

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

JULIANA REGINA RIBEIRO DE SOUZA

**RELAÇÃO FUNCIONAL ENTRE *SERINE ARGININE PROTEIN KINASE 2*
(SRPK2) E *THYMOSIN BETA 4* (T β 4) EM MELANOMA METASTÁTICO MURINO**

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2020

JULIANA REGINA RIBEIRO DE SOUZA

**RELAÇÃO FUNCIONAL ENTRE *SERINE-ARGININE-PROTEIN-KINASE 2*
(SRPK2) E THYMOSIN BETA 4 (T β 4) EM MELANOMA METASTÁTICO MURINO**

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

Orientador: Gustavo Costa Bressan

Coorientadores: Abelardo Silva Junior
Juliana Lopes Rangel Fietto

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2020

T

S729r
2020

Souza, Juliana Regina Ribeiro de, 1989-
Relação funcional entre *Serine Arginine Protein Kinase 2*
(SRPK2) e *Thymosin Beta 4* (Tbeta4) em melanoma metastático
murino / Juliana Regina Ribeiro de Souza. – Viçosa, MG, 2020.
82 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Gustavo Costa Bressan.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.59-82.

1. Melanoma. 2. Timosina. 3. Proteínas quinases.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica
e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica Aplicada. II. Título.

CDD 22. ed. 616.99477

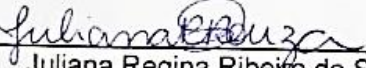
JULIANA REGINA RIBEIRO DE SOUZA

RELAÇÃO FUNCIONAL ENTRE *SERINE ARGININE PROTEIN KINASE 2*
(SRPK2) E *THYMOSIN BETA 4* (T β 4) EM MELANOMA METASTÁTICO MURINO

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

APROVADA: 20 de fevereiro de 2020

Assentimento:


Juliana Regina Ribeiro de Souza
Autora


Gustavo Costa Bressan
Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por nunca me desamparar, me dar força e ajudar a enfrentar toda e qualquer dificuldade para nunca desistir.

Aos meus pais **João Bosco** e **Katya** por estarem ao meu lado, me apoiando, sendo meu porto seguro, ajudando a correr atrás dos meus sonhos, por serem tão especiais e me ensinarem o verdadeiro significado de amor e família.

Ao meu irmão **Bruno** por ser meu melhor amigo, companheiro de aventuras e por compartilhar tantos momentos importantes.

Aos meus **avós** Lauro, Maria, Antônio (*in memoriam*) e Maria Lúcia por serem meus exemplos e estarem em minhas vitórias, seja presencialmente ou no coração.

Aos meus **familiares e afilhados** pelos incentivos e por estarem sempre presentes.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Gustavo Bressan** por ter me recebido tão bem em sua equipe, pela confiança, orientação, carinho e apoio.

À **Regenerx Biopharmaceutical** por fornecer o peptídeo e ao **Prof. Robson Teixeira** o composto, os quais foram utilizados no trabalho.

Aos integrantes do **Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos** pela boa convivência e companheirismo, assim como à **Prof. Juliana Fietto** pelos ensinamentos. Em especial, às “querydas” (**Gabriela, Mônica, Janine, Juliana A., Flávia, Amanda e Graziela**) e aos “querydos” (**Victor G., Lucas, Everton e Raoni**) pelas ajudas na realização do projeto, disponibilidade e por terem me agregado com tanto carinho.

Sou grata por Viçosa ter me apresentado boas pessoas que fazem os meus dias mais alegres. Agradeço ao **Janderson** por estar comigo nos mais diversos momentos, me incentivando, apoiando e dando suporte. À **Jordana**, ao **Gabriel** e ao **Phelipe** pelas conversas e amizade. À **LUVE, Atlético das Biológicas e Studio Proforma** pelos companheiros e momentos que ajudam a aliviar a tensão do trabalho.

Aos meus **amigos**, dos mais antigos aos mais atuais, agradeço pelos encontros, momentos felizes, conversas, companheirismo e por serem grande parte do meu amparo. Em especial à amiga **Paula Mendes** (*in memoriam*) que me acompanhou em toda trajetória sendo uma grande incentivadora, companheira, irmã e que estará para sempre em minhas lembranças e em meu coração.

À **Cláudia Nascimento, Teca Galvão, Marcos Schwarz** e demais professores, colaboradores e colegas de trabalho ao longo da graduação, pelos ensinamentos e ajudas na minha trajetória.

Aos **integrantes da banca**, obrigada pela presença e avaliação deste trabalho.

Agradeço à **Universidade Federal de Viçosa** e ao **Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular** pelo apoio institucional.

Ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (**CAPES**) pelo financiamento para concretização do projeto.

Obrigada a todos que fazem parte da minha história!

*“Eu tentei 99 vezes e falhei, mas na centésima tentativa eu consegui.
Nunca desista de seus objetivos mesmo que esses pareçam impossíveis.*

A próxima tentativa pode ser a vitoriosa.”

Albert Einstein

RESUMO

SOUZA, Juliana Regina Ribeiro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2020. **Relação funcional entre *Serine arginine protein kinase 2 (SRPK2)* e *Thymosin beta 4 (Tβ4)* em melanoma metastático murino.** Orientador: Gustavo Costa Brassan. Coorientadores: Abelardo Silva Junior e Juliana Lopes Rangel Fietto.

O presente trabalho buscou estudar *in vitro* e *in vivo* a relação funcional em modelo de melanoma metastático murino (células B16F10) entre *serine arginine protein kinases* (SRPKs), que estão ligadas à regulação do *splicing* do pré-mRNA pela fosforilação de proteínas SR e são encontradas superexpressas em diferentes tumores, incluindo melanoma, e Thymosin Beta 4 (Tβ4), um peptídeo sequestrador de actina de 4,9-kDa e 43 aminoácidos que desempenha papel na motilidade celular, na transição epitélio-mesenquimal (EMT) e em outras múltiplas atividades biológicas, como cicatrização de feridas, crescimento capilar, inibição da apoptose e metástase tumoral. Observamos que utilizando SRPIN340 e Tβ4 (juntos e separadamente), há diferença na proliferação celular, no modo de migração celular e na formação de colônias, ensaios estes que apresentam o SRPIN340 com resultados reduzidos em comparação ao controle, o Tβ4 aumentados e os dois conjugados tendendo a ter um comportamento intermediário, sugerindo que dividem uma relação funcional. Também há diferença no padrão de fosforilação de proteínas SR (através de ensaio de imunofluorescência), e modificações fenotípicas da actina, possivelmente relacionadas com sequestro de AKT e de G-actina. Visto isso, entender a atuação das SRPKs em interações, como a com o Tβ4, pode levar ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas contra tumores, principalmente metastáticos.

Palavras-chave: SRPKs. Tβ4. Melanoma.

ABSTRACT

SOUZA, Juliana Regina Ribeiro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2020. **Functional relationship between *serine arginine protein kinase 2 (SRPK2)* and *thymosin beta 4 (Tβ4)* in murine metastatic melanoma.** Adviser: Gustavo Costa Brassan. Co-advisers: Abelardo Silva Junior and Juliana Lopes Rangel Fietto.

The present work sought to study *in vitro* and *in vivo* the functional relationship in a model of murine metastatic melanoma (B16F10 cells) between serine arginine protein kinases (SRPKs), that are related to the regulation of pre-mRNA *splicing* by the SR proteins phosphorylation and are found to be overexpressed in different tumors, including melanoma and Thymosin Beta 4 (Tβ4), an actin-hijacker peptide of 4,9-kDa and 43 amino acids that operates in cell motility, in the epithelial-mesenchymal transition (EMT) and in other multiple biological activities, such as wound healing, hair growth, apoptosis inhibition and tumor metastasis. We observed that using SRPIN340 and Tβ4 (together and separately), there is a difference in cell proliferation, in the cell migration mode and in the colonies formation, these trials present the SRPIN340 with reduced results in comparison with the control group, the Tβ4 increased and the two of them combined tending to have an intermediate behavior, suggesting that they share a functional relation. There is also a difference in the SR proteins phosphorylation pattern (through immunofluorescence assay), and actin phenotypic modifications, possibly related to AKT and G-actin hijack. Given this, understanding the role of SRPKs in interactions, such as that with Tβ4, can lead to the development of therapeutic strategies against tumors, especially metastatic.

Keywords: SRPK2. Tβ4. Melanoma.

LISTA DE ABREVIações

AKT – Serina-treonina quinase (também conhecida como PKB - Protein Kinase B)

BSA – Albumina de soro bovino

C57BL/6 – Linhagem isogênica de camundongos com pelagem escura

CEUA – Comitê de ética no uso animais

CLKs – *Cdc-2-like kinase*

DMSO – Dimetilsulfóxido ou Sulfóxido de Dimetilo

DK – Duplo knockout

EGF – Fator de crescimento epidérmico

EGFR – Receptor de fator de crescimento epitelial

ERK – Quinase reguladora de sinal extracelular

EMT – Transição epitélio-mesenquimal

ILK – Quinase ligada à integrina

mRNA – RNA mensageiro

MRTF – Fator de transcrição relacionado ao miocárdio

PBS – Tampão fosfato-salino

PDK1 – Piruvato Desidrogenase quinase 1

PI3K – PhosPholinositide 3 Kinase

RNA – Ácido ribonucleico

RPM – Rotações por minuto

RPMI – Roswell Park Memorial Institute Medium

RS – Domínio rico em arginina (R) e serina (S)

S6K – S6 Kinase

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

Ser-473 – Serina 473

SF2/ASF – Splicing Factor 2

SF3 – Splicing Factor 3

SR – Proteína rica em serina e arginina

SRPIN340 – Inibidor de SRPKs - N-(2-(Piperidin-1-yl)-5-(Trifluoromethyl) Phenyl Isonicotinamide

SRPK1 – Serine-Arginine Protein Kinase 1

SRPK1 KO – Serine-Arginine Protein Kinase 1 knockout

SRPK2 – Serine-Arginine Protein Kinase 2

SRPK2 KO - Serine-Arginine Protein Kinase 2 knockout

SRSF – Serine/arginine rico em fator de splicing

Tβ4 – Thymosin Beta 4

Thr-308 – Treonina 308

TGFβ – Fator de transformação de crescimento

V2 – Vetor vazio

VEGF – Factor de crescimento endothelial vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISAO BIBIOGRÁFICA	13
2.1. CÂNCER E MELANOMA.....	13
2.2. SRPKS: Splicing e proteínas SR	15
2.3. SRPKS: Vias de sinalização e câncer	18
2.4. SRPKS: inibição com SRPIN340.....	21
2.5. Thymosin Beta 4 (Tβ4)	22
2.6. Tβ4 contribui para a migração celular.....	24
2.7. Tβ4 e angiogênese	26
2.8. Tβ4 contribui para EMT em câncer.....	27
2.9. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	28
3. OBJETIVOS	31
3.1. OBJETIVO GERAL	31
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	32
4.1. CULTIVO CELULAR.....	32
4.1.1. Linhagem	32
4.2. OBTENÇÃO SRPIN340, PEPTÍDEO E CÉLULAS MODIFICADAS	32
4.3. ENSAIOS FENOTÍPICOS <i>IN VITRO</i>	33
4.3.1 Ensaio de proliferação com anticorpo anti-ki67.....	33
4.3.2 Ensaio de formação de colônia	34
4.3.3 Ensaio de migração celular	35
4.4 Envolvimento das SRPKs	35
4.4.1 Avaliação de proteínas SR e actina por imunofluorescência	35
4.5 Western Blot	36

4.5.1	Quantificação de proteínas pelo método de Bradford	37
4.6.	ENSAIO <i>IN VIVO</i> - TUMOR SUBCUTÂNEO	37
4.6.1.	Animais e comitê de ética	37
4.6.2.	Crescimento do tumor subcutâneo.....	38
4.6.3	Análises estatísticas.....	38
5.	RESULTADOS	40
5.1.	Verificação do peptídeo na célula de B16F10	40
5.2.	Ensaio fenotípicos em B16F10	40
5.2.1	Ensaio de proliferação.....	40
5.2.2	Ensaio de formação de colônia	41
5.2.3	Ensaio de migração celular	42
5.3	Ensaio de imunofluorescência	43
5.3.1	Avaliação da fosforilação de proteínas SR.....	43
5.3.2	Polimerização da Actina.....	44
5.4	In vivo	45
5.5	Ensaio em células B16F10 <i>knockouts</i> para SRPK1, SRPK2 e SRPK1/SRPK2 (duplo <i>knockout</i>)	47
5.5.1	Avaliação da localização de Tβ4 e da fosforilação de proteínas SR por imunofluorescência	47
5.5.2.	Polimerização de actina em células <i>knockouts</i>	49
5.5.3.	Ensaio de migração.....	50
6.	DISCUSSÃO	51
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	58
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1. INTRODUÇÃO

Eventos de *splicing* anormais podem gerar variantes que contribuem para o desenvolvimento de diversos tipos de câncer, uma vez que alterações no padrão do *splicing* alternativo podem fazer com que as células cancerígenas produzam isoformas que beneficiem o seu desenvolvimento, como o aumento da proliferação celular, crescimento do tumor, aumento da invasividade e a capacidade de formação de metástases (BRINKMAN, 2004). As Serine arginine protein kinases (SRPKs regulam o *splicing* do pré-mRNA pela fosforilação de regiões ricas em serina e arginina presentes nas proteínas SR, uma importante família de fatores de *splicing* (XIAO e MANLEY, 1997).

As SRPKs têm sido observadas com expressão elevada em diferentes tipos de câncer, incluindo melanoma (HAYES *et al.*, 2007; JANG *et al.*, 2008; ROOSMALEN *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2016), o que as tornam potenciais alvos terapêuticos. Visando aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos moleculares relacionados a ação das SRPKs em câncer, nosso grupo de pesquisa previamente realizou triagens de duplo híbrido em leveduras que apontaram o peptídeo Timosina $\beta 4$ (T $\beta 4$) como potencial parceiro de interação de SRPK2 (MELLO, 2014). T $\beta 4$ é um peptídeo que regula a dinâmica da actina em células de mamíferos e tem sido também encontrado em diferentes tipos de câncer, onde regula eventos celulares relevantes como migração, invasão, sobrevivência celular, ativação de células-tronco além de proliferação e metástase (MANNHERZ e HANNAPPEL, 2009; PIAO *et al.*, 2014).

A metástase tumoral é um processo de várias etapas que envolve migração e invasão de células tumorais, angiogênese e crescimento de células tumorais metastáticas. Os resultados de vários estudos sugerem que a expressão da T $\beta 4$ pode ser importante nas metástases tumorais (CHA, 2003; PIAO *et al.*, 2014), assim como as SRPKs (VAN ROOSMALEN *et al.*, 2015; BULLOCK *et al.*, 2016; ZHOU *et al.*, 2018).

Como essas duas moléculas também foram encontradas alteradas em melanoma (MOREIRA *et al.*, 2018; MORITA, HAYASHI, 2018); hipotetizamos que a relação funcional entre elas pudesse levar a uma melhor compreensão das características moleculares do melanoma metastático. Com isso, o objetivo deste trabalho foi obter pistas para o papel da interação SRPK2-T $\beta 4$ no crescimento tumoral e processo metastático em modelo murinho de melanoma.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CÂNCER E MELANOMA

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo, representando cerca de 9,6 milhões de mortes, ou uma em cada seis mortes, em 2018 (WHO, 2019). A característica mais fundamental das células cancerígenas envolve sua capacidade de sustentar a proliferação crônica. Os tecidos normais controlam a produção e liberação de sinais de promoção do crescimento que instruem a entrada e a progressão através do ciclo de crescimento e divisão celular, garantindo assim uma homeostase do número de células e a manutenção da arquitetura e função normais dos tecidos. As células cancerígenas, ao desregular esses sinais, tornam-se mestres de seus próprios destinos (Hanahan e Weinberg, 2011) (Figura 1).



Figura 1: Surgimento do Câncer. multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas (INCA, 2020).

Melanoma é um tipo de câncer que se desenvolve nas células responsáveis pela pigmentação da pele, chamadas de melanócitos. Trata-se de uma lesão maligna potencialmente grave, que pode surgir na pele, nas membranas mucosas, nos olhos e no sistema nervoso central, com grande risco de produzir metástases e com altas taxas de mortalidade nos estágios mais avançados (LIU, 2015). De acordo com a “Skin Cancer Foundation”, no mundo, um em cada três tipos de câncer diagnosticados é de pele, dos quais 4% constitui casos de melanoma. Estes, apresentam tratamento potencialmente eficiente quando tratados no estágio primário (WHO, 2019). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2019), no Brasil, o câncer de pele é o mais frequente e corresponda a cerca de 30% de todos os tumores malignos registrados no país, mas o melanoma representa apenas 3% das neoplasias malignas do órgão.

Devido ao grande risco de desenvolver metástase, o melanoma apresenta altas taxas de mortalidade, sendo responsável por 80% das mortes relacionadas ao câncer de pele (MILLER E MIHM, 2006). Embora o melanoma cutâneo primário possa ser tratado por cirurgia, o melanoma metastático avançado não pode ser tratado apenas por cirurgia e, portanto, requer melhores abordagens terapêuticas (LIU, 2015).

O melanoma, assim como outros tipos de tumores, surge a partir da desregulação de vias de sinalização críticas que controlam a proliferação, migração, invasão, adesão e morte celular (HANAHAN E WEINBERG, 2011). Somado às vias de sinalização, o microambiente contribui para a progressão tumoral uma vez que ele é constituído de componentes importantes para a sustentação do tumor, tais como células imunes, mediadores inflamatórios, citocinas, fatores de crescimento e metaloproteinases (MMps) (GUAN *et al*, 2015, HANAHAN E WEINBERG, 2011) (Figura 2).

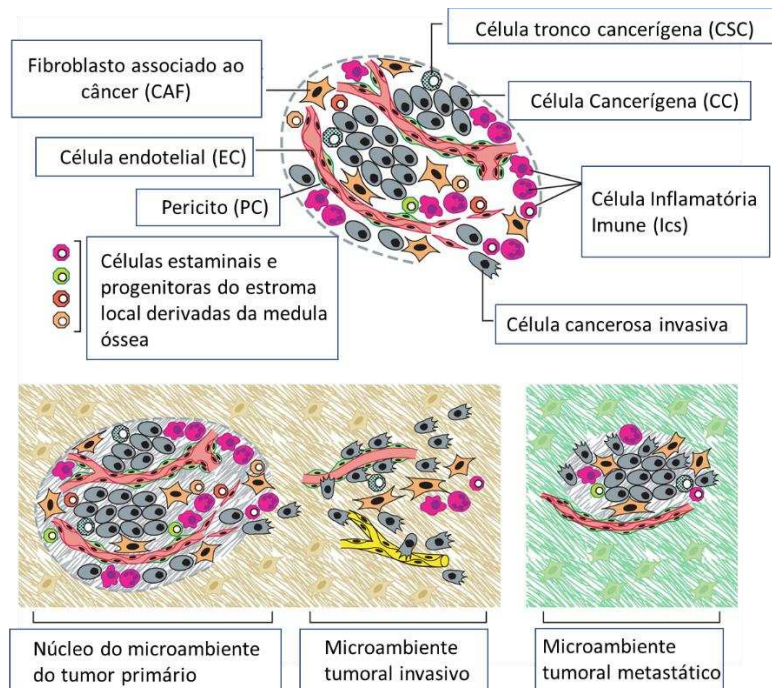


Figura 2: Microambiente do melanoma. O estabelecimento e progressão do melanoma ocorre devido a desregulação de vias de sinalização somados aos fatores presentes no microambiente tumoral, como citocinas, células do sistema imune, mediadores inflamatórios, metaloproteinases e fatores de crescimento (Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011).

Dentro do microambiente epitelial do câncer, as quimiocinas e seus receptores podem influenciar o infiltrado inflamatório (com presença de mediadores inflamatórios, incluindo fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6)

e óxido nítrico (NO), promover ou inibir a angiogênese, modificar o crescimento e a sobrevivência das células tumorais e desempenhar um papel na disseminação metastática (WILSON E BALKWILL, 2002). Uma alteração oncogênica atrai a circulação periférica do tumor os monócitos, neutrófilos e linfócitos que ajudarão a promover o desenvolvimento de tumores, resultando na ativação de fatores de transcrição, principalmente fator nuclear κ B (NF- κ B), transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT3) e fator indutível por hipóxia 1 α (HIF1 α) nas células tumorais. Esses fatores de transcrição coordenam a produção de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas e quimiocinas, bem como a produção de ciclo-oxigenase 2 (COX2) e prostaglandinas e recrutam e ativam vários leucócitos, fazendo com que a inflamação fumegante relacionada ao câncer tenha efeitos promotores de tumores (MANTOVANI *et al.*, 2008). Com isso, o microambiente tumoral também tem um papel relevante no desenvolvimento e metástase do melanoma (PASSARELLI *et al.*, 2017).

2.2. SRPKs: Splicing e proteínas SR

As *serine arginine protein kinases* (SRPKs) constituem uma subfamília de serina-treonina quinases que fosforilam especificamente resíduos de serina que residem em motivos dipeptídicos de serina-arginina/arginina-serina, notadamente presentes em fatores reguladores de *splicing* conhecidos como proteínas SR (GIANNAKOUROS *et al.*, 2011). AS SRPKs possuem um domínio catalítico de aproximadamente 290 aminoácidos dividido em 2 lóbulos, N-terminal e C-terminal, por uma região espaçadora estruturalmente desordenada e pouco conservada (KUROYANAGI *et al.*, 1998) (Figura 3).

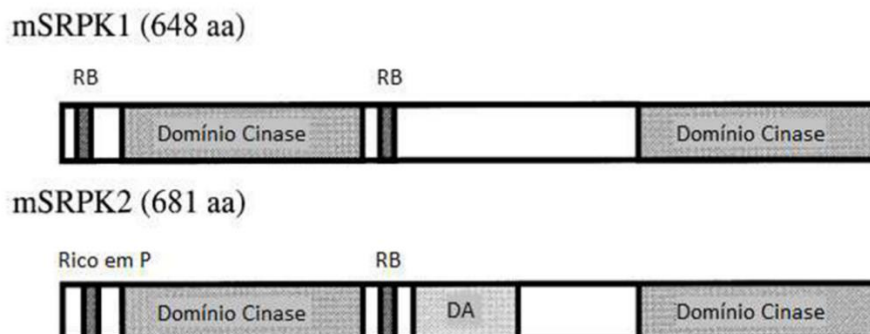


Figura 3: Representação esquemática da estrutura primária das proteínas SRPK1 e SRPK2. RB: região básica; DA: Domínio Ácido; P: Prolina. (Adaptado Kuroyanagi et al, 1998)

Cada membro da família de SRPKs possui seu próprio domínio espaçador, com tamanho e sequência de aminoácidos determinados, além de possivelmente estarem relacionados com uma função específica (GIANNAKOUROS *et al.*, 2011). O domínio espaçador pode ser considerado um efetor em resposta a determinados sinais que controlam a distribuição celular das SRPKs. A localização principalmente citoplasmática das SRPKs é mantida através de interações entre seu domínio espaçador e membros específicos da família de chaperonas moleculares. Entretanto, estas cinases podem ser translocadas para o núcleo em resposta a determinados sinais (ZHONG *et al.*, 2009).

Em mamíferos, a família de SRPK é constituída por três membros: SRPK1, SRPK2 e SRPK3. Esses membros são expressos de forma diferente nos tecidos. SRPK1 ocorre na maioria dos tipos celulares e tecidos, como nos testículos e pâncreas, a SRPK2 é mais elevada no cérebro (WANG *et al.*, 1998), enquanto que a SRPK3 é expressa nas células musculares esqueléticas e coração (NAKAGAWA *et al.*, 2005). Em suas células, o *splicing* do pré-mRNA ocorre em um grande complexo dinâmico de ribonucleoproteínas conhecido como spliceossomo que é composto pelos fatores de *splicing* e pelos pequenos RNAs nucleares (snRNP) U1, U2, U4, U5 e U6, formados por um pequeno RNA estável ligado a proteínas (Query,2009) (Figura 4).

