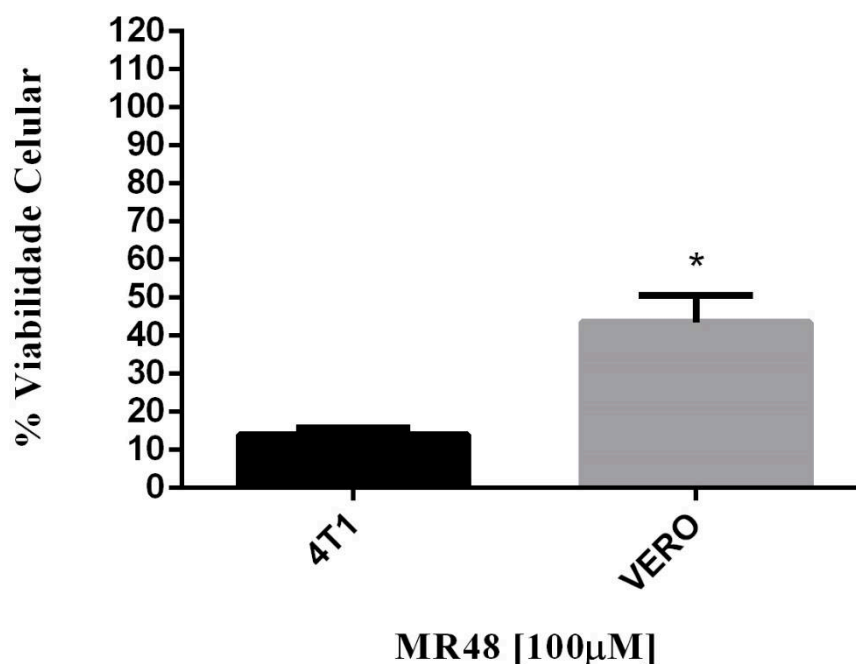
Tabela 2 - Valores da metade da concentração inibitória máxima (IC50) para os compostos MR. Células tumorais e não tumorais foram tratadas com concentrações crescentes (0-200µM) de cada composto por 48 h. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão.

Linhagem Celular	Composto	IC50 [µM]
4T1	MR30	25,75±3,0
	MR38	23,09±2,5
	MR42	10,49±2,9
	MR45	18,47±1,4
	MR48	23,12±3,3
	MR51	23,87±3,9
	SRPIN340	>100*
Linhagem Celular	Composto	IC50 [µM]
VERO	MR30	13,64±3,9
	MR38	10,45±5,2
	MR42	8,02±7,0
	MR45	16,19±1,9
	MR48	36,23±7,5
	MR51	16,73±2,7
	SRPIN340	>100*

* A baixa solubilidade do composto (SRPIN340) não permitiu a determinação do valor de IC50 acima de 100 µM.

Fonte: (Elaborada pelo autor.)

Figura 15 - Triagem citotóxica de MR48 contra células tumorais 4T1 e não tumorais VERO. As células foram expostas a concentração de 100 μ M do composto MR48 por 48 h. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão por teste t. * p <0,05 versus 4T1.



Fonte: (Elaborada pelo autor.)

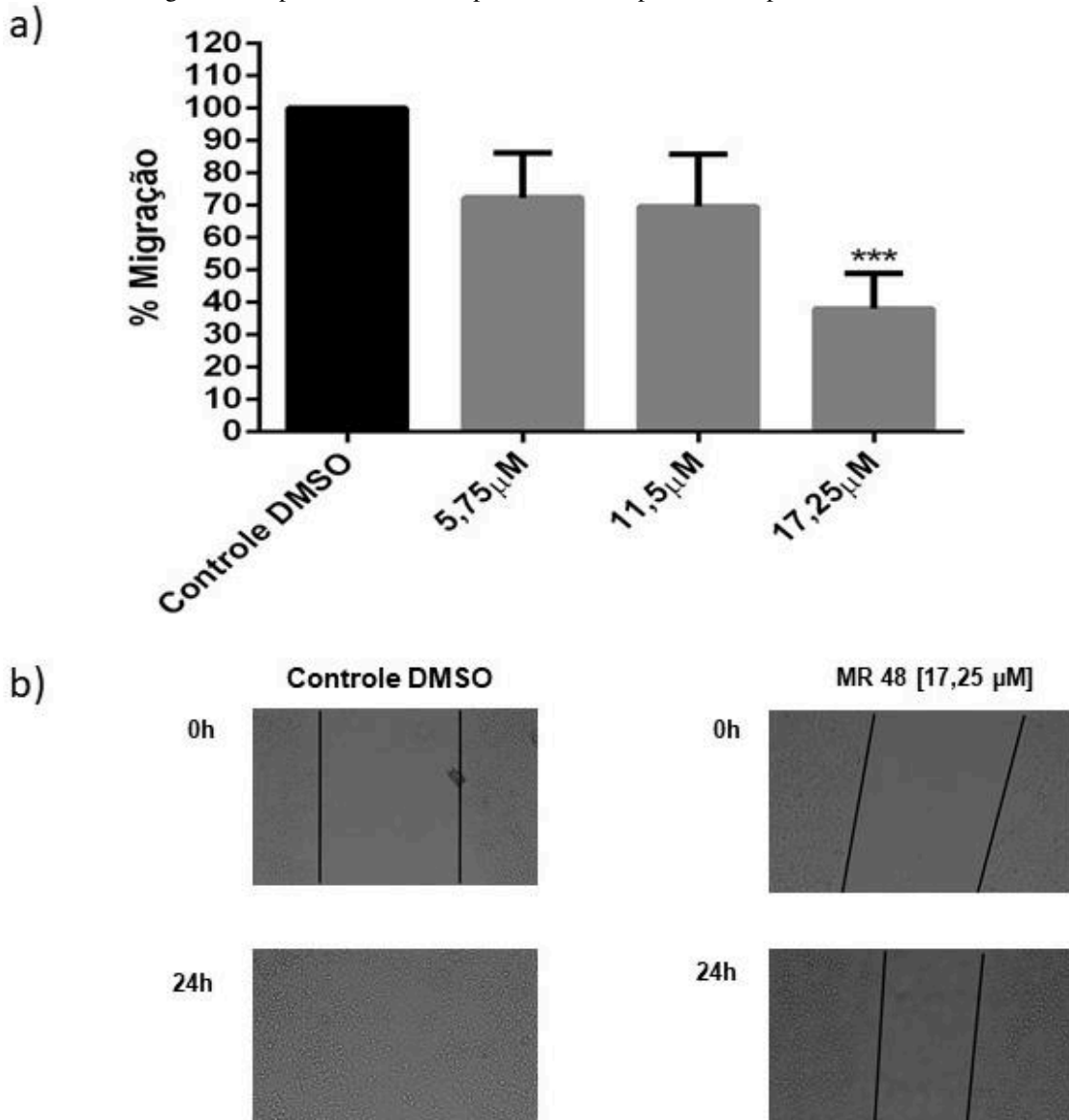
5.3 Efeito antimetastático *in vitro* do composto MR48

Considerando que SRPK1 está relacionado a fenótipos metastáticos em câncer de mama e que sua inibição farmacológica e/ou silenciamento se mostrou eficaz na supressão desses processos (MALVI *et al.*, 2020; van ROOSMALEN *et al.*, 2015), foi avaliado se MR48 poderia influenciar fenótipos de metástase em células 4T1, uma linhagem celular altamente tumorigênica e invasiva com alta expressão de SRPK1 (PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2001; van ROOSMALEN *et al.*, 2015).

Primeiramente, o ensaio de fechamento do risco foi realizado para avaliar se MR48 poderia suprimir a migração de células 4T1 de carcinoma mamário metastático. Para esse ensaio foram utilizados valores abaixo do valor de IC50 determinado, a fim de que o envolvimento da viabilidade celular e citotoxicidade não influenciassem no comportamento migratório das células. Para isso, as células foram tratadas nas concentrações de 5,75 μ M; 11,5 μ M e 17,25 μ M por 24 horas. Consoante a figura 16 abaixo, os resultados indicaram a concentração de 17,25 μ M de MR48 apresentou efeito antimigratório, suprimindo a migração de células de carcinoma mamário significativamente (** p <0,001) quando comparado a

células tratadas com veículo controle (DMSO). Sem diferenças significativas para nas demais concentrações.

Figura 16 - Efeito do composto MR48 no fechamento do risco de células de câncer de mama 4T1. a) O gráfico mostra a porcentagem de inibição de migração celular causada pelo composto. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão por ANOVA e teste *post hoc* de Dunn's. *** $p < 0,001$ versus controle DMSO. b) O composto afetou a migração de células de câncer de mama. As células 4T1 foram tratadas com MR48 (5,25; 11,5; 17,25 μ M) ou veículo DMSO. Para esse experimento, as concentrações abaixo do valor de IC50 foram escolhidas. As fotografias do ensaio do fechamento do risco foram tiradas no momento 0 h e 24 h após o tratamento. As imagens são representativas de experimentos independentes repetidos duas vezes.

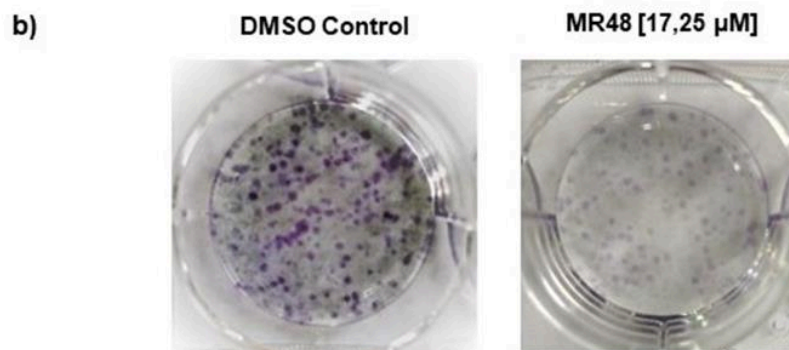
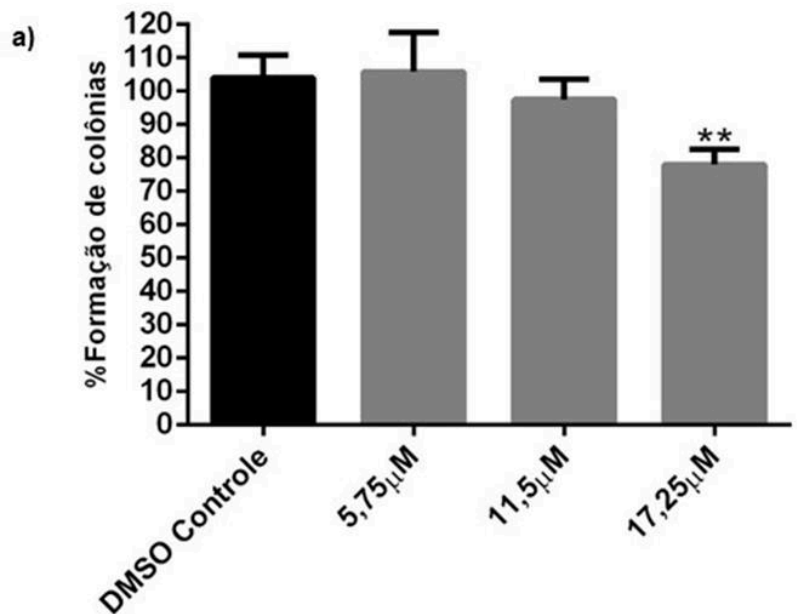


Realizou-se também o ensaio de formação de colônias. Esse ensaio permite avaliar a sobrevivência de células reprodutivas *in vitro*, onde uma única célula pode produzir progênie, ou seja, crescer em colônia (uma única célula capaz de formar uma colônia de 50 ou mais

células). O ensaio clonogênico é comumente utilizado para determinar os efeitos de agentes citotóxicos na capacidade de formação de colônias (BRIX *et al.*, 2020; RAFEHI *et al.*, 2011)

Nesse contexto, para avaliar se MR48 poderia reduzir a formação de colônias de células 4T1 de carcinoma mamário metastático, as células foram tratadas com concentrações abaixo do IC50 [5,75; 11,5 e 17,25 μM] do composto. Segundo a figura 17 abaixo, as células tratadas na concentração de 17,25 μM reduziram significativamente a formação de colônias (** $p < 0,01$) quando comparadas com células tratadas com veículo controle (DMSO). Sem diferenças significativas nas demais concentrações.

Figura 17 - Efeito do composto MR48 na formação de colônias de células de câncer de mama. a) O gráfico mostra os efeitos dos tratamentos com MR48 (5,75; 11,5; 17,25 μM) no percentual de formação de colônias de células tumorais 4T1 em comparação com células tumorais 4T1 em comparação com células tumorais tratadas com veículo DMSO. Para esse experimento as concentrações abaixo do valor de IC50 foram escolhidas. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão. ** $p < 0,01$ em relação ao controle DMSO por ANOVA e teste *post hoc* de *Dunn's*. b) as células 4T1 foram tratadas com MR48 (5,25; 11,5; 17,25 μM) ou veículo DMSO. O ensaio de formação de colônias foi realizado por coloração com azul de toluidina após 9 dias. As imagens mostradas são representativas de experimentos independentes repetidos duas vezes.



Fonte: (Elaborada pelo autor.)

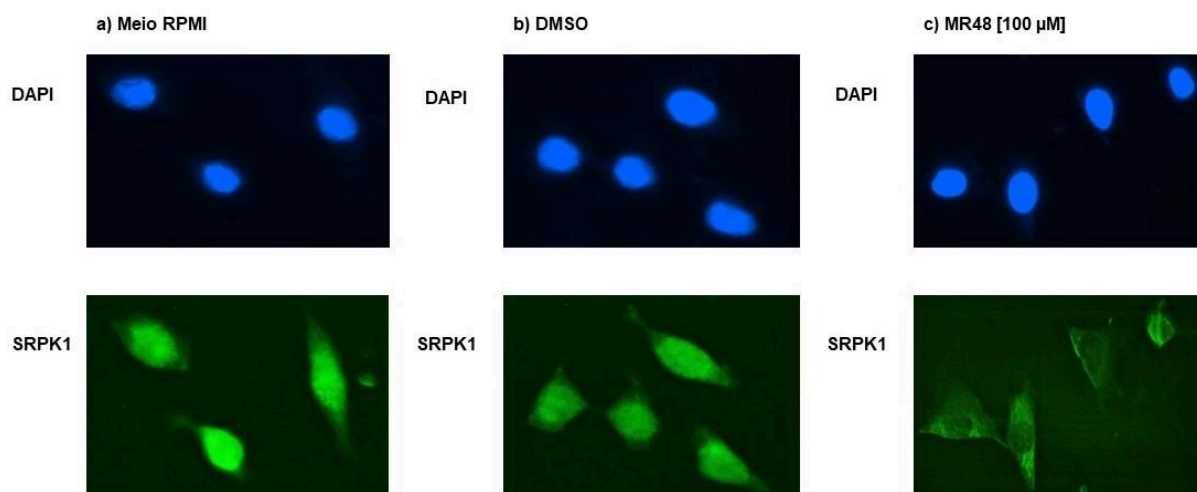
Em conjunto, os resultados mostram que o composto MR48, em concentração abaixo do valor de IC50, é capaz de atuar positivamente contra fenótipos metastáticos em células de câncer de mama metastático 4T1 *in vitro*.

5.4 Efeito do composto MR48 na localização subcelular de SRPK1

Relatos anteriores mostraram que compostos análogos ao SRPIN340 apresentaram efeitos supressores na atividade de SRPK em células de leucemia e melanoma (MOREIRA *et al.*, 2018; SIQUEIRA *et al.*, 2017). Além disso, SRPK1 está implicada em piores desfechos em câncer de mama, como redução da sobrevida, recorrência da doença, assim como diversos fenótipos pró-tumorais, incluindo metástases e resistência ao tratamento clínico (LI *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2020). Nesse raciocínio, com a finalidade de verificar se o análogo MR48 também poderia influenciar a atividade de SRPK1 em células de câncer de mama 4T1, realizou-se o ensaio de imunofluorescência.

De acordo com Zhou *et al.* (2012) a atividade de autofosforilação de SRPK1 leva a sua translocação nuclear. Assim, para verificar se o composto MR48 é capaz de afetar a atividade catalítica de SRPK1 intracelularmente, ensaios de localização celular foram realizados. Os resultados mostrados na figura 18 abaixo indicam que MR48 pode influenciar a atividade de SRPK1 em células 4T1 de câncer de mama, uma vez que houve maior predominância citoplasmática de SRPK1 em células tratadas com MR48 (figura 18, c, inferior) em comparação com células tratadas com veículo controle DMSO (figura 18, b, inferior) e sem tratamento – Meio RPMI (figura 18, a, inferior).

Figura 18 - Efeito do composto MR48 na localização subcelular de SRPK1. As células 4T1 de câncer de mama foram tratadas com 100 μ M do composto MR48 por 2 h. Meio RPMI e veículo DMSO foram usados como tratamentos controle. O regime de tratamento e a avaliação da localização subcelular de SRPK1 foi baseado em um trabalho anterior (MOREIRA *et al.*, 2018). A localização subcelular de SRPK1 (a, b, c) foi avaliada com anticorpos anti-SRPK1. DAPI foi usado como contra-corante nuclear e a fluorescência foi registrada usando um microscópio invertido de fluorescência (EVOS FL). As imagens são representativas de experimentos independentes repetidos duas vezes.



Fonte: (Elaborada pelo autor.)

5.5 Peso corporal e massas relativa e absoluta dos animais

A tabela 3 abaixo mostra as confrontações das massas absolutas (g) e relativas (g/100g) dos órgãos dos animais bem como o peso corporal (g) dos grupos controle, 1×10^4 e 2×10^4 . Não houve diferenças significativas entre as massas absolutas e relativas dos órgãos entre os animais dos grupos controle, 1×10^4 e 2×10^4 . Além disso, os animais não apresentaram redução de peso corporal ao longo do experimento.

Tabela 3 - Peso corporal (PC) inicial, PC final e massa absoluta e relativa dos órgãos camundongos BALB/c fêmeas inoculadas com densidades 104 de células 4T1.

	Controle	Grupo 2×10^4	Grupo 1×10^4
Peso Corporal Inicial (g)	$23 \pm 2,2$	$28,14 \pm 2,2$	$23 \pm 1,9$
Peso Corporal Final (g)	$25,8 \pm 1,9$	$30 \pm 1,8$	$26 \pm 2,3$
Pulmão (g)	$0,26 \pm 0,06$	$0,25 \pm 0,07$	$0,21 \pm 0,02$
Pulmão (g/100g)	$1,0 \pm 0,26$	$0,85 \pm 0,25$	$0,83 \pm 0,10$
Fígado (g)	$1,3 \pm 0,16$	$1,5 \pm 0,18$	$1,2 \pm 0,19$
Fígado (g/100g)	$5,2 \pm 0,63$	$5,13 \pm 0,61$	$4,8 \pm 0,76$
Baço (g)	$0,13 \pm 0,03$	$0,15 \pm 0,03$	$0,13 \pm 0,04$
Baço (g/100g)	$0,53 \pm 0,12$	$0,51 \pm 0,10$	$0,50 \pm 0,15$

*Valores expressos como média \pm desvio padrão. Sem diferença significativa entre os grupos por ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Dunnett.

Fonte: (Elaborada pelo autor.)

A tabela 4 abaixo ilustra as comparações entre as massas absolutas (g) e relativas (g/100g) dos órgãos dos animais bem como o peso corporal (g) entre os grupos controle, 1x10⁵, 2x10⁵ e 4x10⁵. Não houve diferenças significativas entre as massas absolutas e relativas dos órgãos comparando-se os animais dos grupos 4x10⁵ e 2x10⁵ com o grupo controle. Já o grupo 1x10⁵ apresentou diferenças significativas nas massas absolutas e relativas dos órgãos quando comparado com o controle.

Tabela 4 - Peso corporal (PC) inicial, PC final e massa absoluta e relativa dos órgãos camundongos BALB/c fêmeas inoculadas com densidades 10⁵ de células 4T1.

	Controle	Grupo 4x10⁵	Grupo 2x10⁵	Grupo 1x10⁵
Peso Corporal Inicial (g)	26,5 ± 2,0	25,4 ± 2,9	26,4 ± 1,3	26 ± 1,0
Peso Corporal Final (g)	29,2 ± 1,8	27,4 ± 1,7	28,2 ± 1,3	29,2 ± 0,9
Pulmão (g)	0,24 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,22 ± 0,03	0,19 ± 0,02*
Pulmão (g/100g)	0,84 ± 0,08	0,83 ± 0,09	0,79 ± 0,1	0,65 ± 0,08*
Fígado (g)	1,52 ± 0,09	1,34 ± 0,1	1,44 ± 0,2	1,20 ± 0,08*
Fígado (g/100g)	5,20 ± 0,3	4,89 ± 0,3	5,12 ± 0,77	4,41 ± 0,29*
Baço (g)	0,17 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,13 ± 0,02*
Baço (g/100g)	0,58 ± 0,05	0,53 ± 0,06	0,59 ± 0,07	0,44 ± 0,08*

Fonte: (Elaborada pelo autor.)

5.6 Tumores palpáveis, incidência, volume e rejeição tumoral

Na presente investigação, os animais inoculados com densidade celular 10⁴ não foram capazes de desencadear tumores palpáveis.

Em sentido contrário, para os animais inoculados com densidade celular 10⁵ houve desencadeamento de tumores palpáveis. Conforme a tabela 4 abaixo, a partir do dia 6 após o inóculo das células cancerígenas 4T1, houve em todos os grupos animais apresentando tumores palpáveis, sendo para o grupo 1x10⁵ (n=1), para o grupo 2x10⁵ (n=3) e grupo 4x10⁵ (n=3).

Tabela 5 - Número de animais apresentando tumores palpáveis e percentual de incidência tumoral em camundongos BALB/c fêmeas inoculadas com diferentes densidades de 10⁵ de células 4T1.