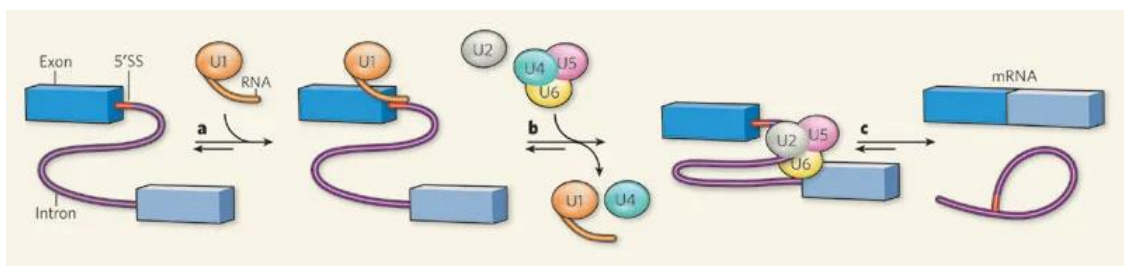


Figura 4: Etapas de formação do spliceossomo e edição do RNAm. O pré-RNAm é formado por regiões codificantes (exons) e não codificantes (introns), que precisam ser editadas pelo spliceossomo. O componente U1 do spliceossomo se liga ao RNA que será editado e posteriormente, as subunidades remanescentes - U2, U4, U5 e U6 – interagem com o complexo RNA-U1. U1 e U4 deixam o complexo, ativando a catálise mediada pelo spliceossomo e o *splicing* do RNA. Finalmente, o spliceossomo remove o íntron e une os exons, deixando o RNAm pronto para ser traduzido. (Query,2009)

Essa maquinaria complexa é capaz de reconhecer elementos na sequência no pré-mRNA que definem os limites dos íntrons e promover a excisão precisa dos mesmos (JURICA e MOORE, 2003). A interação entre o pré-mRNA e os snRNPs durante a montagem do spliceossomo permite a seleção dos sítios de *splicing* e

estabelece um core catalítico para que possa ocorrer a reação de *splicing* no spliceossomo (WANG *et al*, 1998). A maioria dessas interações é mediada pelos fatores de *splicing* não-snRNPs, sendo que os melhores caracterizados pertencem à superfamília de fatores de *splicing* contendo domínios ricos em serina/arginina, as proteínas SR (FU, 1995).

A família de proteínas SR, reguladoras de *splicing*, é altamente conservada e caracteriza-se pela presença de um ou dois motivos de reconhecimento de RNA em sua região aminoterminal, um domínio rico em aminoácidos serina e arginina (SR) em sua extremidade carboxiterminal e outros domínios SR ao longo da cadeia polipeptídica. Os motivos de reconhecimento de RNA são responsáveis pela ligação da proteína ao RNA, enquanto os domínios SR estão envolvidos em diversas interações proteína-proteína importantes durante a montagem do spliceossomo (WANG *et al*, 1998). A localização destas proteínas, é predominantemente nuclear, mas quando não estão envolvidas no processo de transcrição ou de *splicing*, as proteínas SR residem nos speckles nucleares, os quais são subdivisões no núcleo que armazenam os fatores de *splicing* (JANG *et al*, 2008). Ao serem fosforiladas em suas serinas, as proteínas SR saem dos *speckles* e vão para o nucleoplasma onde interagem com o pré-mRNA nascente. O balanço entre fosforilação e desfosforilação promove a escolha correta do sítio de *splicing* e posteriormente a catálise do processo (SHEPARD E HERTEL, 2009) (Figura 5).

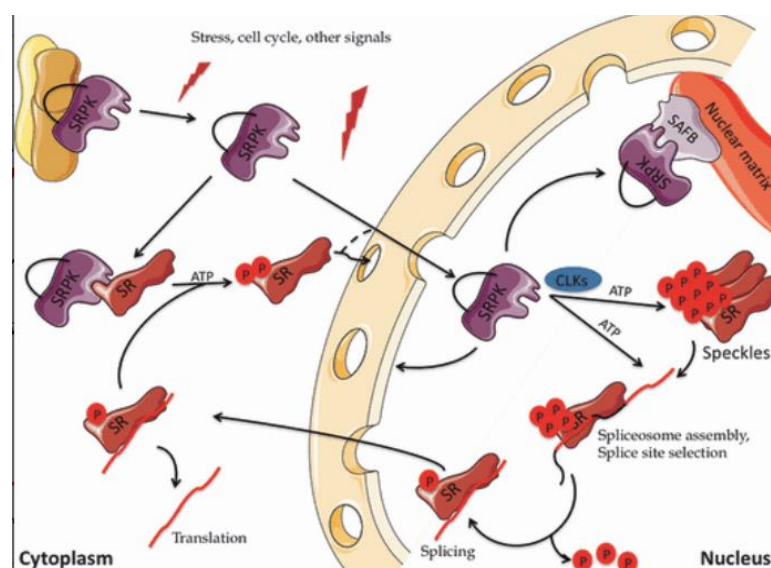


Figura 5: Regulação e função de SRPK na maturação de mRNA (Giannakouros *et al*, 2011).

2.3. SRPKs: Vias de sinalização e câncer

As SRPKs possuem papel essencial na importação nuclear de proteínas SR recém-sintetizadas, pois este transporte ocorre de forma dependente de fosforilação, que na presença de um estímulo, como EGF, as SRPKs podem ser translocadas do citoplasma para o núcleo e participarem da regulação dos níveis de fosforilação das proteínas SR em diferentes fases do *splicing* (DING et al., 2006; ZHONG et al., 2009).

Após o estímulo por EGF, ocorre a interação entre SRPK1 e AKT, que, além de ser importante em diversas vias de sinalização, incluindo migração, diferenciação, proliferação e sobrevivência celular (MANNING E CANTLEY, 2007), induz a autofosforilação de SRPK1, havendo modificações na interação com chaperonas moleculares e permitindo sua translocação para o núcleo (ZHOU *et al.*, 2012). As chaperonas Hsp70 ancoram as cinases de *splicing* no citoplasma, e os complexos Hsp90 facilitam a translocação das SRPKs para o núcleo (ZHOU E FU, 2013).

As SRPKs são consideradas transdutores centrais na via de sinalização de EGF e nos níveis de *splicing* alternativo, sugerindo que o eixo AKT-SRPK-SR constitui o ramo central na transdução de sinal de EGF para regular o programa de *splicing* no núcleo (ZHOU *et al.*, 2012) (Figura 6).

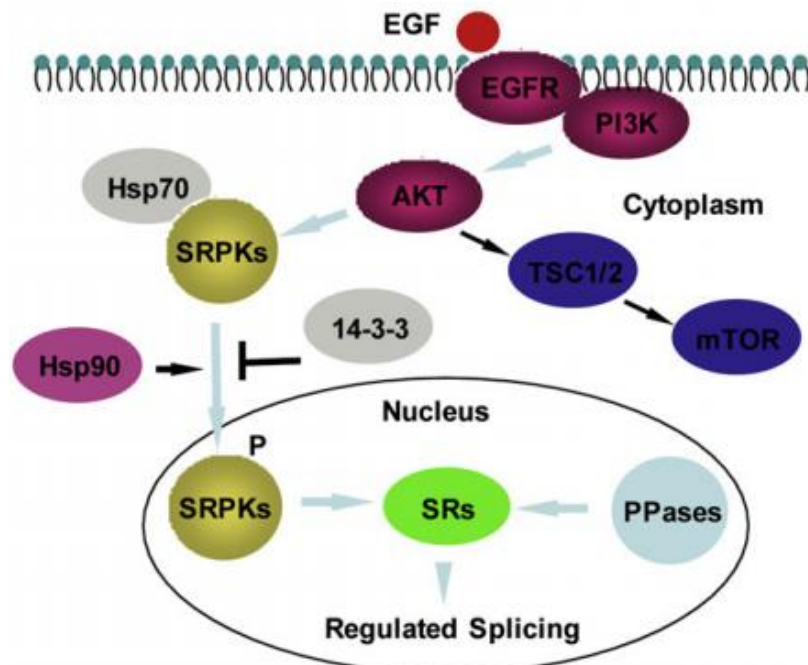


Figura 6: Resumo da sinalização do EGF através do eixo Akt-SRPK-SR para regular o processamento alternativo no núcleo. A Hsp70 é responsável por inibir a importação nuclear das quinases de processamento, a Hsp90 elimina a Hsp70 para facilitar a importação nuclear e as funções 14-3-3 para evitar a acumulação excessiva das quinases de processamento no núcleo (Zhou *et al.*, 2012).

O *splicing* alternativo de pré-mRNA é responsável pela produção de vários mRNAs maduros a partir de um único gene, capazes de atuar em diferentes processos celulares. Eventos de *splicing* anormais, como perda de fidelidade, variação do processo de junção, mudança controlada para alternativas de junção específicas, podem ocorrer durante a progressão do tumor e podem desempenhar um papel importante na carcinogênese, já que as células cancerígenas podem produzir isoformas que beneficiam o seu desenvolvimento, como o aumento da proliferação celular e crescimento do tumor, aumento da invasividade e a capacidade de formação de metástase. Isso ocorre porque os genes normalmente afetados pelas alterações no padrão de *splicing* codificam proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, proliferação, diferenciação, vias de transdução de sinais, morte celular e angiogênese (BRINKMAN, 2004).

Segundo diversos estudos, há uma elevada expressão de SRPKs em diferentes tipos de câncer. Altos níveis de expressão de SRPK1 foram observados em carcinomas de pâncreas, de mama e de cólon (HAYES *et al.*, 2007), gliomas (CHANG *et al.*, 2015), carcinoma e adenocarcinoma de pulmão (GOUT *et al.*, 2012; GONG *et al.*, 2016), carcinoma hepatocelular (ZHOU *et al.*, 2013) e próstata (BULLOCK *et al.*, 2016). O desequilíbrio na expressão de SRPK1 promove o câncer, pois tanto o aumento quanto a diminuição dos níveis de expressão dessas cinases contribuem para o desenvolvimento do tumor (WANG *et al.*, 2014). O aumento da expressão de SRPK2 foi observado em leucemia (JANG *et al.*, 2008), carcinoma das células não-pequenas do pulmão (GOUT *et al.*, 2012) e câncer de cólon (WANG *et al.*, 2016). Além disso, a inibição de SRPKs através da utilização do inibidor farmacológico SRPIN340, apresentou efeitos anti-leucemia (SIQUEIRA *et al.*, 2015).

No contexto de migração celular, Wang e colaboradores 2016, mostram que o aumento das SRPK2 em células de câncer de cólon está diretamente ligado com o aumento do crescimento, migração e tumorigênese. Ao realizarem um *Knockdown* de SRPK2, observam o efeito inverso, comprovando a relação de SRPK2 nos processos de crescimento e migração de células de câncer de cólon. A migração das células tumorais é importante para a disseminação do câncer no organismo a partir do tumor primário. A invasão das células cancerígenas entre os tecidos vizinhos e a formação de metástase em órgãos distantes é uma das principais causas de morte relacionadas ao câncer. Esse processo complexo é caracterizado por

remodelamentos na matriz extracelular e no citoesqueleto, bem como pela reorganização dinâmica da adesão entre células vizinhas e com os tecidos conectivos subjacentes (adesões focais) (ROOSMALEN *et al.*, 2015). (Figura 7)

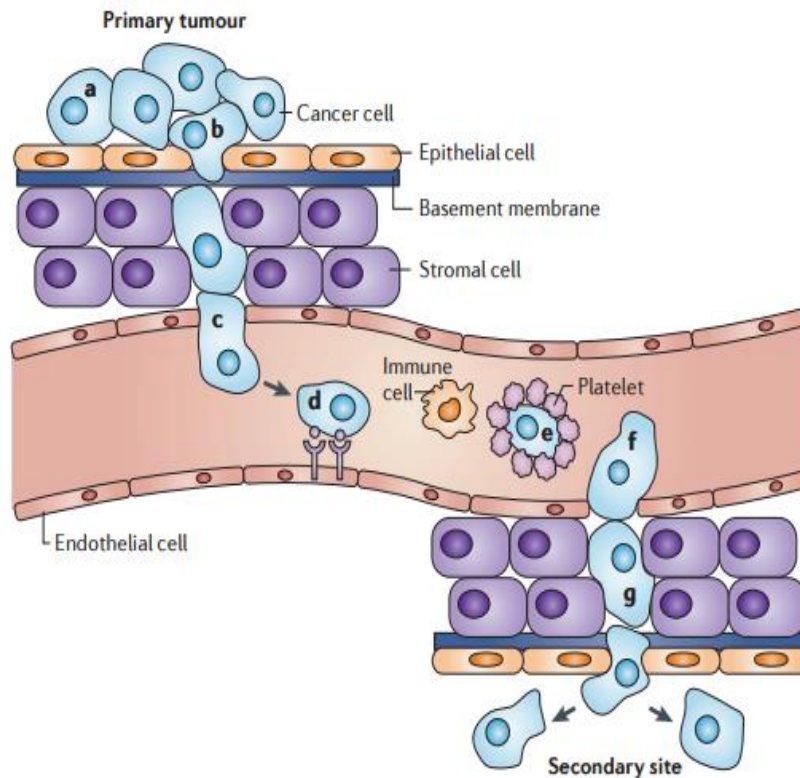


Figura 7: Esquema demonstrando a metástase. As células reduzem a adesão às células vizinhas e migram para os vasos. Na corrente sanguínea as células podem burlar o mecanismo de defesa do sistema imune. Ao sair da corrente sanguínea ocorre a retração das células endoteliais ou morte. (Schroeder *et al.*, 2012).

Outra importante observação, é que a SRPK1 contribui para a regulação do *splicing* alternativo de Rac1b, uma pequena GTPase que promove progressão do ciclo celular e sobrevivência via sinalização de NFκB. A expressão de Rac1b é elevada em tumores de cólon e está correlacionada com o baixo prognóstico para os pacientes (MATOS *et al.*, 2016). A expressão de Rac1b ocorre pelo aumento da inclusão do exon 3 promovido por SRSF1, que se transloca para o núcleo de forma dependente de fosforilação induzida por SRPK1. A depleção de SRPK1 em células de câncer de cólon previne o transporte nuclear de SRSF1 além de induzir sua degradação, limitando sua habilidade de controlar o *splicing* de Rac1b (GONÇALVES *et al.*, 2014) (Figura 8).

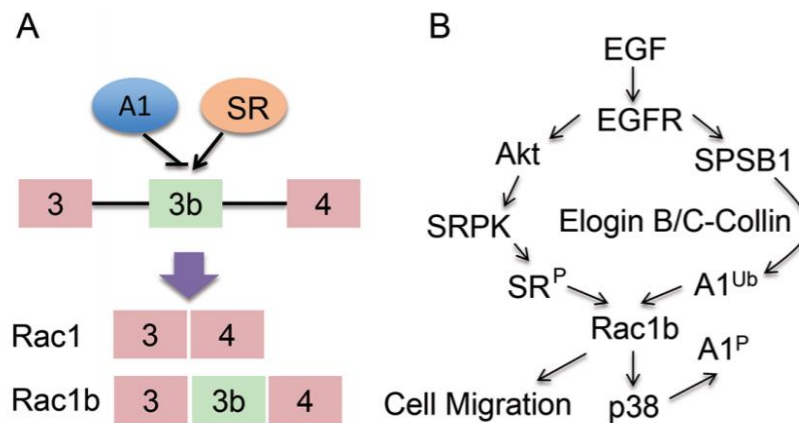


Figura 8: A) *Splicing* alternativo regulado positivamente por proteínas SR. B) EGF ativando SRPK1-2 induzindo o *splicing* de Rac1a

Já as SRPK2, além da sua atuação principal na fosforilação das proteínas SR, já foram relacionadas com outras funções independentes da regulação do *splicing* com importância na progressão do ciclo celular e apoptose (JANG et al., 2009). A atuação nesses processos indica que SRPK2 poderia agir também no desenvolvimento do câncer (WANG et al., 2016).

Cada tipo de câncer pode ativar diferentes vias de sinalização *downstream* pelas SRPKs e causar a alteração de vários processos celulares. Os diversos papéis das SRPKs nestes processos podem ser mediados pela fosforilação de diferentes proteínas SR tecido-específicas ou célula-específicas, dependendo do tumor (BULLOCK, OLTEAN, 2017). Observando as últimas descobertas sobre as diferentes funções das SRPKs fica evidente a necessidade de estudos que visem elucidar os mecanismos moleculares de atuação das SRPKs nas vias de sinalização, *splicing* do pré-mRNA, além de outros processos celulares, sobretudo relacionados ao desenvolvimento do câncer e formação de metástase. Sendo assim, novas descobertas poderão ser feitas sobre o papel oncogênico das SRPKs, permitindo que essas cinases sirvam como potenciais biomarcadores além de poderem ser vistas como alvos terapêuticos atraentes contra o câncer.

2.4. SRPKS: inibição com SRPIN340

Um dos inibidores de SRPK é conhecido como SRPIN340 e é derivado de isonicotinamida N-[2-(1-piperidinil)-5-(trifluorometil) fenil isonicotinamida. Este composto inibe a atividade quinase da SRPK1 e SRPK2 por evitar, de forma

competitiva, a ligação da molécula de ATP ao sítio ativo da enzima, modulando o estado de fosforilação dos fatores de *splicing* SR (Karakama *et al.*, 2010; Anwar *et al.*, 2011) (Figura 9).

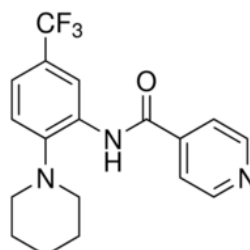


Figura 9: Estrutura do SRPIN340. (Sigma Aldrich, 2019)

Em melanoma o tratamento com SRPIN340 reduziu significativamente a proporção de SRSF1 nuclear e a expressão da isoforma pró-angiogênica VEGF165. Dados *in vivo* corroboraram com esses resultados mostrando uma diminuição do crescimento do tumor (GAMMONS *et al.*, 2014). Assim como foi capaz de reduzir a proliferação, migração, adesão, invasão e formação de colônia em células de melanoma B16-F10. Ensaios *in vivo* apoiaram esses resultados, inibindo também a formação de metástase pulmonar (MOREIRA *et al.*, 2018).

Segundo Gonçalves e Jordan, 2015, em um estudo com câncer colorretal, a inibição da SRPK1 por meio do SRPIN340 promoveu uma diminuição do desenvolvimento tumoral devido á menor expressão da isoforma Rac1b, que contribui para a sobrevivência de células tumorais. Em células de mielóide e leucemias linfóides, esse composto foi capaz de reduzir a viabilidade celular de forma seletiva. Precusores de vias de sobrevivência celular como MAP3K, MAPK1 e AKT foram vistos afetados pelo tratamento com o SRPIN340 (SIQUEIRA *et al.*, 2015).

Com resultados positivos quanto à inibição por esse composto, inibição específica dessas quinases podem ser vantajosas para o tratamento do melanoma metastático.

2.5. Thymosin Beta 4 (Tβ4)

A timosina beta-4 (Tβ4) é um peptídeo sequestrador de actina de 4,9-kDa que contém 43 aminoácidos e apresenta várias funções, desempenhando um papel importante na motilidade celular e promovendo a angiogênese (LV *et al.*, 2013), metástase (CHA *et al.*, 2003), cicatrização de feridas (PHILP *et al.*, 2004), além de apresentar um papel anti-apoptose (MOON *et al.*, 2007), anti-inflamatório (SOSNE *et*

al., 2007) e estar envolvido na via de sinalização de AKT (BOCK-MARQUETTE *et al.*, 2004). É altamente conservado entre as espécies e é encontrado em todos os tecidos e tipos de células, exceto glóbulos vermelhos. (SOSNE *et al.*, 2015), mas foi descrito originalmente como um fator de maturação do timo (LOW *et al.*, 1981). Os níveis diferentes desse polipeptídeo são detectados em diferentes tipos de células e em fluidos corporais. Níveis elevados ocorrem em macrófagos e glóbulos brancos, enquanto as plaquetas contêm níveis mais baixos. É indetectável nos eritrócitos, mas está presente no plasma sanguíneo. Níveis muito altos ocorrem no fluido da ferida e o polipeptídeo pode ser liberado das plaquetas em resposta ao ferimento. Além disso, foi localizada no endotélio do desenvolvimento de vasos sanguíneos e no coração. Curiosamente, em estágios posteriores de desenvolvimento, nem todas as células endoteliais foram positivas para a T β 4, sugerindo que o polipeptídeo pode ser importante para o desenvolvimento de vasos sanguíneos. Tal ação estaria de acordo com os resultados dos efeitos dela na angiogênese (LARSSON, HOLCK, 2007)

É o membro mais abundante e biologicamente ativo da família das β -timosinas, sendo o principal peptídeo sequestrador de G-actina que modula a dinâmica do citoesqueleto em células de mamíferos (MANNHERZ E HANNAPPEL, 2009). Ele liga-se à G-actina, bloqueia a polimerização desta, sugerindo sua importância na cicatrização de feridas (HUFF *et al.*, 2001) (Figura 10).

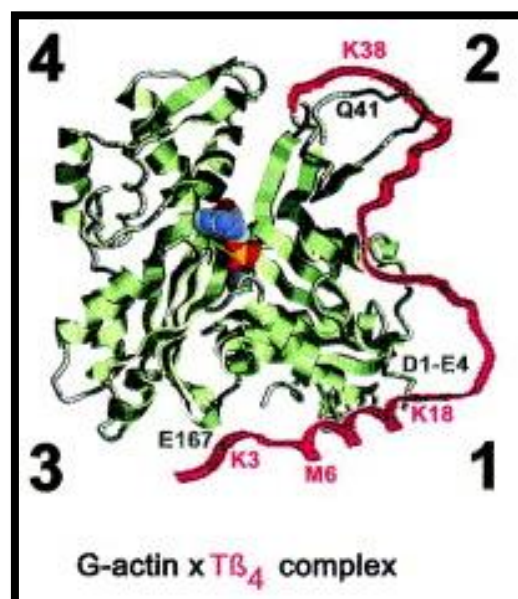


Figura 10: Estrutura de T β 4 associada a G-actina. (Huff *et al.*, 2001)

T β 4 está relacionado com uma ampla variedade de cânceres por ser um regulador de características importantes incluindo migração, invasão, sobrevivência celular, ativação de células-tronco e está diretamente associado ao aumento do crescimento do tumor e metástase (PIAO *et al.*, 2014). Vários estudos mostraram que T β 4 está diferencialmente expresso em diferentes tipos de câncer, como: carcinoma das células não-pequenas do pulmão (JI *et al.*, 2003), câncer de cólon (GEMOLL *et al.*, 2015), pâncreas (ZHANG *et al.*, 2008), fígado (FU *et al.*, 2015), melanoma (CHA *et al.*, 2003) e em carcinoma das células escamosas orais (HONG *et al.*, 2016).

A migração promovida por T β 4 ocorre através de múltiplas vias, mas a migração direta envolve a capacidade de T β 4 se ligar à actina (SOSNE *et al.*, 2015) (Figura 11).