Dias Após Inoculo	Grupo 4x10 ⁵ (n=8)		Grupo 2x10 ⁵ (n=8)		Grupo 1x10 ⁵ (n=7)	
	Tumores palpáveis (n)	%Incidência Tumoral	Tumores palpáveis (n)	%Incidência Tumoral	Tumores palpáveis (n)	%Incidência Tumoral
0	n = 0/8	0	n = 0/8	0	n = 0/7	0
6	n = 3/8	37,50%	n = 3/8	37,50%	n = 1/7	14,20%
9	n = 5/8	62,50%	n = 4/8	50%	n = 2/7	28,50%
12	n = 5/8	62,50%	n = 3/8	37,50%	n = 1/7	14,20%
15	n = 4/8	50%	n = 3/8	37,50%	n = 1/7	14,20%
18	n = 1/8	12,50%	n = 0/8	0	n = 0/7	0
21	n = 0/8	0	n = 0/8	0	n = 0/7	0

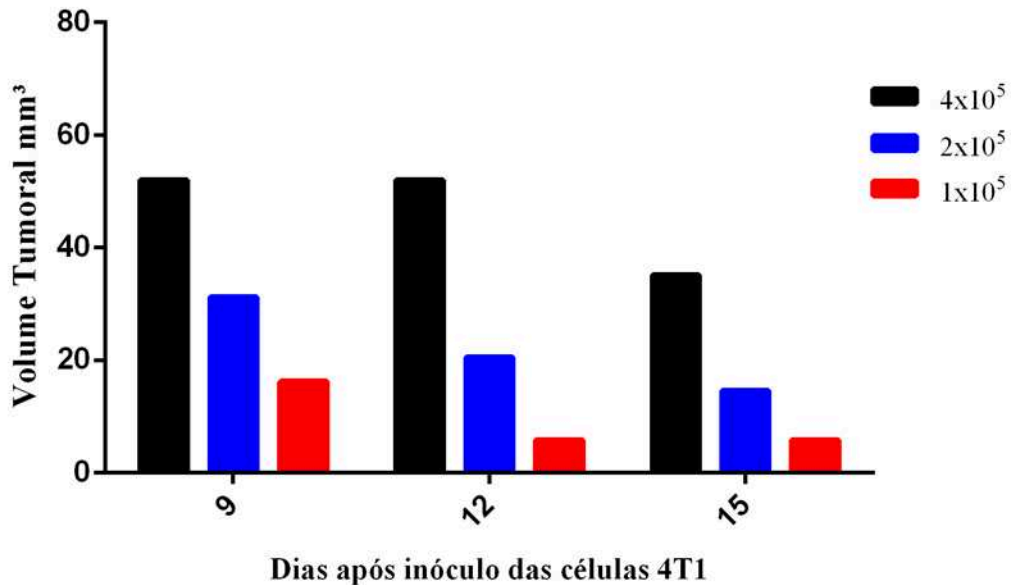
*n = número total de animais por grupo e número de animais apresentando tumores palpáveis por grupo

Fonte: (Elaborada pelo autor.)

No decorrer dos demais dias após o 6º dia de inoculo das células 4T1, os valores de percentual de incidência tumoral nos animais variaram. O grupo 4x10⁵ apresentou maiores resultados totais de incidência tumoral, seguido em ordem decrescente pelo grupo 2x10⁵ e 1x10⁵.

Com relação aos valores volume tumoral apresentado pelos animais, a figura 19 abaixo mostra que o grupo de maior densidade celular 4x10⁵ (n=2) tendeu a ter valor de volume superior quando comparado com os demais valores de volume dos animais do grupo 2x10⁵ (n=2) nos dias 9 a 15. No que se refere ao grupo 1x10⁵, a tendência de superioridade de volume tumoral foi analisada apenas no dia 9, uma vez que nos dias posteriores apenas 1 animal apresentou tumor palpável neste grupo (Tabela 5). Sobre isso, a tendência de superioridade para o grupo 4x10⁵ (n=2), no dia 9, se manteve em relação ao grupo 1x10⁵ (n=2). Além disso, o grupo 2x10⁵ (n=2) tendeu a ter maior volume tumoral em comparação com o grupo 1x10⁵ (n=2) no nono dia (figura 19).

Figura 19 - O gráfico abaixo mostra os volumes tumorais dos grupos de camundongos BALB/c fêmeas inoculadas com diferentes densidades celulares 10^5 de células 4T1.



Fonte: (Elaborada pelo autor.)

A respeito da rejeição tumoral, a partir do dia 9 foi dado início o evento para os grupos 1×10^5 e 2×10^5 , resultando em declínio do volume tumoral (figura 19), menor percentual de incidência tumoral e redução do número de animais (n) apresentando tumores palpáveis (tabela 4). A rejeição total tumoral para ambos os grupos ocorreu no dia 18 (tabela 5).

Em contrapartida, para o grupo de 4×10^5 , a rejeição tumoral teve início mais tardiamente, a partir do dia 12, apesar de que apresentou os mesmos eventos dos grupos anteriores de redução de volume tumoral (figura 19), além de diminuição no percentual de incidência tumoral bem como no número de animais (n) apresentando tumores palpáveis (tabela 4). A integral rejeição tumoral para esse grupo se deu no dia 21 (tabela 5).

Coletivamente, os dados mostram que houve uma maior tendência de surgimento de tumores palpáveis e aumentos de volume tumoral (tabela 5; figura 19), assim como de elevação de percentual de incidência tumoral (tabela 5), nos animais do grupo de densidade celular 4×10^5 . Porém, todos os animais que apresentaram tumores palpáveis nos diferentes grupos foram totalmente capazes de desencadear a rejeição tumoral completa (tabela 5).

6 DISCUSSÃO

Já está estabelecido o papel de SRPKs em metástase e gênese do câncer (NIKAS *et al.*, 2019; PATEL; SACHIDANANDAN; ADNAN, 2019). Há uma relação direta com desequilíbrios em *splicing* alternativo de pre-mRNA em variados tipos de câncer. Por consequência dessa desregulação, células tumorais são capazes de resistir a tratamentos anticancerígenos além de tornarem-se mais agressivas e assumirem fenótipos metastáticos. Portanto, SRPKs se mostram como alvos promissores no desenvolvimento de novas drogas para terapêutica do câncer (CHANG *et al.*, 2015; HUANG *et al.*, 2021). Nesse cenário, neste estudo foi avaliado o efeito citotóxico de vinte e dois compostos análogos ao inibidor de SRPKs SRPIN340 contra diferentes linhagens de células tumorais, além de efeitos antimetastáticos e anti-SRPK1 contra a linhagem de células agressivas 4T1 de câncer de mama metastático murino. Essa linhagem compartilha semelhanças transcricionais com células de câncer de mama humano triplo-negativo, que é um subtipo de carcinoma mamário metastático altamente maligno e que possui falta de terapias direcionadas (IRVIN JR; CAREY, 2008; SCHRÖRS *et al.*, 2020).

Na presente investigação, novas descobertas significativas foram encontradas. Isso inclui potencial citotóxico contra diferentes linhagens de células tumorais que expressam SRPK1, além de efeitos antimetastáticos e possivelmente inibitórios dessa proteína em células invasivas mamárias 4T1. Esses achados reforçam o maior potencial citotóxico de compostos análogos a SRPIN340 quando comparados ao mesmo, além de implicar a provável inibição de SRPK1 na redução de fenótipos de metástases (LIN *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2017), mostrando que esta quinase pode ser um candidato no tratamento do câncer. Os resultados são discutidos a seguir.

Ensaio *in vitro* são cruciais para avaliação pré-clínica de agentes com potenciais propriedades anticâncer (MIRZAYANS; ANDRAIS; MURRAY, 2018). Destaca-se, nesse contexto, o ensaio de medição da viabilidade celular, que é considerado padrão ouro para triagens citotóxicas de fármacos (ADAN; KIRAZ; BARAN, 2016; PINTOR *et al.*, 2020). Os resultados de triagem de citotoxicidade na presente investigação mostram que, dentre os vinte e dois compostos derivados do inibidor de SRPKs SRPIN340, oito apresentaram maior potencial citotóxico quando comparados ao próprio SRPIN340 contra células tumorais mamárias 4T1 (figura 12) e células de carcinoma hepatocelular humano HepG2 (figura 13), além disso, sete são substancialmente mais citotóxicos contra células de carcinoma cervical humano HeLa (figura 14).

Esses achados estão de acordo com os de outros estudos, onde compostos sintetizados inspirados no SRPIN340 também mostraram citotoxicidade significativa contra células de glioblastoma, melanoma e leucemia (MOREIRA *et al.*, 2018; SOUSA *et al.*, 2021; SIQUEIRA *et al.*, 2017). Essa maior citotoxicidade dos compostos análogos a SRPIN340 pode ter relação com a já relatada baixa potência de SRPIN340, conforme vista em estudos anteriores (GAMMONS *et al.*, 2014; SIQUEIRA *et al.*, 2020). Além disso, sugere-se que os compostos análogos podem ter uma maior ação inibitória de SRPK, já que esta transferase está envolvida na resistência citotóxica de células tumorais a terapias anticâncer através da evasão da apoptose celular, além de também contribuir com a viabilidade celular (DONG *et al.*, 2022; HUANG *et al.*, 2021; ODUNSI *et al.*, 2012). Assim sendo, propõe-se que alguns compostos derivados do inibidor de SRPKs SRPIN340 e que aqui foram denominados MR, eventualmente inibem SRPKs, acarretando na significativa toxicidade dos mesmos contra células tumorais.

A medida da metade da concentração inibitória máxima (IC50) é largamente utilizada por fornecer informações sobre a eficácia de um composto farmacológico, mostrando o quanto de composto é necessário para inibir um determinado processo biológico pela metade (AYKUL; MARTINEZ-HACKERT, 2016). Neste estudo, seis compostos MR análogos ao SRPIN340 que mostraram atividade citotóxica substancial contra diferentes linhagens de células tumorais (figura 12; figura 13; figura 14), além do próprio SRPIN340, tiveram a metade da concentração inibitória máxima (IC50) avaliada contra células tumorais metastáticas mamárias e não tumorais, a fim de determinar a dose de composto necessária para inibir pela metade a viabilidade celular, que é determinada como o número de células saudáveis em uma amostra (ADAN; KIRAZ; BARAN, 2016). Os resultados mostram que seis compostos análogos apresentaram maior eficácia em inibir pela metade a viabilidade celular de células de câncer de mama metastático mamário 4T1 quando comparados com SRPIN340 (Tabela 1, parte superior), necessitando de menores concentrações. No entanto, intrigantemente, dentre os seis compostos análogos, cinco apresentaram também alta eficácia em inibir pela metade a viabilidade celular de células não tumorais VERO (Tabela 1, parte inferior), se mostrando citotóxicos. Essa citotoxicidade contra células não tumorais pode estar relacionada com a especificidade desses compostos análogos, que têm possibilidade de não atuarem diretamente apenas na quinase-alvo, como também em locais fora do alvo, o que pode acarretar em respostas citotóxicas conforme já demonstrado em estudos anteriores abordando inibidores de quinase (BHULLAR *et al.*, 2018; DASANU *et al.* 2012; HASINOFF; PATEL, 2010; VASTA *et al.*, 2018).

De modo geral, embora os inibidores de quinase sejam projetados para serem direcionados seletivamente a quinases expressas de forma anormal em células cancerígenas, estudos já demonstraram que alguns inibidores são citotóxicos para células normais devido à atuação fora do alvo, que causa, por exemplo, toxicidade mitocondrial (ZHANG *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2018)

No âmbito do presente estudo, uma provável explicação sobre o processo citotóxico de alguns MR contra células não tumorais pode estar relacionada com o sítio de ligação de ATP presente em SRPK, onde grande parte dos inibidores desta quinase atuam reconhecendo (FUKUHARA *et al.*, 2006; CHANDRA *et al.*, 2020). A título de exemplo, SRPIN340 é um inibidor competitivo de ATP, entretanto há uma alta conservação e similaridade do sítio de ligação de ATP entre quinases e outras enzimas, isto torna desafiador o desenvolvimento de drogas que tenham como alvo seletivo apenas SRPK. Além disso, já foi demonstrado que inibidores de quinase direcionados ao sítio de ATP são capazes de apresentar reatividade cruzada não só entre diferentes quinases e enzimas, mas também com outras proteínas acessórias (BATSON *et al.*, 2017; CHANDRA *et al.*, 2020; VALSASINA; KALISZ; ISACCHI, 2004). Para mais, características estruturais dos compostos também devem ser levadas em consideração, uma vez que mudanças estruturais em compostos inibidores de quinase podem levar a atividades fora do alvo (ROSS-MACDONALD *et al.*, 2008). Certamente essas considerações sugeridas necessitam de estudos posteriores para maior clareza e aprofundamento, indo além do escopo da presente investigação.

Em contraste, destaca-se o composto análogo MR48 apresentou maior eficácia em inibir pela metade a viabilidade celular de células tumorais 4T1, e menor eficácia em células não tumorais VERO (Tabela 1, superior e inferior). Além de tudo, apresentou menor efeito citotóxico contra VERO e maior efeito contra 4T1 (figura 15). Essa menor citotoxicidade de compostos análogos ao SRPIN340 contra células não tumorais já foi demonstrada em estudos anteriores (SIQUEIRA *et al.*, 2017).

Assim sendo, os dados apontam que os novos compostos análogos ao inibidor de SRPKs SRPIN340 apresentam maior eficácia em reduzir pela metade a viabilidade celular de células tumorais 4T1 de câncer de mama quando comparados ao SRPIN340, mostrando, deste modo, melhor eficácia redutora. Contudo, são necessários estudos futuros para elucidar o motivo de alguns análogos terem mostrado também eficácia de redução de viabilidade celular em células não tumorais.

A metástase é um processo de múltiplas etapas, destacando entre estas a capacidade migratória de células cancerígenas. Essa habilidade exerce significativa influência na

disseminação e espalhamento de células tumorais para locais distantes do tumor primário (HUNTER; CRAWFORD; ALSARRAJ, 2008; van ZIJL; KRUPITZA; MIKULITS, 2011). De fato, é cada vez mais reconhecido que o controle da migração de células de câncer é um acentuado problema no tratamento de tumores, e que o processo de motilidade celular pode fornecer novos alvos para a terapia do câncer, onde inibidores apropriados podem atuar restringindo a migração celular e metástase (ECCLES; BOX; COURT, 2005; KARAKUŞ *et al.*, 2018). É o caso de SRPK1, um alvo que está implicado na migração de células de carcinoma (LI, Z.R. *et al.*, 2019; YI *et al.*, 2018). Nessa linha, a presente investigação analisou se um composto análogo ao SRPIN340, denominado MR48, poderia exercer influência na migração de células de câncer de mama 4T1. Conforme mostrado (Figura 16), o composto MR48, em concentração inferior ao valor de IC50, foi capaz de reduzir significativamente a migração de células malignas mamárias. Esse resultado vai de encontro a outros obtidos por estudos que utilizaram diferentes compostos inibidores de SRPKs análogos ao SRPIN340, onde foram capazes de reduzir o processo migratório de células de melanoma (MOREIRA *et al.*, 2018).

O crescimento de colônias metastáticas representa a fase final e mais mortal na progressão maligna de um câncer, nesta etapa ocorre a colonização de locais distantes do tumor primário (LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2017; SUHAIL *et al.*, 2019). Genericamente, nesse estágio as células tumorais que migraram do tumor primário e se direcionaram a órgãos distantes e adjacentes conseguem sobreviver nestes novos microambientes, estabelecendo nichos (colônias) de células metastáticas via proliferação de células iniciadoras de metástases (MASSAGUÉ; OBENAUF, 2016). SRPK1 já se mostrou como um facilitador na habilidade de células tumorais formarem colônias (LI, Y. *et al.*, 2019; ODUNSI *et al.*, 2012). Nesse âmbito, foi avaliado se o composto MR48 análogo ao inibidor de SRPKs SRPIN340 seria capaz de interferir na habilidade de formação de colônias de células de câncer de mama 4T1. Os dados mostram que MR48 foi capaz de reduzir significativamente a formação de colônias em células de câncer de mama metastático (figura 17), em concentração inferior ao IC50. Esse achado vai de encontro a outros estudos utilizando análogos ao SRPIN340, que também se mostraram eficazes em reduzir a capacidade clonogênica em células de melanoma (MOREIRA *et al.*, 2018).

Foi demonstrado que MR48, em concentração abaixo do IC50, é capaz de atuar contra processos de metástase *in vitro*. No entanto, duas concentrações do composto não exerceram efeitos consideráveis em células tumorais 4T1 no contexto metastático (Figuras 16 e 17). Isso pode estar relacionado às características fenotípicas dessas células, já que as 4T1 apresentam

alta agressividade tumoral devido ao seu padrão genético, que resulta em alto nível de migração e proliferação (MAZZUCHELLI *et al.*, 2017). Apesar disso, embora duas concentrações inferiores ao valor de IC50 não tenham exercido efeitos consideráveis em fenótipos metastáticos, uma foi significativamente eficaz. Portanto, mostra-se que SRPKs, com destaque para SRPK1, é um alvo atrativo no contexto do carcinoma mamário metastático e que MR48 foi capaz de atuar positivamente contra fenótipos de metástase.

A expressão elevada e atividade de SRPK1 é causa de desfechos não favoráveis em câncer de mama, como metástases, mau prognóstico clínico, fuga da apoptose celular, resistência a tratamentos anticâncer, recorrência da doença, além de menor sobrevida (LI *et al.*, 2014; LIN *et al.*, 2014; MALVI *et al.*, 2020; van ROOSMALEN *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2020). Isso está relacionado à desregulação de eventos de *splicing* alternativo em células de câncer que superexpressam SRPK1, o que contribui com a geração de proteínas com atividades biológicas pró-tumorais (BELALI *et al.*, 2020; DA SILVA *et al.*, 2015; HAYES; CARRIGAN; MILLER, 2007; KURIMCHAK *et al.*, 2020). Nesse contexto, tendo essa quinase como alvo, os resultados do presente estudo mostram que o composto MR48 foi capaz de atrapalhar a atividade de SRPK1 em células 4T1 de câncer de mama metastático, onde houve maior acúmulo citoplasmático de SRPK1 (figura 18), o que aponta que este composto foi capaz de alterar o tráfego dessa quinase para o núcleo celular. Esse resultado vai de encontro a outros de estudos anteriores que utilizaram inibidores de SRPKs inspirados no SRPIN340, onde obtiveram resultados favoráveis na ação inibitória de SRPKs em melanoma e leucemia (MOREIRA *et al.*, 2018; SIQUEIRA *et al.*, 2017).

Na atualidade, diversos tratamentos potenciais contra câncer de mama, como os tratamentos combinados, vêm tomando significativas proporções devido às possibilidades de prolongamento da sobrevida de pacientes (FISUSI; AKALA, 2019). Assim, no cenário da busca por terapêuticos promissores contra o câncer, os estudos pré-clínicos em modelos experimentais são relevantes, constituindo a base dos estágios iniciais para o desenvolvimento e triagem de possíveis drogas com ação anticancerígenas. A título de exemplo, os modelos experimentais murinos podem ser bons preditivos de respostas a drogas anticâncer bem como de resistências que são observadas na clínica (HERTER-SPRIE; KUNG; WONG, 2013; PAN *et al.*, 2020). Nesse ambiente, visamos estabelecer o modelo murino 4T1 de câncer de mama metastático.

Já é bem documentado que o modelo 4T1 de câncer de mama metastático é relevante por possuir diversas características biológicas semelhantes à doença, tornando assim um modelo animal experimental adequado para câncer de mama humano (PULASKI;

OSTRAND-ROSENBERG, 2001). Diversos estudos abordando esse modelo utilizaram diferentes densidades celulares de 4T1, como 10^4 e 10^5 , para indução da doença obtendo resultados satisfatórios (LI *et al.*, 2007; WENZEL; ZEISIG; FICHTNER, 2010).

Nessa luz, realizamos experimentos pilotos a fim de determinar a densidade ideal de células 4T1 necessária para estabelecer o modelo murino 4T1 de câncer de mama metastático. Para tal, em um primeiro momento, inoculamos densidades celulares 4T1 de 1×10^4 e 2×10^4 nas glândulas mamárias dos animais em suspensões de 50 μ L de meio RPMI isento de soro (PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2001). Todavia, essas densidades de células não foram capazes de desencadear nódulos tumorais palpáveis.

Em um segundo momento, aumentamos as densidades celulares para 1×10^5 , 2×10^5 e 4×10^5 e inoculamos estas densidades em suspensões de 100 μ L de meio RPMI isento de soro nas glândulas mamárias dos animais (YANG; ZHANG; HUANG, 2012). Nessas densidades e suspensões houve um tímido desenvolvimento tumoral.

Importante destacar que ambas densidades celulares, após inoculadas, não resultaram na perda de peso corporal (g) em nenhum grupo (tabela 2; tabela 3), mostrando que a saúde dos animais não foi afetada e que os procedimentos experimentais não resultaram em estresse (LEE *et al.*, 2012).

Nesta investigação, ocorreram diferenças significativas entre as massas relativa e absoluta do grupo 1×10^5 em relação ao controle (tabela 3). Estudos reportam que essas diferenças podem estar relacionadas a metástases (GEBREMESKEL *et al.*, 2015; NAKAMURA *et al.*, 1999), contudo nesta pesquisa esta hipótese foi descartada. A diferença significativa no presente trabalho não está relacionada ao aumento do peso do baço dos animais do grupo 1×10^5 em relação ao controle. A saber, o aumento da progressão tumoral em 4T1 tem como desfecho a esplenomegalia, por isto o baço dos animais tende a ter maior volume, implicando conseqüentemente na elevação de peso do órgão conforme a doença progride (STEENBRUGGE *et al.*, 2019). Isso não ocorreu neste trabalho, onde o valor das massas absoluta e relativa do baço do grupo 1×10^5 foi menor quando comparado ao controle (tabela 3). Por conta disso, a possibilidade de metástase e progressão tumoral de doença 4T1 foi desconsiderada.

Nossos resultados mostram que, na densidade 10^4 de células 4T1, não houve desenvolvimento tumoral. Na densidade celular 10^5 , embora os valores de percentual de incidência tumoral e de animais apresentando tumores palpáveis tenham variado (tabela 4), bem como os volumes tumorais (figura 19), houve rejeição completa de tumores (tabela 4). Isso sugere que as células inoculadas nos animais levaram a imunogenicidade não intencional.

Considerando que a resposta imunológica adaptativa em modelos de roedores já é evidente ao longo de 15 dias e que apresentam aumentos constantes nos dias posteriores (FANELLI *et al.*, 2017), infere-se que houve uma atuação crescente das respostas imunológicas adaptativas contra as diferentes densidades de células 4T1 ao longo do tempo, já que a rejeição tumoral dos animais no grupo de maior densidade celular 4×10^5 ocorreu mais tardiamente quando comparada com os demais grupos (tabela 4). Em resumo, os resultados apontam que possivelmente o crescimento tumoral foi restringido pelas ações do sistema imunológico adaptativo dos animais, que já se mostrou capaz de atuar contra tumores (KRALL *et al.*, 2018).