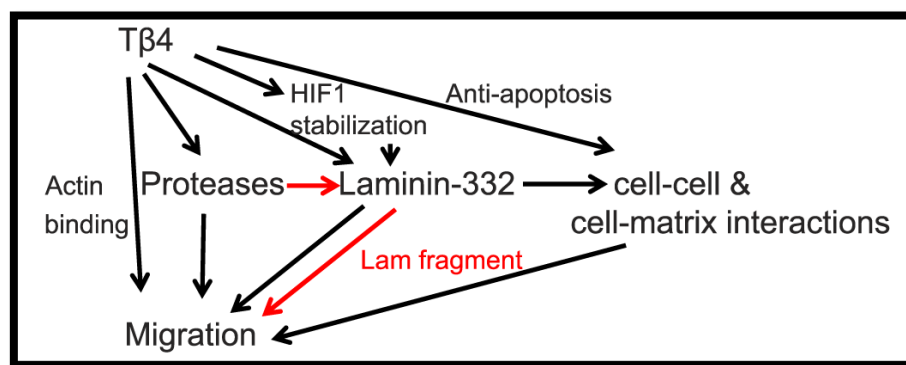


Figura 11: Esquema mostrando o T β 4 envolvido, por diversas vias, com a migração. (Sosne *et al.*, 2015)

2.6. T β 4 contribui para a migração celular

A migração celular, um evento crucial para a metástase do tumor, depende da montagem dinâmica da actina, um evento regulado pelas Rho GTPases como RhoA, Cdc42 e Rac1 (YAMAZAKI *et al.*, 2005). As proteínas Rac pertencem à família de pequenas Rho GTPases e podem ser encontradas na forma inativa ligada a GDP, ou na forma ativa ligada a GTP. A interconversão entre esses dois estados é finamente controlada pela taxa de troca de nucleotídeos de guanina e pela hidrólise de GTP, que são aceleradas pelos fatores de troca de nucleotídeos (GEFs) e pelas proteínas ativadoras de GTPase (GAPs), respectivamente (VAN AELST E D'SOUZA-SCHOREY, 1997). Rac ligada ao GDP se encontra sequestrada no citoplasma através da interação com inibidores de dissociação Rho-GDP (GDI). Em resposta a sinais

externos, como fatores de crescimento ou ligantes de integrinas, ocorre o recrutamento de Rac para a membrana plasmática e a interação de Rac com GEFs. A ativação de Rac e a interação com efetores iniciam cascatas de sinalização que controlam diversas funções celulares, como a reorganização do citoesqueleto, modificações morfológicas celulares e mobilidade celular (BURRIDGE E WENNERBERG *et al.*, 2004). Rac1b, uma isoforma de Rac1, apresenta uma reduzida atividade intrínseca de GTPase, aumento da atividade de troca GDP/GTP e baixa habilidade de interagir com os inibidores de dissociação de GDP (FIEGEN *et al.*, 2004). O aumento da expressão de Rac1b pode ser visto em determinados tipos de tumores, como câncer de mama (SCHNELZER *et al.*, 2000), pulmão (ZHOU *et al.*, 2013) e colorretal (JORDAN *et al.*, 1999). A *up*-regulação de Rac1b resulta no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, além de mediar Transição Epitélio Mesenquimal (EMT) induzido pelas metaloproteinases-3 (MMP-3) (RADISKY *et al.*, 2005). A condição de hipóxia/reoxigenação (H/R) é um evento importante que ocorre no microambiente tumoral, pois contribui para a resistência aos medicamentos anti-câncer e leva ao aumento da migração das células cancerígenas (HARRIS, 2002). Células HeLa sob condições de H/R apresentam capacidade de migração aumentada, níveis maiores de T β 4 e maior atividade das GTPases Rac1 e Rap1. A diminuição da atividade de Rac1 e Rap1 ocorreu através do *knockdown* de T β 4 nessas células. Juntos, esses resultados indicam que a migração de células cancerígenas pode ser dependente da ativação de Rap1 e Rac1, mediada por T β 4 (LEE *et al.*, 2015).

Células de câncer de cólon superexpressando T β 4 também possuem alta capacidade de migração e altos níveis de expressão de ILK e IQGAP1, um ativador de Rac1. Este estudo mostrou que o aumento da migração das células superexpressando T β 4 ocorre devido à ativação de Rac1 (TANG *et al.*, 2011). Células de câncer de próstata superexpressando T β 4 apresentaram um aumento da formação de pseudopodia baseada em actina e migração celular. Apesar de T β 4 ativar diferentes vias de sinalização, como ILK (BOCK-MARQUETTE *et al.*, 2004) ou Erk (OH *et al.*, 2006), a formação de pseudopodia nas células LNCaP foi diminuída através da inibição de PI3K, um regulador positivo de ILK que leva à ativação de Cdc42 e Rac e conseqüentemente, à formação de pseudopodia. Essas observações sugerem que

a ativação da via de sinalização de PI3K por T β 4 é uma possível explicação para a formação de pseudopodia nas células LNCaP (ITO *et al.*, 2009).

2.7. T β 4 e angiogênese

A angiogênese aumenta a ocorrência de metástase em sítios periféricos através da migração das células tumorais (MOON *et al.*, 2010), e vem sendo considerada uma das atividades mais importantes de T β 4 no desenvolvimento do tecido e malignidade. Estudos mostram que T β 4 induz a angiogênese por promover a migração de células endoteliais e de outras células vasculogênicas (CHA *et al.*, 2003). Entretanto, o mecanismo preciso pelo qual T β 4 dirige a angiogênese e a migração celular não estão bem definidos.

O fornecimento de oxigênio em tumores sólidos é frequentemente diminuído porque as células tumorais crescem mais rapidamente do que as células endoteliais que formam os vasos sanguíneos. A adaptação das células tumorais à hipóxia é essencial para o estabelecimento do tumor primário e sua progressão. A expressão de muitos genes, induzíveis por hipóxia, é controlado por HIF-1, um fator de transcrição composto pelas subunidades HIF-1 α e HIF-1 β . Em tumores, a atividade de HIF-1 depende da disponibilidade de HIF-1 α , citosólico, que é rapidamente degradada pela via ubiquitina-proteassomo em normoxia. Em hipóxia ocorre a inibição da degradação de HIF-1 α , que se transloca para o núcleo e, juntamente com HIF-1 β , estimula a angiogênese por ativar a transcrição de VEGF (HUANG *et al.*, 1998).

Inicialmente foi descoberto que quando T β 4 está superexpresso em células B16F10 e ocorre o aumento do número de vasos sanguíneos no tumor sólido através do aumento da expressão de VEGF (CHA *et al.*, 2003). Posteriormente, identificou-se que T β 4 aumenta a expressão de VEGF porque estabiliza a subunidade HIF-1 α em nível de proteína, impedindo a sua degradação pelo sistema ubiquitina-proteassomo e possibilitando sua translocação nuclear (JO *et al.*, 2010). Resultados semelhantes foram observados em células HeLa em condição que hipóxia, em que a estabilização de HIF-1 α por T β 4 foi mediado pela ativação de ERK através do aumento dos níveis de ERK fosforilado (OH *et al.*, 2008). Em câncer de cólon, T β 4 e HIF-1 α co-localizam, o que suporta a conclusão de que T β 4 está envolvida no aumento da estabilidade de HIF-1 α para induzir a expressão de VEGF (JO *et al.*, 2010).

2.8. T β 4 contribui para EMT em câncer

A transição epitelial-mesenquimal (*epithelial-mesenchymal transition*, EMT) é um processo caracterizado pela perda das características originais das células tumorais e o ganho do fenótipo mesenquimal, além da produção de células isoladas não-polarizadas, embebidas na matriz extracelular (LEVAYER E LECUIT, 2008). Em nível molecular, EMT requer múltiplos eventos, como o rompimento das junções intercelulares, perda da polaridade celular, rompimento dos microtúbulos e a ruptura da membrana basal. Esse processo tem sido considerado uma etapa chave na progressão do câncer, pois permite que as células tumorais adquiram um comportamento invasivo e sejam capazes de se translocarem a partir do tumor primário, penetrarem no epitélio vascular, entrarem na circulação e formarem metástases nos órgãos distantes (NEMOLATO *et al.*, 2012).

T β 4 está superexpresso em câncer colorretal e interfere na expressão de marcadores de EMT, como E-caderina, N-caderina, vimentina, fibronectina e MMP-2, promovendo adesão celular, invasão e migração. Um exemplo foi o estudo que demonstra que a superexpressão de T β 4 nas células de carcinoma SW480 de cólon provoca uma diminuição dramática em ambos os totais e intercelulares níveis da E-caderina, que foi postulado como resultado de uma ruptura da junção aderente devido à despolimerização dos microfilamentos de actina desencadeados por esse peptídeo (WANG *et al.*, 2004). O T β 4 desencadeia um EMT no carcinoma colorretal ao regular positivamente a ILK. A atividade da ILK nesses processos é regulada de maneira dependente de PI3K. A PI3K ativada estimula a atividade da ILK, que estimula a fosforilação de dois alvos a jusante, AKT e GSK-3 β . (KIM, JANG, 2015). Os efeitos promovidos por T β 4 são mediados pela via de sinalização ILK/Akt/ β -catenina (PIAO *et al.*, 2014). Efeitos semelhantes foram observados em células de carcinoma de células escamosas bucal, em que houve alteração da expressão dos marcadores de EMT, além de induzir a ativação de MMP-2 (HONG *et al.*, 2016). O papel de T β 4 em EMT também já foi relatado em adenocarcinomas colorretais de pacientes, sendo que a maior expressão de T β 4 foi identificada na porção infiltrativa frontal do tumor sofrendo EMT, contribuindo para favorecer a invasão (NEMOLATO *et al.*, 2012). A elucidação dos mecanismos moleculares da atuação de T β 4 no processo de EMT ainda é um desafio. Entretanto, a determinação de que forma T β 4 é capaz de realizar

essas e outras funções que favorecem o desenvolvimento do tumor faz com que este peptídeo seja considerado um possível alvo para terapias anti-câncer.

Uma outra via na qual o T β 4 está envolvido é a de TGF β , que segundo Morita e Hayashi (2018), TGF β facilita a expressão de T β 4 e leva à ativação de fatores de transcrição relacionados ao miocárdio (MRTF), que são coativadores do fator de resposta sérica (SRF) e regulam a expressão de genes críticos para a transição epitelial-mesenquimal (EMT) e metástase tumoral. T β 4 ligada a G-actina, não permite que haja interação desta com MRTFs, já que o domínio T β 4 WH2 e os motivos MRTF RPEL interagem competitivamente com a mesma chave hidrofóbica na molécula de actina. Então, um aumento do nível de T β 4 provoca a dissociação do complexo actina / MRTF e, conseqüentemente, o acúmulo e ativação da MRTF nuclear, uma vez que com a ligação da G-actina, a timosina β 4 (T β 4) induz a translocação de MRTF para o núcleo (Hinkel *et al*, 2014). A via TGF β / T β 4 / MRTF / SRF é crítica para metástase e progressão tumoral. (MORITA *et al*, 2018)

2.9. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

No presente estudo, hipotetizamos que existe uma relação funcional entre SRPKs e T β 4. Visto isso, o estudo sobre as interações entre proteínas e suas consequências têm sido cada vez mais exploradas e são muito importantes para o entendimento de mecanismos moleculares envolvidos em diferentes processos celulares. O caráter oncogênico das SRPKs tem sido bem evidenciado, porém, há muito a se decifrar sobre seus mecanismos de atuação nos diferentes tipos de câncer, sobretudo no que diz respeito às particularidades da função e mecanismos regulatórios que controlam a atividade de cada uma (SRPK1 ou SRPK2) nos tumores em que estão superexpressas. Tais detalhes são importantes pois podem impactar diretamente no desenvolvimento de estratégias terapêuticas baseadas na inibição dessas enzimas.

Além do papel sequestrador de G-actina desempenhado por T β 4, esta molécula parece atuar de forma muito mais ampla em tumores, como em processos anti-apoptóticos, angiogênicos e de estímulo à migração e invasão. Além disso, já foi mostrado que T β 4 é requerida para o *splicing* adequado da proteína muscular titina em cardiomiócitos, apesar do mecanismo exato de sua atuação ainda ser desconhecido (SMART *et al.*, 2017). Isso leva a especular que T β 4 pode estar também

atuando na regulação do *splicing* de outras proteínas no contexto tumoral potencialmente via SRPK2.

Ademais, T β 4 é mostrada envolvida em diferentes vias de sinalização, como por exemplo a de TGF β (MORITA, HAYASHI, 2018) e Integrinas (HUANG, 2007; BOCK MARQUETTE, 2004), sendo que ambas culminam na ativação de AKT. As SRPKs, por sua vez, são reguladas por AKT no contexto da via desencadeada por EGF (ZHOU *et al.*, 2012). Portanto, eventos de *cross-talk* entre essas vias podem ser possíveis através da interação SRPK2- T β 4 no contexto tumoral.

Portanto, foi feito um esquema com eventos de sinalização que demonstram a potencial relação entre T β 4 e SRPK2. A principal via de sinalização é a de EGF, no qual o eixo AKT-SRPK-SR constitui o ramo central na transdução de sinal de EGF para regular o programa de *splicing* no núcleo (ZHOU *et al.*, 2012). Como esta via de sinalização já está bem descrita na literatura, (DING *et al.*, 2006; ZHONG *et al.*, 2009; MANNING E CANTLEY, 2007; ZHOU E FU, 2013), ela se apresenta como o eixo principal com as setas preenchidas, mostrando a translocação pro núcleo de SRPKs e a influência no *splicing*. Já foi visto que o T β 4 forma um complexo com PINCH e ILK e fosforila AKT que é ativado por PI3K (Fukuda *et al.*, 2003), o que mostra uma ligação entre as duas vias (EGF e Integrinas). A partir daí, pode-se sugerir que um dos caminhos posteriores após fosforilação de AKT pelo complexo, pode ter ligação com a SRPK2, o que foi colocado como linhas tracejadas. O esquema também mostra que T β 4 está diretamente ligado com a actina, uma vez que este é um peptídeo sequestrador de G-actina, que modula a dinâmica do citoesqueleto em células de mamíferos (MANNHERZ e HANNAPPEL, 2009) (Figura 12).

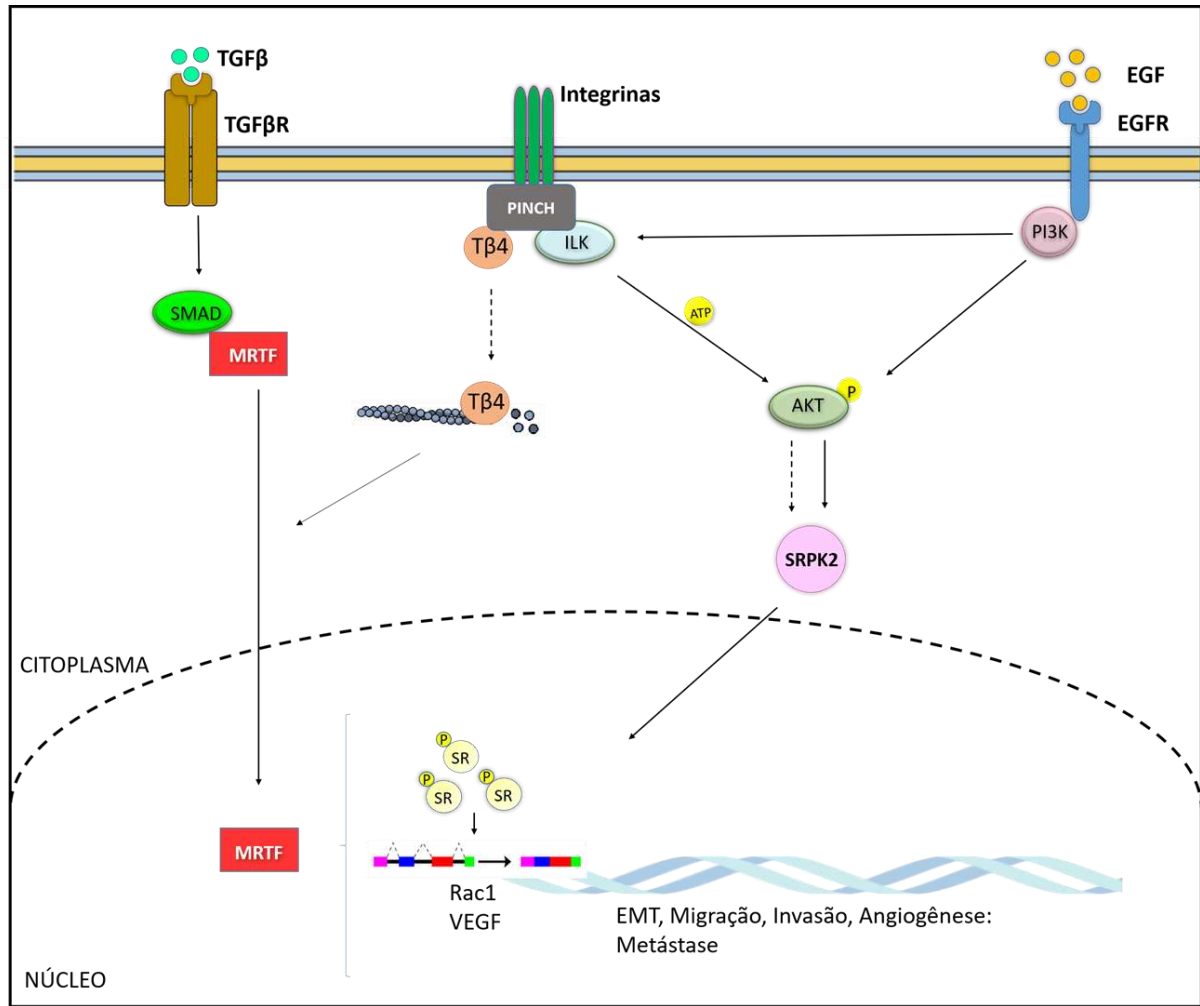


Figura 12 : Eventos de sinalização que demonstram a potencial relação entre Tβ4 e SRPK2. Via de EGF, como ramo central na transdução de sinal de EGF para regular o programa de splicing no núcleo. Via de TGFβ mostrando que Tβ4 tem relação com os fatores de transcrição do miocárdio (MRTF). O PI3K ativando o complexo Tβ4-PINCH-ILK, fosforilando AKT, e, posteriormente com linhas pontilhadas incidindo hipótese, a continuação por SRPK2 regulando os eventos nucleares. Também é mostrado o Tβ4 com ligação direta à actina, uma vez que é um peptídeo sequestrador de G-actina.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a relação funcional entre SRPKs e T β 4 no contexto do melanoma metastático murino.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a influência da relação de SRPK2 e T β 4 em ensaios fenotípicos como proliferação celular, formação de colônia e migração;
- Avaliar a influência da relação de SRPK2 e T β 4 em fosforilação de proteínas SR;
- Avaliar a influência da relação de SRPK2 e T β 4 em polimerização dos filamentos de actina;
- Investigar o desenvolvimento do melanoma subcutâneo em camundongos C57BL/machos inoculados com células B16F10, com aplicação dos tratamentos propostos;
- Avaliar a influência da relação de SRPK e T β 4 em células knockouts para SRPK1, SRPK2 e Duplo knockout na localização de T β 4, fosforilação de proteínas SR e polimerização de actina;
- Observar a influência da relação de SRPK e T β 4 com as células knockouts para SRPK1, SRPK2 e Duplo knockout no ensaio de migração.

4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.1. CULTIVO CELULAR

4.1.1. Linhagem

Para todas as análises, as células de melanoma B16F10 (cedidas pela professora Anésia do Departamento da Biologia Geral da UFV) foram cultivadas em garrafas de cultivo celular, com meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium, Sigma), suplementado com 10% de SFB - Soro Fetal Bovino (GIBCO, CAT 10270-106, USA), 11ml/L de tampão Hepes, 10mL/L de antibióticos penicilina-estreptomicina em 0,85% salina (GIBCO, CAT 15140148, USA).

Para o desenvolvimento dos experimentos, as células serão desprendidas das garrafas de cultivo através da exposição à tripsina (3mL) por 10 minutos, coletadas em tubos de 15 mL, centrifugadas a 1500rpm por 6 minutos, ressuspensas em meio RPMI, contadas em Câmara de Neubauer e plaqueadas conforme a necessidade.

4.2. OBTENÇÃO DO SRPIN340, DO PEPTÍDEO E DE CÉLULAS MODIFICADAS

A síntese do inibidor de SRPKs, SRPIN340, (FUKUHARA *et al.*, 2006; HAGIWARA *et al.*, 2009) foi realizada em parceria com o grupo do professor Dr. Róbson Ricardo Teixeira do Departamento de Química da UFV. Em Moreira *et al.*, 2018, mostrou-se a atividade de SRPIN340 e outros derivados em células B16F10. Várias concentrações foram testadas e observou-se diminuição em todos os ensaios - migração, invasão, adesão celular e formação de colônias - na concentração de 25 μ M. Por isso, foi a concentração escolhida para realização dos ensaios desenvolvidos.

O peptídeo T β 4 foi conseguido com a empresa farmacêutica Regenerx Biopharmaceutical. Foram recebidos 20mg do peptídeo liofilizado, 99% de pureza. A ressuspensão foi feita em H₂O miliQ. A concentração utilizada do T β 4 foi de 100ng/mL, a qual foi utilizada diversos estudos realizados com o peptídeo, como a superexpressão de T β 4 em câncer pancreático em humanos (ZHANG, 2008), promovendo migração de células cardíacas (EVANS *et al.*, 2013), regulando a via de sinalização pró-inflamatória TLR (SANTRA *et al.*, 2014), aumento de proliferação de células em palato de rato (ZHU, 2014) e tendo indícios da necessidade do T β 4 para que ocorra o correto *splicing* de titina (SMART *et al.*, 2017).

Em parceria com a pesquisadora Ângela Saito, pesquisadora e coordenadora no Laboratório de Organismos Modelo do LNBio/CNPEM, foi feita a técnica de CRISPR CAS9 para obtenção de células modificadas, obtendo assim o grupo controle V2, e células knockouts para SKPK1, SRPK2 e duplo knockout.

4.2.1 Verificação do peptídeo na célula B16F10

Foi adquirido o anticorpo Rabbit anti-T β 4 (RayBiotech) para realização de ensaios com marcação de T β 4. Para averiguar a presença e localização do T β 4 na célula de B16F10 tratada, fez-se imunofluorescência com o anti-T β 4 1:100. Posteriormente, foi feito um western blot para também comprovar que o peptídeo se encontrava na célula

4.3. ENSAIOS FENOTÍPICOS IN VITRO

4.3.1 Ensaio de proliferação com anticorpo anti-ki67

O ensaio de proliferação usando o anticorpo anti-Ki67 (Rabbit Anti-Ki67 antibody, sp6,ab16667, Abcam), foi feito por imunofluorescência, de modo com que se observe, no tempo de 24 horas, o número de células marcadas. O Ki67 é um marcador sensível e específico de proliferação muito usado em laboratórios de patologia devido ao poder de diagnóstico e prognóstico no câncer. Também é visto que se relaciona com metástases e estágio clínico dos tumores. (Li et al, 2014).

Para isso, 1×10^5 células foram plaqueadas em placas de 24 poços contendo uma lamínula circular previamente lavada e autoclavada. As células foram incubadas com meio e soro fetal bovino e após 24 horas, os poços foram tratados com 0,4% DMSO (controle), SRPIN340 25 μ M (Tratado com SRPIN340 e DMSO), T β 4 100ng/mL (Tratado com T β 4 e DMSO) e com ambos (Tratado com T β 4, SRPIN340 e DMSO) permanecendo então por 24 horas.

Após o período determinado de tratamento, o meio de cultivo foi descartado e as células foram lavadas com 1 ml de PBS e fixadas com 200 μ l de solução paraformaldeído 4 % (v/v) diluído em PBS por 20 minutos. Para a permeabilização e bloqueio, foram adicionados 250 μ l de Triton X-100 0,25 % (v/v) e 2 % (m/v) de BSA diluídos em PBS, mantidas em leve agitação por 1 hora e depois lavadas três vezes com PBS. Após as lavagens, as células foram incubadas durante 1 h com o anticorpo

primário Rabbit Anti-Ki67 antibody – sp6 - (ab16667) diluído em solução de bloqueio (BSA 2% m/v em PBS). Foi utilizado o anti-Ki67 produzido em camundongo 1:100. Após a incubação com o anticorpo primário, as lamínulas foram lavadas quatro vezes com PBS e incubadas com o anticorpo secundário anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 (Thermo Scientific) por 1 h. Em seguida foram novamente lavadas cinco vezes com PBS. Para marcação do núcleo as células foram lavadas com PBS e as lâminas foram montadas utilizando Prolong Gold® com DAPI (Molecular Probes). As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência EVOS® utilizando os filtros DAPI LED CUBE e GFP LED CUBE e o gráfico montado com programa GraphPadPrism 5.0 (GraphPadSoftware Inc., EUA).

4.3.2 Ensaio de formação de colônia

Para complementar a análise sobre a proliferação celular foi avaliado o efeito dos inibidores sobre o potencial replicativo de uma única célula, com base no ensaio de formação de colônia ou ensaio de clonogenicidade. Como controle, foram usadas células tratadas apenas com 0,4% DMSO. Os tratamentos com o inibidor SRPIN340 25 μ M e o peptídeo T β 4 100ng/mL foram realizados por 24 horas. Para tal, 1×10^3 células/poço em 1,5 mL de meio de cultura RPMI serão semeadas em placas de cultura de 6 poços, fazendo os tratamentos em triplicata. Ultrapassado o período de 24 horas, os poços serão lavados 3x com PBS e o meio de cultura foi adicionado, sendo esta, subsequentemente substituído a cada 3 dias. Após o período de 7 dias de experimento, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% e coradas com azul de toluidina 1% (sigma). Agregados com mais de 50 células foram reconhecidos como colônia e classificados como sobreviventes. As colônias foram identificadas por meio de análise com microscópio óptico. Foram considerados os valores referentes ao controle negativo correspondentes a 100% de viabilidade celular. As imagens representativas das colônias foram obtidas através de fotografia macroscópica dos poços da placa de cultivo. Posteriormente, foi feito o gráfico com o programa GraphPadPrism 6.0 (GraphPadSoftware Inc., EUA).