Tomados na totalidade, os dados da presente pesquisa expõem que o composto MR48 análogo ao inibidor de SRPKs SRPIN340 levou a um maior efeito citotóxico contra diferentes linhagens células tumorais, incluindo as mamárias. Além disso, MR48 apresentou efeitos antimetastáticos e supressores de SRPK1 intracelularmente em células malignas de câncer de mama. Além do mais, no que tange ao modelo murino 4T1, os animais não geraram tumores de forma satisfatória, possivelmente por terem apresentado uma resposta imune contra as células 4T1 inoculadas, que podem ter desencadeado imunogenicidade não intencional no nosso modelo.

7 CONCLUSÕES

Os dados mostram que compostos MR apresentou atividade citotóxica significativamente superior ao SRPIN340 contra células cancerígenas. Além disso, a fim de determinar a capacidade em reduzir pela metade a viabilidade celular de células tumorais mamárias metastáticas 4T1 e não tumorais VERO, seis compostos MR e SRPIN340 foram selecionados, onde o composto MR48 apresentou os melhores resultados, tendo maior capacidade em diminuir pela metade a viabilidade celular de 4T1 e menor capacidade em VERO. Esse composto foi selecionado para ensaios posteriores e apresentou efeitos antimetastáticos e eventualmente inibitórios de SRPK1 intracelularmente.

No estudo piloto, a tentativa em estabelecer o modelo de câncer de mama murino metastático 4T1, mesmo após inoculações de diferentes densidades celulares 4T1, não foi possível. Os tumores foram totalmente rejeitados pelos animais, apesar de um tímido aumento no volume tumoral na densidade celular 10^5 . Nossa especulação é que essas células levaram a imunogenicidade não intencional no nosso modelo animal imunocompetente. Outros estudos podem ser feitos visando esclarecer as questões abertas nesta presente investigação.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste estudo, o composto MR48 mostrou potencial contra fenótipos metastáticos, além de atrapalhar o tráfego de SRPK1. Para melhor concretizar sua atuação antimetastática, futuros experimentos como o de invasão podem ser feitos. SRPK1 atua fosforilando proteínas SR, dessa forma, para melhor avaliar a possível inibição dessa quinase por MR48, sugere-se que sejam realizados futuros estudos avaliando o estado de fosforilação de SR quando células são tratadas com o composto.

EGF é um fator de crescimento que estimula a autofosforilação e translocação de SRPK (ZHOU *et al.*, 2012), por isso, posteriores experimentos tratando células com esse fator em conjunto com MR48, poderia trazer mais *insight* sobre o potencial dessa molécula em atrapalhar a atividade de SRPKs.

Embora estudos já tenham relatado que inoculações de altas densidades de células 4T1 geram tumores de rápido crescimento, porém com risco de baixa taxa de obtenção metastática (GREGÓRIO *et al.*, 2016), outros trazem como resultados o oposto, onde altas densidades celulares de 4T1, como as de 10^5 , quando inoculadas resultam em tumores consideráveis bem como taxa metastática (YANG; ZHANG; HUANG, 2012). No nosso estudo, densidades celulares de 10^4 não foram capazes de formar tumores, além de que, densidades 10^5 acarretaram em tumores tímidos e que foram rejeitados pelos animais. Portanto, sugere-se a alternativa de inocular maiores densidades celulares de 4T1, como as de 10^6 ou 10^7 , já que há estudos mostrando que estas densidades são capazes de causar tumores e metástases (SAMANT *et al.*, 2006; TAO *et al.*, 2008).

No presente estudo, os animais foram capazes de rejeitar as células tumorais devida a uma suposta imunogenicidade não intencional. Assim sendo, uma alternativa é realizar a imunossupressão dos animais a fim de evitar esse possível desfecho não programado.

Essas sugestões podem ser levadas em conta para futuros experimentos que visem padronizar o modelo de câncer de mama murino 4T1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU-OUF, H. *et al.* High Serine-arginine Protein Kinase 1 Expression with PTEN Loss Defines Aggressive Phenotype of Prostate Cancer Associated with Lethal Outcome and Decreased Overall Survival. **Eur Urol Open Sci**, v.23, pp.1-8, Dec. 2020. PMID: 34337483; PMCID: PMC8317848. DOI: 10.1016/j.euros.2020.11.005.
- ACOSTA-GUZMÁN, P.; MATEUS-GÓMEZ, A.; GAMBA-SÁNCHEZ, D. Direct transamidation reactions: Mechanism and recent advances. **Molecules**, v.23, n.2382, pp. 1-17, Set. 2018. DOI: 10.3390/molecules23092382.
- ADAN, A.; KIRAZ, Y.; BARAN, Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 17, n.14, pp. 1213-1221, 2016. PMID: 27604355. DOI: 10.2174/1389201017666160808160513.
- ANCZUKÓW, O. *et al.* The splicing factor SRSF1 regulates apoptosis and proliferation to promote mammary epithelial cell transformation. **Nat Struct Mol Biol**, v.19, pp. 220-228, Jan. 2012. PMID: 22245967; PMCID: PMC3272117. DOI: 10.1038/nsmb.2207.
- ANCZUKÓW, O., KRAINER, AR. Splicing-factor alterations in cancers. **RNA**, v. 22, n.9, pp.1285-1301, Sep. 2016. PMID: 27530828; PMCID: PMC4986885. DOI: 10.1261/rna.057919.116.
- AUBOL, B.E. Release of SR Proteins from CLK1 by SRPK1: A Symbiotic Kinase System for Phosphorylation Control of Pre-mRNA Splicing. **Molecular Cell**, v. 63, pp. 218-228, Jul. 2016. PMID: 27397683; PMCID: PMC4941815. DOI: 10.1016/j.molcel.2016.05.034.
- AYKUL, S., MARTINEZ-HACKERT, E. Determination of half-maximal inhibitory concentration using biosensor-based protein interaction analysis. **Anal Biochem**, v. 508, pp. 97-103, Sep. 2016. PMID: 27365221; PMCID: PMC4955526. DOI:10.1016/j.ab.2016.06.025.
- BATSON, J. *et al.* Development of Potent, Selective SRPK1 Inhibitors as Potential Topical Therapeutics for Neovascular Eye Disease. **ACS Chem Biol**, v.12, pp. 825-832, Jan. 2017. PMID: 28135068. DOI: 10.1021/acscchembio.6b01048.
- BELALI, T. *et al.* WT1 activates transcription of the splice factor kinase SRPK1 gene in PC3 and K562 cancer cells in the absence of corepressor BASP1. **Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech**, v. 1863, n. 12, Dec. 2020. PMID: 33017668. DOI: 10.1016/j.bbagr.2020.194642.
- BHULLAR, K.S. *et al.* Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions. **Mol Cancer**, v. 17, n. 48, Feb. 2018. DOI:10.1186/s12943-018-0804-2.
- BOWLER, E.; OLTEAN, S. Alternative Splicing in Angiogenesis. **International Journal Molecular Sciences**, v. 20, n. 2067, pp. 1-27, Apr. 2019. PMID: 31027366; PMCID: PMC6540211. DOI: 10.3390/ijms20092067.

- BRIX, N. *et al.* The clonogenic assay: robustness of plating efficiency-based analysis is strongly compromised by cellular cooperation. **Radiat Oncol**, v. 15, n. 248, Oct. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13014-020-01697-y>.
- BULLOCK, N. *et al.* Serine-arginine protein kinase 1 (SRPK1), a determinant of angiogenesis, is upregulated in prostate cancer and correlates with disease stage and invasion. **J Clin Pathol**, v. 69, pp. 171-175, 2016. PMID: 26500332; PMCID: PMC4752636. DOI: 10.1136/jclinpath-2015-203125.
- BULLOCK, N.; OLTEAN, S. The many faces of SRPK1. **J Pathol**, v. 241, pp. 437-440, Feb. 2017. PMID: 27859253; PMCID: PMC5324686. DOI: 10.1002/path.4846.
- BUSCH, A.; HERTEL, KJ. Evolution of SR protein and hnRNP splicing regulatory factors. **Wiley Interdiscip Rev RNA**, v.3, n.1, pp. 1-12, Jan-Feb. 2012. PMID: 21898828; PMCID: PMC3235224. DOI: 10.1002/wrna.100.
- CHANDRA, A. *et al.* Identification of a novel and potent small molecule inhibitor of SRPK1: mechanism of dual inhibition of SRPK1 for the inhibition of cancer progression. **Aging (Albany NY)**, v. 13, n.1, pp. 163-180, Dec. 2020. DOI: 10.18632/aging.202301.
- CHANG, Y. *et al.* The influence of SRPK1 on glioma apoptosis, metastasis, and angiogenesis through the PI3K/Akt signaling pathway under normoxia. **Tumour Biol**, v. 36, pp. 6083-6093 Aug. 2015. PMID: 25833691. DOI: 10.1007/s13277-015-3289-2.
- CHEN, W.; MOORE, M.J. Spliceosomes. **Curr Biol**, v. 25, n. 5, Mar. 2015. PMID: 25734262. DOI: 10.1016/j.cub.2014.11.059.
- CHEN, X. *et al.* QKI is a critical pre-mRNA alternative splicing regulator of cardiac myofibrillogenesis and contractile function. **Nat Commun**, v. 12, n. 89, Jan. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20327-5>.
- COUGHLIN, S.S. Epidemiology of Breast Cancer in Women. In: Ahmad A. (eds) Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.1152, pp. 9-29, Aug. 2019. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-20301-6_2.
- CUI, H.W. *et al.* Synthesis and biological evaluation of D-ring fused 1,2,3-thiadiazole dehydroepiandrosterone derivatives as antitumor agents. **Eur J Med Chem**, v. 111, pp. 126-137, Mar. 2016. PMID: 26866967. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.01.058.
- CZUBATY, A.; PIEKIELKO-WITKOWSKA, A. Protein kinases that phosphorylate splicing factors: Roles in cancer development, progression and possible therapeutic options. **Int J Biochem Cell Biol**, v.91, pp. 102-115, Oct. 2017. PMID: 28552434. DOI: 10.1016/j.biocel.2017.05.024.
- DASANU, C.A. *et al.* Cardiovascular toxicity associated with small molecule tyrosine kinase inhibitors currently in clinical use. **Expert Opin Drug Saf**, v. 11, n.3, pp. 445-457, Apr.2012. PMID: 22469002. DOI: 10.1517/14740338.2012.672971.
- DA SILVA, M.R. *et al.* Splicing Regulators and Their Roles in Cancer Biology and Therapy. **Biomed Res Int**, v. 2015, pp. 1-12, Apr.2015. PMID: 26273588; PMCID: PMC4529883.

DOI: 10.1155/2015/150514.

DENG, K. *et al.* Abnormal alternative splicing promotes tumor resistance in targeted therapy and immunotherapy. **Transl Oncol**, v. 14, n. 6, Jun. 2021. PMID: 33774500. DOI: 10.1016/j.tranon.2021.101077.

DE RUIJTER, T.C. *et al.* Characteristics of triple-negative breast cancer. **J Cancer Res Clin Oncol**, v.137, pp. 183-192, Feb. 2011. PMID: 21069385. DOI: 10.1007/s00432-010-0957-x.

DI MARZO, V. *et al.* Palmitoylethanolamide inhibits the expression of fatty acid amide hydrolase and enhances the anti-proliferative effect of anandamide in human breast cancer cells. **Biochem J**, v. 358, pp. 249-255, Aug. 2001. PMID: 11485574; PMID: PMC1222054. DOI: 10.1042/0264-6021:3580249.

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

DONG, Z. *et al.* Increased expression of SRPK1 (serine/arginine-rich protein-specific kinase 1) is associated with progression and unfavorable prognosis in cervical squamous cell carcinoma. **Bioengineered**, v. 13, n. 3, pp. 6100-6112, Mar. 2022. PMID: 35192432; PMID: PMC8973769. DOI: 10.1080/21655979.2022.2034705.

DU, J.X. *et al.* Splicing factors: Insights into their regulatory network in alternative splicing in cancer. **Cancer Lett**, v. 501, pp. 83-104, Mar. 2021. PMID: 33309781. DOI: 10.1016/j.canlet.2020.11.043.

DUTERTRE, M.; VAGNER, S.; AUBOEUUF, D. Alternative splicing and breast cancer. **RNA Biol**, v. 7, n.4, pp. 403-51, Jul-Aug. 2010. PMID: 20622514. DOI: 10.4161/rna.7.4.12152.

DVINGE, H. *et al.* RNA splicing factors as oncoproteins and tumour suppressors. **Nat Rev Cancer**, v. 16, n.7, pp. 413-430, Jul. 2016. PMID: 27282250. DOI: 10.1038/nrc.2016.51. PMID: 27282250.

ECCLES, S.A.; BOX, C.; COURT, W. Cell migration/invasion assays and their application in cancer drug discovery. **Biotechnol Annu Ver**, v. 11, pp. 391-421, 2005. PMID: 16216785. DOI: 10.1016/S1387-2656(05)11013-8.

FANELLI, C. *et al.* Innate And Adaptive Immunity are Progressively Activated in Parallel with Renal Injury in the 5/6 Renal Ablation Model. **Scientific Reports, Representante Científico** 7, n. 3192, Jun. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02915-6>.

FIGUEIREDO, C. R. *et al.* A novel microtubule destabilizing complementarity-determining region C36L1 peptide displays antitumor activity against melanoma in vitro and in vivo. **Scientific Reports**, v. 5, n.14310, Set. 2015. PMID: 26391685; PMID: PMC4585759. DOI: 10.1038/srep14310.

FISUSI, F.A.; AKALA, E.O. Drug Combinations in Breast Cancer Therapy. **Pharm Nanotechnol**, v. 7, n.1, pp. 3-23, 2019. PMID: 30666921; PMCID: PMC6691849. DOI: 10.2174/2211738507666190122111224.

FUKUHARA, T. *et al.* Utilization of host SR protein kinases and RNA-splicing machinery during viral replication. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 30, pp. 11329-11333, Jul. 2006. PMID: 16840555; PMCID: PMC1544086. DOI: 10.1073/pnas.0604616103.

GAMMONS, M. *et al.* Targeting SRPK1 to control VEGF-mediated tumour angiogenesis in metastatic melanoma. **Br J Cancer**, v. 111, n. 3, pp. 477-485, Jul. 2014. PMID: 25010863; PMCID: PMC4119992. DOI: <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.342>.

GAUTREY, H.L.; TYSON-CAPPER. A.J. Regulation of Mcl-1 by SRSF1 and SRSF5 in cancer cells. **PLoS One**, v. 7, n.12, Dec. 2012. PMID: 23284704; PMCID: PMC3524227. DOI: 10.1371/journal.pone.0051497.

GEBREMESKEL, S. *et al.* The reversible P2Y12 inhibitor ticagrelor inhibits metastasis and improves survival in mouse models of cancer. **Int. J. Cancer**, v.136, n.1, pp. 234-240, Jan. 2015. PMID: 24798403 DOI: 10.1002/ijc.28947.

GHOSH, G.; ADAMS, J.A. Phosphorylation mechanism and structure of serine-arginine protein kinases. **FEBS J**, v. 278, n.4, pp. 587-597, Feb. 2011. PMID: 21205204; PMCID: PMC3079193. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07992.x.

GIANNAKOUROS, T. *et al.* Serine-arginine protein kinases: a small protein kinase family with a large cellular presence. **FEBS J**, v. 278, n.4, pp. 570-586, Feb. 2011. PMID: 21205200. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07987.x.

GONÇALVES, V. *et al.* Ibuprofen disrupts a WNK1/GSK3 β /SRPK1 protein complex required for expression of tumor-related splicing variant RAC1B in colorectal cells. **Oncotarget**, v. 11, n.47, pp. 4421-4437, Nov. 2020. PMID: 33315986; PMCID: PMC7720772. DOI: 10.18632/oncotarget.27816.

GONG, L. *et al.* Serine-arginine protein kinase 1 promotes a cancer stem cell-like phenotype through activation of Wnt/ β -catenin signalling in NSCLC. **J Pathol**, v. 240, n. 2, pp. 184-196, Oct. 2016. PMID: 27391422. DOI: 10.1002/path.4767.

GRAVELEY, B.R. A protein interaction domain contacts RNA in the prespliceosome. **Mol Cell**, v.13, n.3, pp. 302-304, Feb. 2004. PMID: 14967137. DOI: 10.1016/s1097-2765(04)00055-3.

GREGÓRIO, A.C. *et al.* Inoculated Cell Density as a Determinant Factor of the Growth Dynamics and Metastatic Efficiency of a Breast Cancer Murine Model. **PLoS ONE**, v. 11, n.11, pp. 1-19, Nov. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165817>.

GROSSO, A. R.; MARTINS, S.; CARMO-FONSECA, M. The emerging role of splicing factors in cancer. **EMBO reports**, v.9, n.11, pp. 1087-1093, Nov. 2008. PMID: 18846105; PMCID: PMC2581861. DOI: <https://doi.org/10.1038/embor.2008.189>.

GUI, P.; BIVONA; T.G. Evolution of metastasis: new tools and insights. **Trends Cancer**, v. 8, n. 2, pp. 98-109, Feb. 2022. PMID: 34872888. DOI: 10.1016/j.trecan.2021.11.002.

HAN, J. *et al.* SR proteins induce alternative exon skipping through their activities on the flanking constitutive exons. **Molecular and cellular biology**, v.31, n.4, pp. 793–802, Feb. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1128/MCB.01117-10>.

HAN, P. *et al.* Characterization of alternative splicing events and prognostic signatures in breast cancer. **BMC Cancer** 21, v. 587, May. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12885-021-08305-6>.

HAPACH, L.A. *et al.* Engineered models to parse apart the metastatic cascade. **npj Precision Oncology**, v.3, n. 20, Aug. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41698-019-0092-3>.

HASINOFF, B.B.; PATEL, D. The lack of target specificity of small molecule anticancer kinase inhibitors is correlated with their ability to damage myocytes in vitro. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 249, n.2, pp. 132-139, Dec. 2010. PMID: 20832415. DOI: 10.1016/j.taap.2010.08.026.

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 carcinomas. **Cancer Res**, v.67, n.5, pp. 2072-2080, Mar. 2007. PMID: 17332336. DOI: 10.1158/0008-5472.

HERTER-SPRIE, G. S.; KUNG, A. L.; WONG, K. K. New cast for a new era: preclinical cancer drug development revisited. **The Journal of clinical investigation**, v. 123, n. 9, pp. 3639-3645, Sep. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI68340>.

HUANG, J.Q. *et al.* SRPK1/AKT axis promotes oxaliplatin-induced anti-apoptosis via NF- κ B activation in colon cancer. **J Transl Med**, v. 19, n. 280, Jun. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12967-021-02954-8>.

HUNTER, K.W.; CRAWFORD, N.P.; ALSARRAJ, J. Mechanisms of metastasis. **Breast Cancer Res** 10, n. S2, Dec. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1186/bcr1988>.

INCA. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: INCA, 2019.

INCA. **Números de Câncer**. Rio de Janeiro: INCA, 2021. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>. Acesso em: 18 jan. 2022.

IRVIN JR, W.J.; CAREY, L.A. What is triple-negative breast cancer? **Eur J Cancer**, v.44, n.18, pp. 2799-2805, Dec. 2008. PMID: 19008097. DOI: 10.1016/j.ejca.2008.09.034.

JEONG, S. SR Proteins: Binders, Regulators, and Connectors of RNA. **Molecules and cells**, v. 40, n.1, pp. 1-9, Jan. 2017. DOI:10.14348/molcells.2017.2319.

JIA, R. *et al.* SRp20 is a proto-oncogene critical for cell proliferation and tumor induction and maintenance. **Int J Biol Sci**, v. 6, n.7, pp. 803-826, Dec. 2010. PMID: 21179588; PMCID: PMC3005347. DOI: 10.7150/ijbs.6.806.

KARAKUŞ, F. *et al.* Inhibition of cell proliferation, migration and colony formation of LS174T Cells by carbonic anhydrase inhibitor. **African health sciences**, v. 18, n.4, pp. 1303-1310, Dec. 2018. DOI: <https://doi.org/10.4314/ahs.v18i4.51>.

KHAN, K. M. *et al.* Oxazolones: new tyrosinase inhibitors; synthesis and their structure-activity relationships. **Bioorg. Med. Chem**, v.14, n.17, pp. 6027-6033, Set. 2006. PMID: 16750372. DOI: 10.1016/j.bmc.2006.05.014.

KOEDOOT, E. *et al.* Uncovering the signaling landscape controlling breast cancer cell migration identifies novel metastasis driver genes. **Nat Commun** 10, n. 2983, Jul. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11020-3>.

KOUTROUMANI, M. *et al.* Evidence for disulfide bonds in SR Protein Kinase 1 (SRPK1) that are required for activity and nuclear localization. **PLoS ONE**, v. 12, n.2, pp.1-21, Feb. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171328>.

KRALL, J.A. *et al.* The systemic response to surgery triggers the outgrowth of distant immune-controlled tumors in mouse models of dormancy. **Sci Transl Med**, v. 10, n. 436, Apr. 2018. PMID: 29643230; PMCID: PMC6364295. DOI: 10.1126/scitranslmed.aan3464.

KURIMCHAK, A.M. *et al.* Kinome Profiling of Primary Endometrial Tumors Using Multiplexed Inhibitor Beads and Mass Spectrometry Identifies SRPK1 as Candidate Therapeutic Target. **Mol Cell Proteomics**, v. 19, n. 12, pp. 2068-2090, Dec. 2020. PMID: 32994315; PMCID: PMC7710141. DOI: 10.1074/mcp.RA120.002012.

LAMBERT, A.W; PATTABIRAMAN, D.R; WEINBERG, R.A. Emerging Biological Principles of Metastasis. **Cell**, v. 168, n.4, pp. 670-691, Feb, 2017. PMID: 28187288; PMCID: PMC5308465. DOI: 10.1016/j.cell.2016.11.037.

LANIGAN, R.R; SHEPPARD, T.D. Recent developments in amide synthesis: Direct amidation of carboxylic acids and transamidation reactions. **Eur. J. Med. Chem**, v. 2013, n. 33, pp. 7453-7465, Aug. 2013. DOI: 10.1002/ejoc.201300573.