4.3.3 Ensaio de migração celular

A migração celular foi avaliada pelo ensaio wound healing, no qual um risco com uma ponteira de 200 μ L é feito na placa de cultivo de forma a desfazer a monocamada de células. A porcentagem de fechamento desse risco, medido com auxílio de programas de tratamento de imagens, é um indicativo da migração celular.

Para o ensaio, 1×10^5 células B16F10 foram semeadas em cada poço de placas de 24 poços e mantidas em incubadora com 5% de CO₂ a 37° C, em atmosfera úmida por 48 horas ou até atingirem a confluência. Após esse tempo, foi feito um risco vertical reto no centro de cada poço da placa e posteriormente, os poços foram lavados com cuidado duas vezes com meio (1mL). Após a lavagem, 1mL de meio foi adicionado em cada poço e as células foram tratadas: Controle (tratado apenas com 0,4% DMSO), SRPIN340 25 μ M (Tratado com SRPIN e DMSO), T β 4 100ng/mL (Tratado com T β 4 e DMSO) e com ambos (Tratado com T β 4, SRPIN340 e DMSO). Os tratamentos foram feitos em triplicata na placa e o experimento também foi repetido em triplicata. Após a adição do SFB e das drogas os poços foram fotografados com auxílio do programa LASV3.8 no tempo 0 e monitorados por fotografias até o tempo de 24 horas (Ferreira et al., 2013). Posteriormente, foi feito o gráfico com o programa GraphPadPrism 5.0 (GraphPadSoftware Inc., EUA).

4.4 Envolvimento das SRPKs

4.4.1 Avaliação de proteínas SR e actina por imunofluorescência

Avaliação de proteínas SR e actina por imunofluorescência

As células B16F10 serão incubadas com meio e soro fetal bovino e após 24 horas, os poços serão tratados com scFvs ou PBS. Após 24h, o meio de cultivo foi descartado e as células foram lavadas com 1 ml de PBS e fixadas com 200 μ l de solução paraformaldeído 4 % (v/v) diluído em PBS por 20 minutos. Para a permeabilização e bloqueio, foram adicionados 250 μ l de Triton X-100 0,25 % (v/v) e 2 % (m/v) de BSA diluídos em PBS, mantidas em leve agitação por 1 hora e depois lavadas três vezes com PBS. Após as lavagens, as células serão incubadas durante 1 h com o anticorpo primário diluído em solução de bloqueio (BSA 2% m/v em PBS). Foi utilizado o anti-SRSF3 produzido em camundongo 1:100 (BD Biosciences). Após a incubação com o anticorpo primário, as lamínulas serão lavadas quatro vezes com

PBS e incubadas com o anticorpo secundário anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 (Thermo Scientific) por 1 hora. Em seguida serão novamente lavadas cinco vezes com PBS.

Para melhor visualização da localização intracelular das proteínas em estudo, será realizada a marcação dos filamentos de actina utilizando Rhodamine Phalloidin (Thermo Scientific) por 20 minutos. Para marcação do núcleo as células serão lavadas com PBS e as lâminas serão montadas utilizando Prolong Gold® com DAPI (Molecular Probes). As imagens serão obtidas em microscópio de fluorescência EVOS® utilizando os filtros DAPI LED CUBE e GFP LED CUBE e o gráfico foi gerado com o programa GraphPadPrism 6.0 (GraphPadSoftware Inc., EUA).

4.5 Western Blot

Para teste do anticorpo anti- T β 4, usou-se como controle uma célula de B16F10 sem o peptídeo. Fez-se o tratamento da célula com o T β 4 100ng/mL por 24 horas. Após esse período o sobrenadante foi descartado, as células foram tratadas com tripsina, para desprendimento da monocamada celular, lavadas com PBS e centrifugadas. O pellet celular foi então lisado em tampão PBS 1x (1% V/V de NP40, 1mmol/L de EDTA, 150mmol/L de NaCl e 10mmol/L de Tris pH 7,4) suplementado com inibidores de proteases e fosfatases (Sigma) (Aprotinina, Leupeptina, Pepstatina, Ortovanodato de sódio e NaF). Foi utilizada a proporção de 50 μ L de tampão de lise para 2x10⁶ células. As amostras foram incubadas em gelo por 10 minutos, ressuspendidas vigorosamente com pipeta e centrifugadas para a remoção de partículas celulares insolúveis. O sobrenadante foi então adicionado ao tampão de amostra 2x (Tris/HCl 100mM pH 6,8, SDS 4% V/V, azul de bromofenol 0,2% V/V e glicerol 20% V/V) na proporção 1:1 e aquecido a 80°C por 5 minutos.

A corrida eletroforética foi realizada em gel de poliacrilamida 12% aplicando-se 40 μ g de proteínas totais em cada canaleta. A corrida foi iniciada em 70 volts e, após passar pelo *starting gel*, a voltagem foi aumentada para 120 volts até o final. Posteriormente as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Biorad) a 250 mA por 2 h a 4 °C em tampão de transferência (39 mM de glicina, 48 mM de tris base e 20% de metanol). As membranas foram bloqueadas overnight em TBS-T (50 mM Tris-Cl, pH 7,6, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Tween 20) contendo 2 % de

BSA (Sigma). No dia seguinte, as membranas foram lavadas em TBS-T três vezes por 5 minutos cada e incubadas com o anticorpo primário por 1 h. O anticorpo anti-T β 4 (RayBiotech), nas concentrações de 1:1000 e 1:3000. As membranas foram lavadas em TBS-T três vezes durante 10 minutos cada e posteriormente foram incubadas por 1 h com o anticorpo secundário Anti-Mouse IgG (whole molecule)-Peroxidase (Sigma) na diluição 1:10000. Após a incubação com o anticorpo secundário as membranas foram lavadas em TBS-T três vezes de 10 minutos cada. As bandas proteicas foram visualizadas pela detecção de quimioluminescência utilizando o equipamento C-DiGit Blot Scanner (LI-COR), e como substrato, Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare).

4.5.1 Quantificação de proteínas pelo método de Bradford

A quantificação de proteínas dos lisados de células foi realizada conforme metodologia adaptada de BRADFORD, 1976. Inicialmente foi construída uma curva padrão a partir de diferentes concentrações de BSA (1,4 mg/mL; 1,0 mg/mL; 0,7 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,25 mg/mL; e 0,125 mg/mL) diluída de acordo com cada experimento. A curva padrão obtida será utilizada para os cálculos da concentração de proteína nas amostras. A quantificação de proteínas será realizada utilizando 295 μ L de Reagente de Bradford e 5 μ L de amostra diluída 40 vezes em água. A leitura de absorvância será feita a 595 nm.

4.6. ENSAIO *IN VIVO*-TUMOR SUBCUTÂNEO

4.6.1. Animais e comitê de ética

Camundongos C57BL/ machos (n=40, peso \cong 20g) oriundos do Biotério Central da UFV, foram mantidos no Biotério do Departamento de Biologia Geral (UFV) alojados em grupos de quatro animais em caixas de polipropileno (49 cm x 34 cm x 16 cm) e em condições controladas de temperatura (21 ± 2 °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 as normas propostas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, sendo o projeto aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFV, com número de registro 34/2019.

4.6.2. Crescimento do tumor subcutâneo

Para análise do crescimento tumoral subcutâneo, suspensão de células na concentração de 1×10^6 células/mL⁻¹ foi preparada em solução salina estéril, sendo que desta suspensão, 200 µL foram inoculados, por via subcutânea, no flanco direito de 40 camundongos. Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais (10 animais por grupo). O SRPIN340 e o Tβ4 foram administrados via aplicação intratumoral. No grupo controle foi administrado PBS com DMSO 1% (intratumoral).

O SRPIN340 (160µg/mL) e o Tβ4 (5mg/kg) foram diluídos em DMSO 1% em PBS e a aplicação foi de 50uL por animal. No grupo com a aplicação de ambos, foi aplicado 50uL de cada, totalizando 100uL por animal. Os tratamentos foram iniciados no 7º dia após a inoculação das células tumorais. Os tratamentos pelas vias intratumorais, foram administrados durante 17 dias. O SRPIN340 foi inoculado diariamente e o Tb4 foi inoculado duas vezes por semana (Kleinman,2016) nos primeiros 7 dias. Na segunda semana, a inoculação foi feita dia sim, dia não. Durante todo o período, os pesos corporais dos animais foram mensurados a cada dois dias, juntamente com a medição do tamanho do tumor utilizando paquímetro, sendo seu volume calculado utilizando-se a fórmula $\text{Volume} = 0,52 \times D1^2 \times D2$, em que D1 é o comprimento e D2 a largura do tumor.

No 18º dia os animais foram pesados e anestesiados com cloridrato de xilazina (10mg/kg/intraperitoneal) e cloridrato de quetamina (150mg/kg/intraperitoneal), sendo posteriormente retirado o sangue via retro orbital para obtenção do soro e eutanasiados por deslocamento cervical. Foram retirados o tumor, o baço e o pulmão para posteriores análises. Estes foram imersos em solução fixadora de paraformaldeído (4% em tampão fosfato de sódio 0,2M/pH 7,3) por 24 horas e após esse tempo, foram armazenados em álcool 70%.

Após a normalização para a taxa de crescimento dos tumores, foi feita a razão entre o volume do tumor da medição no dia em relação ao da medição anterior para obtenção do gráfico.

4.6.3 Análises estatísticas

Os dados foram expressos com média \pm desvio padrão. Análises estatísticas foram avaliadas por análise de variância unidirecional. A diferença foi considerada

significativa em $p < 0,05$. Os resultados foram avaliados quanto a sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados apresentaram distribuição normal, sendo submetidos à análise de variância (ANOVA), e suas médias comparadas pelo teste de Student Newman Kells a nível de 5% de significância

As análises estatísticas dos testes *in vivo* foram realizadas utilizando o programa GraphPadPrism 5.0 (GraphPadSoftware Inc., EUA). Para análise de variação do peso foi utilizado análise de variância (ANOVA) seguido de teste Dunnett, por permitir comparar os grupos tratados com o controle.

5. RESULTADOS

5.1. Verificação do peptídeo na célula de B16F10

Foi verificado a presença do peptídeo revelando a imunofluorescência e o western-blot com o anticorpo anti-T β 4 (RayBiotech).

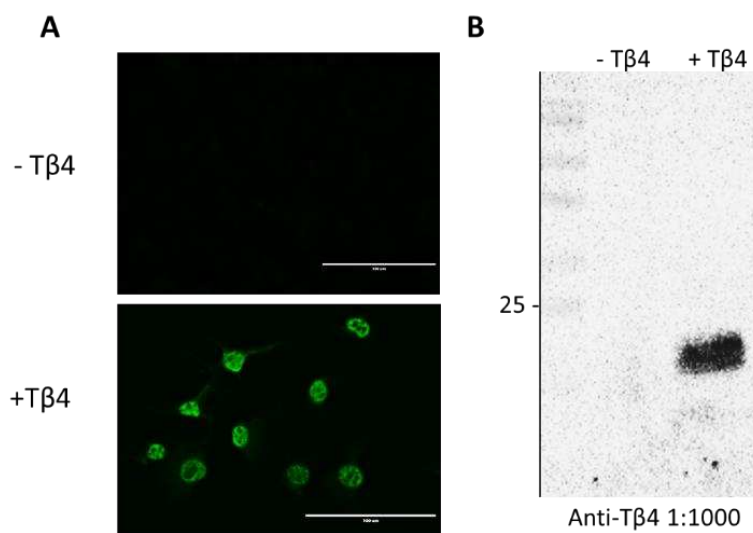


Figura 13: Teste de concentração anticorpo anti- T β 4 (RayBiotech). A) A melhor concentração foi de anti- T β 4 1:100 usando o anticorpo secundário anti-rabbit alexa 488 1:100. A) fluorescência foi registrada usando um microscópio de fluorescência invertida (EVOS FL). B) o Western Blot foi revelado após um SDS-Page com as amostras de B16F10 sem e com o peptídeo T β 4 nas concentrações de 1:1000 e 1:3000, aparecendo a banda somente na concentração de 1:1000.

5.2. Ensaio fenotípicos em B16F10

5.2.1 Ensaio de proliferação

O percentual de proliferação para o DMSO 0,4% (Controle) foi de 61,71%; para o SRPIN340 foi de 8,11%, para o T β 4 foi de 90,71% e para T β 4 e SRPIN340 conjugados foi de 70,18% no tempo de 24 horas. Apresentou-se significância do grupo controle comparado ao SRPIN340 e com o T β 4 e, também, do SRPIN340 quando comparado com o T β 4 e com os dois combinados. (Figura 14)

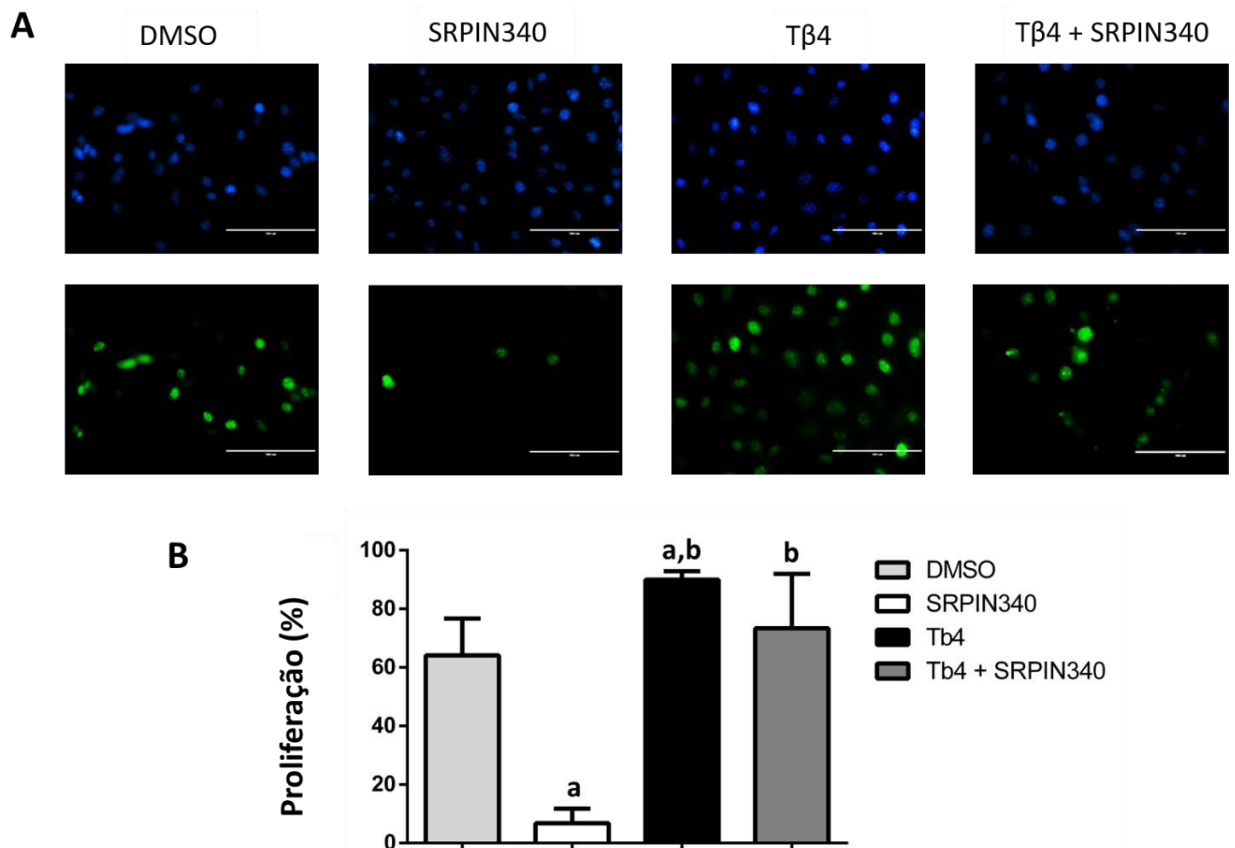


Figura 14: Avaliação da proliferação celular pela marcação de Ki67. As células B16F10 foram tratadas com DMSO (0,4%), SRPIN340 (25 μ M), T β 4 (100ng/mL) e com os dois últimos combinados pelo tempo de 24 horas. Obteve-se o número absoluto de células marcadas pelo DAPI e GFP, de modo a obter-se uma porcentagem de fluorescência. O DAPI foi usado como contra-coloração nuclear e a fluorescência foi registrada usando um microscópio de fluorescência invertida (EVOS FL). Barra de escala: 50 μ M. A) Fotos representativas. B) Gráfico relativo às porcentagens de fluorescência. Os dados são expressos em média \pm desvio padrão, com a sendo $P < 0,01$ versus controle (DMSO) pelo teste de Dunnett e b sendo $P < 0,01$ versus o SRPIN pelo teste de Turkey.

5.2.2 Ensaio de formação de colônia

Foi observado que a inibição de SRPKs com o SRPIN340 levou a diminuição da formação de colônias e o tratamento com o T β 4 levou ao aumento quando comparado com o controle DMSO. Já a combinação dos tratamentos mostrou-se com um resultado intermediário indicando um bloqueio parcial do peptídeo pelo SRPIN340. (Figuras 15A e 15B)

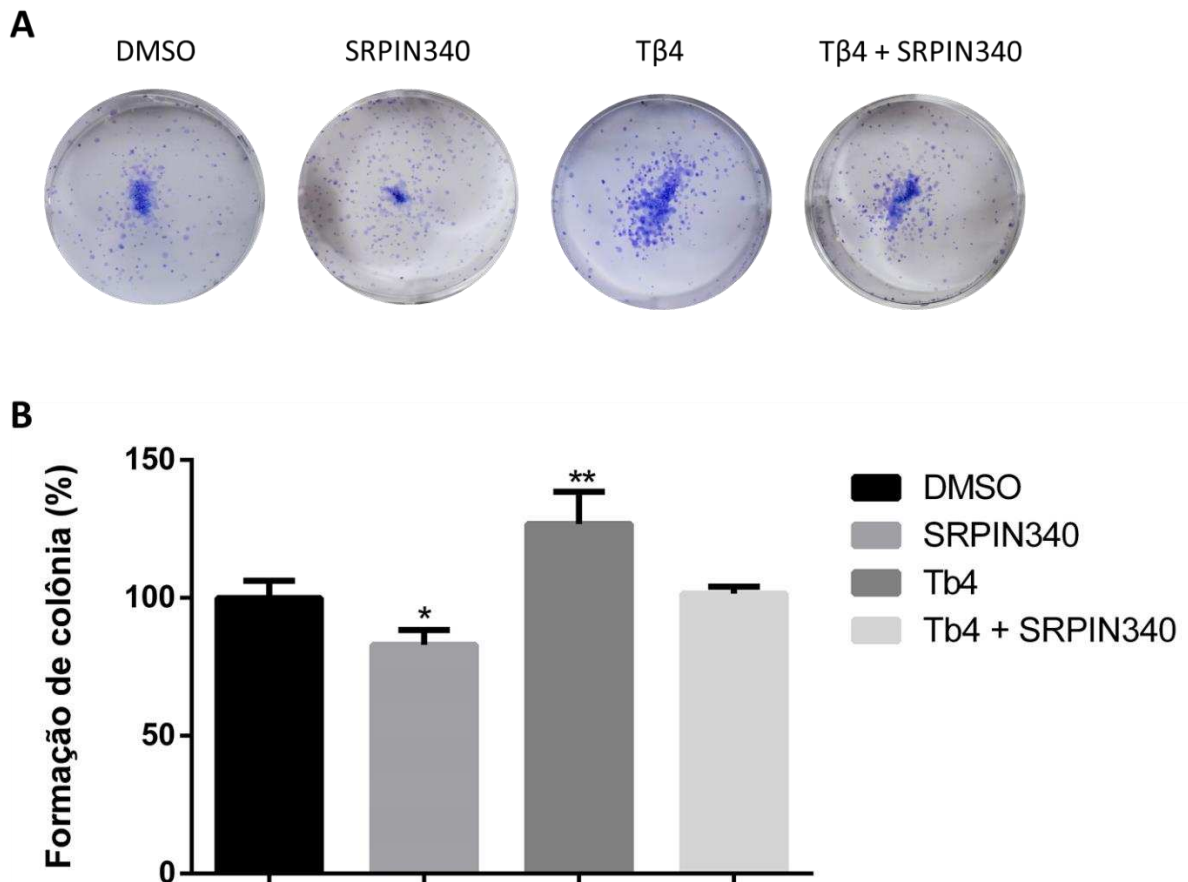


Figura 15 : Efeito de compostos na formação de colônias de células de melanoma. (A) As células B16F10 foram tratadas com DMSO (controle), SRPIN340 (25 μ M), T β 4 (100ng/mL) ou os dois conjugados. O ensaio de colônia foi realizado por coloração com azul de toluidina após 7 dias. (B) O gráfico mostra o efeito dos tratamentos no número absoluto de formação de colônias em comparação com as células tratadas com veículo. Os dados são expressos como a média \pm desvio padrão das experiências em triplicado. * P <0,05 ou ** P <0,01 versus controle (DMSO) pelo teste de Dunnett.

5.2.3 Ensaio de migração celular

Após 24 horas, pode-se observar diminuição significativa para SRPIN340 (25 μ M), aumento significativo para T β 4 (100ng/mL) e significância também para os dois combinados, tendo um percentual de migração próxima a do grupo controle. (Figura 16)

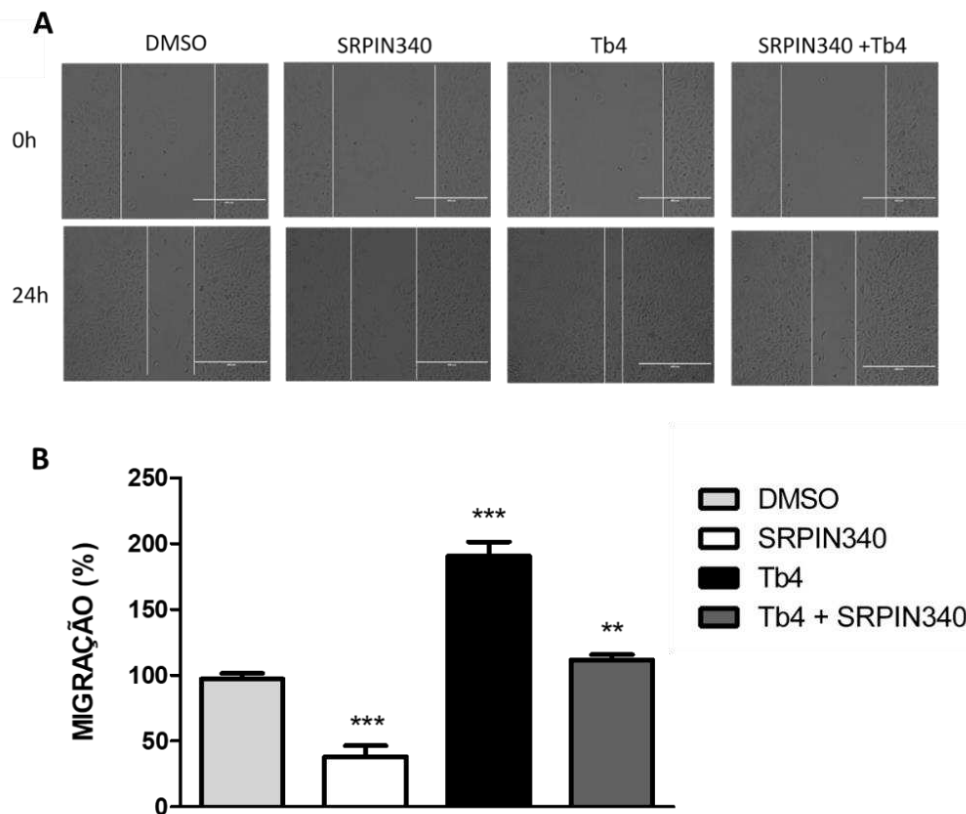


Figura 16: Efeito de compostos no potencial migratório de células de melanoma in vitro. (A) Os compostos afetam a migração das células de melanoma. As células B16F10 foram tratadas com DMSO, SRPIN340 (25 μ M), T β 4 (100ng/mL) ou os dois conjugados. A migração celular foi determinada por fotografias do ensaio de cicatrização de feridas após 24 horas de exposição. (B) O gráfico mostra a porcentagem de alteração da migração celular causada pelos compostos. As células tratadas com DMSO foram usadas como controle. Os resultados são expressos em células adesivas em relação ao controle (em 100%) e os dados são expressos em média \pm desvio padrão das experiências em triplicado. ** P <0,01 ou *** P <0,001 versus controle (DMSO) pelo teste de Dunnett.

5.3 Ensaio de imunofluorescência

5.3.1 Avaliação da fosforilação de proteínas SR

Pode-se observar que o tratamento com o SRPIN340 levou a diminuição da detecção de proteínas SR fosforiladas de forma condizente com a inibição de SRPKs (Moreira et al., 2018). O efeito da T β 4 apresentou um efeito dinâmico na fosforilação, tendo inicialmente levado à diminuição, porém também ao aumento em tempos de incubação maiores. Interessantemente, quando o tratamento com T β 4 foi combinado com o SRPIN340 a fosforilação de proteínas SR não mais foi detectada. Essa observação indica que T β 4 pode influenciar a atividade de *splicing* desempenhada por proteínas SR de forma dependente da atividade de SRPKs. (Figura 17).

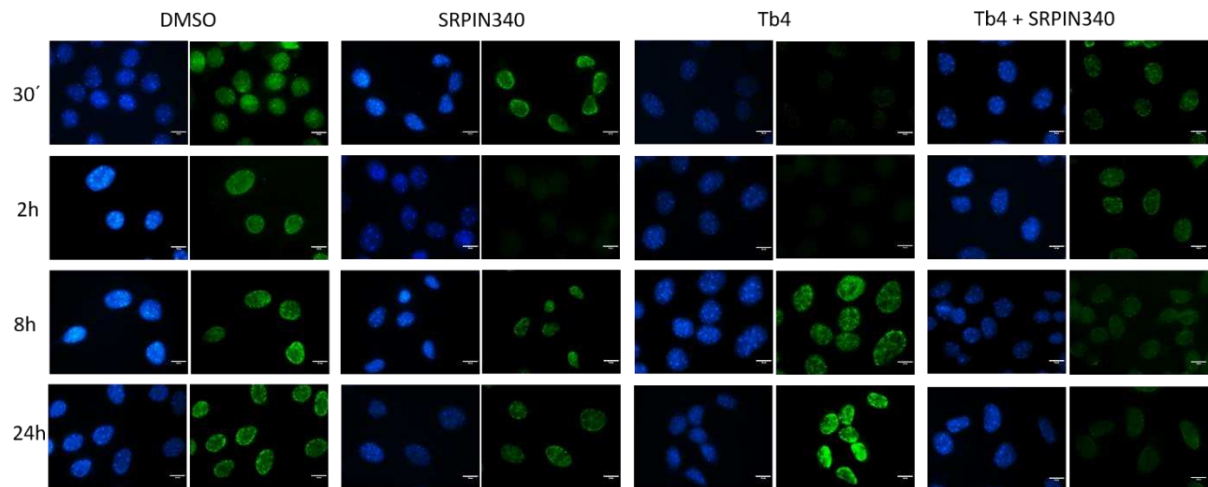


Figura 17 : Efeito de compostos na fosforilação de proteínas SR. As células B16F10 foram tratadas com DMSO 0,4%, SRPIN340 25uM, T β 4 100ng/mL e os dois combinados. Foi feito um *time course* (30 minutos, 2h, 8h e 24h) para avaliação da fluorescência. O anticorpo primário foi o anti-SRSF3. O DAPI foi utilizado como uma contracorante nuclear e a fluorescência foi registrada usando um microscópio de fluorescência invertida (EVOS FL). As imagens mostradas são representativas de três experiências independentes. Barra de escala: 10 μ m

5.3.2 Polimerização da Actina

Comparando com o controle, as células tratadas com o SRPIN340 apresentam um perfil com maior ramificação dos lamelipódios, enquanto com o T β 4, aparentemente, há uma diminuição destes nos tempos de 8 e 24 horas. Com os dois tratamentos combinados, apresenta maior ramificação nos tempos iniciais e uma diminuição nos tempos de 8 e 24 horas, assim como com o tratamento de T β 4. (Figura 18)

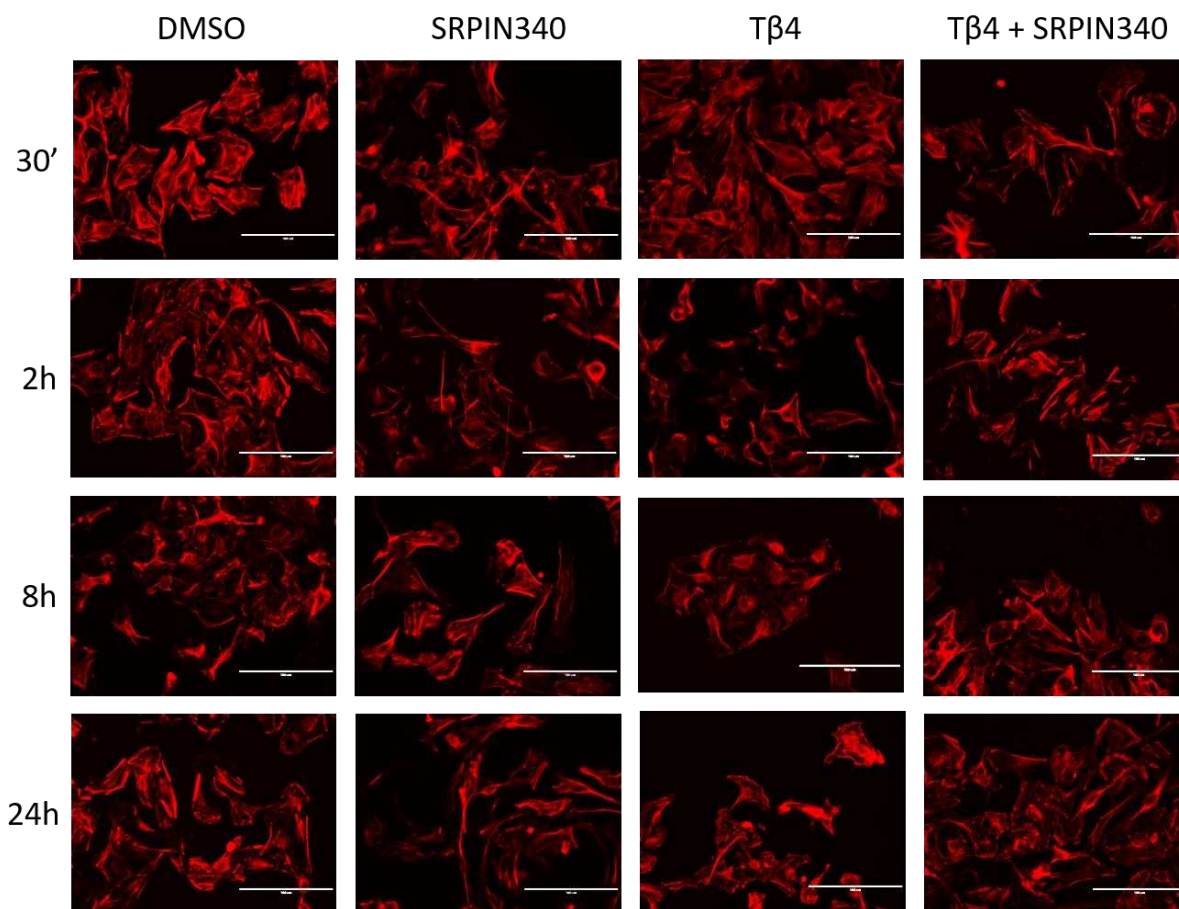


Figura 18: Efeito de compostos na actina. As células B16F10 foram tratadas com DMSO 0,4%, SRPIN340 25 μ M, T β 4 100ng/mL e os dois conjugados no tempo de 24h. A marcação dos filamentos de actina foi feita utilizando Rhodamine Phalloidin (Thermo Scientific) e a fluorescência foi registrada usando um microscópio de fluorescência invertida (EVOS FL). As imagens mostradas são representativas de triplicatas independentes. Barra de escala: 10 μ m

5.4 In vivo

Obteve-se a taxa de crescimento tumoral (Figura 19) através da razão entre o volume do tumor da medição no dia em relação ao da medição anterior.

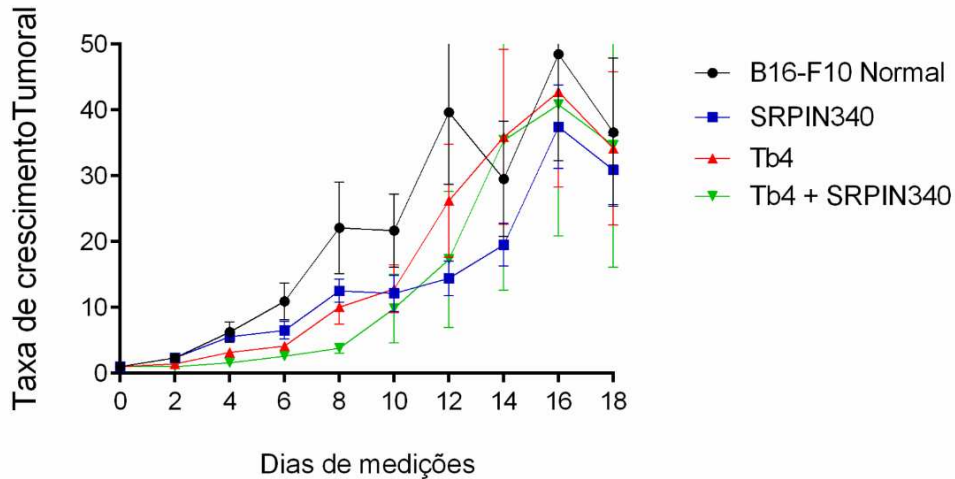


Figura 19: Taxa de crescimento tumoral. Inoculação de 200 μL de uma suspensão de células na concentração de 1×10^6 células/ mL^{-1} , por via subcutânea, no flanco direito de 40 camundongos. Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais de acordo com o tratamento recebido (10 animais por grupo): DMSO (controle), SRPIN340, T β 4 e os dois combinados. As inoculações eram de 50 μL de cada composto. O SRPIN340 inoculado diariamente e o T β 4 duas vezes na primeira semana e na segunda, a cada dois dias e o experimento durou 18 dias. O gráfico foi gerado pelo GraphPad Prism 6.

Os dados relativos ao peso dos animais, foram tabulados e os grupos com T β 4 apresentavam maiores valores. Os animais do grupo controle e do SRPIN340 apresentaram quedas de pesos a partir, de aproximadamente, a metade do experimento (Figura 20).

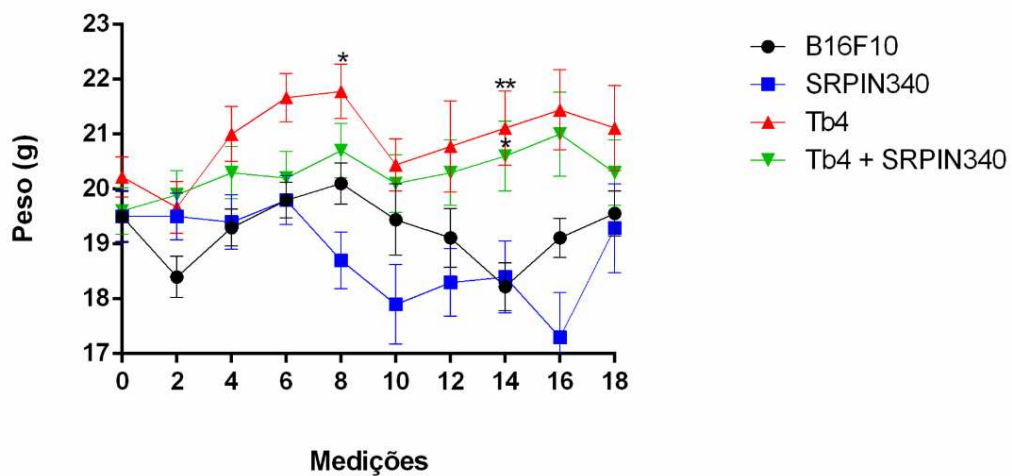


Figura 20: Peso dos animais dos grupos DMSO (controle), SRPIN340, T β 4 e os dois combinados ao longo de 18 dias. O gráfico foi gerado pelo GraphPad Prism 6. * $P < 0,05$ ou ** $P < 0,01$ versus controle (DMSO) pelo teste de Dunnett.

Ao analisar a massa do tumor, baço e pulmão dos animais eutanasiados, estes apresentavam valores próximos, não havendo significância estatística quando comparados com o grupo controle, com exceção dos pulmões de T β 4 que se apresentaram maiores que os do controle (Figura 21).

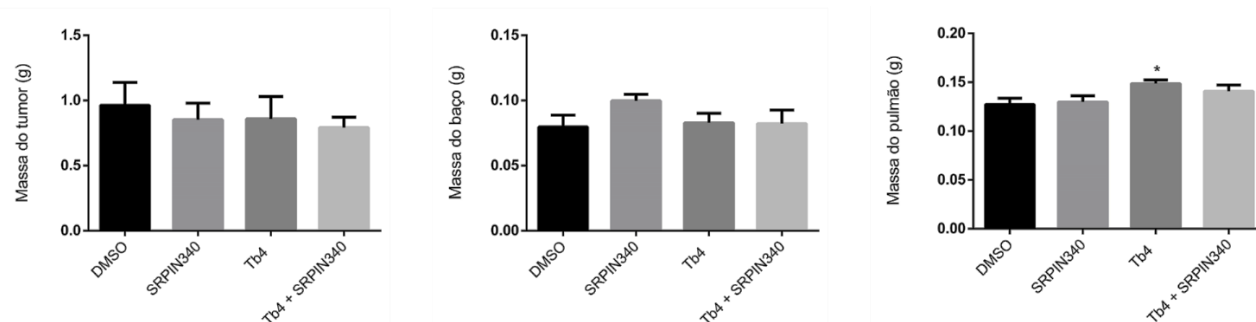


Figura 21: Massa, em gramas, do tumor, baço e pulmão. Quatro grupos experimentais: DMSO (controle), SRPIN340, T β 4 e os dois combinados. As pesagens foram feitas após a eutanásia. O gráfico foi gerado pelo GraphPad Prism 6. * P <0,05 versus controle (DMSO) pelo teste de Dunnett.

Não foram observadas metástases visíveis macroscopicamente em nenhum dos dois órgãos retirados. Não houve significância estatística em nenhum dos resultados in vivo, sendo este, um piloto para os próximos experimentos com as modificações adequadas.

5.5 Ensaios em células B16F10 *knockouts* para SRPK1, SRPK2 e SRPK1/SRPK2 (duplo *knockout*)

5.5.1 Avaliação da localização de T β 4 e da fosforilação de proteínas SR por imunofluorescência

A marcação de T β 4 acontece nuclear nas células apresentando um padrão um pouco diferente onde, aparentemente, observa-se uma marcação do citoplasma com maior intensidade nas SRPK2 KO e nas células duplo knockout a marcação citoplasmática parece não acontecer (Figura 22).

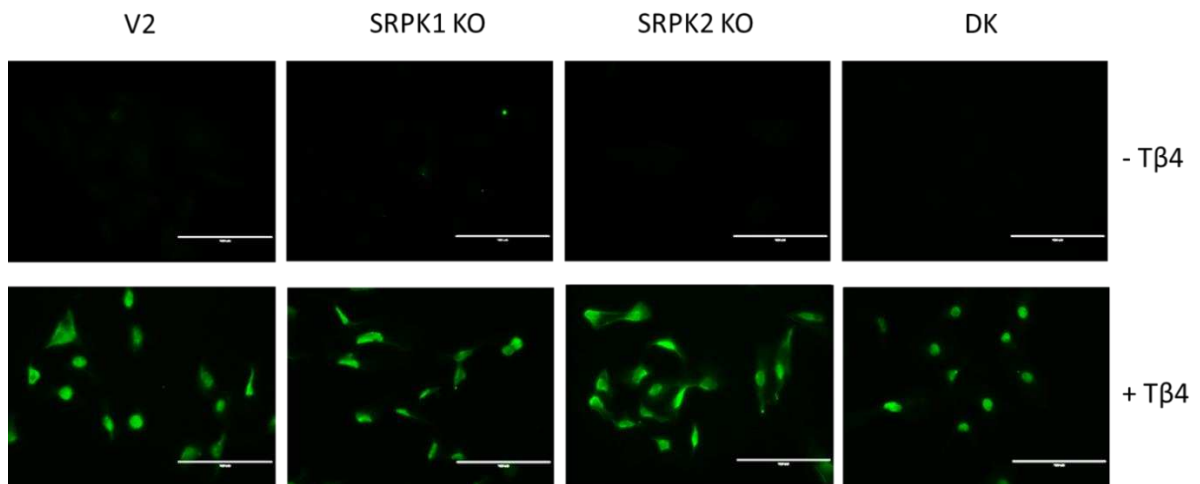


Figura 22: Marcação de T β 4 em células B16F10 knockouts. Antes de serem fixadas, as células foram tratadas ou não com T β 4 por 24 horas. Utilizou-se anticorpo primário anti- T β 4 1:100 e o anti-rabbit alexa 488 1:100 como secundário. A fluorescência foi registrada usando um microscópio de fluorescência invertida (EVOS FL).

Em seguida, averiguou-se a marcação de proteínas SR fosforiladas em diferentes tempos de exposição a T β 4. Pode-se observar que as proteínas SR não sofrem alteração no padrão de fosforilação ao longo do tempo e nem com o tratamento de T β 4 (Figura 23).

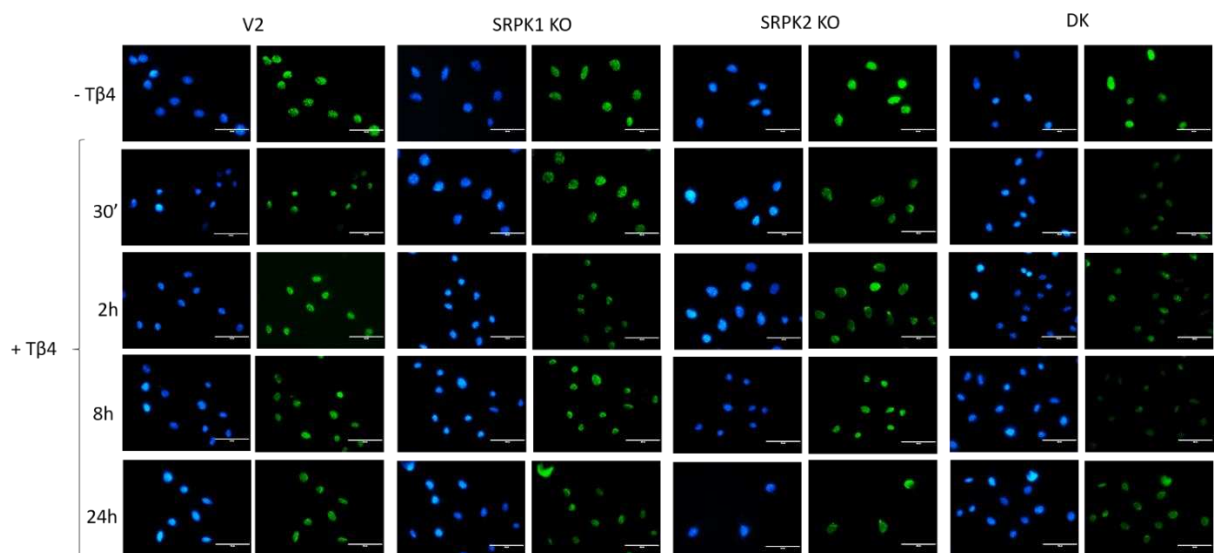


Figura 23 : Efeito da T β 4 na fosforilação de proteínas SR. As células foram tratadas com T β 4 durante os tempos indicados. O anticorpo primário foi o anti-SRSF3. O DAPI foi utilizado como uma contracolorante nuclear e a fluorescência foi registrada usando um microscópio de fluorescência invertida (EVOS FL). As imagens mostradas são representativas de três experiências independentes. Barra de escala: 50 μ m

5.5.2. Polimerização de actina em células knockouts

Foi realizado um *time course*, por imunofluorescência, para marcação dos filamentos de actina, utilizando Rhodamine Phalloidin (Thermo Scientific) nas células V2, SRPK1 KO, SRPK2 KO e Duplo KO. Os tempos foram de 30 minutos, 2 horas, 8 horas e 24 horas. (Figura 24).

As lâminas apresentam, de uma forma geral, filamentos de actina alongados e ramificados, com exceções aparentes em SRPK2 KO com T β 4 em 24 horas e Duplo knockout sem o T β 4 e com T β 4 em 24 horas. Isso mostra uma pequena diferença morfológica com os tratamentos.

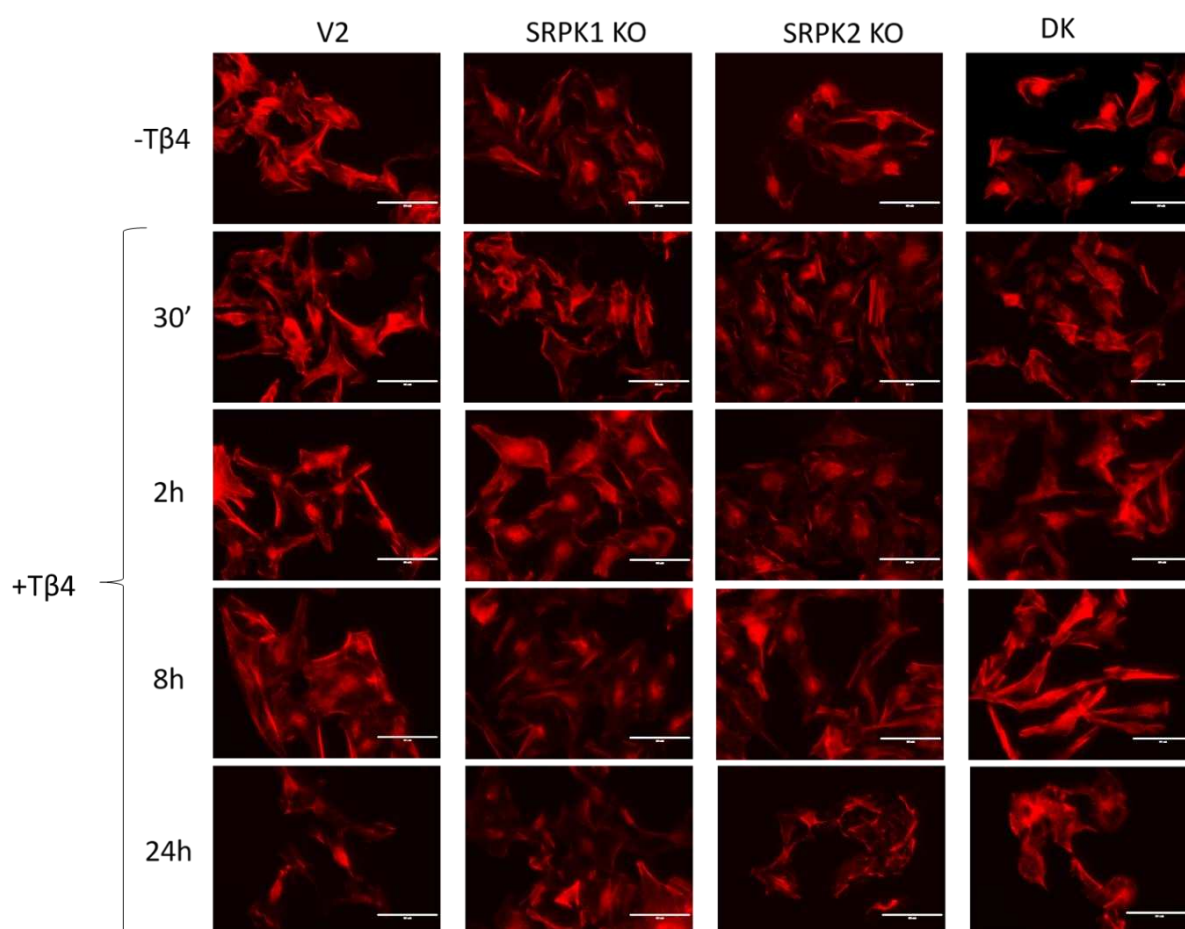


Figura 24: Efeito de compostos na actina. As células V2, SRPK1 KO, SRPK2 KO e DK (Duplo KO) foram tratadas com e sem T β 4 100ng/mL no tempo de 24h. A marcação dos filamentos de actina foi feita utilizando Rhodamine Phalloidin (Thermo Scientific), a marcação do T β 4 foi com o anti- T β 4 (RayBiotech) 1:100 e a fluorescência foi registrada usando um microscópio de fluorescência invertida (EVOS FL). As imagens mostradas são representativas de vários experimentos independentes. Barra de escala: 10 μ m

5.5.3. Ensaio de migração

Foi realizado o ensaio de migração das células B16F10 tratadas (DMSO, SRPIN340, T β 4 e os dois combinados) para as células knockouts. Porém, não houve significância estatística. O padrão de migração, entre elas as linhagens, foi bem parecido e não parece ter sido alterado com o tratamento de T β 4 nas condições empregadas. (Figura 25).

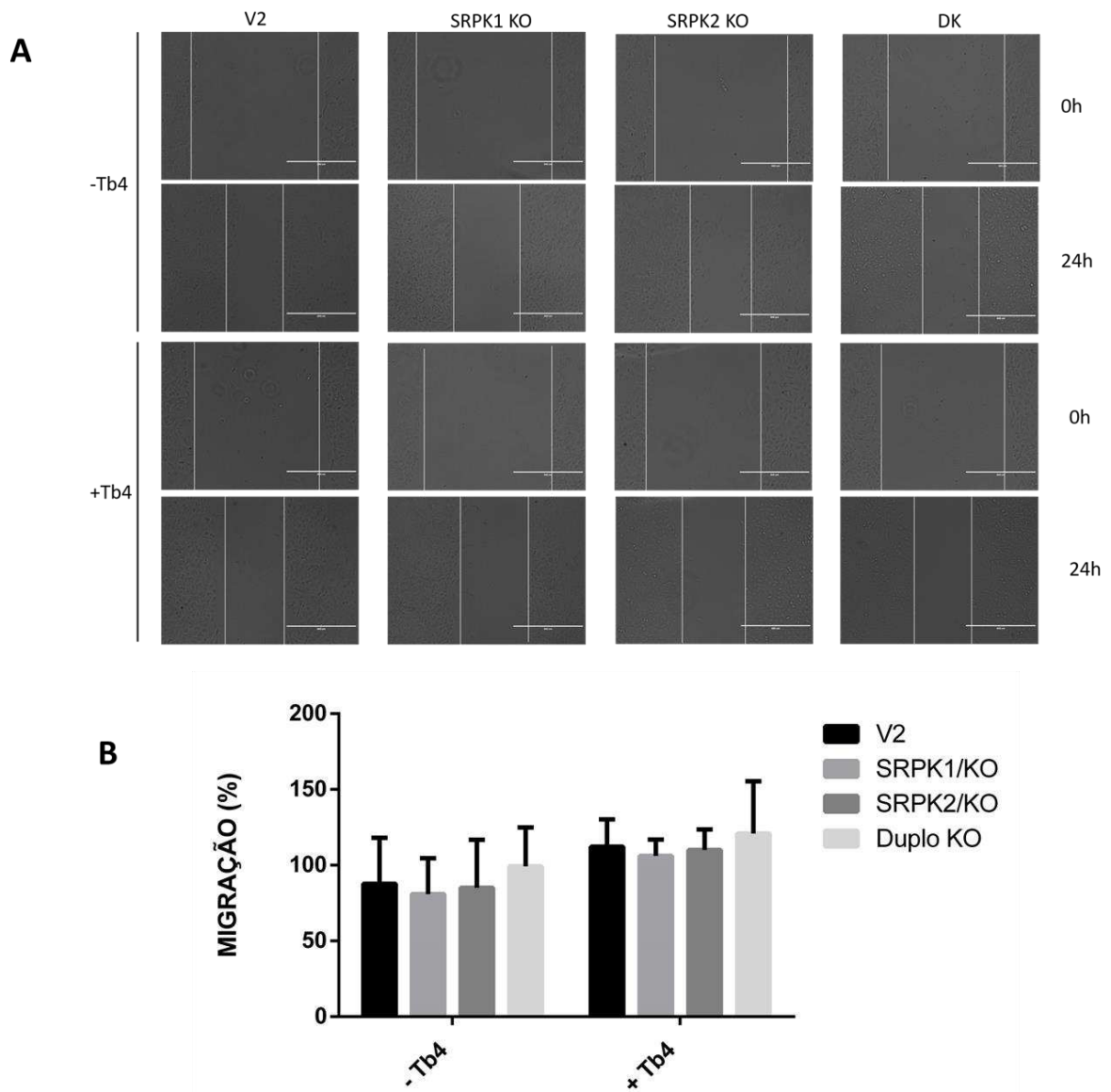


Figura 25: Efeito da T β 4 nas células B16F10 V2, SRPK1 KO, SRPK2 KO, DK. As células foram tratadas ou não com T β 4 (100ng/mL). A migração celular foi determinada por fotografias do ensaio de “Wound Healing”, após 24 horas de exposição. O gráfico foi gerado pelo GraphPad Prism 6. Foram realizados 3 experimentos independentes. Não houve significância estatística entre os grupos.

6. DISCUSSÃO

A partir de um ensaio de duplo híbrido de leveduras observou-se possíveis interações de SRPK2 com diferentes proteínas (MELLO, 2014). Fez-se, então, necessário avaliar em maiores detalhes a possível relação funcional entre SRPK2 e proteínas. Dentre as proteínas identificadas, T β 4 é reguladora de processos importantes em tumores, como migração, invasão, sobrevivência celular, transição epitelial-mesenquimal e está diretamente associada ao aumento do crescimento do tumoral e metástase (PIAO et al., 2014). Além disso, assim como SRPK2, T β 4 participa de vias de sinalização que envolvem a ativação de AKT e está relacionada com diversos tipos de câncer, incluindo o melanoma metastático (HAYES, 2007; JANG, 2008; ROOSMALEN et al., 2015; WANG et al., 2016; MORIT, HAYASHI, 2018; WHANG, 2003; CHA et al., 2003). Tomados em conjunto, esses dados disponíveis indicaram ser importante investigar a relação funcional entre T β 4 e SRPK2.

O papel da SRPK nos cânceres e em outras doenças humanas, como infecções virais e proliferação vascular desregulada, levou à busca de moléculas capazes de inibir sua atividade catalítica (DA SILVA *et al.*, 2015; BULLOCK, OLTEAN, 2017). Uma destas é o SRPIN340 que inibe a atividade quinase das SRPKs por evitar, de forma competitiva, a ligação da molécula de ATP ao sítio ativo da enzima (KARAKAMA *et al.*, 2010).

Ensaio *in vitro* que permitem avaliar aspectos fenotípicos relacionados ao câncer e ao processo metastático são de suma importância para observação de respostas a diferentes tratamentos farmacológicos e, também, para se estudar a relação funcional entre proteínas com características oncogênicas.

Já foi visto que a inibição das SRPKs promove alterações, como por exemplo em proliferação celular. Gammons e colaboradores (2014) mostram que a inibição das SRPKs provocava uma diminuição do crescimento do tumor *in vivo*, possivelmente pela diminuição da expressão da isoforma pró-angiogênica de VEGF, indicando então, diminuição de proliferação em melanoma. Outros relatos na literatura mostram que a inibição da SRPK1 está associada à diminuição da proliferação em outros tipos de câncer. Moreira e colaboradores (2018) testou diferentes compostos inibidores de SRPKs, dentre eles o SRPIN340, em diferentes concentrações, verificando, diminuição de proliferação, assim como de formação de colônia e migração em melanoma.

Wang e colaboradores (2016), mostraram que o aumento das SRPK2 em células de câncer de cólon está diretamente ligado com o aumento do crescimento, migração e tumorigênese. Ao realizarem um Knockdown de SRPK2, observam o efeito inverso, comprovando a relação de SRPK2 nos processos de crescimento e migração de células de câncer de cólon. Em câncer de pulmão, o “knockdown” da SRPK1 nesse caso tem a capacidade de inibir os processos de crescimento e migração celular (LIU *et al*, 2015). Wu e colaboradores (2013) consideraram que as SRPKs poderiam estar associadas a eventos da migração celular em gliomas por meio das vias de sinalização MAPK ou PI3K/AKT, assim como é mostrado por Chang e colaboradores (2015) que, em tumores cerebrais a inibição das SRPKs com iRNA, promoveu diminuição da migração, uma vez que essa inibição acarretou alterações na expressão de metaloproteínas 2 e 9, responsáveis pela degradação de componentes da matriz extracelular.

T β 4 também tem sido documentada como envolvida no controle da proliferação celular (SUMAN, 2012; CHEN, 2012; HUANG *et al*, 2016; HONG *et al*, 2016). Em câncer de pulmão, houve uma diminuição na proliferação de células quando o T β 4 endógeno foi silenciado. Da mesma forma, a inibição da expressão da T β 4 suprimiu a formação de colônias. *In vivo*, foi feita marcação com Ki67 e o número de células positivas para Ki67 diminuiu significativamente no grupo *knockdown* para T β 4 em comparação com o dos controles (HUANG, 2016). Em câncer colorretal, O T β 4 é superexpresso e promove a invasão e migração celular através da via de sinalização ILK / AKT / b-catenina. Ela interage com ILK, que promove a ativação de AKT, b-catenina e integrina. sugerindo que o T β 4 é um regulador positivo da cascata de sinalização ILK / AKT / b-catenina / Integrina (PIAO, 2014). Lee e colaboradores (2015) correlaciona o “knockdown” de T β 4 com diminuição de Rac1 e Rap1, reguladoras de splicing. Isso indica que a migração de células cancerígenas pode ser dependente da ativação de Rap1 e Rac1, mediada por T β 4. Bock-Marquette (2004) mostra que a T β 4 pode estimular a migração de cardiomiócitos e células endoteliais e promover a sobrevivência de cardiomiócitos. As proteínas PINCH e ILK do domínio LIM, necessárias para a migração e sobrevivência celular, formaram um complexo com T β 4 que resultou na fosforilação da quinase de sobrevivência AKT. A inibição da fosforilação de AKT reverteu os efeitos da T β 4 nas células cardíacas. O complexo T β 4-PINCH-ILK é ativado por PI3K, assim como AKT. A subunidade α -parvin do

complexo T β 4-PINCH-ILK estimula a translocação de AKT do citoplasma para a membrana (FUKUDA *et al*, 2003), onde ela será duplamente fosforilada por PDK1 em Thr-308 e por mTORC2 em Ser-473.

Considerando essas informações, ensaios fenotípicos relacionados ao câncer e a metástase foram avaliados em melanoma metastático murino tratadas com SRPIN340 e T β 4 visando obter indícios sobre a relação funcional SRPK-T β 4. Os resultados dos três ensaios fenotípicos realizados corroboram com o que já foi visto em estudos anteriores (MOREIRA *et al.*, 2018; SUMAN, 2012; CHEN, 2013; CHEN, 2014; HUANG, 2016; BOCK-MARQUETTE, 2004). Ao analisar os tratamentos com SRPIN340, este levou a diminuição da proliferação, formação de colônia e migração, enquanto T β 4 levou ao aumento. Por outro lado, interessante, os dados relativos aos tratamentos com SRPIN340 e T β 4 em conjunto mostraram resultados intermediários, demonstrando que a inibição de SRPKs é capaz de bloquear pelo menos parcialmente a ação do peptídeo. Esses resultados indicam que T β 4 parece de fato ser um elemento de sinalização regulador *upstream* às SRPKs, porém os efeitos intermediários observados sugerem que a ação do peptídeo não depende exclusivamente da atividade dessas enzimas para promover os fenótipos observados.

As proteínas SR são fatores de *splicing* caracterizados por sua capacidade de interagir simultaneamente com o RNA por meio de um motivo de reconhecimento de RNA (RRM) e outras proteínas um domínio rico em resíduos de arginina e serina, o domínio RS. A localização destas proteínas é predominantemente nuclear, onde podem ser encontradas nos *speckles* nucleares quando não estão envolvidas no processo de transcrição ou de *splicing*. Ao serem fosforiladas em suas serinas, as proteínas SR pode mudar a sua localização dos *speckles* para o nucleoplasma onde interagem com o pré-mRNA nascente. Portanto, o balanço entre fosforilação e desfosforilação relaciona-se com a atividade dessas proteínas na escolha do sítio a ser utilização na reação de *splicing* (SHEPARD E HERTEL, 2009).

Nesse sentido, o balanço nos eventos de fosforilação/desfosforilação das proteínas SR é um processo altamente dinâmico e tempo-dependente, o que precisa ser avaliado no contexto dos experimentos que foram realizados. Considerando o SRPIN340, este foi capaz de inibir a fosforilação das proteínas SR após 2 horas de tratamento, a fosforilação de proteínas SR é inibida, porém, em tempos maiores (8 e 24 horas) as proteínas retomam à fosforilação podendo indicar tanto uma baixa na

atividade do composto como uma compensação por deslocamento da via principal de fosforilação, com a célula reorganizando as formas de sinalização, obtendo-se atividade de outras quinases que também atuam na fosforilação de proteínas SR, como por exemplo a família das CLKs. Já foi visto, por exemplo, que que Clk / Sty tem como alvo direto as proteínas SR, especificamente ASF / SF2 e SC35 (PRASAD *et al*, 1999). O Tβ4 mostra uma ativação de proteínas SR após um tempo maior de tratamento, o que pode estar relacionado com AKT e a capacidade de Tβ4 realizar um equilíbrio dinâmico entre G- e F-actina, essencial para a rápida reorganização do citoesqueleto. Inicialmente, Tβ4 estaria sequestrando G-actina e evitando a fosforilação de AKT. Posteriormente, ao liberar G-actina, promove a fosforilação de AKT, tendo como consequência a fosforilação de proteínas SR, o que é um indicativo de que o Tβ4 ativa SRPKs. Ao se analisar o tratamento conjunto SRPIN340/Tβ4, há um bloqueio da ativação das proteínas SR, corroborando os resultados fenotípicos anteriores que sugerem que a Tβ4 é um elemento de sinalização upstream as SRPKs. Nesse caso, o SRPIN340 é capaz de abolir quase por completo a ação da Tβ4 sobre a fosforilação das proteínas SR, indicando que as SRPKs são as principais efetoras desse peptídeo sobre a ativação das proteínas SR.

Outro ensaio realizado foi para verificar se a polimerização da actina sofria modificações nos padrões morfológicos quando células B16F10 eram submetidas aos diferentes tratamentos. O Tβ4 é um sequestrador de G-actina que modula a dinâmica do citoesqueleto em células de mamíferos (MANNHERZ, HANNAPPEL, 2009). Ele liga-se à G-actina, bloqueia a polimerização desta, sugerindo sua importância na cicatrização de feridas (HUFF *et al*, 2001). A G-actina (globular) tem a característica de se ligar a ATP/ADP e magnésio, é uma molécula polar, sendo que a polimerização é mais rápida na extremidade positiva da actina (farpada). Filamentos de actina podem alterar a forma da célula e também gerar movimento em resposta a sinalizações extracelulares. A dinâmica de formação dos filamentos de actina funciona como uma “escada rolante”, ou *treadmilling*, onde uma unidade globular se incorpora à uma das extremidades (geralmente a farpada) e vai percorrendo todo o filamento, se dissociando na outra extremidade (geralmente a pontiaguda) . De acordo com as propriedades da proteína associada, os filamentos de actina podem se organizar de forma estável ou não, assumindo diferentes conformações (DOMINGUEZ, HOLMES, 2011). A migração celular é dependente de estruturas formadas pela actina. A

movimentação celular se inicia pela formação de protusões celulares do tipo lamelipódio e filopódios, na direção na qual a célula vai se movimentar. Estas protusões contêm actina, onde as extremidades farpadas de alta polimerização se encontram próximas à membrana plasmática. Neste processo, a membrana da região que se projeta se adere à superfície em adesões focais. Em seguida, o núcleo e o corpo da célula são empurrados para frente por forças mediadas pelas fibras de estresse. Por último, fibras de retração puxam a parte de trás da célula para frente. (COOPER *et al*, 2007).

No *time course* realizado para avaliar as modificações morfológicas da actina, a faloidina liga-se à F-actina, impedindo a sua despolimerização. Uma das modificações que se pode esperar é a contração de lamelipódios quando tratado com o T β 4, já que ao sequestrar G-actina, ele estimula e promove uma despolarização de actina. Sanders e colaboradores (1992) mostram que em câncer de pulmão, ocorre despolimerização de estruturas de actina após micro-injeções de T β 4, mostrando diminuição dos lamelipódios. Isso pode ser observado nos tratamentos de 8 e 24 horas com o peptídeo. Os tratados com SRPIN340 apresentam a actina com ramificação dos lamelipódios, mostrando-as polimerizadas. Ao serem combinados, os lamelipódios apresentam-se ramificados, aparentando ter pouco impacto na despolimerização.

Após a observação dos resultados *in vitro*, o ensaio *in vivo* foi realizado a fim de observar o crescimento tumoral e o processo metastático em camundongos. Moreira e colaboradores (2018) realizou experimentos *in vivo* com B16F10 e SRPIN340 em camundongos C57BL, sendo o motivo do modelo escolhido para esse trabalho. As células de B16F10 foram inoculadas nos camundongos e somente após o 7^o dia, todos os animais apresentavam o tumor, sendo então, o dia para início dos tratamentos.

Estudos feitos com o T β 4 são, normalmente, realizados através da superexpressão ou Knockdown por iRNA deste (SUMAN, 2012; CHEN, 2012; CHAN, 2014). Um dos intuitos do trabalho foi testar o funcionamento do peptídeo quando inoculado diretamente no tumor, utilizando então, o peptídeo exógeno que foi conseguido com a empresa farmacêutica Regenerx Biopharmaceutical.

Os tumores não começaram com valores próximos dos volumes de tumores. Ao separar aleatoriamente os animais quando receberam as células de B16F10, nas

primeiras medições, o grupo controle e o do SRPIN340 apresentaram animais com maiores tumores quando comparados aos outros dois grupos. Não houve remanejamento dos animais, porque estes já se encontravam ambientalizados e acostumados com o grupo, e caso fosse feita mudança, eles poderiam brigar entre si, por exemplo, para estabelecer um macho alfa, uma vez que isso é característica desse grupo de camundongos. Vale ressaltar, que no segundo dia do experimento, um dos animais do grupo do T β 4 havia sido morto, com indícios de briga, e foi comido pelos outros animais da gaiola.

Era interessante notar que durante todo o tempo do experimento, os pelos dos animais que recebiam o T β 4 cresciam rapidamente, sendo necessária algumas depilações extras ao longo do estudo. Essa característica já havia sido notada em outros estudos como por Gao e colaboradores (2015) e Philp e colaboradores (2003 e 2007), que mostram o peptídeo promovendo o crescimento capilar

No 14^o dia seria o dia para finalizar o experimento, porém, ao ser feita a medição (7^a medição), os tumores ainda se encontravam aquém do valor máximo encontrado em Moreira e colaboradores (2018). Decidiu-se então, continuar com o experimento e ir observando o tamanho do tumor e as condições dos animais para estabelecer um limite de dias para que a eutanásia acontecesse. Nos últimos dias de experimento, vários tumores apresentavam necrose, principalmente os do grupo SRPIN340, mostrando diminuição do tumor pelo processo da necrose. No 16^o dia os animais estavam bem, porém, no 17^o dia, o grupo SRPIN340 apresentou dois animais mortos, provavelmente por condições causadas pela doença. Os animais dos grupos que receberam o peptídeo T β 4 apresentaram-se bem durante todo o experimento e tinham maiores pesos quando comparados com o grupo controle e o grupo SRPIN340, assim como ao serem eutanasiados, apresentaram peso maior dos pulmões.

Este experimento in vivo, foi um piloto para obter condições e modificações a serem feitas nos próximos que serão realizados. Os resultados apresentam-se pouco claros, devendo modificar, por exemplo, os dias de inoculação do peptídeo, padronizar a quantidade de dias que o experimento durará e realizar análises histológicas dos órgãos para obtenção de respostas mais claras e objetivas quanto ao crescimento tumoral e processo metastático em melanoma com os tratamentos propostos.

As células que foram modificadas (V2, SRPK1 KO, SRPK2 KO e Duplo KO) apresentaram localização de T β 4 nuclear em todos os grupos, mas apresentou-se diferença quanto a localização citoplasmática, a qual pode ser observada em V2, SRPK1 KO e SRPK2 KO, porém, não é observado no duplo knockout. Na imunofluorescência de proteínas SR, estas continuam aparecendo fluorescentes, podendo indicar um deslocamento da via principal de fosforilação, com a célula reorganizando as formas de sinalização, obtendo-se atividade de outras quinases que também atuam na fosforilação destas proteínas, como por exemplo a família das CLKs. Quanto ao padrão de polimerização da actina, aparentemente, não há uma diferença muito clara, mas há uma diferença, mesmo que pequena, morfológica que reflete a um desbalanço nos controles de polimerização e despolimerização de actina, o que pode ter a ver com o tratamento. A aplicação do T β 4 estimularia a despolimerização. As células também não demonstram diferenças significativas no ensaio de migração.

Um dado interessante a ser comentado, é que o T β 4 já foi sintetizado e comercializado para o uso humano como suplemento. Com o nome de TB500 (Enhanced Peptides, Lifetech Lab), está sendo muito usado por atletas após os treinos por ter ações como aumentar o crescimento muscular, aumento na resistência e força, diminuição de inflamação em vários tipos de tecido, diminuição de inflamação nas articulações, relaxamento de espasmo muscular e melhoramento do tônus muscular, reparação de tendões e ligamentos, melhoria da flexibilidade das articulações.

Há outros efeitos mostrados como características do produto, como deposição de colágeno, cura mais rápida de feridas, reparação global de tecidos, crescimento do cabelo, crescimento de novas células sanguíneas, reparação do tecido cardíaco danificado após um ataque cardíaco, cicatrização de úlceras e lesões (incluindo úlceras estomacais e intestinais), migração de queratinócitos, diferenciação de células endoteliais (vasos sanguíneos e linfáticos), aumento da troca de substância entre as células, prevenção de formações de aderências e bandas fibrosas nos músculos, tendões e ligamentos, protege e restaura os neurônios após lesão cerebral.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Esse estudo mostrou que o composto SRPIN340 reduziram o comportamento metastático *in vitro* das células de melanoma, diminuindo a proliferação, formação de colônia e migração em contrapartida ao peptídeo T β 4, que demonstrou aumentar o comportamento metastático. Os dois tratamentos em conjunto mostram resultados intermediários, o que sugere que T β 4 e SRPKs possuem uma relação funcional. Houve também, modificações com relação à sinalização de proteínas SR e mudanças fenotípicas da actina possivelmente relacionadas com sequestro de AKT e de G-actina. Um primeiro experimento *in vivo* foi feito como piloto para corroborar os resultados encontrados, porém modificações serão necessárias para os próximos experimentos a serem realizados, para que se possa fechar os dados com significância estatística.

É de suma importância, na continuação do projeto, desenvolver experimentos que auxiliarão na confirmação da interação SRPK2/T β 4, como imunoprecipitação, co-localização e imunolocalização. Com a continuação do estudo com o T β 4, há a possibilidade de aprofundar os experimentos utilizando as células knockouts para SRPKs (SRPK1, SRPK2 e Duplo knockout) a fim de melhor entender as vias de sinalização relacionadas às moléculas de interesse. As SRPKs têm sido relatadas como importantes oncoproteínas sendo o conhecimento de suas relações funcionais de suma importância para o entendimento da biologia do câncer e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIZADEH, A. M.; SHIRI, S.; FARSINEJAD, S. Metastasis review: from bench to bedside. **Tumour Biol**, v. 35, n. 9, p. 8483-523, Sep 2014. ISSN 1423-0380.

ANWAR, A. Hosoya T, Leong KM, Onogi H, Okuno Y, Hiramatsu T, Koyama H, Suzuki M, Hagiwara M, Garcia-Blanco MA. The kinase inhibitor SFV785 dislocates dengue virus envelope protein from the replication complex and blocks virus assembly. **PLoS One**, v. 6, n. 8, p. e23246, 2011. ISSN 1932-6203.

ARGILÉS, J.M, Busquets, S, Stemmler, B, López-Soriano, F.J. Cancer cachexia: understanding the molecular basis. **Nat Rev Cancer**. 2014 Nov;14(11):754-62.

BARON N, Deuster O, Noelker C, Stüer C, Strik H, Schaller C, Dodel R, Meyer B, Bacher M. Role of macrophage migration inhibitory factor in primary glioblastoma multiforme cells. **J Neurosci Res**. 2011 May;89(5):711-7.

BECKER-HERMANS, Arie G, Medvedovsky H, Kerem A, Shachar I. CD74 Is a Member of the Regulated Intramembrane Proteolysis-processed Protein Family. **Mol Biol Cell**. 2005 Nov; 16(11): 5061–5069

BISACCHI D, Benelli R, Vanzetto C, Ferrari N, Tosetti F, Albini A. Anti-angiogenesis and angioprevention: mechanisms, problems and perspectives. **Cancer Detect Prev**. 2003; 27(3):229-238.

BOCK-MARQUETTE, I.; SAXENA, A.; WHITE, M. D.; DIMAIO, J. M.; SRIVASTAVA, D. Thymosin beta4 activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair, *Nature*, v. 432, p. 466–472, 2004.

BOURGEOIS, C. F.; LEJEUNE, F.; STEVENIN, J. Broad specificity of SR (serine/arginine) proteins in the regulation of alternative *splicing* of pre-messenger RNA. **Prog Nucleic Acid Res Mol Biol**, v. 78, p. 37-88, 2004. ISSN 0079-6603

BRINKMAN, B. M. N. Splice variants as cancer biomarkers. **Clinical Biochemistry**, v. 37, n. 7, p. 584–594, 2004

BULLOCK N; Potts J; Simpkin, A.J; Koupparis. A; Harper S.J, Oxley J, Oltean S1.. 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, n. 2, p. 171-5, Feb 2016. ISSN 1472-4146.

BULLOCK, N.; OLTEAN, S. The many faces of SRPK1. **Journal of Pathology**, v. 241, p. 437–440, 2017.

BURRIDGE, K.; WENNERBERG, K. Rho and Rac take center stage. *Cell*, v. 116, p. 167-179, 2004.

CALANDRA T, ROGER T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. **Nature**. 2003; 3:791-800.

CATTANEO L, Cicconi R, Mignogna G, Giorgi A, Mattei M, Graziani G, Ferracane R, Grosso A, Aducci P, Schininà ME, Marra M. Anti-Proliferative Effect of Rosmarinus officinalis L. Extract on Human Melanoma A375 Cells. *PLoS One*. 2015 Jul 15;10(7):e0132439.

CASULA, G.; FAA, G. Thymosin b-4 in colorectal cancer is localized predominantly at the invasion front in tumor cells undergoing epithelial mesenchymal transition. *Cancer Biology & Therapy*, v. 13, n. 4, p. 191-197, 2012.

CHA HJ, JEONG MJ, KLEINMAN HK. Role of thymosin beta4 in tumor metastasis and angiogenesis. **J Natl Cancer Inst**. 2003; 95(22):1674–1680. doi:10.1093/jnci/djg100

CHANG Y, Wu Q, Tian T, Li L, Guo X, Feng Z, Zhou J, Zhang L, Zhou S, Feng G, Han F, Yang J, Huang F. The influence of SRPK1 on glioma apoptosis, metastasis, and angiogenesis through the PI3K/Akt signaling pathway under normoxia. **Tumour Biol**, v. 36, n. 8, p. 6083-93, Aug 2015. ISSN 1423-0380.

CHEN S, SHIMODA M, CHEN J, GRAYBURN PA. Stimulation of adult resident cardiac progenitor cells by durable myocardial expression of thymosin beta 4 with ultrasound-targeted microbubble delivery [published correction appears in *Gene Ther*. 2013 Feb;20(2):234]. **Gene Ther**. 2013; 20(2):225–233. doi:10.1038/gt.2012.89

CHENG SP, Liu CL, Chen MJ, Chien MN, Leung CH, Lin CH, Hsu YC, Lee JJ. CD74 expression and its therapeutic potential in thyroid carcinoma **Endocr RelatCancer**. 2015 Apr;22(2):179-90.

CHIU ,S.C.Yang, N.S. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha through selective blockade of Pre-mRNA *splicing* by shikonin. **Mol Pharmacol**. 2007 Jun;71(6):1640-5. Epub 2007 Mar 14

CHO D, Song H, Kim YM, Houh D, Hur DY, Park H, Yoon D, Pyun KH, Lee WJ, Kurimoto M, Kim YB, Kim YS, Choi I. Endogenous interleukin-18 modulates immune escape of murine melanoma cells by regulating the expression of Fas ligand and reactive oxygen intermediates. **Cancer Res**. 2000 May 15;60(10):2703-9.

COOPER, Geoffrey M.; HAUSMAN, Robert E. *The cell: a molecular approach*. 4th ed. Washington: ASM Press: Sinauer Associates, 2007.

CUMMINS DL, Cummins JM, Pantle H, Silverman MA, Leonard AL, Chanmugam A. Cutaneous malignant melanoma. **Mayo Clin Proc**. 2006 Apr;81(4):500-7.

DA SILVA M.R, Moreira G.A, Gonçalves da Silva R.A, de Almeida Alves Barbosa É, Pais Siqueira R, Teixeira R.R, Almeida M.R, Silva Júnior A, Fietto JL, Bressan GC. *Splicing* Regulators and Their Roles in Cancer Biology and Therapy. **Biomed Res Int**. 2015;2015:150514.

DING, J. H.; ZHONG, X. Y.; HAGOPIAN, J. C.; CRUZ, M. M.; GHOSH, G.; FERAMISCO, J.; ADAMS, J. A.; FU, X. D. Regulated cellular partitioning of SR proteinspecific kinases in mammalian cells. *Molecular Biology of the Cell*, v. 17, p. 876–885, 2006.

DOMINGUEZ R, HOLMES KC. Actin structure and function. **Annu Rev Biophys.** 2011; 40:169–186. doi:10.1146/annurev-biophys-042910-155359

DUFFY, S. W. Some current issues in breast cancer screening. **J Med Screen**, v. 12, n. 3, p. 128-33, 2005. ISSN 0969-1413.

ENHANCED PEPTIDES. TB500 10MG (Timosina Beta 4). Disponível em <<https://www.tiosamsuplementos.com.br/tb500-10mg-timosina-beta-4-enhanced-chemicals>> Acessado em 20jan2020

EVANS MA, SMART N, DUBÉ KN, et al. Thymosin β 4-sulfoxide attenuates inflammatory cell infiltration and promotes cardiac wound healing. **Nat Commun.** 2013; 4:2081. doi:10.1038/ncomms3081

FERREIRA JG, Diniz PM, Andrade de Paula CA, Lobo YA, Paredes-Gamero EJ, Paschoalin T, Nogueira-Pedro A, Maza PK, Toledo MS, Suzuki E, Oliva ML. The impaired viability of prostate cancer cell lines by the recombinant plant kallikrein inhibitor. **J Biol Chem.** 2013 May 10;288(19):13641-54.

FIEGEN, D.; HAEUSLER, L. C.; BLUMENSTEIN, L.; HERBRAND, U.; DVORSKY, R.; VETTER, I. R.; AHMADIAN, M. R. Alternative splicing of Rac1 generates Rac1b, a self-activating GTPase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 4743-4749, 2004.

FIGUEIREDO CR, Azevedo RA, Mousdell S, Resende-Lara PT, Ireland L, Santos A, Girola N, Cunha RLOR, Schmid MC, Polonelli L, Travassos LR, Mielgo A. Blockade of MIF-CD74 Signalling on Macrophages and Dendritic Cells Restores the Antitumour Immune Response Against Metastatic Melanoma. **Front Immunol.** 2018 May 23;9:1132.

FU, X. D. The superfamily of arginine-serine-rich splicing factors. **RNA**, v. 1, p. 663–680, 1995.

FUJII M, Lyakh LA, Bracken CP, Fukuoka J, Hayakawa M, Tsukiyama T, Soll SJ, Harris M, Rocha S, Roche KC, Tominaga S, Jen J, Perkins ND, Lechleider RJ & Roberts AB 2006. SNIP1 is a candidate modifier of the transcriptional activity of c-Myc on E box-dependent target genes. **Molecular Cell** 24(5):771–783

FUKUDA T, CHEN K, SHI X & WU C 2003. PINCH-1 is an obligate partner of integrin-linked kinase (ILK) functioning in cell shape modulation, motility, and survival. *The Journal of Biological Chemistry*. 278: 51324–51333

FUKUHARA T, Hosoya T, Shimizu S, Sumi K, Oshiro T, Yoshinaka Y, Suzuki M, Yamamoto N, Herzenberg LA, Herzenberg LA & Hagiwara M 2006. Utilization of host SR protein kinases and RNA-splicing machinery during viral replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(30):11329-33

GAI J.W, Wahafu W, Song L, Ping H, Wang M, Yang F, Niu Y, Qing W, Xing N. Expression of CD74 in bladder cancer and its suppression in association with cancer proliferation, invasion and angiogenesis in HT-1376 cells. **Oncol Lett**. 2018 May;15.

GAMMONS M.V, Lucas R, Dean R, Coupland SE, Oltean S, Bates DO. Targeting SRPK1 to control VEGF-mediated tumour angiogenesis in metastatic melanoma. **Br J Cancer**, v. 111, n. 3, p. 477-85, Jul 29 2014. ISSN 1532-1827.

GAO X, Liang H, Hou F, et al. Thymosin Beta-4 Induces Mouse Hair Growth. **PLoS One**.2015;10(6):e0130040.Published 2015 Jun 17. doi:10.1371/journal.pone.0130040

GEMOLL, T.; STROHKAMP, S.; SCHILLO, K.; THORNS, C.; HABERMANN, J. K. MALDI-imaging reveals thymosin beta-4 as an independent prognostic marker for colorectal cancer. **Oncotarget**, v. 6, n. 41, p. 43869-43880, 2015

GIANNAKOUROS, T. NIKOLAKAKI E, MYLONIS I, GEORGATSOU E. Serine-arginine protein kinases: a small protein kinase family with a large cellular presence. **FEBS J**, v. 278, n. 4, p. 570-86, Feb 2011. ISSN 1742-4658.

GIL-YAROM N, Radomir L, Sever L, Kramer MP, Lewinsky H, Bornstein C, Blecher-Gonen R, Barnett-Itzhaki Z, Mirkin V, Friedlander G, Shvidel L, Herishanu Y, Lolis EJ, BECKER-HERMAN S, AMIT I, SHACHAR I. CD74 is a novel transcription regulator. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2017 Jan 17;114(3):562-567

GONÇALVES, V.; HENRIQUES, A.F.; PEREIRA, J.F.; NEVES COSTA, A.; MOYER, M.P.; MOITA, L.F.; GAMA-CARVALHO, M.; MATOS, P.; JORDAN, P. Phosphorylation of SRSF1 by SRPK1 regulates alternative splicing of tumor related Rac1b in colorectal cells. **RNA**, v. 20, n. 4, p. 474-482, 2014.

GONCALVES, V.; JORDAN, P. Posttranscriptional Regulation of *Splicing* Factor SRSF1 and Its Role in Cancer Cell Biology. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 287048, 2015. ISSN 2314-6141 (Electronic).

GORE Y, Starlets D, Maharshak N, Becker-Herman S, Kaneyuki U, Leng L, Bucala R, Shachar I. Macrophage migration inhibitory factor induces B cell survival by activation of a CD74-CD44 receptor complex. **J Biol Chem**. 2008 Feb 1;283(5):2784-92

GOUBRAN, H. A. Regulation of tumor growth and metastasis: the role of tumor microenvironment. **Cancer Growth Metastasis**, v. 7, p. 9-18, 2014. ISSN 1179-0644.

GOUT, S, Brambilla E, Boudria A, Drissi R, Lantuejoul S, Gazzeri S, Eymin B.. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e46539, 2012. ISSN 1932-6203.

GREENWOOD C1, Metodieva G, Al-Janabi K, Lausen B, Alldridge L, Leng L, Bucala R, Fernandez N, Metodiev MV. Stat1 and CD74 overexpression is co-dependent and linked to increased invasion and lymph node metastasis in triple-negative breast cancer **J Proteomics**. 2012 Jun 6;75(10):3031-40.

GRIMM, E.A, SIKORA, A.G, EKMEKCIOGLU S. Molecular pathways: inflammation-associated nitric-oxide production as a cancer-supporting redox mechanism and a potential therapeutic target. **Clin Cancer Res**. 2013 Oct 15;19(20):5557-63

GUAN, X. Cancer metastases: challenges and opportunities. **Acta Pharm Sin B**, v. 5, n. 5, p. 402-18, Sep 2015. ISSN 2211-3835.

GUANG-LIANG Chen, Yubin L, Daniel E, *et al.* High fat diet increases melanoma cell growth in the bone marrow by inducing osteopontin and interleukin 6. *Oncotarget*. 2016 May 3.

HAGIWARA, M.; FUKUHARA, T.; SUZUKI, M.; HOSOYA, T. Method for Controlling Protein Phosphorylation, and Antiviral Agents Whose Active Ingredients Comprise Agents that Control SR Protein Activity. United States Patent. US7569536 B2, 2009

HATCHER J.M, Wu G, Zeng C, Zhu J, *et al.* SRPKIN-1: A Covalent SRPK1/2 Inhibitor that Potently Converts VEGF from Pro-angiogenic to Anti-angiogenic Isoform. **Cell Chem Biol**. 2018 Apr 19;25(4):460-470.e6.

HAN, X., Yang, J., Jia, Z., Wei, P., Zhang, H., Lv, W., Sun, J., Huo, Q. Knockdown of Serine-Arginine Protein Kinase 1 Inhibits the Growth and Migration in Renal Cell Carcinoma Cells. **Oncol. Res**. 25, 389–395. 2017

HANAHAN D, WEINBERG RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**. 2011; 144(5):646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013

HARRIS, A. L. Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth. *Nature Reviews Cancer*, v. 2, p. 38–47, 2002

HAVENS, M. A.; Duelli, D. M.; Hastings, M. L. Targeting RNA *splicing* for disease therapy. **Wiley Interdiscip Rev RNA**, v. 4, n. 3, p. 247-66, May-Jun 2013. ISSN 1757-7012.

HAYES, G. M, Carrigan PE, Beck AM, Miller LJ. Targeting the RNA *splicing* machinery as a novel treatment strategy for pancreatic carcinoma. **Cancer Res**, v. 66, n. 7, p. 3819-27, Apr 1 2006. ISSN 0008-5472.

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, p. 2072-80, Mar 1 2007. ISSN 0008-5472.

HINKEL R, TRENKWALDER T, PETERSEN B, et al. MRTF-A controls vessel growth and maturation by increasing the expression of CCN1 and CCN2. *Nat Commun*. 2014

HONG, K. O.; LEE, J. I.; HONG, S. P.; HONG, S. D. Thymosin β 4 induces proliferation, invasion, and epithelial-to-mesenchymal transition of oral squamous cell carcinoma. *Amino Acids*, v. 48, p. 117–127, 2016.

HUANG, L. E.; GU, J.; SCHAU, M.; BUNN, H. F. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 95, p. 7987–7992, 1998

HUANG HC, HU CH, TANG MC, WANG WS, CHEN PM, SU Y. Thymosin beta4 triggers an epithelial-mesenchymal transition in colorectal carcinoma by upregulating integrin-linked kinase. **Oncogene**. 2007; 26(19):2781–2790. doi:10.1038/sj.onc.1210078

HUANG D, WANG S, WANG A, CHEN X, ZHANG H. Thymosin beta 4 silencing suppresses proliferation and invasion of non-small cell lung cancer cells by repressing Notch1 activation. **Acta Biochim Biophys Sin** (Shanghai). 2016; 48(9):788–794. doi:10.1093/abbs/gmw070

HUH, Y. H. Kim SH, Chung KH, Oh S, Kwon MS, Choi HW, Rhee S, Ryu JH, Park ZY, Jun CD, Song WK. Swiprosin-1 modulates actin dynamics by regulating the F-actin accessibility to cofilin. **Cell Mol Life Sci**, v. 70, n. 24, p. 4841-54, Dec 2013. ISSN 1420-9071.

HUFF, T.; MULLER, C.S.G.; OTTO, A. M.; NETZKER, R.; HANNAPPEL, E. B-
Thymosins, small acidic peptides with multiple functions. **The International Journal
of Biochemistry & Cell Biology**, v. 33, p. 205–220, 2001.

HUI ZHAO, Guosheng W, Ji Z, Mengyan S, *et al.* Melanocyte-specific gene 1 promotes
melanoma progression by enhancing the expression of Bcl-2 **Oncol Lett.** 2018 Feb;
15(2): 2413–2418.

IMHOF BA, Aurrand-Lions M. Angiogenesis and inflammation face off. **Nat
Med.**2006;12:171-2.

ITAKURA E, Huang, R.R, Wen, D.R, Paul E, Wünsch, P.H, Cochran, A.J. IL-10
expression by primary tumor cells correlates with melanoma progression from radial to
vertical growth phase and development of metastatic competence. **Mod Pathol.** 2011
Jun;24(6):801-9.

ITO, M.; IGUCHI, K.; USUI, S.; HIRANO, K. Overexpression of Thymosin b4 Increases
Pseudopodia Formation in LNCaP Prostate Cancer Cells. *Biological and
Pharmaceutical Bulletin*, v. 32, n. 6, p. 1101—1104, 2009.

JANG SW1, Liu X, Fu H, Rees H, Yepes M, Levey A, Ye K. Interaction of Akt-
phosphorylated SRPK2 with 14-3-3 mediates cell cycle and cell death in neurons. **J
Biol Chem.** 2009 Sep 4;284(36):24512-25

JANG SW, Yang SJ, Ehlén A, Dong S, Khoury H, Chen J, Persson JL, Ye K.
Serine/arginine protein-specific kinase 2 promotes leukemia cell proliferation by
phosphorylating acinus and regulating cyclin A1.**Cancer Res.** 2008 Jun
15;68(12):4559-70.

JERANT, A. F. Johnson JT, Sheridan CD, Caffrey TJ. Early detection and treatment of
skin cancer. **Am Fam Physician**, v. 62, n. 2, p. 357-68, 375-6, 381-2, Jul 15 2000.
ISSN 0002-838X.

JESSE B. Wolinsky, Yolonda L. Colson, Mark W. Grinstaff. Local Drug Delivery Strategies for Cancer Treatment: Gels, Nanoparticles, Polymeric Films, Rods, and Wafers. **J Control Release**, 2011.

JI, P.; DIEDERICHS, S.; WANG, W.; *et al.* MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin b4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene*, v. 22, p. 8031–8041, 2003.

JO, J. O.; KIM, S. R.; BAE, M. K.; KANG, Y. J.; OCK, M. S.; KLEINMAN, H. K.; CHA, H. J. Thymosin β 4 induces the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in a hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α -dependent manner. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1803, p. 1244–1251, 2010.

JORDAN, P.; BRAZAO, R., BOAVIDA, M. G.; GESPACH, C.; CHASTRE, E. Cloning of a novel human Rac1b splice variant with increased expression in colorectal tumors. *Oncogene*, v. 18, p. 6835-6839, 1999

JURICA M. S.; MOORE, M. J. Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Molecular. Cell*, v. 12, p. 5–14, 2003.

KARAKAMA, Y. Sakamoto N, Itsui Y, Nakagawa M, Tasaka-Fujita M, Nishimura-Sakurai Y, Kakinuma S, Oooka M, Azuma S, Tsuchiya K, Onogi H, Hagiwara M, Watanabe M.. Inhibition of hepatitis C virus replication by a specific inhibitor of serine-arginine-rich protein kinase. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 8, p. 3179-86, Aug 2010. ISSN 1098-6596.

KIM J, Shao Y, Kim SY, Kim S, Song HK, Jeon JH, Suh HW, Chung JW, Yoon SR, Kim YS & Choi I (2008). Hypoxia-induced IL-18 increases hypoxia-inducible factor-1 α expression through a Rac1-dependent NF- κ B pathway. **Mol Biol Cell** 19, 433–444.

KIM J, JUNG Y. Potential role of thymosin Beta 4 in liver fibrosis. **Int J Mol Sci**. 2015; 16(5):10624–10635. Published 2015 May 8. doi:10.3390/ijms160510624

KIM R.H, Wang D, Tsang M, Martin J, Huff C, de Caestecker MP, Parks WT, Meng X, Lechleider RJ, Wang T & Roberts AB 2000. A novel smad nuclear interacting protein, SNIP1, suppresses p300- dependent TGF-beta signal transduction. **Genes & Development** 14(13): 1605–1616.

KINDT N, Journe F, Laurent G, Saussez S. Involvement of macrophage migration inhibitory factor in cancer and novel therapeutic targets. **Oncol Lett.** 2016 Oct;12(4):2247-2253. Epub 2016 Aug 2.

KORN, E. L. Liu PY, Lee SJ, Chapman JA, Niedzwiecki D, Suman VJ, Moon J, Sondak VK, Atkins MB, Eisenhauer EA, Parulekar W, Markovic SN, Saxman S, Kirkwood JM. Meta-analysis of phase II cooperative group trials in metastatic stage IV melanoma to determine progression-free and overall survival benchmarks for future phase II trials. **J Clin Oncol**, v. 26, n. 4, p. 527-34, Feb 1 2008. ISSN 1527-7755.

KUROYANAGI, N.; ONOGI, H.; WAKABAYASHI, T.; HAGIWARA, M. Novel SR-Protein-Specific Kinase, SRPK2, Disassembles Nuclear Speckles. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 242, p. 357-364, 1998.

KWON, M. S. Park KR, Kim YD, Na BR, Kim HR, Choi HJ, Piragyte I, Jeon H, Chung KH, Song WK, Eom SH, Jun CD. Swiprosin-1 is a novel actin bundling protein that regulates cell spreading and migration. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e71626, 2013. ISSN 1932-6203.

LAI, Y. W. Wang SW, Chang CH, Liu SC, Chen YJ, Chi CW, Chiu LP1, Chen SS, Chiu AW. Chung CH8 Butein inhibits metastatic behavior in mouse melanoma cells through VEGF expression and translation-dependent signaling pathway regulation. **BMC Complement Altern Med**, v. 15, n. 1, p. 445, 2015. ISSN 1472-6882.

LARSSON LI, Holck S. Localization of thymosin beta-4 in tumors. **Ann N Y Acad Sci.** 2007;1112:317–325. doi:10.1196/annals.1415.005

LEE, J. W.; RYU, Y. K.; JI, Y. H.; KANG, J. H.; MOON, E. Y. Hypoxia/reoxygenation-experienced cancer cell migration and metastasis are regulated by Rap1- and Rac1-GTPase activation via the expression of thymosin beta-4. *Oncotarget*, v. 6, n. 12, p. 9820-9833, 2015

LEVAYER, R.; LECUIT, T. Breaking down EMT. *Nature Cell Biology*, v.10, p.757-759, 2008.

LEGATE, K.R.; Montañez, E.; Kudlacek, O.; Füssler, R. Ilk, pinch and parvin: The tipp of integrin signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006, 7, 20–31.

LI H, Qiu Z, Li F, Wang C. The relationship between MMP-2 and MMP-9 expression levels with breast cancer incidence and prognosis. *Oncol Lett.* 2017 Nov;14(5):5865-5870.

LIFE TECH LABS. TB-500 – Peptídeo acetato de Tomosina Beta-4. Disponível em <<https://pt-br.lifetech-labs.to/biopeptide/tb-500/>> Acessado em 20jan2020

LINDNER R. Invariant Chain Complexes and Clusters as Platforms for MIF Signaling. **Cells.** 2017 Feb 10;6(1)

LIU YH, Lin CY, Lin WC, Tang SW, Lai MK, Lin JY. Up-regulation of vascular endothelial growth factor-D expression in clear cell renal cell carcinoma by CD74: a critical role in cancer cell tumorigenesis. *J Immunol.* 2008 Nov 1;181(9):6584-94.

LIU CH, Chang FY, Hung DK. Terpene microemulsions for transdermal curcumin delivery: effects of terpenes and cosurfactants. **Colloids Surf B Biointerfaces.** 2011 Jan 1;82(1):63-70.

LIU, H. Hu X, Zhu Y, Jiang G, Chen S. Up-regulation of SRPK1 in non-small cell lung cancer promotes the growth and migration of cancer cells. **Tumour Biol**, Dec 14 2015. ISSN 1423-0380.

LIU YH, Lin CY, Lin WC, Tang SW, Lai MK, Lin JY. Up-regulation of vascular endothelial growth factor-D expression in clear cell renal cell carcinoma by CD74: a critical role in cancer cell tumorigenesis. **J Immunol.** 2008 Nov 1;181(9):6584-94.

LONG, J. C.; Caceres, J. F. The SR protein family of *splicing* factors: master regulators of gene expression. **Biochem J**, v. 417, n. 1, p. 15-27, Jan 1 2009. ISSN 1470-8728

LOW, T. L.; HU, S. K.; GOLDSTEIN, A. L. Complete amino acid sequence of bovine thymosin beta 4: a thymic hormone that induces terminal deoxynucleotidyl transferase activity in thymocyte populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences** (PNAS), v. 78, p. 1162–1166, 1981

LUE H. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. **Microbes Infect.** 2002;4(4):449–460.

LUE H, THIELE M, FRANZ J. Macrophage migration inhibitor factor (MIF) promotes cell survival by activation of the Akt pathway and role for CSN5/JAB1 in the control of autocrine MIF activity. **Oncogene**, 2007; 26(35):5046–5059.

LV, S.; CHENG, G.; ZHOU, Y.; XU, G. Thymosin beta4 induces angiogenesis through Notch signaling in endothelial cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.381,p.283–290, 2013.

MANNHERZ HG, HANNAPPEL E. The beta-thymosins: intracellular and extracellular activities of a versatile actin binding protein family. **Cell Motil Cytoskeleton.** 2009

MANTOVANI A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-Related Inflammation. **Nature** 454(7203): 436–44. 2010.

MANNING BD.; CANTLEY LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. **Cell**, v. 129, p. 1261–1274, 2007.

MASOOD R, Cai J, Zheng T, Smith DL, Hinton DR, Gill PS. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor-positive human tumors. **Blood**. 2001

MAVROU, A, Brakspear K, Hamdollah-Zadeh M, *et al*. Serine-arginine protein kinase 1 (SRPK1) inhibition as a potential novel targeted therapeutic strategy in prostate cancer. **Oncogene**, v. 34, n. 33, p. 4311-9, Aug 13 2015. ISSN 1476-5594

MATOS, P.; GONÇALVES, V.; JORDAN, P. Targeting the serrated pathway of colorectal cancer with mutation in BRAF. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1866, n. 1, p. 51-63, 2016.

MC DONALD, P.C.; Fielding, A.B.; Dedhar, S. Integrin-linked kinase-essential roles in physiology and cancer biology. **J. Cell Sci**. 2008, 121, 3121–3132.

MELLO, A. O. Identificação de novos parceiros de interação para a cinase reguladora de splicing SRPK2. 2014. 91p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2014.

MELNIKOVA V, Bar-Eli M. Inflammation and melanoma metastasis. **Pigment Cell. Melanoma Res**. 2009 Jun;22(3):257-67.

MILLER, A. J.; Mihm, M. C., Jr. Melanoma. **N Engl J Med**, v. 355, n. 1, p. 51-65, Jul 6 2006. ISSN 1533-4406

MOON, E. Y.; IM, Y. S.; RYU, Y. K.; KANG, J. H. Actin-sequestering protein, thymosin beta-4, is a novel hypoxia responsive regulator. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 27, p. 601–609, 2010.

MOREIRA GA, LIMA GDA, SIQUEIRA RP, *et al*. Antimetastatic effect of the pharmacological inhibition of serine/arginine-rich protein kinases (SRPK) in murine melanoma. **Toxicol Appl Pharmacol**. 2018; 356:214–223. doi:10.1016/j.taap.2018.08.012

MOSER, K., Kriwet, K., Froehlich, C., Naik, A., Kalia, Y. N., Guy, R. H. Permeation enhancement of a highly lipophilic drug using supersaturated systems. **J. Pharm.Sci.**, v.90, n.5, p.607-616, 2001.

NAKAGAWA O, Arnold M, Nakagawa M, *et al.* Centronuclear myopathy in mice lacking a novel muscle-specific protein kinase transcriptionally regulated by MEF2. **Genes Dev**, v. 19, n. 17, p. 2066-77, Sep 1 2005.

NASR BOUZAIENE N, Chaabane F, Sassi A, Chekir-Ghedira L, Ghedira K. Effect of apigenin-7-glucoside, genkwanin and naringenin on tyrosinase activity and melanin synthesis in B16F10 melanoma cells. **Life Sci.** 2016 Jan 1;144:80-5.

NEMOLATO, S.; RESTIVO, A.; CABRAS, T.; *et al.* Tumor Progression Is Mediated by Thymosin- β 4 through a TGF β /MRTF Signaling Axis. **Mol Cancer Res.** 2018; 16(5):880–893.

NIKOLAKAKI E, Kohen R, Hartmann AM, Stamm S, Georgatsou E, Giannakouros T. Cloning and characterization of an alternatively spliced form of SR protein kinase 1 that interacts specifically with scaffold attachment factor-B. **J Biol Chem**, v. 276, n. 43, p. 40175-82, Oct 26 2001. ISSN 0021-9258.

NOBRE, C.C, DE ARAÚJO, J.M, FERNANDES, T.A, COBUCCI, R.N, LANZA, D.C, ANDRADE, V.S, FERNANDES, J.V. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF): Biological Activities and Relation with Cancer. **Pathol Oncol Res.** 2017 Apr;23(2):235-244.

OLSZANSKI AJ. Current and Future Roles of Targeted Therapy and Immunotherapy in Advanced Melanoma. 2014;20(4).

OH, J. M.; RYOO, I. J.; YANG, Y.; KIM, H. S.; YANG, K. H.; MOON, E. Y. Hypoxia-inducible transcription factor (HIF)-1 α stabilization by actin-sequestering protein, thymosin beta-4 (TB4) in Hela cervical tumor cells. *Cancer Letters*, v. 264, p. 29–35, 2008.

OH, S. Y.; SONG, J. H.; GIL, J. E.; KIM, J. H.; YEOM, Y. I.; MOON, E. Y. ERK activation by Thymosin-beta-4 (TB4) overexpression induces paclitaxel-resistance. *Experimental Cell Research*, v. 312, p. 1651-1657, 2006

PASSARELLI A, Mannavola F, Stucci LS, Tucci M, Silvestris F. Immune system and melanoma biology: a balance between immunosurveillance and immune escape. **Oncotarget**. 2017 Oct 31;8(62):106132-106142

PIAO, Z.; HONG, C. S.; JUNG, M. R.; CHOI, C.; PARK, Y. K. Thymosin beta4 induces invasion and migration of human colorectal cancer cells through the ILK/ AKT/beta-catenin signaling pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 452, p. 858–864, 2014.

PHILIP M, Rowley Da, Schreiber H. Inflammation as a tumor promoter in câncer induction. **SeminCancer Biol**.2004; 14:433-9.

PHILP D, Nguyen M, Scheremeta B, St-Surin S, Villa A M, *et al.*(2004). Thymosin beta 4 increases hair growth by activation of hair follicle stem cells. *FASEBJ* 18:385–387.PMID:14657002 9.

PHILP D, St-Surin S, Cha H J, Moon H S, Kleinman H K, *et al.* (2007) Thymosin beta 4 induces hair growth via stem cell migration and differentiation. *Ann NY Acad Sci* 1112:95–103. PMID:17947589

QING-MIN Yao, Pei-Pei Li, Shu-Mei Liang, Kang Lu, Xiao-Juan Zhu, Yan-Xia Liu, Feng Zhang, Ting Yuan, Xin Wang. Methylprednisolone suppresses the Wnt signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia cell line MEC-1 regulated by LEF-1 expression. **Int J Clin Exp Pathol**. 2015.

QUERY, C. C. Structural biology: Spliceosome subunit revealed. *Nature*, v. 458, n. 7237, p. 418-9, Mar 26 2009.

RADISKY, D. C.; LEVY, D. D.; LITTLEPAGE, L. E.; LIU, H.; NELSON, C. M.; FATA, J. E.; LEAKE, D.; GODDEN, E. L.; ALBERTSON, D. G.; NIETO, M. A.; WERB, Z.; BISSELL, M. J. Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature*, v. 436, p. 123-127, 2005.

REN G, Sheng L, Liu H, Sun Y, An Y, Li Y. The crucial role of SRPK1 in TGF-beta-induced proliferation and apoptosis in the esophageal squamous cell carcinomas. **Med Oncol**, v. 32, n. 7, p. 209, Jul 2015. ISSN 1559-131X.

ROCHA S., Martin A. M., Meek D. W., Perkins N. D. p53 Represses Cyclin D1 Transcription through Down Regulation of Bcl-3 and Inducing Increased Association of the p52 NF- κ B Subunit with Histone Deacetylase (2003) *Mol. Cell. Biol.* 23, 4713–4727

ROCHE, K.C, Wiechens N, Owen-Hughes T, Perkins N.D. The Fha domain protein SNIP1 is a regulator of the cell cycle and cyclin D1 expression. **Oncogene** 23: 8185–8195, 2004.

RODRIGUEZ L.G, Wu X, Guan J.L. Wound-healing assay. **Methods Mol Biol.**;294:23-9. 2005

ROOSMALEN, W. V.; DÉVÉDEC, S. E. L.; GOLANI, O.; *et al.* Tumor cell migration screen identifies SRPK1 as breast cancer metastasis determinant. *Journal of Clinical Investigation*, v. 125, p. 1648–1664, 2015.

SAHA A, Lee YC, Zhang Z, Chandra G, Su SB, Mukherjee AB. Lack of an endogenous anti-inflammatory protein in mice enhances colonization of B16F10 melanoma cells in the lungs. **J Biol Chem.** 2010 Apr 2;285(14):10822-31.

SANTANA, M. A. N, Silva, I. B, Barbosa, J.A P., Lima, I. R. Vieira, J. R. C., Lima, Leite, R. M. P, Leite, S. P. L. Histomorphometric analysis in kidney tissue of mice treated with *Indigofera Suffruticosa* Mill. **Internacional Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. ISSN, 0975-1491, 2015.

SANTRA M, ZHANG ZG, YANG J, et al. Thymosin β 4 up-regulation of microRNA-146a promotes oligodendrocyte differentiation and suppression of the Toll-like proinflammatory pathway. **J Biol Chem.** 2014; 289(28):19508–19518. doi:10.1074/jbc.M113.529966

SCHAGGER, H. Tricine-SDS-PAGE. **Nature Protocols** 1, 16–22 (2006)

SCHINDLER L, Dickerhof N, Hampton MB, Bernhagen J. Post-translational regulation of macrophage migration inhibitory factor: Basis for functional fine-tuning. *Redox Biol.* 2018 May;15:135-142.

SCHNELZER, A.; PRECHTEL, D.; KNAUS, U.; DEHNE, K.; GERHARD, M.; GRAEFF, H.; HARBECK, N.; SCHMITT, M.; LENGYEL, E. Rac1 in human breast cancer: overexpression, mutation analysis, and characterization of a new isoform, Rac1b. *Oncogene*, v. 19, n. 26, p. 3013–3020, 2000.

SCHRÖDER B, Saftig P (2016) Intramembrane proteolysis within lysosomes. **Ageing ResRev** 32:51–64.

SETHI, N.; Kang, Y. Notch signalling in cancer progression and bone metastasis. **Br J Cancer**, v. 105, n. 12, p. 1805-10, Dec 6 2011. ISSN 1532-1827.

SHEPARD PJ E HERTEL KJ. The SR protein family. **Genome Biology** 10 (10): 242. 2009

SHI X, Leng L, Wang T . CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. **Immunity**, 2006; 25(4):595–606.

SHUMAN MOSS, LA.; JENSEN-TAUBMAN, S.; STETLER-STEVENSON, WG. Matrix metalloproteinases: changing roles in tumor progression and metastasis. **Am J Pathol**, v. 181, n. 6, p. 1895-9, Dec 2012. ISSN 1525-2191.

SIGALA I, Tsamis KI, Gousia A, Alexiou G, Voulgaris S, Giannakouros T, Kyritsis AP, Nikolakaki E. Expression of SRPK1 in gliomas and its role in glioma cell lines viability. **Tumour Biol**, Jan 6 2016. ISSN 1423-0380.

SIGMA ALDRICH. Estrutura SRPIN340. Disponível em <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/sml1088?lang=pt®ion=BR>> Acessado em 20jan2020.

SILVA, M.R; Jacques C.M.C. Epidermal barrier function and systemic diseases. **Clinics in dermatology**, v. 30, p. 277-279, Elsevier,2012.

SINGH, R. K. Cooper, T. A. Pre-mRNA *splicing* in disease and therapeutics. **Trends Mol Med**, v. 18, n. 8, p. 472-82, Aug 2012. ISSN 1471-499X.

SIQUEIRA, R. P. Barbosa É de A, Polêto MD, Righetto GL, Seraphim TV, Salgado RL, Ferreira JG, Barros MV, de Oliveira LL, Laranjeira AB, Almeida MR, Júnior AS, Fietto JL, Kobarg J, de Oliveira EB, Teixeira RR, Borges JC, Yunes JA, Bressan GC. 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, p. e0134882, 2015. ISSN 1932-6203.

SOSNE, G., KLEINMAN, H.K. Primary mechanisms of thymosin b4 repair activity in dry eye disorders and other tissue injuries. **Invest Ophthalmol Vis Sci**; 56:5110–5117, 2015.

SMART, N.; RIEGLER, J.; TURTLE, C. *et al.* Aberrant developmental titin splicing and dysregulated sarcomere length in Thymosin β 4 knockout mice. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v. 102, p. 94–107, 2017

SPORN, M. B. The war on cancer. **Lancet**, v. 347, n. 9012, p. 1377-81, May 18 1996. ISSN 0140-6736.

SSADH HA, Spencer PS, Alabdulmenaim W1, Alghamdi R, Madar IH, Miranda-Sayago JM, Fernández N. Measurements of heterotypic associations between cluster of differentiation CD74 and CD44 in human breast cancer-derived cells. **Oncotarget**. 2017 Sep 14;8(54):92143-92156.

STARLETS D, Gore Y, Binsky I, Haran M, Harpaz N, Shvidel L, Becker-Herman S, Berrebi A, Shachar I. Cell-surface CD74 initiates a signaling cascade leading to cell proliferation and survival. **Blood**. 2006 Jun 15;107(12):4807-16.

SUMAN P, Ramachandran H, Sahakian S, et al. The use of angiogenic-antimicrobial agents in experimental wounds in animals: problems and solutions. **Ann N Y Acad Sci**. 2012;1270:28–36. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06653.x

TANG, M. C.; CHAN, L. C.; YEH, Y. C.; CHEN, C. Y.; CHOU, T. H.; WANG, W. S.; SU, Y. Thymosin beta 4 induces colon cancer cell migration and clinical metastasis via enhancing ILK/IQGAP1/Rac1 signal transduction pathway. **Cancer Letters**, v. 308, p. 162–171, 2011.

TANG, Y. Lv P, Sun Z, Han L, Zhou W. 14-3-3beta Promotes Migration and Invasion of Human Hepatocellular Carcinoma Cells by Modulating Expression of MMP2 and MMP9 through PI3K/Akt/NF-kappaB Pathway. **PLoS One**, v. 11, n. 1, p. e0146070, 2016. ISSN 1932-6203.

TANESE K, Hashimoto Y, Berkova Z, Wang Y, Samaniego F, Lee JE Ekmekcioglu S5, GRIMM EA5. Cell Surface CD74-MIF Interactions Drive Melanoma Survival in Response to Interferon- γ . **J Invest Dermatol**. 2015 Nov;135(11):2775-2784. doi: 10.1038/jid.2015.204. Epub 2015 Jun 3.

TILLMANN S, Bernhagen J, Noels H. Arrest Functions of the MIF Ligand/Receptor Axes in Atherogenesis. *Front Immunol*. 2013 May 16;4:115.

UPHEBER S, Karle A, Miller J, Schlaugk S, Gross E, Reuning U. Alternative *splicing* of KAI1 abrogates its tumor-suppressive effects on integrin $\alpha\beta 3$ -mediated ovarian cancer biology. **Cell Signal**. 2015 Mar;27(3):652-62.

VAN AELST, L.; D'SOUZA-SCHOREY, C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes & Development*, v. 11, p. 2295-2322, 1997.

VAN ROOSMALEN W, Le Dévédec SE, Golani O, Smid M, Pulyakhina I, Timmermans AM, Look MP, Zi D, Pont C, de Graauw M, Naffar-Abu-Amara S, Kirsanova C, Rustici G, Hoen PA, Martens JW, Foekens JA, Geiger B, van de Water B. Tumor cell migration screen identifies SRPK1 as breast cancer metastasis determinant. **J Clin Invest**, v. 125, n. 4, p. 1648-64, Apr 2015. ISSN 1558-8238.

VARINELLI L, Caccia D, Volpi, C.C, Caccia C, De Bortoli. M, Taverna E, Gualeni A.V, Leoni V, Gloghini A, Manenti G, Bongarzone I. 4-IPP, a selective MIF inhibitor, causes mitotic catastrophe in thyroid carcinomas. *Endocr Relat Cancer*. 2015 Oct;22(5):759-75.

VIDAL-VANACLOCHA F, Fantuzzi G, Mendoza, Fuentes Am, Anasagasti Mj, Martin J. L IL-18 regulates IL-1beta-dependent hepatic melanoma metastasis via vascular cell adhesion molecule-1. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2000;97:734-9.

VILLANUEVA J, Herlyn M. Melanoma and the tumor microenvironment. **Curr Oncol Rep**. 2008 Sep;10(5):439-46.

WANG R, Brattain MG (2007) The maximal size of protein to diffuse through the nuclear pore is larger than 60kDa. **FEBS Lett** 581(17):3164–3170.

WANG, H. Y. Lin W, Dyck JA, Yeakley JM, Songyang Z, Cantley LC, Fu XD. SRPK2: a differentially expressed SR protein-specific kinase involved in mediating the interaction and localization of pre-mRNA *splicing* factors in mammalian cells. **J Cell Biol**, v. 140, n. 4, p. 737-50, Feb 23 1998. ISSN 0021-9525.

WANG WS, Chen PM, Hsiao HL, Wang HS, Liang WY, Su Y. Overexpression of the thymosin beta-4 gene is associated with increased invasion of SW480 colon carcinoma cells and the distant metastasis of human colorectal carcinoma. **Oncogene**. 2004.

WANG, J. Zhang J, Li K, Zhao W, Cui Q. SpliceDisease database: linking RNA *splicing* and disease. **Nucleic Acids Res**, v. 40, n. Database issue, p. D1055-9, Jan 2012. ISSN 1362-4962.

WANG J, Wu HF, Shen W, Xu DY, Ruan TY, Tao GQ, Lu PH. SRPK2 promotes the growth and migration of the colon cancer cells. **Gene**. 2016 Jul 15;586(1):41-7

WANG, W., Chen, P., Hsiao, H. *et al.* Overexpression of the thymosin β -4 gene is associated with malignant progression of SW480 colon cancer cells. **Oncogene** 22, 3297–3306 (2003).

WEBER, G. F. Why does cancer therapy lack effective anti-metastasis drugs? **Cancer Lett**, v. 328, n. 2, p. 207-11, Jan 28 2013. ISSN 1872-7980.

WILSON J, Balkwill F. The role of cytokines in the epithelial cancer microenvironment. **Semin Cancer Biol**. 2002 Apr; 12(2):113-120.

WU Q, Chang Y, Zhang L, *et al.* SRPK1 Dissimilarly Impacts on the Growth, Metastasis, Chemosensitivity and Angiogenesis of Glioma in Normoxic and Hypoxic Conditions. **J Cancer**, v. 4, n. 9, p. 727-35, 2013. ISSN 1837-9664.

XIANMIN Bu, Chenghai Zhao, Xianwei Dai Involvement of COX-2/PGE2 Pathway in the Upregulation of MMP-9 Expression in Pancreatic Cancer **Gastroenterol Res Pract**. 2011

XIAO, S. H.; MANLEY, J. L. **Phosphorylation of the ASF/SF2 RS domain affects both protein–protein and protein–RNA interactions and is necessary for splicing**. *Genes & Development*, v. 11, p. 334–344, 1997.

XIAO R., Sun Y., Ding J. H., Lin S., Rose D. W., Rosenfeld M. G., Fu X. D., Li X. *Splicing Regulator SC35 Is Essential for Genomic Stability and Cell Proliferation during Mammalian Organogenesis* (2007) *Mol. Cell. Biol.* 27, 5393–5402.

YADDANAPUDI K, Putty K, Rendon BE, Lamont GJ, Faughn JD, Satoskar A, Lasnik A, Eaton JW, Mitchell RA. Control of tumor-associated macrophage alternative activation by macrophage migration inhibitory factor. **J Immunol.** 2013 Mar 15;190(6):2984-93.

YANG, G. L. Tao HR, Wang HW, Sun Y, Zhang LD, Zhang C, He W, Xu MH, Zhao JM, Gao FH .Ara-C increases gastric cancer cell invasion by upregulating CD-147-MMP-2/MMP9 via the ERK signaling pathway. **Oncol Rep**, v. 33, n. 4, p. 2045-51, Apr 2015. ISSN 1791-2431.

YAMAZAKI, D.; KURISU, S.; TAKENAWA, T. Regulation of cancer cell motility through actin reorganization. *Cancer Science*, v. 96, p. 379–386, 2005.

ZHANG, Y.; FEURINO, L. W.; ZHAI, Q.; WANG, H.; FISHER, W. E.; CHEN, C.; YAO, Q., LI, M. Thymosin Beta 4 is Overexpressed in Human Pancreatic Cancer Cells and Stimulates Proinflammatory Cytokine Secretion and JNK Activation. **Cancer Biology & Therapy**, v. 7, n. 3, p. 419–423, 2008.

ZHANG, J. Jiang H, Xia W, Jiang Y, Tan X, Liu P, Jia H, Yang X, Shen G. Serine-arginine protein kinase 1 is associated with hepatocellular carcinoma progression and poor patient survival. **Tumour Biol**, Jul 23 2015. ISSN 1423-0380.

ZHAO Z, Chen C, Liu Y, Wu C. 17 β -Estradiol treatment inhibits breast cell proliferation, migration and invasion by decreasing MALAT-1 RNA level. **Biochem Biophys Res Commun.** 2014 Mar 7;445(2):388-93.

ZHIYONG L, Shuzhou Chu, Shun Yao, Yu Li, Songqing Fan, Xiaoyang Sun, Ling Su, Xiangguo Liu. CD74 interacts with CD44 and enhances tumorigenesis and metastasis

via RHOA-mediated cofilin phosphorylation in human breast cancer cells. **Oncotarget**. 2016 Oct 18; 7(42): 68303–68313.

ZHONG, X. Y. Ding JH, Adams JA, Ghosh G, Fu XD. Regulation of SR protein phosphorylation and alternative *splicing* by modulating kinetic interactions of SRPK1 with molecular chaperones. **Genes Dev**, v. 23, n. 4, p. 482-95, Feb 15 2009. ISSN 1549-5477

ZHOU P, Qin J, Li Y, Li G, Wang Y, Zhang N, Chen P, Li C. Combination therapy of PKC ζ and COX-2 inhibitors synergistically suppress melanoma metastasis. **J Exp Clin Cancer Res**. 2017 Sep 2;36(1):115.

ZHOU Z, Qiu J, Liu W, Zhou Y, Plocinik RM, Li H, Hu Q, Ghosh G, Adams JA, Rosenfeld MG, Fu XD. 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, p. 422-33, Aug 10 2012. ISSN 1097-4164

ZHOU, Z.; FU, X. D. Regulation of *splicing* by SR proteins and SR protein-specific kinases. **Chromosoma**, v. 122, n. 3, p. 191-207, Jun 2013. ISSN 1432-0886.

ZHOU, H. Zhang B, Zheng J, Yu M, Zhou T, Zhao K, Jia Y, Gao X, Chen C, Wei T The inhibition of migration and invasion of cancer cells by graphene via the impairment of mitochondrial respiration. **Biomaterials**, v. 35, n. 5, p. 1597-607, Feb 2014. ISSN 1878-5905

ZHU T, Park HC, Son KM, Kwon JH, Park JC, Yang HC. Effects of thymosin β 4 on wound healing of rat palatal mucosa. **Int J Mol Med**. 2014;34(3):816–821. doi:10.3892/ijmm. 2014.

ZHUO YJ, Liu ZZ, Wan S, Cai ZD, Xie JJ, Cai ZD, Song SD, Wan YP, Hua W, Zhong W, Wu CL. Enhanced expression of SRPK2 contributes to aggressive progression and metastasis in prostate cancer. **Biomed Pharmacother**. 2018 Jun;102:531-538.