LEE, S. *et al.* Body Weight Changes of Laboratory Animals during Transportation. **Asian-Australas J Anim Sci**, v. 25, n.2, pp. 286-290, Feb. 2012. PMID: 25049564; PMCID: PMC4093136. DOI: 10.5713/ajas.2011.11227.

LEE, Y.; DONALD, C. R. Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. **Annual review of biochemistry**, v. 84, pp. 291-323, Mar. 2015. PMID: 25784052; PMCID: PMC4526142. DOI:10.1146/annurev-biochem-060614-034316.

LIANG, Y. *et al.* Metastatic heterogeneity of breast cancer: Molecular mechanism and potential therapeutic targets. **Semin Cancer Biol**, v. 60, pp. 14-27, Feb. 2020. PMID: 31421262. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.08.012.

LI, G.; SZOSTAK, M. Highly selective transition-metal-free transamidation of amides and amidation of esters at room temperature, **Nat. Commun** **9**, n. 4165, Oct. 2018. DOI: 10.1038/s41467-018-06623-1.

LI, H. *et al.* Induction of strong antitumor immunity by an HSV-2-based oncolytic virus in a murine mammary tumor model. **J Gene Med**, v.9, n.3, pp. 161-169, Mar. 2007. PMID: 17266169. DOI: 10.1002/jgm.1005.

LI, X.H. *et al.* Serine-arginine protein kinase 1 is associated with breast cancer progression and poor patient survival. **Med Oncol**, v. 2014, n. 83, Jun. 2014. PMID: 24961466. DOI: 10.1007/s12032-014-0083-8.

LI, Y. *et al.* SRPK1 facilitates tumor cell growth via modulating the small nucleolar RNA expression in gastric cancer. **J Cell Physiol**, v.234, n.8, pp. 13582-13591, Aug. 2019. PMID: 30633341. DOI: 10.1002/jcp.28036.

LI, Z.R. *et al.* SOX2 knockdown inhibits the migration and invasion of basal cell carcinoma cells by targeting the SRPK1-mediated PI3K/AKT signaling pathway. **Oncol Lett**, v. 17, n.2, pp. 1617-1625, Feb. 2019. DOI: 10.3892/ol.2018.9810.

LIN, J.C. *et al.* Elevated SRPK1 lessens apoptosis in breast cancer cells through RBM4-regulated splicing events. **RNA**, v. 20, n.10, pp. 1621-1631, Aug. 2014. DOI:10.1261/rna.045583.114.

LIN, S. *et al.* Dephosphorylation-dependent sorting of SR splicing factors during mRNP maturation. **Mol Cell**, v. 20, n.3, pp. 413-425, Nov. 2005. PMID: 16285923. DOI: 10.1016/j.molcel.2005.09.015.

LIU, H. *et al.* SRPK1/2 and PP1 α exert opposite functions by modulating SRSF1-guided MKNK2 alternative splicing in colon adenocarcinoma. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, Res** **40**, n.75, Feb. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13046-021-01877-y>.

LIU, Z.; RABADAN, R. Computing the Role of Alternative Splicing in Cancer. **Trends Cancer**, v. 7, n.4, pp. 347-358, Apr. 2021. PMID: 33500226; PMCID: PMC7969404. DOI: 10.1016/j.trecan.2020.12.015.

LONG, J.C; CÁ CERES, J.F. The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. **Biochem J**, v. 417, n. 1, pp. 15-27, Jan. 2009. PMID: 19061484. DOI: 10.1042/BJ20081501.

MALVI, P. *et al.* LIMK2 promotes the metastatic progression of triple-negative breast cancer by activating SRPK1. **Oncogenesis**, v.9, n. 77, pp. 1-16, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41389-020-00263-1>.

MARTÍNEZ-MONTIEL, N. *et al.* Alternative Splicing in Breast Cancer and the Potential Development of Therapeutic Tools. **Genes (Basel)**, v. 8, n.217, pp. 1-14, Oct. 2017. PMID: 28981467; PMCID: PMC5664086. DOI: 10.3390/genes8100217.

MASSAGUÉ, J.; OBENAU, A.C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. **Nature**, v. 529, n. 7586, pp. 298-306, Jan. 2016. PMID: 26791720; PMCID: PMC5029466. DOI: 10.1038/nature17038.

MAVROU, A. *et al.* Serine-arginine protein kinase 1 (SRPK1) inhibition as a potential novel targeted therapeutic strategy in prostate cancer. **Oncogene**, v. 34, n. 33, pp. 4311-4319, Aug. 2015. PMID: 25381816; PMCID: PMC4351909. DOI: 10.1038/onc.2014.360.

MAVROU, A.; OLTEAN, S. SRPK1 inhibition in prostate cancer: A novel anti-angiogenic treatment through modulation of VEGF alternative splicing. **Pharmacological Research**, v. 107, pp. 276-281, May. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.03.013>.

MAZZUCHELLI, S. *et al.* Nanometronomic treatment of 4T1 breast cancer with nanocaged doxorubicin prevents drug resistance and circumvents cardiotoxicity. **Oncotarget**, v. 8, n.5, pp. 8383-8396, Jan. 2017. PMID: 28039473; PMCID: PMC5352408. DOI: 10.18632/oncotarget.14204.

MIRZAYANS, R.; ANDRAIS, B; MURRAY, D. Viability Assessment Following Anticancer Treatment Requires Single-Cell Visualization. **Cancers (Basel)**, v. 10, n. 255, pp. 1-11, Aug. 2018. DOI:10.3390/cancers10080255.

MOHAMED, L. W. *et al.* Design and synthesis of novel oxazolone and triazinone derivatives and their biological evaluation as COX-2 inhibitors. **Bioorg. Chem**, v.72, pp. 308-314, Jun. 2017. DOI: 10.1016/j.bioorg.2017.04.012.

MOLE, S. *et al.* Human papillomavirus type 16 infection activates the host serine arginine protein kinase 1 (SRPK1) - splicing factor axis. **J Gen Virol**, v. 101, n.5, pp. 523-532, May. 2020. PMID: 32182205; PMCID: PMC7414453. DOI: 10.1099/jgv.0.001402.

MOREIRA, G.A, *et al.* Antimetastatic effect of the pharmacological inhibition of serine/arginine-rich protein kinases (SRPK) in murine melanoma. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 356, pp. 214-223, Oct. 2018. PMID: 30138656. DOI: 10.1016/j.taap.2018.08.012.

NAKAMURA, K. *et al.* Inhibitory Effect of Cordyceps sinensis on Spontaneous Liver Metastasis of Lewis Lung Carcinoma and B16 Melanoma Cells in Syngeneic Mice. **Jpn. J. Pharmacol**, v.79, n.3, pp. 335-341, Mar. 1999. PMID: 10230862. DOI: 10.1254/jjp.79.335.

NARO, C.; SETTE, C. Phosphorylation-mediated regulation of alternative splicing in cancer. **International Journal of Cell Biology**, v. 2013, pp. 1-15, Aug. 2013. PMID: 24069033; PMCID: PMC3771450. DOI: 10.1155/2013/151839.

NIKAS, I.P. *et al.* Serine-Arginine Protein Kinase 1 (SRPK1) as a Prognostic Factor and Potential Therapeutic Target in Cancer: Current Evidence and Future Perspectives. **Cells**, v.9, n. 19, pp. 1-19, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells9010019>.

ODUNSI, K. *et al.* Elevated Expression of the Serine-Arginine Protein Kinase 1 Gene in Ovarian Cancer and Its Role in Cisplatin Cytotoxicity In Vitro. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, pp. 1-10, Dec. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051030>.

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

PAJARES, M.J. *et al.* 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.

PAN, E. *et al.* A Systematic Review of the Efficacy of Preclinical Models of Lung Cancer Drugs. **Front Oncol**, v. 10, n.591, pp. 1-8, Apr. 2020. PMID: 32391273; PMCID: PMC7190806. DOI: 10.3389/fonc.2020.00591.

PANDIT, S. *et al.* 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.

PARK, S. *et al.* Differential Functions of Splicing Factors in Mammary Transformation and Breast Cancer Metastasis. **Cell Rep**, v. 29, n.9, pp. 2672-2688, Nov. 2019. PMID: 31775037; PMCID: PMC6936330. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.10.110.

PATEL, M.; SACHIDANANDAN, M.; ADNAN, M. Serine arginine protein kinase 1 (SRPK1): a moonlighting protein with theranostic ability in cancer prevention. **Mol Biol Rep** **46**, pp. 1487–1497, Feb. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4545-5>.

PEREIRA, A. *et al.* Brønsted acid catalyzed azlactone ring opening by nucleophiles. **Tetrahedron** **20**, v. 70, n.20, pp. 3271-3275, May. 2014. DOI: 10.1016/j.tet.2013.11.037.

PINTOR, A.V.B. *et al.* MTT versus other cell viability assays to evaluate the biocompatibility of root canal filling materials: a systematic review. **Int Endod J**, v. 53, n.10, pp. 1348-1373, Oct. 2020. PMID: 32602945. DOI: 10.1111/iej.13353.

PULASKI, B.A.; OSTRAND-ROSENBERG, S. Mouse 4T1 breast tumor model. **Curr Protoc Immunol**, May. 2001. PMID: 18432775. DOI: 10.1002/0471142735.im2002s39.

RAFEHI, H. *et al.* Clonogenic assay: adherent cells. **J Vis Exp**, v. 13, n.49, Mar. 2011. PMID: 21445039; PMCID: PMC3197314. DOI: 10.3791/2573.

READ, A.; NATRAJAN, R. Splicing dysregulation as a driver of breast cancer. **Endocr Relat Cancer**, v. 25, n.9, pp. 419-430, May. 2018. DOI:10.1530/ERC-18-0068.

RODRIGUES, *et al.* Synthesis and cytotoxic activity of SRPIN340-inspired diamides. No Prelo

ROSS-MACDONALD, P. *et al.* Identification of a nonkinase target mediating cytotoxicity of novel kinase inhibitors. **Mol Cancer Ther**, v. 7, n.11, pp. 3490-3498, Nov. 2008. PMID: 19001433. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0826.

SAMANT, R.S. *et al.* Suppression of murine mammary carcinoma metastasis by the murine ortholog of breast cancer metastasis suppressor 1 (Brms1). **Cancer Lett**, v. 235, n. 2, pp. 260-265, Apr. 2006. PMID: 15978719. DOI: 10.1016/j.canlet.2005.04.032.

SCHRÖRS, B. *et al.* Multi-Omics Characterization of the 4T1 Murine Mammary Gland Tumor Model. **Front Oncol**, v. 10, n. 1195, pp. 1-14, Jul. 2020. PMID: 32793490; PMCID: PMC7390911. DOI: 10.3389/fonc.2020.01195.

SHILO, A.; SIEGFRIED, Z.; KARNI, R. The role of splicing factors in deregulation of alternative splicing during oncogenesis and tumor progression. **Mol Cell Oncol**, v. 2, n.1, pp. 1-13, Feb. 2015. PMID: 27308389; PMCID: PMC4905244. DOI: 10.4161/23723548.2014.970955.

SHKRETA, L. *et al.* Cancer-Associated Perturbations in Alternative Pre-messenger RNA Splicing. **Cancer Treat Res**, v. 158, pp. 41-94, Mar. 2013. PMID: 24222354. DOI: 10.1007/978-3-642-31659-3_3.

SILIPO, M.; GAUTREY, H.; TYSON-CAPPER, A. Deregulation of splicing factors and breast cancer development. **J Mol Cell Biol**, v. 7, n.5, pp. 388-401, Oct. 2015. PMID: 25948865. DOI: 10.1093/jmcb/mjv027.

SIQUEIRA, R.P. *et al.* Combined SRPK and AKT pharmacological inhibition is synergistic in T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. **Toxicol In Vitro**, v. 65, n. 104777, Jun. 2020. PMID: 31962201. DOI: 10.1016/j.tiv.2020.104777.

SIQUEIRA, R.P. *et al.* Potential Antileukemia Effect and Structural Analyses of SRPK Inhibition by N-(2-(Piperidin-1-yl)-5-(Trifluoromethyl)Phenyl)Isonicotinamide (SRPIN340). **PLoS One**, v.10, n. 8, pp.1-21, Aug. 2015. PMID: 26244849; PMCID: PMC4526641. DOI: 10.1371/journal.pone.0134882.

SIQUEIRA, R.P. *et al.* Trifluoromethyl arylamides with antileukemia effect and intracellular inhibitory activity over serine/arginine-rich protein kinases (SRPKs). **Eur J Med Chem**, v. 134, pp. 97-109, Jul. 2017. PMID: 28407594. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.03.078.

SONG, X. *et al.* Alternative splicing in cancers: From aberrant regulation to new therapeutics. **Semin Cell Dev Biol**, v. 75, pp. 13-22, Mar. 2018. PMID: 28919308. DOI: 10.1016/j.semcdb.2017.09.018.

SOUSA, S. *et al.* Synthesis of Novel 1,2,3-triazoles Inspired on The SRPIN340 And Evaluation of Their Effects on Human Glioblastoma Cell Line. **Química Nova [online]**, v. 44, n. 10, pp. 1268-1279, Jul. 2021. DOI: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170793>.

STEENBRUGGE, J. *et al.* Comparative Profiling of Metastatic 4T1- vs. Non-metastatic Py230-Based Mammary Tumors in an Intraductal Model for Triple-Negative Breast Cancer. **Front Immunol**, v. 10, n. 2928, pp.1-10, Dec. 2019. PMID: 31921184; PMCID: PMC6927949. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02928.

SUHAIL, Y. *et al.* Systems Biology of Cancer Metastasis. **Cell Syst**, v. 9, n. 2, pp. 109-127, Aug. 2019. PMID: 31465728; PMCID: PMC6716621. DOI: 10.1016/j.cels.2019.07.003.

SUNG, H. *et al.* 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, Feb. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.

SUNGHEE, P. *et al.* Differential Functions of Splicing Factors in Mammary Transformation and Breast Cancer Metastasis. **Cell Reports**, v. 29, n. 9, pp. 2672-2688, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.110>.

SUPRADIT, K. *et al.* Inhibition of serine/arginine-rich protein kinase-1 (SRPK1) prevents cholangiocarcinoma cells induced angiogenesis. **Toxicol In Vitro**, v. 82, n. 105385, May. 2022. PMID: 35568131. DOI: 10.1016/j.tiv.2022.105385.

SUPURAN, C.T. Amide derivatives of benzene-sulfonamide, pharmaceutical composition thereof and method for cancer treatment using the same (US20120095092). **Expert Opin Ther Pat**, v. 22, n.10, pp. 1251-1255, Oct. 2012. PMID: 22849544. DOI: 10.1517/13543776.2012.712687.

TAO, K.*et al.* Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. **BMC Cancer**, v.8, n. 228, pp. 1-19, Aug. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-8-228>.

TESHOME, M. Role of Operative Management in Stage IV Breast Cancer. **Surg Clin North Am**, v. 98, n. 4, pp. 859-868, Aug. 2018. PMID: 30005779. DOI: 10.1016/j.suc.2018.03.012.

TUNNICLIFFE, R.B. *et al.* Molecular Mechanism of SR Protein Kinase 1 Inhibition by the Herpes Virus Protein ICP27. **mBio**, v. 10, n.5, Oct. 2019. PMID: 31641093; PMCID: PMC6805999. DOI: 10.1128/mBio.02551-19.

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

TZELEPIS, K. *et al.* SRPK1 maintains acute myeloid leukemia through effects on isoform usage of epigenetic regulators including BRD4. **Nat Commun**, v.9, n. 5378, Dec. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07620-0>.

VALE, J.A. **Efeito da inibição de Serine Arginine Protein Kinases (SRPKs) em modelo de melanoma murino subcutâneo**. 2017. 70f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2017.

VALE, J.A.D. *et al.* Effect of the topical administration of N-(2-(4-bromophenylamino)-5-(trifluoromethyl)phenyl)nicotinamide compound in a murine subcutaneous melanoma model. **Anticancer Drugs**, v. 31, n.7, pp. 718-727, Aug. 2020. PMID: 32568827. DOI: 10.1097/CAD.0000000000000944.

VALSASINA, B.; KALISZ, H.M.; ISACCHI, A. Kinase selectivity profiling by inhibitor affinity chromatography. **Expert Rev Proteomics**, v. 1, n.3, pp. 303-315, Oct. 2004. PMID: 15966827. DOI: 10.1586/14789450.1.3.303.

van ROOSMALEN, W. *et al.* Tumor cell migration screen identifies SRPK1 as breast cancer metastasis determinant. **J Clin Invest**, v. 125, n.4, pp. 1648-1664, Apr. 2015. PMID: 25774502; PMCID: PMC4396474. DOI: 10.1172/JCI74440.

van ZIJL, F.; KRUPITZA, G.; MIKULITS, W. Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. **Mutat Res**, v. 728, n. 1-2, pp. 23-34, Jul-Oct. 2011. PMID: 21605699; PMCID: PMC4028085. DOI: 10.1016/j.mrrev.2011.05.002.

VASTA, J.D. *et al.* Quantitative, Wide-Spectrum Kinase Profiling in Live Cells for Assessing the Effect of Cellular ATP on Target Engagement. **Cell Chem Biol**, v. 25, n. 2, pp. 206-214, Feb. 2018. PMID: 29174542; PMCID: PMC5814754. DOI: 10.1016/j.chembiol.2017.10.010.

WANG, C. *et al.* 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, H. *et al.* The crucial role of SRPK1 in IGF-1-induced EMT of human gastric cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 42, pp. 72157-72166, Aug. 2017. PMID: 29069776; PMCID: PMC5641119. DOI: 10.18632/oncotarget.20048.

WANG, L.; ZHANG, S.; WANG, X. The Metabolic Mechanisms of Breast Cancer Metastasis. **Frontiers in oncology**, v. 10, n. .602416, pp. 1-21, Jan. 2021. DOI:10.3389/fonc.2020.602416.

WANG, Q; WANG. G.T., LU, W.H. MiR-155 Inhibits Malignant Biological Behavior of Human Liver Cancer Cells by Regulating SRPK1. **Technol Cancer Res Treat**, Jan-Dec. 2021. PMID: 33827350; PMCID: PMC8172333. DOI: 10.1177/1533033820957021.

WENZEL, J.; ZEISIG, R.; FICHTNER, I. Inhibition of metastasis in a murine 4T1 breast cancer model by liposomes preventing tumor cell-platelet interactions. **Clin Exp Metastasis**. v. 27, pp. 25-34, Jan. 2010. PMID: 19916050. DOI: 10.1007/s10585-009-9299-y.

WILKINSON, M, E. *et al.* Structural basis for conformational equilibrium of the catalytic spliceosome. **Molecular Cell**, v.81, n. 7, pp. 1439-1452, Apr. 2021, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.02.021>.

XU, X. *et al.* Serine-arginine protein kinase 1 (SRPK1) is elevated in gastric cancer and plays oncogenic functions. **Oncotarget**, v. 8, n. 37, pp. 61944-61957, Jun. 2017. PMID: 28977917; PMCID: PMC5617477; DOI: 10.18632/oncotarget.18734.

YANG, Q. *et al.* Aberrant alternative splicing in breast cancer. **J Mol Cell Biol**, v. 11, n.10, pp. 920-929, Oct. 2019. PMID: 31065692; PMCID: PMC6884705. DOI: 10.1093/jmcb/mjz033.

YANG, S.; ZHANG, J.J.; HUANG, X.Y. Mouse models for tumor metastasis. **Methods Mol Biol**, v. 928, pp. 221-228, Aug. 2012. PMID: 22956145; PMCID: PMC3674868. DOI: 10.1007/978-1-62703-008-3_17.

YI, N. *et al.* SRPK1 is a poor prognostic indicator and a novel potential therapeutic target for human colorectal cancer. **Onco Targets Ther**, v. 11, pp. 5359-5370, Sep. 2018. PMID: 30214242; PMCID: PMC6128266. DOI: 10.2147/OTT.S172541.

ZHANG, J. *et al.* Cytotoxicity of 34 FDA approved small-molecule kinase inhibitors in primary rat and human hepatocytes. **Toxicol Lett**, v.291, pp.138-148, Jul. 2018. PMID: 29655783. DOI: 10.1016/j.toxlet.2018.04.010.

ZHANG, J. *et al.* Effects of 31 FDA approved small-molecule kinase inhibitors on isolated rat liver mitochondria. **Arch Toxicol**, v. 91, n.8, pp. 2921-2938, Aug. 2017. PMID: 28032146; PMCID: PMC5515969. DOI: 10.1007/s00204-016-1918-1.

ZHANG, Y. *et al.* Alternative splicing and cancer: a systematic review. **Sig Transduct Target Ther** 6, n. 78, Feb. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00486-7>.

ZHONG, X.Y. *et al.* Regulation of SR protein phosphorylation and alternative splicing by modulating kinetic interactions of SRPK1 with molecular chaperones. **Genes Dev**, v. 23, n.4, pp. 482-495, Feb. 2009. PMID: 19240134; PMCID: PMC2648651. DOI: 10.1101/gad.1752109.

ZHOU, B. *et al.* SRPK1 contributes to malignancy of hepatocellular carcinoma through a possible mechanism involving PI3K/Akt. **Mol Cell Biochem**, v. 379, pp. 191-199, Jul. 2013. PMID: 23644876. DOI: 10.1007/s11010-013-1641-7.

ZHOU, Z. *et al.* The Akt-SRPK-SR axis constitutes a major pathway in transducing EGF signaling to regulate alternative splicing in the nucleus. **Mol Cell**, v. 47, n.3, pp. 422-433, Aug. 2012. PMID: 22727668; PMCID: PMC3418396. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.05.014.

ZHOU, Z.; FU, X.D. Regulation of splicing by SR proteins and SR protein-specific kinases. **Chromosoma**, v. 122, n.3, pp. 191-207, Jun. 2013. PMID: 23525660; PMCID: PMC3660409. DOI: 10.1007/s00412-013-0407-z.

ANEXOS**ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 54/2021, intitulado “Efeito antimetastático de compostos inibidores de SRPK no modelo de câncer de mama murino 4T1”, coordenado pelo professor Gustavo Costa Bressan do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTIC, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTIC, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 23/09/2021, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 54/2021, named “Antimetastatic effect of SRPK inhibitor compounds in the 4T1 murine breast cancer model”, is in agreement with the actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008, Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTIC, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTIC therefore being approved by the Committee on September 23, 2021 valid for 12 months.



Prof. Mariella Bontempo Duca de Freitas
Coordenadora
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV