

**JULIANA REGINA RIBEIRO DE SOUZA**

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

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

Orientador: Gustavo Costa Bressan

Coorientadores: Gabriela Alves Moreira  
Juliana Lopes Rangel Fietto

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2024**

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

T

S729a  
2024 Souza, Juliana Regina Ribeiro de, 1989-  
Avaliação da relação funcional entre serine-arginine protein  
kinase 2 (SRPK2) e Thymosin beta 4 (T $\beta$ 4) em melanoma  
metastático murino / Juliana Regina Ribeiro de Souza. – Viçosa,  
MG, 2024.

1 tese eletrônica (64 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Gustavo Costa Bressan.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2024.

Referências bibliográficas: f. 51-64.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.670>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Melanoma. 2. Timosina. 3. Proteínas serina-treonina  
quinases. 4. Metástase. 5. Ratos como animais de laboratório.  
I. Bressan, Gustavo Costa, 1983-. II. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada.  
III. Título.

CDD 22. ed. 616.99477


**JULIANA REGINA RIBEIRO DE SOUZA**

**RELAÇÃO FUNCIONAL ENTRE *SERINE-ARGININE-PROTEIN-KINASE 2* (SRPK2) E THYMOSIN BETA 4 (Tβ4) EM MELANOMA METASTÁTICO MURINO**

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


APROVADA: 31 de maio de 2024.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente  
 JULIANA REGINA RIBEIRO DE SOUZA  
Data: 09/10/2024 15:49:17-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Juliana Regina Ribeiro de Souza  
Autor

Documento assinado digitalmente  
 GUSTAVO COSTA BRESSAN  
Data: 09/10/2024 15:54:09-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Gustavo Costa Bressan  
Orientador

*À minha família, minha base.*

## AGRADECIMENTOS

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

Aos meus pais **João Bosco** (*in memoriam*) 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. Foram as primeiras pessoas a compartilharem a aprovação no doutorado e sem vocês, este sonho não teria se tornado realidade. Meu pai é minha saudade diária e sou muito grata por senti-lo sempre por perto.

Ao meu irmão **Bruno** por ser meu melhor amigo, companheiro de aventuras, protetor, incentivador e por compartilhar tantos momentos importantes. Sua presença e amizade são sempre fundamentais para minha vida.

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

Aos meus **familiares**, que sempre estiveram ao meu lado, oferecendo apoio e carinho nos momentos mais importantes, minha profunda gratidão. Vocês são uma fonte constante de inspiração e força.

Aos meus **afilhados** agradeço por trazerem alegria e leveza à minha vida. Vocês me motivam a ser uma pessoa melhor.

Ao **Janderson**, agradeço por seu amor, paciência e apoio. Você esteve ao meu lado em cada passo desta jornada, oferecendo palavras de encorajamento e compreensão nos momentos mais difíceis. Sua presença e companheirismo foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

À **Mariana**, agradeço a amizade, apoio, incentivo e por estar sempre ao meu lado compartilhando tantos momentos especiais.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Gustavo Bressan** por sua orientação, apoio contínuo, confiança, compreensão, carinho e paciência ao longo deste processo. Sem suas contribuições, este trabalho não teria sido possível. Você é fonte de inspiração.

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

A todos os integrantes do **Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos** que estiveram presentes nesses quatro anos pela boa convivência e companheirismo. Temos uma equipe maravilhosa.

Aos amigos, companheiros inseparáveis desse período **Samuel, Janine e Laís**, que sempre com muito apoio, conseguimos nos ajudar e ser um quarteto fantástico na pós-graduação.

Aos companheiros de SBBq por momentos importantes de obtenção de conhecimento e boas aventuras. Em especial nosso grupinho de alegrins dourados: **Luana, Larissa, Júlia e Luciana**.

Aos meus estagiários, **Arthur W, Matheus, Arthur F, Júlia** por poder compartilhar meus conhecimentos com vocês e pela ajuda em experimentos.

À **prof. Juliana Fietto** pelos ensinamentos, conversas e incentivos.

À **Gabriela** pela amizade e por estar disponíveis para trocas de informações sobre a pesquisa e os experimentos.

À professora **Mariana Neves** pela parceria e disponibilidade do Biotério para realização de experimentos.

À **Ju Alves** pela ajuda e companheirismo de sempre.

À professora **Mariana Boroni e equipe no INCA** pela parceria e trocas de informações.

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 faz muita falta por ser uma grande incentivadora, companheira, irmã. Está 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, ajudas na minha trajetória e amizade que perdurara ao longo de todo o tempo de pós-graduação.

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

Ao **Edu** e à secretaria do programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. por todo o auxílio prestado.

À **Dayse**, técnica do nosso laboratório, por todo o serviço essencial e pelos bons momentos de conversas.

Ao funcionário do Biotério Central da UFV, **Juliano**, pelo fornecimento dos animais e ajudas.

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.

Ao **UNIFAGOC** pela oportunidade de ingressar na docência e colocar em prática meu conhecimento. Além disso, obrigada aos **colegas de trabalho e amigos** pela companhia e momentos de conversa.

**Obrigada a todos que fazem parte da minha história!**

*“Nenhum cientista pensa com fórmulas.  
Os ideais que iluminaram o meu caminho são  
a bondade, a beleza e a verdade.”  
(Albert Einstein)*

## RESUMO

SOUZA, Juliana Regina Ribeiro, DSc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2024. **Relação funcional entre *Serine arginine protein kinase 2 (SRPK2)* e *Thymosin beta 4 (Tβ4)* em melanoma metastático murino.** Orientador: Gustavo Costa Brassan. Coorientadores: Juliana Lopes Rangel Fietto e Gabriela Alves Moreira.

Melanoma é uma forma de câncer que emerge das células pigmentares da pele, conhecidas como melanócitos. Apresenta alto risco de desenvolver metástase e, com isso, altas taxas de mortalidade. O peptídeo Tβ4, sequestrador de actina endógeno de 4,9 kDa, atua na motilidade celular, transição epitelial-mesenquimal (EMT) e outras múltiplas atividades biológicas, incluindo metástase tumoral. Anteriormente, identificamos uma possível ligação funcional entre Tβ4 e Serine Arginine Protein Kinase 2 (SRPK2), uma proteína relacionada ao controle do splicing do pré-mRNA e que têm sido encontradas superexpressas em diversos tumores, incluindo o melanoma. O objetivo deste estudo foi investigar a relação funcional e a interação entre Tβ4 e SRPK2 no contexto do melanoma metastático. Ensaios fenotípicos in vitro de proliferação celular, migração e formação de colônias foram realizados em células B16F10 de tipo selvagem ou modificadas por CRISPR-Cas9. A dinâmica da actina foi investigada em ensaios de imunofluorescência. Ensaio de ELISA foi realizado para observar a interação. O melanoma metastático foi induzido em camundongos através da injeção de células B16F10. Podemos observar que a expressão de Tβ4 correlaciona-se com mau prognóstico em pacientes com melanoma metastático. Por meio dos ensaios in vitro, observamos que seu efeito na promoção da proliferação celular, migração e formação de colônias foi prejudicado pelo inibidor farmacológico de SRPK ou pela depleção genética de SRPK2. Assim, o Tβ4 promoveu a organização dos lamelipódios da actina, que também foi afetada negativamente pela depleção funcional do SRPK. Além disso, os tratamentos com um inibidor farmacológico de SRPK (SRPIN340) ou com a depleção impediram o crescimento induzido por tumor Tβ4 in vivo. Juntos, esses resultados sugerem que SRPK2 transduz o sinal de Tβ4 em células tumorais para afetar a organização da actina e possivelmente o splicing do pré-mRNA, o que deve ser melhor investigado no contexto do melanoma metastático.

**Palavras-chave:** Melanoma, Tβ4, SRPK2, metástase.

## ABSTRACT

SOUZA, Juliana Regina Ribeiro, DSc., Federal University of Viçosa, May 2024. **Functional relationship between Serine Arginine Protein Kinase 2 (SRPK2) and Thymosin Beta 4 (Tβ4) in murine metastatic melanoma.** Advisor: Gustavo Costa Brassan. Co-advisors: Juliana Lopes Rangel Fietto and Gabriela Alves Moreira.

Melanoma is a form of cancer that arises from the pigment-producing cells of the skin, known as melanocytes. It carries a high risk of developing metastasis and, consequently, high mortality rates. The 4.9 kDa endogenous actin-sequestering peptide, Tβ4, plays a role in cell motility, epithelial-mesenchymal transition (EMT), and various other biological activities, including tumor metastasis. Previously, we identified a potential functional link between Tβ4 and Serine-Arginine Protein Kinase 2 (SRPK2), a protein involved in the regulation of pre-mRNA splicing that has been found to be overexpressed in various tumors, including melanoma. The objective of this study was to investigate the functional relationship and interaction between Tβ4 and SRPK2 in the context of metastatic melanoma. In vitro phenotypic assays of cell proliferation, migration, and colony formation were conducted using wild-type and CRISPR-Cas9 modified B16F10 cells. Actin dynamics were investigated using immunofluorescence assays. ELISA was performed to observe the interaction. Metastatic melanoma was induced in mice through the injection of B16F10 cells. We observed that Tβ4 expression correlates with poor prognosis in patients with metastatic melanoma. In vitro assays showed that Tβ4's effect on promoting cell proliferation, migration, and colony formation was impaired by either pharmacological inhibition of SRPK or genetic depletion of SRPK2. Consequently, Tβ4 promoted the organization of actin lamellipodia, which was also adversely affected by functional depletion of SRPK. Additionally, treatments with a pharmacological inhibitor of SRPK (SRPIN340) or depletion inhibited Tβ4-induced tumor growth in vivo. Together, these results suggest that SRPK2 transduces the Tβ4 signal in tumor cells to affect actin organization and possibly pre-mRNA splicing, warranting further investigation in the context of metastatic melanoma.

**Keywords:** Melanoma, Tβ4, SRPK2, metastasis

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

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 – PhosPhoInositide 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

T $\beta$ 4 – Thymosin Beta 4

Thr-308 – Treonina 308

TGF $\beta$  – Fator de transformação de crescimento

V2 – Vetor vazio

VEGF – Factor de crescimento endothelial vascular

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	16
<b>2.1 Câncer e melanoma .....</b>	<b>16</b>
<b>2.2 SRPKs: Splicing e Proteínas SR.....</b>	<b>18</b>
<b>2.3 SRPKs: Vias de sinalização e câncer .....</b>	<b>21</b>
<b>2.4 Thymosin Beta 4 .....</b>	<b>25</b>
<b>2.5 Tβ4 e angiogênese .....</b>	<b>28</b>
<b>2.6 Tβ4 contribui para EMT em câncer.....</b>	<b>29</b>
<b>2.7 Tβ4 e vias de sinalização.....</b>	<b>30</b>
<b>2.8 Inibidores de SRPKs .....</b>	<b>32</b>
<b>2.9 Justificativa e hipótese.....</b>	<b>33</b>
3. OBJETIVOS .....	35
<b>3.1 Objetivo geral .....</b>	<b>35</b>
<b>3.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>35</b>
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
<b>4.1 Cultura de Células.....</b>	<b>36</b>
<b>4.2 Composto Químico .....</b>	<b>36</b>
<b>4.3 Ensaio de migração celular .....</b>	<b>36</b>
<b>4.4 Ensaio de formação de Colônia.....</b>	<b>37</b>
<b>4.5 Ensaio de Imunofluorescência .....</b>	<b>37</b>
<b>4.6 Ensaio Imunoenzimático Ligado a Enzima (ELISA) .....</b>	<b>37</b>
<b>4.7 Modelo de Tumor Subcutâneo In Vivo e Procedimentos Histológicos ....</b>	<b>38</b>
<b>4.8 Processamento Histológico .....</b>	<b>39</b>
<b>4.9 Curva de sobrevida .....</b>	<b>40</b>
<b>4.10 Análises estatísticas .....</b>	<b>40</b>
5. RESULTADOS .....	41
5.1 Efeito em fenótipos relacionados à metástase.....	41
5.2 Efeito em células geneticamente depletadas de SRPK2 .....	42
5.3 Efeito em melanoma subcutâneo em camundongos .....	43
5.4 Análises Histológicas da Pele e Tumores de Camundongos .....	45
5.5 Curva de Sobrevivência de Kaplan-Meier de Pacientes Humanos .....	46
6. DISCUSSÃO .....	48
7. CONCLUSÕES .....	50
REFERÊNCIAS.....	51

## 1. INTRODUÇÃO

Melanoma é uma forma de câncer que emerge das células pigmentares da pele, conhecidas como melanócitos. (EDDY, *et al*, 2021). Este é um tumor maligno potencialmente sério, podendo manifestar-se na pele, membranas mucosas, olhos e sistema nervoso central, com elevado potencial metastático e índices de mortalidade consideráveis em estágios avançados (LIU, 2015). Segundo a "Skin Cancer Foundation", o câncer de pele representa um em cada três diagnósticos de câncer, embora represente apenas 4% de todos os cânceres dermatológicos, sendo que o tratamento no estágio primário pode ser eficaz (WHO, 2024). Devido ao risco significativo de metástase, o melanoma exibe altas taxas de mortalidade, sendo responsável por 80% das mortes relacionadas ao câncer de pele (MILLER E MIHM, 2006).

Uma das causas do desenvolvimento de metástases tumorais é a desregulação das cinases SRPKs. As proteínas cinases serina/arginina (SRPK) modulam a atividade de fatores de *splicing* por meio da fosforilação altamente específica dos domínios SR presentes nesses fatores, regulando assim o processo de *splicing* do pré-mRNA (XIAO e MANLEY, 1997).

A remodelação do proteoma por meio do *splicing* alternativo desempenha um papel crucial no desenvolvimento celular. Anomalias no *splicing* podem gerar variantes que contribuem para diversos tipos de câncer, uma vez que alterações nesse padrão podem resultar na produção de isoformas que promovem o crescimento tumoral, aumentando a proliferação celular, a formação de tumores, a invasividade e a capacidade metastática (BRINKMAN, 2004).

A expressão elevada das cinases reguladoras de *splicing*, as SRPKs, tem sido observada em vários tipos de câncer, implicando em sua contribuição para a migração e invasão tumoral (HAYES, 2007; JANG, 2008; ROOSMALEN *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2016). Isso ressalta a importância de investigações direcionadas aos mecanismos moleculares das SRPKs em vias de sinalização, *splicing* do pré-mRNA e outros processos celulares, especialmente relacionados ao desenvolvimento e disseminação do câncer. Novas descobertas podem transformar essas cinases em biomarcadores potenciais e alvos terapêuticos promissores contra o câncer.

Em nosso grupo de pesquisa, foi realizado um ensaio de duplo híbrido em leveduras para explorar novas interações moleculares com a proteína SRPK2, revelando uma possível interação entre a região espaçadora de SRPK2 e a

Timosina  $\beta 4$  (T $\beta 4$ ) (MELLO, 2014). A T $\beta 4$ , um peptídeo que regula a dinâmica do citoesqueleto de actina em células de mamíferos (MANNHERZ e HANNAPPEL, 2009), demonstrou expressão em diferentes tipos de câncer, influenciando a migração, invasão, sobrevivência celular e ativação de células-tronco, além de estar associada ao crescimento tumoral e à metástase (PIAO et al., 2014).

Estudos recentes destacam o potencial da inibição farmacológica das SRPKs no controle de diversas neoplasias, impulsionando a busca por inibidores terapêuticos dessas enzimas. Um exemplo é o SRPIN340, um inibidor de SRPK1 e SRPK2 derivado de isonicotinamida, capaz de reduzir a viabilidade celular, induzir apoptose e modificar o splicing alternativo em células de leucemia (SIQUEIRA et al., 2015). Em modelos experimentais de melanoma metastático *in vitro* e *in vivo*, o SRPIN340 diminuiu a migração, invasão e formação de colônias, além de reduzir nódulos metastáticos e potencializar a resposta imunológica local (MOREIRA et al., 2018; MOREIRA, 2020). Outros inibidores farmacológicos, como SRPIN803, SPHINX, SRPKIN-1 e a série SRVIC, também foram desenvolvidos (MOROOKA et al., 2015; MAVROU et al., 2015). No entanto, como são inibidores não seletivos, a avaliação de respostas específicas para SRPK1 ou SRPK2 é dificultada. Com isso, utilizou-se a técnica de silenciamento por CRISPR-Cas9 das proteínas SRPK1 e SRPK2, mostrando-se promissores no entendimento da inibição dessas enzimas (CAETANO, 2022).

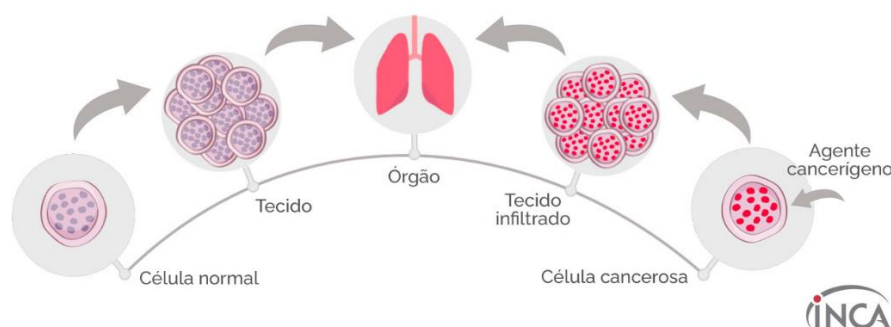
A metástase tumoral é um processo complexo que envolve várias etapas, incluindo migração e invasão de células tumorais, angiogênese e crescimento de células tumorais metastáticas. Estudos anteriores sugerem que a expressão da T $\beta 4$  pode desempenhar um papel crucial nas metástases tumorais (CHA, 2003; PIAO et al., 2014), assim como as SRPKs (ROOSMALEN et al., 2015; BULLOCK et al., 2016; ZHOU et al., 2018). Dado que essas duas moléculas também apresentaram alterações em melanoma (MOREIRA et al., 2018; MORITA, HAYASHI, 2018), especulamos que a interação funcional entre elas poderia fornecer insights sobre as características moleculares do melanoma metastático. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar o papel da relação funcional SRPK2-T $\beta 4$  no crescimento tumoral e processo metastático em um modelo murinho de melanoma. Compreender o papel das SRPKs em interações com proteínas envolvidas em processos como migração celular, invasão, proliferação e metástase pode conduzir ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas para tumores, especialmente os

metastáticos. A investigação dos mecanismos moleculares subjacentes à interação SRPK2-T $\beta$ 4 no crescimento tumoral e na metastatização mostra-se promissora.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Câncer e melanoma

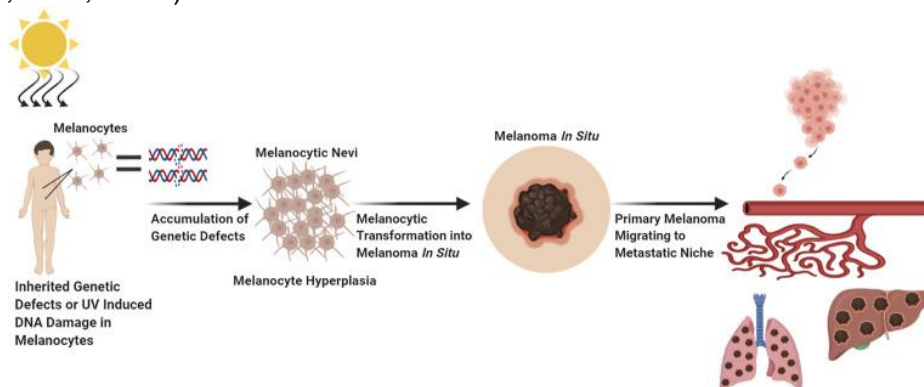
O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo, representando cerca de 9,6 milhões de mortes, ou uma em cada seis mortes, em 2018 (WHO, 2024). A característica mais fundamental das células cancerígenas envolve sua capacidade de sustentar a proliferação crônica. Os tecidos normais controlam a 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, controlam os seus próprios destinos (HANAHAN E WEINBERG, 2011) (Figura 1).



**Figura 1: O que é o câncer?** De um lado células normais, formando tecido e órgãos. Do outro lado, um agente cancerígeno atua sobre a célula, tornando-a cancerosa. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo. (INCA, 2024).

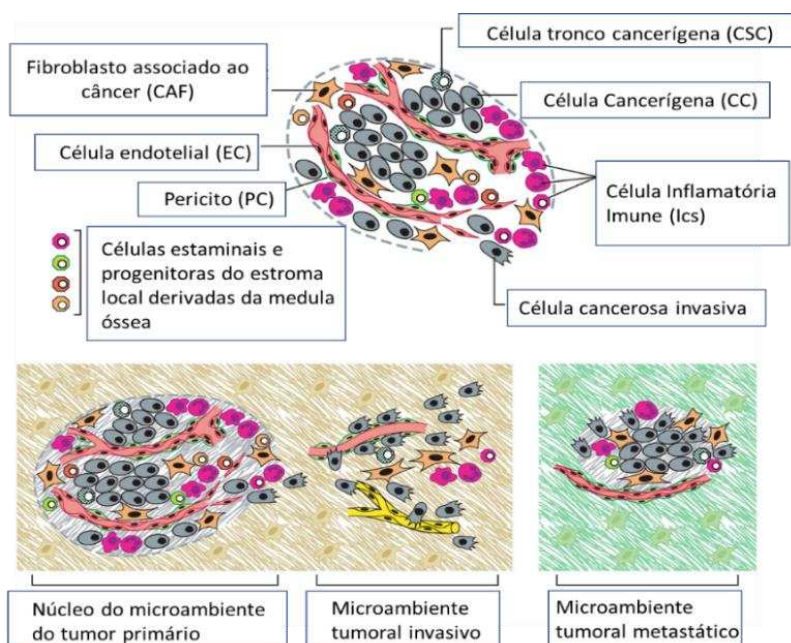
O melanoma, um tipo de câncer de pele originado nos melanócitos, assim como outros tumores, resulta da desregulação de vias de sinalização cruciais que governam a proliferação, migração, invasão, adesão e apoptose celular (HANAHAN E WEINBERG, 2011). No Brasil, o câncer de pele é o mais frequente, correspondendo a cerca de 30% de todos os tumores malignos registrados no país, o melanoma representa 4% das neoplasias malignas do órgão, mas merece total atenção, visto que é o tipo mais grave, devido à sua alta possibilidade de provocar metástase (INCA, 2024). Detectar o melanoma em seus estágios iniciais, ou *in situ*, é essencial para o prognóstico e a sobrevivência dessa doença mortal. A taxa de sobrevivência em 5 anos para o melanoma primário é de 99%, enquanto cai drasticamente para apenas 27% no caso de melanoma metastático. (SIEGEL, *et al*, 2021). O melanoma possui a maior carga mutacional entre todos os tipos de câncer, devido aos danos no DNA causados por UV e/ou erros de replicação do DNA

(ALEXANDROV, *et al*, 2013; LAWRENCE, *et al*, 2013). Essas mutações contribuem para diversos aspectos da neoplasia melanocítica; e, algumas são consideradas mutações condutoras por serem capazes de iniciar a transformação melanocítica, os primeiros passos da formação, progressão e disseminação do tumor (Figura 2). (EDDY, *et al*, 2021)



**Figura 2: Fatores que contribuem para a transformação melanocítica.** (EDDY, *et al*, 2021).

O microambiente tumoral é o ecossistema que circunda um tumor dentro do corpo e é composto por componentes essenciais para a manutenção do tumor, como células imunes, mediadores inflamatórios, citocinas, fatores de crescimento e metaloproteinases (MMps), fazendo com que ele desempenhe um papel importante na progressão tumoral. (GUAN *et al.*, 2015; HANAHAN E WEINBERG, 2011) (Figura 3).

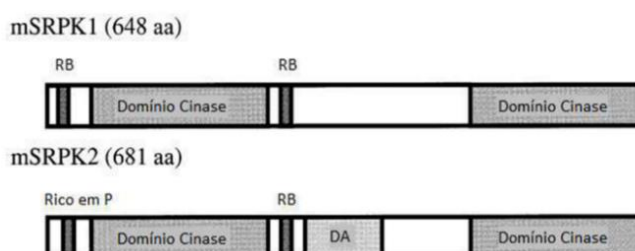


**Figura 3: Microambiente do melanoma.** O estabelecimento e progressão do melanoma ocorre devido a desregulação de vias de sinalização somados aos fatores presentes no microambiente tumoral, como citocinas, células do sistema imune, mediadores inflamatórios, metaloproteinases e fatores de crescimento (Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011).

No microambiente epitelial do câncer, quimiocinas e seus receptores influenciam o infiltrado inflamatório, que inclui mediadores como fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e óxido nítrico (NO). Essas substâncias podem tanto promover quanto inibir a angiogênese, modificar o crescimento e a sobrevivência das células tumorais, e desempenhar um papel na disseminação metastática (WILSON E BALKWILL, 2002). Alterações oncogênicas atraem monócitos, neutrófilos e linfócitos para a circulação periférica do tumor, auxiliando no desenvolvimento tumoral e ativando fatores de transcrição como o fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT3) e fator indutível por hipóxia 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) nas células tumorais. Esses fatores de transcrição coordenam a produção de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas e quimiocinas, além de ciclo-oxigenase 2 (COX2) e prostaglandinas. Eles também recrutam e ativam diversos leucócitos, contribuindo para uma inflamação persistente relacionada ao câncer, que promove o crescimento tumoral (MANTOVANI *et al.*, 2008). Portanto, o microambiente tumoral desempenha um papel crucial no desenvolvimento e metástase do melanoma (PASSARELLI *et al.*, 2017).

## 2.2 SRPKs: Splicing e Proteínas SR

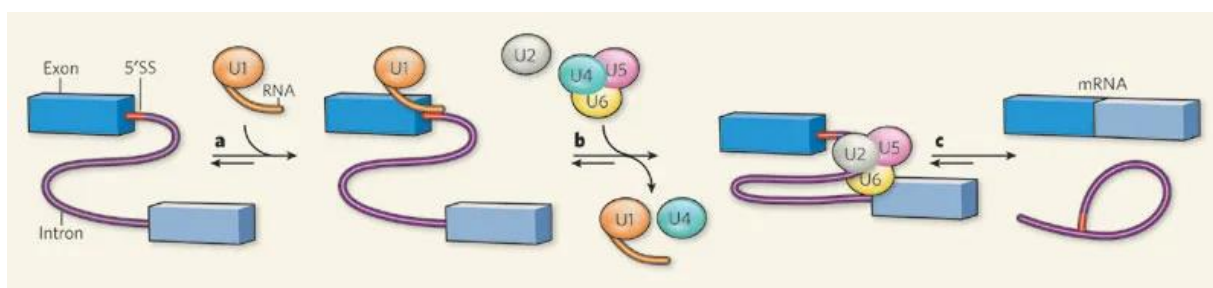
As serina-arginina quinases (SRPKs) desempenham várias funções biológicas, incluindo controle do ciclo celular, apoptose e splicing alternativo (HOGG *et al.*, 2023; TUFAIL *et al.*, 2023). Estas quinases fazem parte de uma subfamília de serina-treonina quinases que fosforilam especificamente resíduos de serina situados em motivos dipeptídicos serina-arginina/arginina-serina, especialmente 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 dois lóbulos, N-terminal e C-terminal, separados por uma região espaçadora estruturalmente desordenada e pouco conservada (KUROYANAGI *et al.*, 1998) (Figura 4).



**Figura 4:** 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 específicos, que podem estar relacionados a funções distintas (GIANNAKOUROS *et al.*, 2011). O domínio espaçador atua como um efetor em resposta a determinados sinais que controlam a distribuição celular das SRPKs. A localização predominantemente citoplasmática das SRPKs é mantida através de interações entre seu domínio espaçador e membros específicos da família de chaperonas moleculares. No entanto, essas quinases podem ser translocadas para o núcleo em resposta a certos sinais (ZHONG *et al.*, 2009).

Em mamíferos, a família de SRPK é composta por três membros: SRPK1, SRPK2 e SRPK3. Esses membros são expressos de maneira diferente nos tecidos. SRPK1 é encontrada na maioria dos tipos celulares e tecidos, como testículos e pâncreas, SRPK2 é mais abundante no cérebro (WANG *et al.*, 1998), enquanto SRPK3 é expressa nas células musculares esqueléticas e no coração (NAKAGAWA *et al.*, 2005). Nas células, o splicing do pré-mRNA ocorre em um grande complexo dinâmico de ribonucleoproteínas conhecido como spliceossomo, que é composto por 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 5).

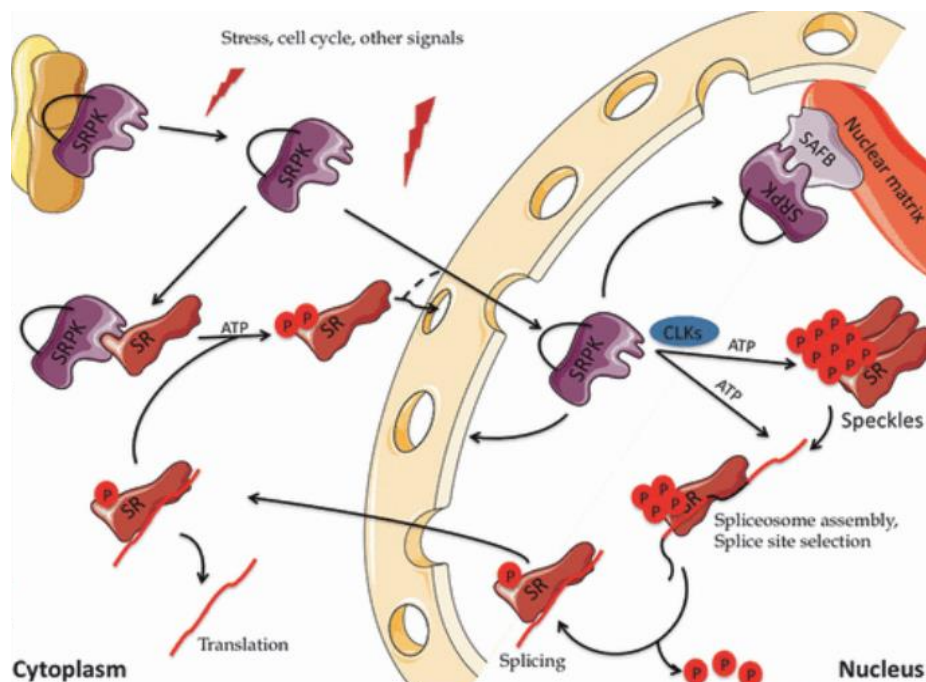


**Figura 5:** Etapas de formação do spliceossomo e edição do RNAm. O pré-RNAm é formado por regiões codificantes (exons) e não codificantes (introns), que precisam ser editadas pelo spliceossomo. O componente U1 do spliceossomo se liga ao RNA que será editado e posteriormente, as subunidades remanescentes - 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 intron e une os exons, deixando o RNAm pronto para ser traduzido. (Query,2009)

Essa complexa maquinaria é capaz de reconhecer elementos específicos na sequência do pré-mRNA que definem os limites dos íntrons e promovem a sua precisa excisão (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 núcleo catalítico para a reação de splicing no spliceossomo

(WANG *et al.*, 1998). A maioria dessas interações é mediada por fatores de splicing que não são snRNPs, sendo os mais bem caracterizados aqueles pertencentes à superfamília de fatores de splicing contendo domínios ricos em serina/arginina, as proteínas SR (FU, 1995).

A família de proteínas SR, reguladoras do splicing, é altamente conservada e caracteriza-se pela presença de um ou dois motivos de reconhecimento de RNA na região amino-terminal, um domínio rico em aminoácidos serina e arginina (SR) na extremidade carboxi-terminal, 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 várias interações proteína-proteína cruciais durante a montagem do spliceossomo (WANG *et al.*, 1998). A localização dessas proteínas é predominantemente nuclear, mas quando não estão envolvidas no processo de transcrição ou splicing, as proteínas SR residem nos speckles nucleares, que são subdivisões no núcleo que armazenam os fatores de splicing (JANG *et al.*, 2008). Quando fosforiladas em suas serinas, as proteínas SR saem dos speckles e se movem para o nucleoplasma, onde interagem com o pré-mRNA nascente. O equilíbrio entre fosforilação e desfosforilação promove a escolha correta do sítio de splicing e posteriormente a catálise do processo (SHEPARD E HERTEL, 2009) (Figura 6).



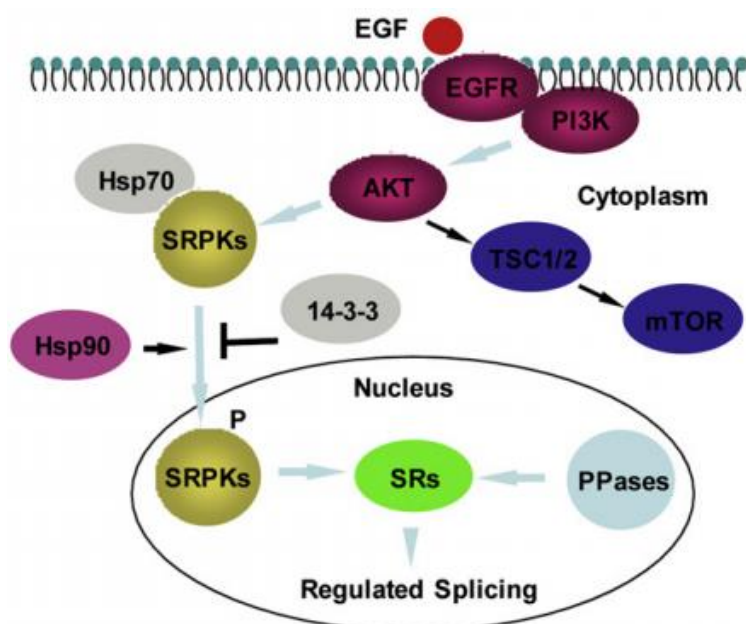
**Figura 6:** Regulação e função de SRPK na maturação de mRNA (Giannakouros *et al.*, 2011).

### 2.3 SRPKs: Vias de sinalização e câncer

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

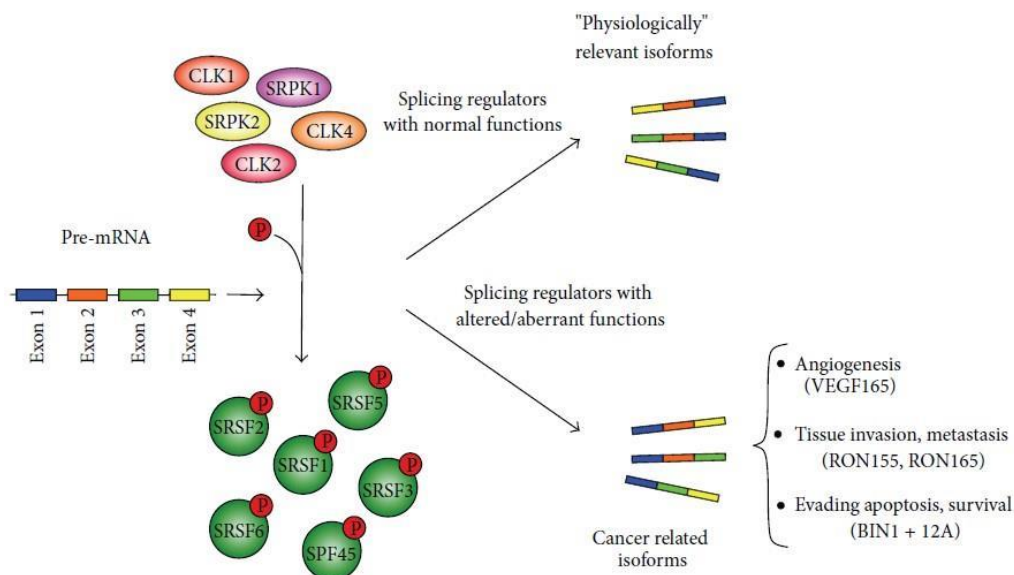
Após a estimulação pelo EGF, ocorre a interação entre SRPK1 e AKT, que é fundamental em várias vias de sinalização, incluindo migração, diferenciação, proliferação e sobrevivência celular (MANNING E CANTLEY, 2007). Esta interação induz a autofosforilação de SRPK1, modificando sua interação com chaperonas moleculares e permitindo sua translocação para o núcleo (ZHOU *et al.*, 2012). As chaperonas Hsp70 ancoram as cinases de splicing no citoplasma, enquanto os complexos Hsp90 facilitam a translocação das SRPKs para o núcleo (ZHOU E FU, 2013).

As SRPKs são vistas como transdutores centrais na via de sinalização do EGF e nos níveis de splicing alternativo, sugerindo que o eixo AKT-SRPK-SR é o principal ramo na transdução do sinal de EGF para regular o programa de splicing no núcleo (ZHOU *et al.*, 2012) (Figura 7).



**Figura 7:** 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 (Figura 8) (BRINKMAN, 2004).



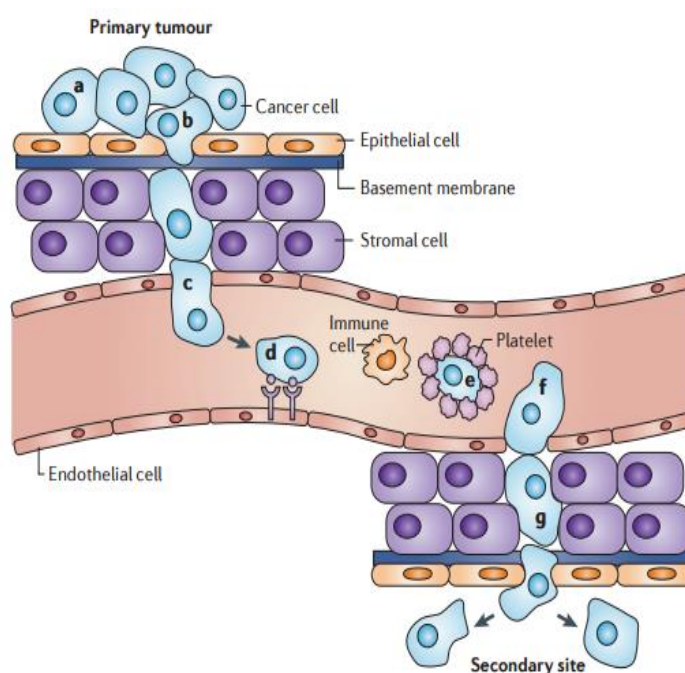
**Figura 8:** Desregulação do splicing alternativo em câncer e elementos trans. A desregulação de elementos trans, como fatores de splicing, incluindo proteínas SR e SRPKs, pode levar à formação de isoformas de mRNAs anteriormente inexistentes e/ou à modificação de isoformas de mRNAs em tecidos específicos no contexto do câncer. Esse fenômeno pode resultar na produção de proteínas com atividades pró-câncer. (DA SILVA et al., 2015).

Diversos estudos indicam uma elevada expressão de SRPKs em diferentes tipos de câncer. Níveis elevados de SRPK1 foram observados em carcinomas de pâncreas, mama e cólon (HAYES *et al.*, 2007), gliomas (CHANG *et al.*, 2015), carcinoma e adenocarcinoma de pulmão (GOUT *et al.*, 2012), 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 dessas quinases 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 de células não pequenas do pulmão (GOUT *et al.*, 2012) e câncer de cólon (WANG *et al.*, 2016).

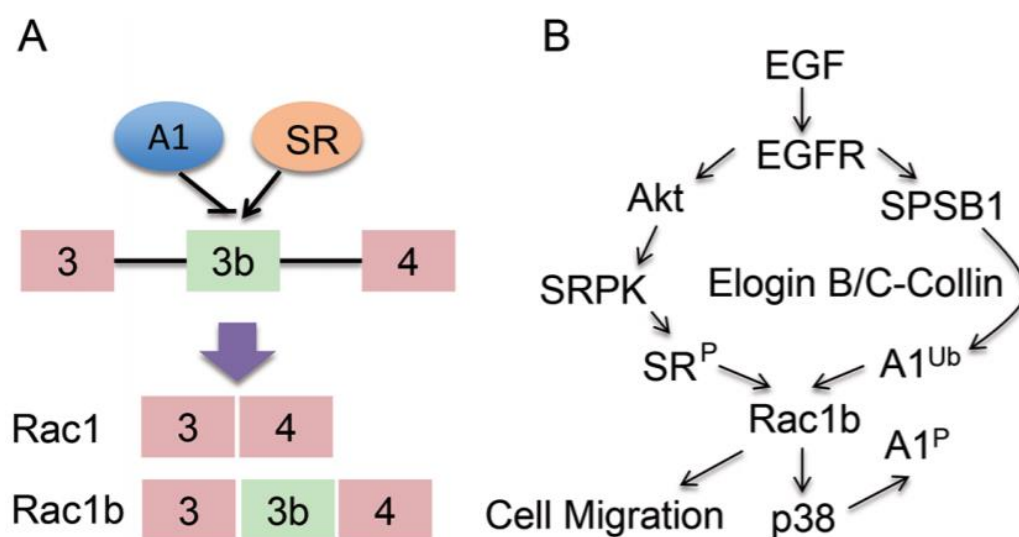
Além disso, a inibição de SRPKs usando o inibidor farmacológico SRPIN340 demonstrou efeitos anti-leucemia (SIQUEIRA *et al.*, 2015). No contexto da migração celular, Wang e colaboradores (2016) mostram que o aumento de SRPK2 em células de câncer de cólon está diretamente ligado ao crescimento, migração e tumorigenese. A realização de um knockdown de SRPK2 resultou no efeito inverso, comprovando a relação de SRPK2 nos processos de crescimento e migração dessas células.

A migração das células tumorais é crucial para a disseminação do câncer no organismo a partir do tumor primário. A invasão das células cancerígenas nos tecidos adjacentes e a formação de metástases em órgãos distantes é uma das principais causas de morte relacionada 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 9).



**Figura 9:** 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.

Outro ponto importante é que a SRPK1 desempenha um papel crucial na regulação do splicing alternativo de Rac1b, uma pequena GTPase que promove a progressão do ciclo celular e a sobrevivência celular via sinalização de NFκB. A expressão de Rac1b é elevada em tumores de cólon e está associada a um prognóstico desfavorável para os pacientes (MATOS *et al.*, 2016). A expressão de Rac1b resulta do aumento da inclusão do exon 3, promovido pela proteína SRSF1, que se transloca para o núcleo de maneira dependente da fosforilação induzida por SRPK1. Quando SRPK1 é depletada em células de câncer de cólon, isso impede o transporte nuclear de SRSF1 e induz sua degradação, limitando sua capacidade de controlar o splicing de Rac1b (GONÇALVES *et al.*, 2015) (Figura 10).



**Figura 10:** A) *Splicing* alternativo regulado positivamente por proteínas SR. B) EGF ativando SRPK1-2 induzindo o *splicing* de Rac1a

Além de sua função principal na fosforilação das proteínas SR, as SRPK2 também têm sido associadas a outras funções independentes da regulação do splicing, como a progressão do ciclo celular e a apoptose (JANG *et al.*, 2009). Esta atuação sugere que a SRPK2 pode também influenciar o desenvolvimento do câncer (WANG *et al.*, 2016).

Cada tipo de câncer pode ativar diferentes vias de sinalização downstream pelas SRPKs, resultando na alteração de vários processos celulares. Os diversos papéis das SRPKs nesses processos podem ser mediados pela fosforilação de diferentes proteínas SR específicas a tecidos ou células, dependendo do tumor (BULLOCK, OLTEAN, 2017).

As recentes descobertas sobre as múltiplas funções das SRPKs evidenciam a necessidade de estudos adicionais para elucidar os mecanismos moleculares da atuação dessas quinases nas vias de sinalização, no splicing do pré-mRNA e em outros processos celulares, especialmente aqueles relacionados ao desenvolvimento do câncer e à formação de metástases. Novas pesquisas poderão revelar mais sobre o papel oncogênico das SRPKs, permitindo que essas quinases sejam consideradas potenciais biomarcadores e alvos terapêuticos promissores contra o câncer.

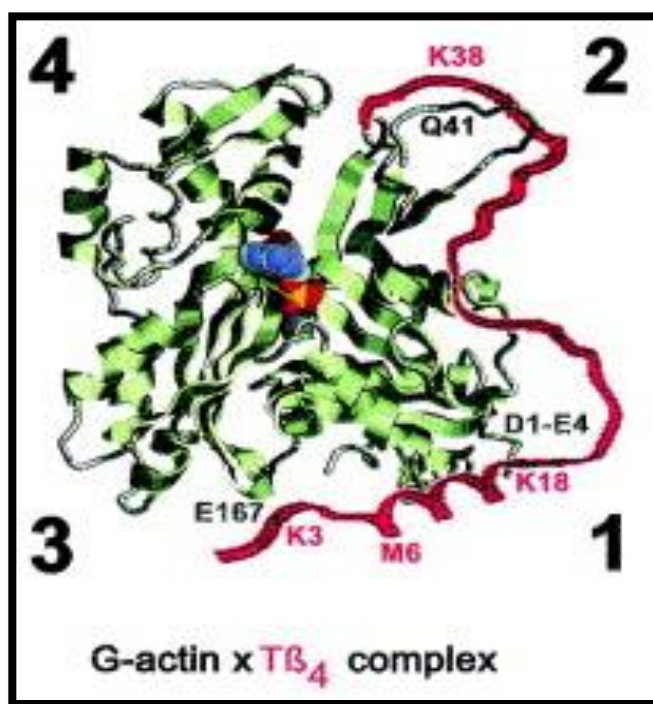
## 2.4 Thymosin Beta 4

A timosina beta-4 (T $\beta$ 4) é um peptídeo multifuncional amplamente distribuído, desempenhando um papel crucial em diversos processos fisiológicos e patológicos no corpo (XING *et al.*, 2021). Este peptídeo sequestrador de actina, com 4,9 kDa e 43 aminoácidos, é fundamental para a motilidade celular e promoção da angiogênese (LV *et al.*, 2013), metástase (CHA *et al.*, 2003), cicatrização de feridas (PHILP *et al.*, 2004), além de possuir propriedades anti-apoptóticas (MOON *et al.*, 2007) e anti-inflamatórias (SOSNE *et al.*, 2007), estando também envolvido na via de sinalização de AKT (BOCK-MARQUETTE *et al.*, 2004). T $\beta$ 4 é altamente conservada entre as espécies e encontrada em todos os tecidos e tipos de células, exceto nos glóbulos vermelhos (SOSNE *et al.*, 2015). Originalmente, foi descrita como um fator de maturação do timo (LOW *et al.*, 1981).

Os níveis desse polipeptídeo variam entre diferentes tipos de células e fluidos corporais. Macrófagos e glóbulos brancos apresentam altos níveis de T $\beta$ 4, enquanto as plaquetas contêm níveis mais baixos. Ela é indetectável nos eritrócitos, mas presente no plasma sanguíneo, e seus níveis são muito altos no fluido da ferida, onde pode ser liberada das plaquetas em resposta ao ferimento. T $\beta$ 4 também foi localizada no endotélio dos vasos sanguíneos em desenvolvimento e no coração. Em estágios posteriores de desenvolvimento, nem todas as células endoteliais mostraram-se positivas para T $\beta$ 4, sugerindo seu papel potencial no desenvolvimento dos vasos sanguíneos, o que está de acordo com os efeitos observados na angiogênese (LARSSON, HOLCK, 2007; SHUMIN *et al.*, 2020).

T $\beta$ 4 é o membro mais abundante e biologicamente ativo da família das  $\beta$ -timosinas, sendo o principal peptídeo sequestrador de G-actina que modula a

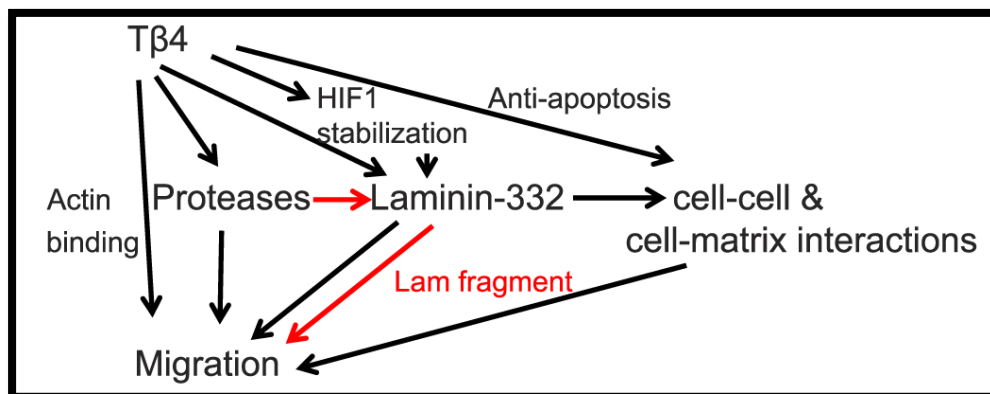
dinâmica do citoesqueleto em células de mamíferos (MANNHERZ E HANNAPPEL, 2009). Ela se liga à G-actina, bloqueando sua polimerização, o que sugere sua importância na cicatrização de feridas (HUFF *et al.*, 2001) (Figura 11).).



**Figura 11:** Estrutura de Tβ4 associada a G-actina. (Huff et al, 2001)

O Tβ4 está associado a uma ampla variedade de cânceres devido ao seu papel regulador em características essenciais como migração, invasão, sobrevivência celular e ativação de células-tronco. Ela está diretamente ligada ao aumento do crescimento tumoral e à metástase (PIAO *et al.*, 2014). Diversos estudos demonstraram que Tβ4 está diferencialmente expressa em vários tipos de câncer, incluindo carcinoma de células não pequenas do pulmão (JI *et al.*, 2003), câncer de cólon (GEMOLL *et al.*, 2015), câncer de pâncreas (ZHANG *et al.*, 2008), câncer de fígado (FU *et al.*, 2015), melanoma (CHA *et al.*, 2003) e carcinoma de células escamosas orais (HONG *et al.*, 2016).

A promoção da migração celular por Tβ4 ocorre através de múltiplas vias, mas a migração direta envolve sua capacidade de se ligar à actina. Esta ligação é fundamental para a modulação do citoesqueleto, facilitando a dinâmica necessária para a migração das células cancerosas. Assim, o papel de Tβ4 na progressão do câncer e na metástase torna-se uma área crucial de estudo, oferecendo potenciais alvos para intervenções terapêuticas futuras. (SOSNE *et al.*, 2015) (Figura 12).



**Figura 12:** Esquema mostrando o T $\beta$ 4 envolvido, por diversas vias, com a migração. (Sosne et al, 2015)

A migração celular, essencial para a metástase tumoral, é altamente dependente da dinâmica da montagem da actina, regulada pelas Rho GTPases, incluindo RhoA, Cdc42 e Rac1 (YAMAZAKI *et al.*, 2005). As proteínas Rac fazem parte da família das pequenas Rho GTPases e alternam entre uma forma inativa ligada a GDP e uma forma ativa ligada a GTP. Essa interconversão é rigorosamente controlada pela taxa de troca de nucleotídeos de guanina e pela hidrólise de GTP, aceleradas pelos fatores de troca de nucleotídeos (GEFs) e pelas proteínas ativadoras de GTPase (GAPs), respectivamente (VAN AELST E D'SOUZA-SCHOREY, 1997).

Quando ligada ao GDP, Rac é sequestrada no citoplasma por meio da interação com inibidores de dissociação Rho-GDP (GDI). Em resposta a sinais externos, como fatores de crescimento ou ligantes de integrinas, Rac é recrutada para a membrana plasmática, onde interage com GEFs. A ativação de Rac e sua interação com efetores iniciam cascatas de sinalização que controlam funções celulares diversas, incluindo a reorganização do citoesqueleto, mudanças morfológicas celulares e mobilidade celular (BURRIDGE E WENNERBERG, 2004). Rac1b, uma isoforma de Rac1, apresenta atividade intrínseca de GTPase reduzida, aumento da atividade de troca GDP/GTP e baixa capacidade de interação com inibidores de dissociação de GDP (FIEGEN *et al.*, 2004).

A expressão elevada de Rac1b é observada em vários 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 em aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e na mediação da Transição Epitélio-

Mesenquimal (EMT) induzida por metaloproteinases-3 (MMP-3) (RADISKY *et al.*, 2005). No microambiente tumoral, a condição de hipóxia/reoxigenação (H/R) é crítica, contribuindo para a resistência aos medicamentos anticâncer e aumentando a migração das células cancerígenas (HARRIS, 2002).

Em células HeLa sob condições de H/R, observa-se maior capacidade de migração, níveis elevados de T $\beta$ 4 e maior atividade das GTPases Rac1 e Rap1. A redução da atividade de Rac1 e Rap1 foi observada com o knockdown de T $\beta$ 4 nessas células, indicando que a migração celular cancerígena pode depender da ativação de Rap1 e Rac1 mediada por T $\beta$ 4 (LEE *et al.*, 2015).

Células de câncer de cólon superexpressando T $\beta$ 4 também demonstram alta capacidade de migração e altos níveis de ILK e IQGAP1, um ativador de Rac1. Esse estudo indicou que o aumento da migração nessas células está ligado à ativação de Rac1 (TANG *et al.*, 2011). Além disso, células de câncer de próstata superexpressando T $\beta$ 4 mostraram aumento na formação de pseudópodes baseados em actina e na migração celular. Embora T $\beta$ 4 ative várias vias de sinalização, como ILK (BOCK-MARQUETTE *et al.*, 2004) ou Erk (OH *et al.*, 2006), a formação de pseudópodes em células LNCaP foi reduzida pela inibição de PI3K, um regulador positivo de ILK que ativa Cdc42 e Rac, resultando na formação de pseudópodes. Essas observações sugerem que a ativação da via de sinalização de PI3K por T $\beta$ 4 é uma explicação provável para a formação de pseudópodes em células LNCaP (ITO *et al.*, 2009).

## 2.5 T $\beta$ 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 $\beta$ 4 no desenvolvimento do tecido e malignidade. Estudos mostram que T $\beta$ 4 induz a angiogênese por promover a migração de células endoteliais e de outras células vasculogênicas (CHA *et al.*, 2003) e aumenta a viabilidade das células progenitoras endoteliais (EPC), desencadeando tanto a proliferação quanto a migração celular, além de estimular a formação de estruturas semelhantes a capilares nas células (QUAN, *et al.*, 2017). LV e Colaboradores, 2020 mostraram também que o T $\beta$ 4 pode promover a angiogênese em camundongos CLI através da regulação das vias Notch/NF- $\kappa$ B.

O fornecimento de oxigênio em tumores sólidos é frequentemente insuficiente 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 e progressão do tumor primário. A expressão de muitos genes induzidos por hipóxia é controlada por HIF-1, um fator de transcrição composto pelas subunidades HIF-1 $\alpha$  e HIF-1 $\beta$ . Em tumores, a atividade de HIF-1 depende da disponibilidade de HIF-1 $\alpha$ , que é rapidamente degradada pela via ubiquitina-proteassomo em condições de normoxia. Em hipóxia, a degradação de HIF-1 $\alpha$  é inibida, permitindo sua translocação para o núcleo, onde, junto com HIF-1 $\beta$ , estimula a angiogênese ao ativar a transcrição de VEGF (HUANG *et al.*, 1998).

Inicialmente, descobriu-se que quando T $\beta$ 4 está superexpresso em células B16F10, ocorre um aumento do número de vasos sanguíneos no tumor sólido devido à maior expressão de VEGF (CHA *et al.*, 2003). Posteriormente, identificou-se que T $\beta$ 4 aumenta a expressão de VEGF porque estabiliza a subunidade HIF-1 $\alpha$  no nível proteico, impedindo sua degradação pelo sistema ubiquitina-proteassomo e permitindo sua translocação nuclear (JO *et al.*, 2010). Resultados semelhantes foram observados em células HeLa sob condições de hipóxia, onde a estabilização de HIF-1 $\alpha$  por T $\beta$ 4 foi mediada pela ativação de ERK, aumentando os níveis de ERK fosforilado (OH *et al.*, 2008). Em câncer de cólon, T $\beta$ 4 e HIF-1 $\alpha$  colocalizam, corroborando a conclusão de que T $\beta$ 4 está envolvido na estabilização de HIF-1 $\alpha$  para induzir a expressão de VEGF (JO *et al.*, 2010).

## **2.6 T $\beta$ 4 contribui para EMT em câncer**

A transição epitelial-mesenquimal (EMT) é um processo em que as células tumorais perdem suas características epiteliais e adquirem um fenótipo mesenquimal, resultando na formação de células isoladas, não polarizadas, embebidas na matriz extracelular (LEVAYER E LECUIT, 2008). Molecularmente, a EMT envolve vários eventos, como a quebra das junções intercelulares, perda da polaridade celular, desintegração dos microtúbulos e ruptura da membrana basal. Este processo é crucial na progressão do câncer, pois permite que as células tumorais se tornem invasivas, se desloquem do tumor primário, penetrem no epitélio vascular, entrem na circulação e formem metástases em órgãos distantes (NEMOLATO *et al.*, 2012).

T $\beta$ 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 estudo demonstrou que a superexpressão de T $\beta$ 4 em células de carcinoma de cólon SW480 resulta em uma diminuição significativa nos níveis totais e intercelulares de E-caderina, atribuída à ruptura das junções aderentes devido à despolimerização dos microfilamentos de actina desencadeada por esse peptídeo (WANG *et al.*, 2004). T $\beta$ 4 desencadeia a EMT no carcinoma colorretal regulando positivamente a ILK. A atividade da ILK nesses processos é mediada pela PI3K, que, quando ativada, estimula a ILK, levando à fosforilação de AKT e GSK-3 $\beta$  (KIM E JANG, 2015). Os efeitos de T $\beta$ 4 são mediados pela via de sinalização ILK/Akt/ $\beta$ -catenina (PIAO *et al.*, 2014).

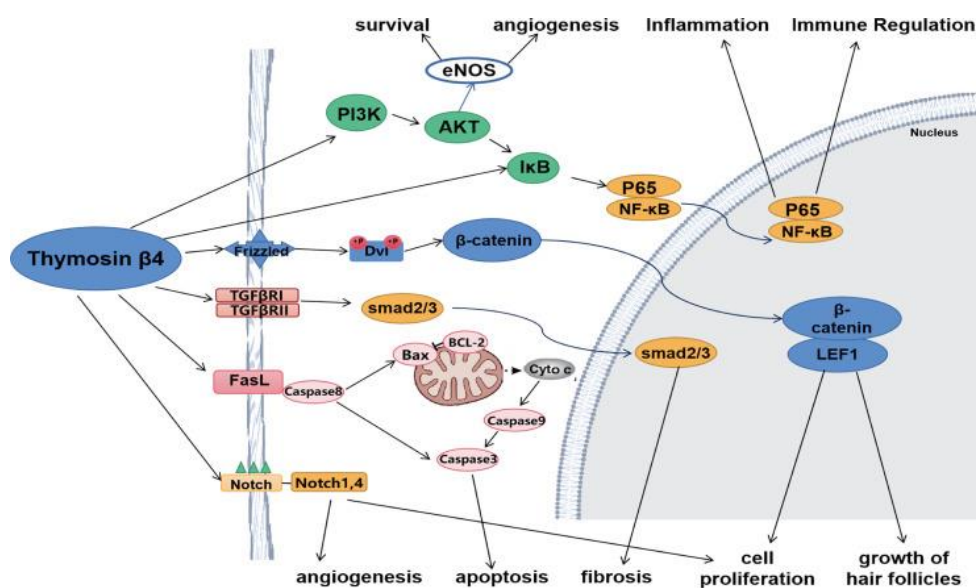
Efeitos semelhantes foram observados em células de carcinoma de células escamosas bucal, onde T $\beta$ 4 alterou a expressão de marcadores de EMT e induziu a ativação de MMP-2 (HONG *et al.*, 2016). O papel de T $\beta$ 4 na EMT também foi relatado em adenocarcinomas colorretais de pacientes, com maior expressão de T $\beta$ 4 identificada na porção infiltrativa frontal do tumor, contribuindo para a invasão (NE-MOLATO *et al.*, 2012). A elucidação dos mecanismos moleculares pelos quais T $\beta$ 4 atua na EMT ainda é um desafio. No entanto, compreender como T $\beta$ 4 promove estas e outras funções que favorecem o desenvolvimento do tumor torna este peptídeo um potencial alvo para terapias anticâncer.

Outra via em que T $\beta$ 4 está envolvido é a de TGF $\beta$ . De acordo com Morita e Hayashi (2018), o TGF $\beta$  facilita a expressão de T $\beta$ 4, levando à ativação de fatores de transcrição relacionados ao miocárdio (MRTFs). Esses fatores são coativadores do fator de resposta sérica (SRF) e regulam a expressão de genes críticos para a transição epitelial-mesenquimal (EMT) e a metástase tumoral. Quando ligado à G-actina, T $\beta$ 4 impede a interação desta com os MRTFs, pois o domínio WH2 de T $\beta$ 4 e os motivos RPEL dos MRTFs competem pela mesma cavidade hidrofóbica na molécula de actina. Assim, um aumento nos níveis de T $\beta$ 4 provoca a dissociação do complexo actina/MRTF e, conseqüentemente, o acúmulo e a ativação dos MRTFs no núcleo. A ligação da G-actina por T $\beta$ 4 induz a translocação dos MRTFs para o núcleo (Hinkel *et al.*, 2014). A via TGF $\beta$ /T $\beta$ 4/MRTF/SRF é, portanto, crítica para a metástase e progressão tumoral (MORITA *et al.*, 2018).

## 2.7 T $\beta$ 4 e vias de sinalização

T $\beta$ 4 influencia a secreção de diversas citocinas e modula várias vias de sinalização. Tem um papel na redução do dano inflamatório ao regular as vias dos

receptores NF- $\kappa$ B e Toll-like, diminuindo a liberação de citocinas como TNF- $\alpha$  e quinases associadas ao receptor de IL-1. Durante o processo de reparação tecidual, T $\beta$ 4 regula vias como PI3K/Akt/eNOS, Notch e angiopoietina-1/Tie2. Além disso, também tem influência em diversas outras vias de sinalização, como a via TGF- $\beta$  para mitigar a fibrose e a via Wnt para promover a formação de folículos capilares. (Figura 13) (XING *et al*, 2021).



**Figura 13:** T $\beta$ 4 regula várias vias de sinalização. T $\beta$ 4 melhora o dano inflamatório regulando as vias do receptor NF- $\kappa$ B e Toll-like. Durante o reparo tecidual, o T $\beta$ 4 regula as vias PI3K/Akt/eNOS e Notch. Além disso, o T $\beta$ 4 regula a via do TGF- $\beta$  para aliviar a fibrose e a via Wnt para promover a formação do folículo piloso. T $\beta$ 4 também regula a via da apoptose para inibir a apoptose. (XING *et al*, 2021).

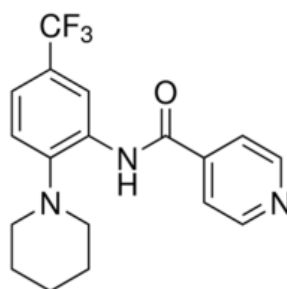
A via PI3K/Akt desempenha um papel crucial na microangiogênese, migração celular e angiogênese (ZHOU *et al*, 2010) e faz parte da via principal de SRPK (ZHOU *et al*, 2012). Na via PI3K/Akt/eNO, ela regula a expressão e a atividade da eNOS, contribuindo para a mobilização local de células progenitoras endoteliais (CPEs) e promovendo a formação de novos vasos sanguíneos. (PETIT, *et al*, 2007) Estudos demonstraram que o T $\beta$ 4 exógeno estimula a proliferação, migração e adesão das CPEs através da ativação da via de sinalização PI3K/Akt/eNOS (QIU, 2019). Além disso, em modelos animais de isquemia cerebral e isquemia dos membros, a administração de T $\beta$ 4 resultou no aumento da fosforilação de Akt e na expressão de eNOS, promovendo a regeneração vascular e a recuperação funcional (PANG, 2010), e segundo Trenkwaller e colaboradores, 2015, demonstrou induzir a angiogênese em doenças isquêmicas através da via de sinalização PI3K/Akt.

A via de sinalização Notch desempenha múltiplos papéis em processos fisiológicos e patológicos, incluindo função neuronal, proliferação celular, apoptose,

angiogênese, estabilidade das células endoteliais arteriais e expansão das células-tronco hematopoiéticas da medula óssea. (XING *et al*, 2021). Estudos recentes têm investigado o papel dessa via na resposta ao peptídeo T $\beta$ 4, revelando sua capacidade de induzir a angiogênese e a diminuição da atividade do peptídeo quando a via Notch é inibida. (LV, 2013).

## 2.8 Inibidores de SRPKs

Um dos inibidores inespecíficos de SRPK, conhecido como SRPIN340, é um derivado da isonicotinamida, especificamente a N-[2-(1-piperidinil)-5-(trifluorometil)fenil]isonicotinamida. Este composto inibe competitivamente a atividade quinase da SRPK1 e SRPK2 ao impedir a ligação da molécula de ATP ao sítio ativo da enzima, modulando assim o estado de fosforilação dos fatores de splicing SR (KARAKAMA *et al.*, 2010; ANWAR *et al.*, 2011) (Figura 14).



**Figura 14:** 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. Ensaio *in vivo* apoiaram esses resultados, inibindo também a formação de metástase pulmonar (MOREIRA *et al*, 2018). Resultados similares, incluindo a redução do tamanho tumoral e o aumento de VEGF antiangiogênico, foram observados em um modelo de câncer de próstata tratado com um inibidor de SRPK1 chamado SPHINX (GAMMONS *et al.*, 2014; MAVROU *et al.*, 2015).

Segundo Gonçalves e Jordan (2015), em um estudo com câncer colorretal, a inibição da SRPK1 pelo composto SRPIN340 resultou em uma redução do desenvolvimento tumoral devido à menor expressão da isoforma Rac1b, que é crucial para a sobrevivência das células tumorais. Em células de leucemias

mieloides e linfoides, o SRPIN340 demonstrou reduzir a viabilidade celular de forma seletiva. Precusores de vias de sobrevivência celular, como MAP3K, MAPK1 e AKT, foram afetados pelo tratamento com SRPIN340 (SIQUEIRA *et al.*, 2015). Esses resultados sugerem que a inibição específica dessas quinases pode ser uma abordagem vantajosa para o tratamento do melanoma metastático.

## 2.9 Justificativa e hipótese

As interações proteicas têm sido amplamente estudadas e são essenciais para compreender os mecanismos moleculares e sua relação com vias de sinalização. O papel oncogênico das SRPKs é bem estabelecido, mas ainda há muito a explorar sobre os mecanismos moleculares específicos dessas quinases em diferentes tipos de câncer. Isso inclui a função particular e os mecanismos regulatórios que controlam a atividade de SRPK1 e SRPK2 nos tumores em que estão superexpressas. Investigar seu envolvimento em vias de sinalização durante processos de migração celular, invasão e proliferação é fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra o câncer.

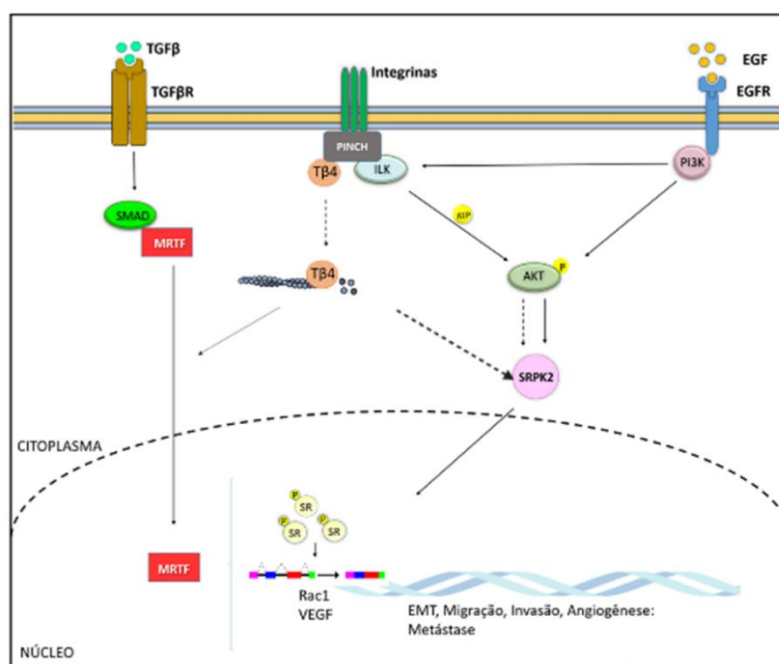
Um ensaio de duplo híbrido realizado pelo nosso grupo de pesquisa identificou 19 possíveis novas interações entre a região espaçadora de SRPK2 e outras moléculas, incluindo a interação com o peptídeo T $\beta$ 4 (MELLO, 2014). Analisar a importância da interação entre SRPK2 e T $\beta$ 4 nos processos de migração, proliferação celular, transição epitélio-mesenquimal, crescimento tumoral e metástase em modelos de melanoma, utilizando inibidor e células knockout para SRPK2 via CRISPR/Cas9, é crucial devido à sua implicação no câncer. É relevante destacar que ambas as proteínas podem ser encontradas no citoplasma e no núcleo, e estão relacionadas ao *splicing*.

Além do papel de sequestro de G-actina desempenhado por T $\beta$ 4, essa molécula parece ter uma atuação mais ampla em tumores, incluindo processos anti-apoptóticos, angiogênicos e de estímulo à migração e invasão. Foi demonstrado que T $\beta$ 4 é necessária para o *splicing* adequado da proteína muscular titina em cardiomiócitos, embora o mecanismo exato ainda seja desconhecido (SMART *et al.*, 2017). Isso sugere que T $\beta$ 4 pode também estar envolvida na regulação do *splicing* de outras proteínas no contexto tumoral, possivelmente via SRPK2.

Ademais, T $\beta$ 4 está envolvida em diferentes vias de sinalização, como as de TGF $\beta$  (MORITA, HAYASHI, 2018) e Integrinas (HUANG, 2007; BOCK

MARQUETTE, 2004), ambas culminando na ativação de AKT. As SRPKs são reguladas por AKT no contexto da via desencadeada por EGF (ZHOU et al., 2012). Portanto, é possível que haja eventos de cross-talk entre essas vias através da interação SRPK2-T $\beta$ 4 no contexto tumoral.

Abaixo, foi desenvolvido um esquema ilustrando eventos de sinalização que demonstram a potencial relação entre T $\beta$ 4 e SRPK2. A principal via de sinalização é a de EGF, onde o eixo AKT-SRPK-SR representa o ramo central na transdução de sinal de EGF para regular o programa de splicing no núcleo (ZHOU et al., 2012). Essa via de sinalização está bem documentada na literatura (DING et al., 2006; ZHONG et al., 2009; MANNING E CANTLEY, 2007; ZHOU E FU, 2013), e é apresentada como o eixo principal, com setas preenchidas indicando a translocação nuclear das SRPKs e sua influência no splicing. Foi demonstrado que T $\beta$ 4 forma um complexo com PINCH e ILK, fosforilando AKT, que é ativado por PI3K (Fukuda et al., 2003), sugerindo uma ligação entre as vias de EGF e Integrinas. Propomos que um dos caminhos posteriores à fosforilação de AKT pelo complexo pode envolver a SRPK2, representado como linhas tracejadas. O esquema também destaca que T $\beta$ 4 se liga diretamente à actina, modulando a dinâmica do citoesqueleto em células de mamíferos (MANNHERZ e HANNAPPEL, 2009) (Figura 15).



**Figura 15: Eventos de sinalização que demonstram a potencial relação entre T $\beta$ 4 e SRPK2.** Via de EGF, como ramo central na transdução de sinal de EGF para regular o programa de splicing no núcleo. Via de TGF $\beta$  mostrando que T $\beta$ 4 tem relação com os fatores de transcrição do miocárdio (MRTF). O PI3K ativando o complexo T $\beta$ 4-PINCH-ILK, fosforilando AKT, e, posteriormente com linhas pontilhadas indicando hipótese, a continuação por SRPK2 regulando os eventos nucleares. Também é mostrado o T $\beta$ 4 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 e a interação de SRPK2 e T $\beta$ 4 em melanoma metastático

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Verificar a influência da relação de SRPK2 e T $\beta$ 4 em ensaios fenotípicos como proliferação celular, formação de colônia e migração, com utilização de inibidor e células knockouts para SRPK2;
- Avaliar a influência da relação de SRPK2 e T $\beta$ 4 em polimerização dos filamentos de actina;
- Realizar busca de dados de pacientes com melanoma e a relação com o peptídeo T $\beta$ 4
- Verificar a interação SRPK2/T $\beta$ 4
- Investigar o desenvolvimento do melanoma subcutâneo em camundongos C57BL/machos inoculados com células B16F10, com aplicação dos tratamentos propostos;
- Avaliar alterações histopatológicas do tumor e pulmão dos animais (in vivo)

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Cultura de Células**

As células utilizadas foram de camundongo B16F10 (linha celular de melanoma metastático), cedidas pela Dra. Anésia Aparecida dos Santos (Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil) e células silenciadas pela técnica de CRISPR-Cas9 em parceria com Laboratório de Organismos Modelo do LNBio/CNPEM e Dra. Mônica Caetano (Laboratório de Bioquímica celular e Bioprodutos, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil). As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Sigma) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS) (LGC Biotecnologia), 100 g/mL de estreptomicina e 100 unidades/mL de penicilina em pH 7,2 e 37°C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### **4.2 Composto Químico**

SRPIN340 - N-(2-(Piperidin-1-yl)-5-(Trifluoromethyl) Phenyl Isonicotinamide – sintetizado, caracterizado e publicados em nosso trabalho anterior (SIQUEIRA et al., 2017).

Thymosin Beta 4 (Tβ4) - conseguido com a empresa farmacêutica Regenerx Biopharmaceutical.(EUA).

### **4.3 Ensaio de migração celular**

As células B16F10 foram plaqueadas em placas de 24 poços e cultivadas por 24h até 80 – 90% de confluência. As células foram lavadas duas vezes com PBS e as monocamadas foram raspadas com uma ponta de micropipeta para criar um arranhão uniforme. Em seguida, as células foram lavadas novamente com PBS para remover o desprendimento. O composto SRPIN340 (25 μM) , e/o peptídeo Thymosin Beta 4 (1 μM) foram adicionados ao meio RPMI. O tratamento do veículo com DMSO (0,4% v/v) foi usado como controle. Imagens digitais das monocamadas feridas foram obtidas por fotomicroscópio EVOS fl (Life Technologies) por até 24h. As zonas riscadas não preenchidas foram quantificadas pelo sistema de software Image J do Java.

#### 4.4 Ensaio de formação de Colônia

As células B16F10 foram plaqueadas em placas de 6 poços em triplicata na densidade de  $1,0 \times 10^3$  células por poço. Após 24 h, as células foram tratadas com o composto SRPIN340 (25  $\mu$ M) , e/o peptídeo Thymosin Beta 4 (1  $\mu$ M) durante 24 h. O meio foi trocado e as células foram cultivadas por 7 dias. As colônias formadas foram então fixadas e coradas com solução de azul de toluidina (0,5% v/v) e metanol (20% v/v). As colônias foram contadas usando o software ImageJ e os resultados foram expressos como uma porcentagem das culturas de controle não tratadas.

#### 4.5 Ensaio de Imunofluorescência

As células B16F10 foram plaqueadas em placas de 24 poços contendo lamínulas, Após 24h, foram tratadas com SRPIN340 (25  $\mu$ M) , e/o peptídeo Thymosin Beta 4 (1  $\mu$ M). As células tratadas como o veículo DMSO e meio RPMI foram usadas como controle. Em mais 24h, as lamínulas foram fixadas com 4% v/v de paraformaldeído/Hepes por 20 min, lavadas com PBS e então permeabilizadas em 1% v/v Triton X-100/PBS por 20 min, lavadas com PBS e bloqueadas com 3% m/v BSA/PBS-T (PBS contendo 0,05% v/v de Tween-20) durante 1h. As células foram então incubadas com anticorpos primários anti-Ki67 (BD Biosciences) por 1 h. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpo secundário anti-mouse -IgG-Alexa Fluor 488 (Invitrogen) por 1 h. Para finalizar, após lavagem com PBS, foi utilizado Rhodamine Phalloidin (Thermo Scientific) por 30 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 foram obtidas em microscópio de fluorescência EVOS® utilizando os filtros DAPI LED CUBE e GFP LED CUBE.

#### 4.6 Ensaio Imunoenzimático Ligado a Enzima (ELISA)

O teste ELISA foi realizado de acordo com De Souza et al. (2013), com modificações (De Souza et al., 2013). As placas de 96 poços (Nunc MaxiSorp™) foram sensibilizadas com o peptídeo Timosina Beta 4 (curva de 0,0625  $\mu$ g/poço a 1 mg/poço) em tampão carbonato 0,1 M ( $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ , pH 9,6), durante a noite, a 4 °C. As placas foram lavadas quatro vezes com PBS-Tween 20 a 0,05% e bloqueadas com leite hidrolisado Aptamil Pepti a 3% por 1 h, a 26 °C. Os extratos proteicos contendo SRPK2 (diluídos em 1:10 em PBS-Tween 20 a 1%) e o controle

foram incubados por 1 h, a 26 °C. Após a lavagem com PBS-Tween 20 a 0,05%, foi adicionada a anticorpo primário anti-His diluído em 1:5000 (Sigma) e incubado por 1 h à temperatura ambiente. Após esse período, foi realizada mais uma lavagem com PBS-Tween 20 a 0,05% e o anticorpo secundário anti-IgG conjugado com peroxidase, diluído em 1:5000 (Sigma, A6792), foi adicionado e incubado por 1 h, a 26 °C. As placas foram lavadas quatro vezes com PBS-Tween 20 a 0,05% e o desenvolvimento foi realizado adicionando 100 µL do substrato TMB (Sigma, T0440) por 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 0,5 M. A absorbância foi lida a 450 nm no leitor SpectraMax® M5 (Molecular Devices, Silicon Valley, Califórnia, Estados Unidos).

#### **4.7 Modelo de Tumor Subcutâneo In Vivo e Procedimentos Histológicos**

Camundongos machos da linhagem C57BL/6 (n = 14; peso, 23–43 g) foram obtidos do Laboratório Central de Animais (Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil) e mantidos sob condições controladas, a 21,2 °C, 60% a 70% de umidade relativa, e ciclos de luz/escuro de 12 h. Os animais receberam alimentação e água ad libitum. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV, protocolo 41/2016).

Para a análise do crescimento tumoral subcutâneo, foram preparados 200 µL de suspensão celular de B16F10 ( $1 \times 10^6$  células) em solução salina estéril e inoculados subcutaneamente no flanco direito dos camundongos. Os camundongos portadores das células de melanoma foram divididos aleatoriamente em dois grupos (n = 7 animais/grupo). Os tumores foram analisados em relação ao seu desenvolvimento. O peso corporal e os volumes tumorais (V) foram medidos três vezes por semana antes do procedimento de tratamento, utilizando a fórmula  $V = 0,52 \times D1^2 \times D2$ , onde D1 e D2 são o diâmetro curto e longo do tumor, respectivamente. Após o crescimento do tumor, os tratamentos começaram de forma intratumoral com 50 µL de Tβ4 (5 mg/mL) ou água diariamente durante duas semanas. O peso corporal de cada camundongo foi registrado a cada 2 dias para determinar se os tratamentos afetaram a saúde dos animais.

No dia 15, os camundongos foram pesados e eutanasiados por anestesia profunda (cloridrato de cetamina, 150 mg/kg/i.p., e cloridrato de xilazina, 10 mg/kg/i.p.), seguido de punção cardíaca. Tumores, pulmão, baço e pele foram

removidos, pesados e fixados em paraformaldeído (4% v/v) em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2, à temperatura ambiente por 24 h para análises histológicas. Os órgãos coletados foram desidratados em uma série crescente de etanol (70, 80, 90 e 100% v/v) e incorporados em parafina. Um microtomógrafo rotativo (RM 2255, Leica) foi utilizado para obter seções de 4 µm, que foram coradas com hematoxilina-eosina e, em seguida, analisadas qualitativamente utilizando um microscópio óptico Olympus CX40. Todos os animais sobreviveram até o término do experimento, portanto, todas as análises subsequentes foram realizadas com 7 animais de cada grupo.

#### **4.8 Processamento Histológico**

As análises histológicas foram realizadas seguindo os passos descritos anteriormente (VALE, 2020). Fragmentos de pulmão, pele e tumor foram desidratados em uma série crescente de etanol para a inclusão em parafina. Seções com espessura de 4 µm foram obtidas utilizando um microtomógrafo rotativo (RM 2255, Leica Biosystems, Nussloch, Alemanha). Enquanto algumas seções histológicas foram coradas com hematoxilina/eosina e azul de toluidina para avaliação da arquitetura tecidual e sua organização, outras seções foram coradas com PicroSirius Red para avaliar a presença de fibras colágenas. Os tecidos foram, então, analisados qualitativamente sob um microscópio de luz (Olympus BX-50, Tóquio, Japão).

Para a análise estereológica, imagens digitais das seções de tecido tumoral foram obtidas utilizando um microscópio de luz (Olympus BX-53) conectado a uma câmera digital (Olympus DP73) e analisadas com o software Image-Pro Plus 4.5 (Media® Cybernetics, Silver Spring, Maryland, EUA). A proporção volumétrica foi obtida contando 5000 pontos, por animal, projetados em 10 campos histológicos de tecido tumoral em aumento de 200×. Os pontos coincidentes sobre os componentes tumorais foram registrados: células tumorais, células mortas, figuras mitóticas (células mitóticas com cromossomos visíveis sob microscopia de luz), vasos sanguíneos, infiltrado inflamatório, melanina e tecido conectivo. O volume de cada componente foi calculado utilizando a seguinte fórmula:  $V = PP/PT \times 100$ , onde PP é o número de pontos localizados na estrutura de interesse e PT é o número total de pontos na área histológica.

#### 4.9 Curva de sobrevida

Dados de transcriptômica de bulk RNA-seq e clínicos de pacientes com melanoma foram baixados do banco de dados “The Cancer Genome Atlas—TCGA” (<http://cancergenome.nih.gov/>) utilizando o pacote “TCGA biolinks” em ambiente R (Colaprico *et al*, 2016). Os pacientes da coorte de melanoma (SKCM) foram divididos em primário e metastático. Para identificar uma potencial influência da expressão de TMSB4X na sobrevivência de pacientes com melanoma metastático, classificamos estes pacientes em dois grupos: aqueles com a expressão de TMSB4X menor do que a média de expressão de todos os pacientes para este gene (grupo “Low”) e os pacientes com expressão de TMSB4X maior ou igual a média de expressão (grupo “High”). Estes dois grupos foram comparados utilizando intervalos de tempo em uma análise de sobrevida começando da submissão da espécime metastática até o final do acompanhamento ou a morte do indivíduo. Para essa análise utilizamos os pacotes em R “survival” e “survminer” de maneira a obter as curvas de sobrevida Kaplan-Meier de 5 anos de acompanhamento e o teste log-rank para comparar as sobrevidas estimadas entre os dois grupos (Therneau, 2022; Kassambara *et al*, 2017). O valor de “Hazard Ratio” (HR) e os intervalos de confiança 95% (CIs) foram obtidos através das estimativas de máxima verossimilhança para cada covariante utilizando o modelo de regressão de Cox (Cox, 2022)].

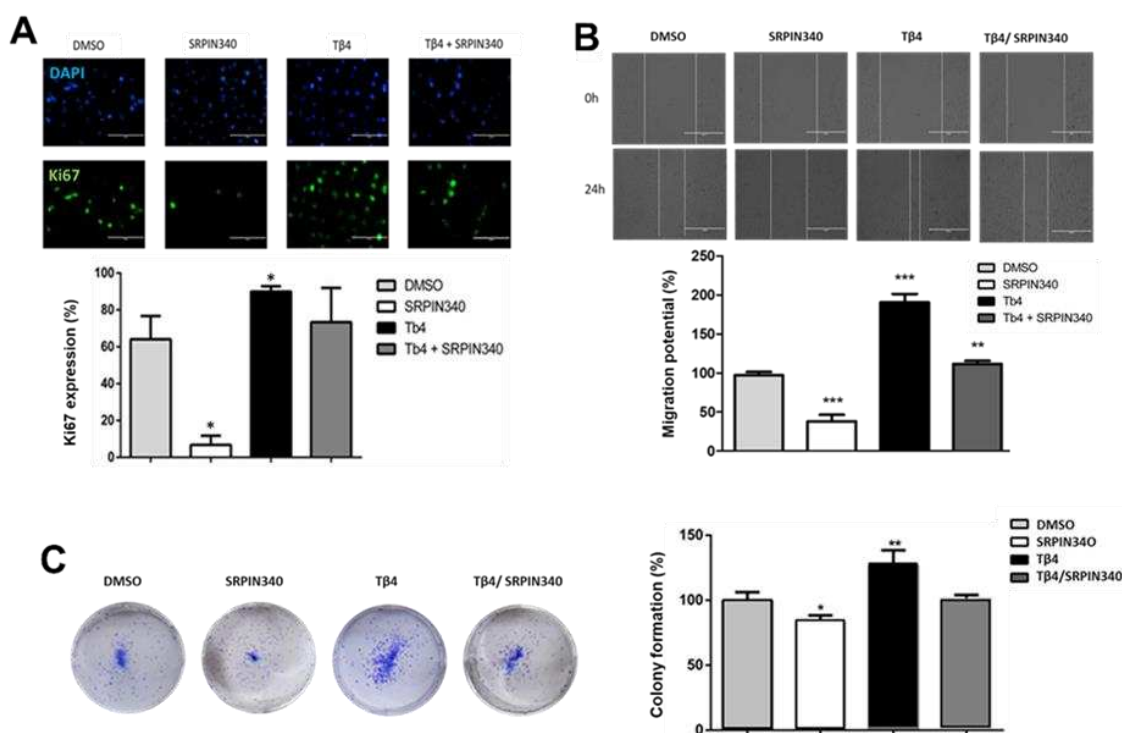
#### 4.10 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando Microsoft Excel (Microsoft Office Software), GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.) e software ImageJ. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de experimentos independentes repetidos duas vezes em triplicata (n=6). A significância estatística foi avaliada usando ANOVA de uma via, seguida pelos testes post hoc de Dunn ou Dunnett. Asteriscos indicam os níveis de significância: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  em relação aos controles.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Efeito em fenótipos relacionados à metástase

Em um primeiro conjunto de experimentos, avaliamos se a atividade da Timosina Beta 4 (Tβ4) em fenótipos relacionados à metástase era influenciada pelo inibidor farmacológico de SRPK1/2, SRPIN34032. O marcador de proliferação Ki-67 apresentou expressão aumentada após o tratamento com Tβ4, a qual foi reduzida pelo SRPIN340 (Figura 1A). Resultados semelhantes foram observados em ensaios de migração celular e formação de colônias (Figuras 1B-C), sugerindo que o efeito do Tβ4 em fenótipos relacionados à metástase *in vitro* é pelo menos parcialmente dependente da função das SRPKs.



**Figura 16: Efeito do Tβ4 e do SRPIN340 em ensaios fenotípicos *in vitro*.** (A) Avaliação da proliferação celular por marcação com Ki67. Células B16F10 foram tratadas com DMSO (0,4%), SRPIN340 (25 μM), Tβ4 (100 ng/mL) e a combinação de ambos por 24 horas. O número absoluto de células marcadas por DAPI e GFP foi obtido para calcular a porcentagem de fluorescência. O DAPI foi utilizado como contra-coloração nuclear, e a fluorescência foi registrada utilizando um microscópio de fluorescência invertido (EVOS FL). Barra de escala: 50 μm. (B) Efeito dos compostos no potencial migratório de células de melanoma *in vitro*. Células B16F10 foram tratadas com DMSO, SRPIN340 (25 μM), Tβ4 (100 ng/mL) ou ambos. A migração celular foi determinada por fotografias do ensaio de fechamento de feridas tiradas após 24 horas de exposição. O gráfico mostra a mudança percentual na migração celular causada pelos compostos. Células tratadas com DMSO foram usadas como controle. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de experimentos em triplicata. \*\*P < 0,01 ou \*\*\*P < 0,001 versus controle (DMSO) pelo teste de Dunnett. (C) Efeito dos compostos na formação de colônias de células de melanoma. Células B16F10 foram tratadas com DMSO (controle), SRPIN340 (25 μM), Tβ4 (100 ng/mL) ou ambos. O ensaio de colônias foi realizado utilizando coloração com azul de toluidina após 7 dias. O gráfico mostra o efeito dos tratamentos no número absoluto de formações de colônias comparado às células tratadas com veículo. Os dados são expressos como média ± desvio padrão de experimentos em triplicata. \*P < 0,05 ou \*\*P < 0,01 versus controle (DMSO) pelo teste de Dunnett.

## 5.2 Efeito em células geneticamente depletadas de SRPK2

Para superar as limitações de seletividade e especificidade do SRPIN34024, avaliamos se a atividade do T $\beta$ 4 era afetada pela depleção do SRPK2 em células de melanoma metastático murinas. A expressão prejudicada do SRPK2 foi confirmada (Figura 2A) e parecia diminuir o efeito do T $\beta$ 4 em aumentar o sinal de fluorescência de Ki-67 (Figura 2B). Da mesma forma, o efeito do T $\beta$ 4 na reorganização da actina, migração celular e formação de colônias foi prejudicado em células com expressão reduzida de SRPK2 (Figuras 2C-E). Essas descobertas sugerem uma interação física entre T $\beta$ 4 e SRPK2, como observado em ensaios de Imunoenzima Ligada (ELISAs) (Figura 2F). Coletivamente, esses dados indicam que SRPK2 e T $\beta$ 4 estão funcionalmente relacionados em mecanismos associados ao tumor.

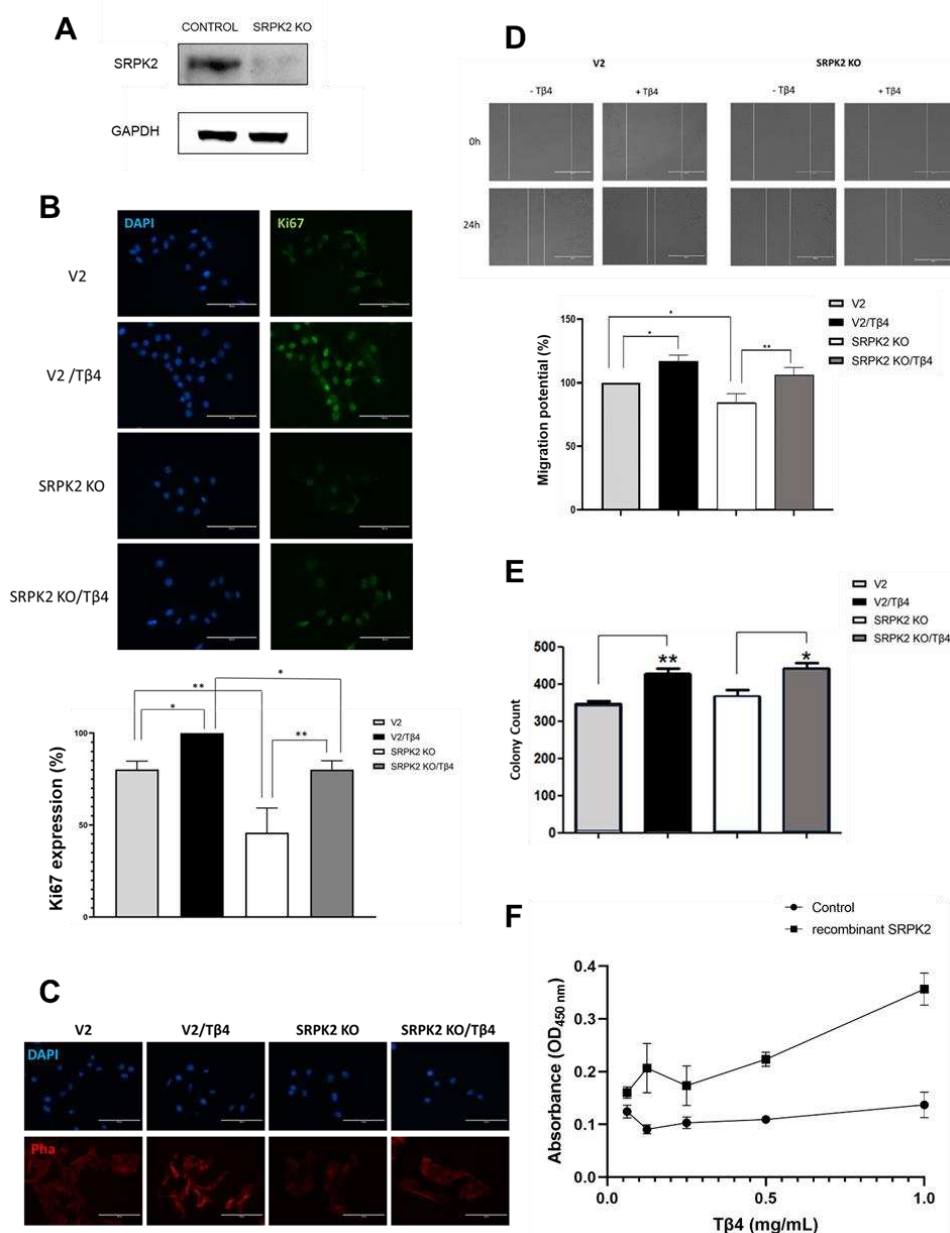
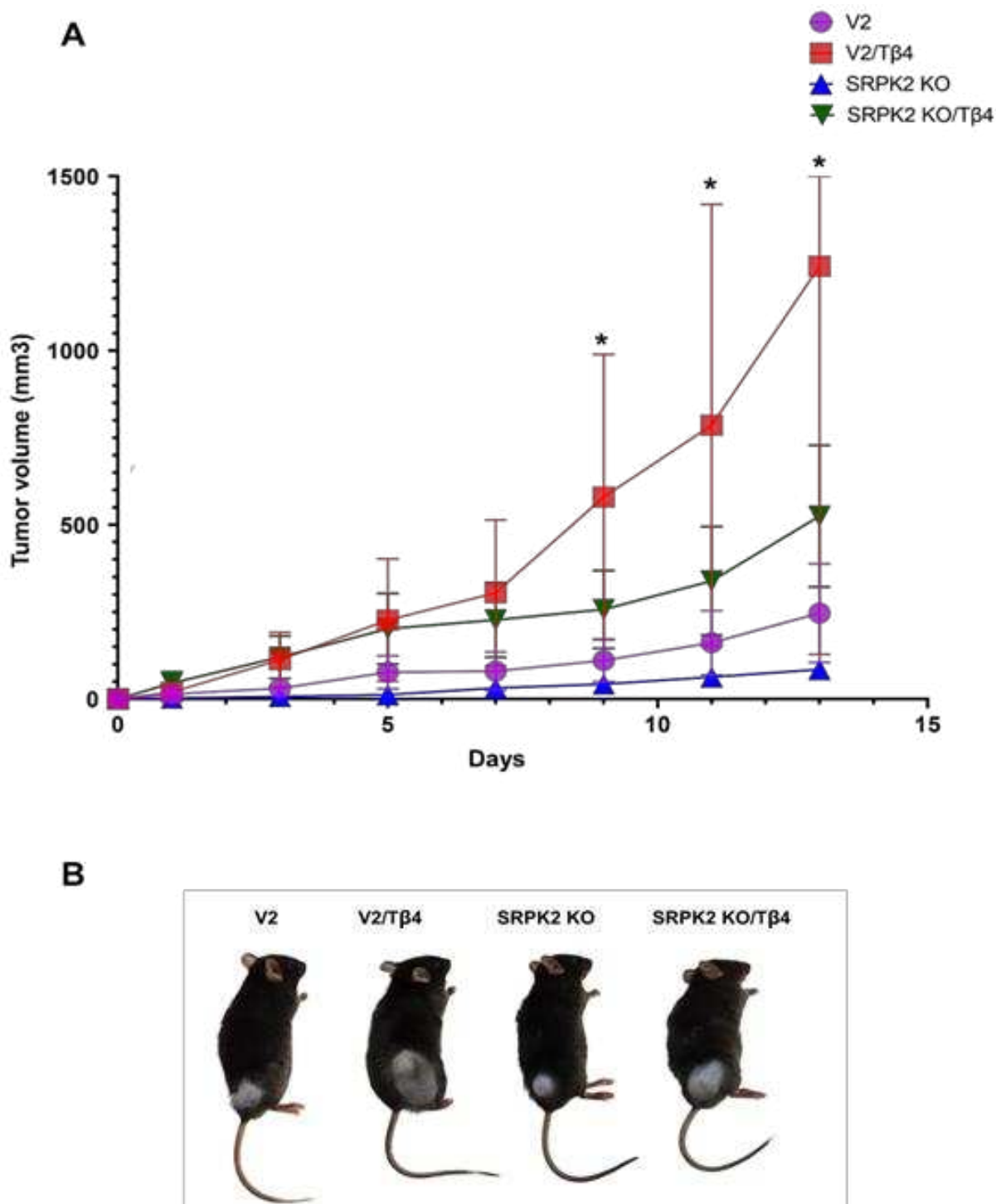


Figura 17: **Efeito em células geneticamente depletadas de SRPK2.** (A) Análise de Western blot das linhagens B16F10 geradas por edição do genoma CRISPR-Cas9. "Controle" denota células transduzidas com o vetor LentiCRISPRv2 vazio (denominado aqui "V2"). Os níveis da proteína SRPK2 foram normalizados em relação à GAPDH. (B) Avaliação da proliferação celular por marcação com Ki67 em células B16F10 V2 e SRPK2 KO, tratadas ou não com Tβ4 (100 ng/mL). O número absoluto de células marcadas por DAPI e GFP foi obtido para calcular as células rotuladas com fluorescência. O DAPI foi usado como contra-coloração nuclear, e a fluorescência foi registrada utilizando um microscópio de fluorescência invertido (EVOS FL). Barra de escala: 50 μm. (C) Efeito dos compostos na actina. Células V2 e SRPK2 KO foram tratadas com e sem 100 ng/mL de Tβ4 por 24 horas. Os filamentos de actina foram marcados com Faloidina de Rodoamina (Thermo Scientific), Tβ4 foi marcado com anticorpo anti-Tβ4 (RayBiotech) 1:100, e a fluorescência foi registrada utilizando um microscópio de fluorescência invertido (EVOS FL). As imagens mostradas são representativas de vários experimentos independentes. Barra de escala: 10 μm. (D) Efeito do Tβ4 em células B16F10 V2 e SRPK2 KO. As células foram tratadas com ou sem Tβ4 (100 ng/mL). A migração celular foi determinada por fotografias do ensaio de cicatrização de feridas tiradas após 24 horas de exposição. (E) Efeito do silenciamento do SRPK2 na capacidade de formação de colônias das células B16F10 V2 e SRPK2 KO após 9 dias, com ou sem Tβ4. (F) Ensaio de Imunoenzima Ligada (ELISA). Detecção da interação Tβ4-SRPK2 por ELISA indireto utilizando extrato bruto expresso em *E. coli* Shuffle com o vetor de expressão para SRPK2 (●) e sem o vetor de expressão (controle) (•). A concentração de Tβ4 utilizada para sensibilização variou de 0,0625 mg/mL a 1 mg/mL. Os extratos brutos foram diluídos 5 vezes antes da aplicação. O gráfico foi gerado pelo GraphPad Prism 6. Três experimentos independentes foram realizados. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ). Os resultados são expressos como média ± desvio padrão.

### 5.3 Efeito em melanoma subcutâneo em camundongos

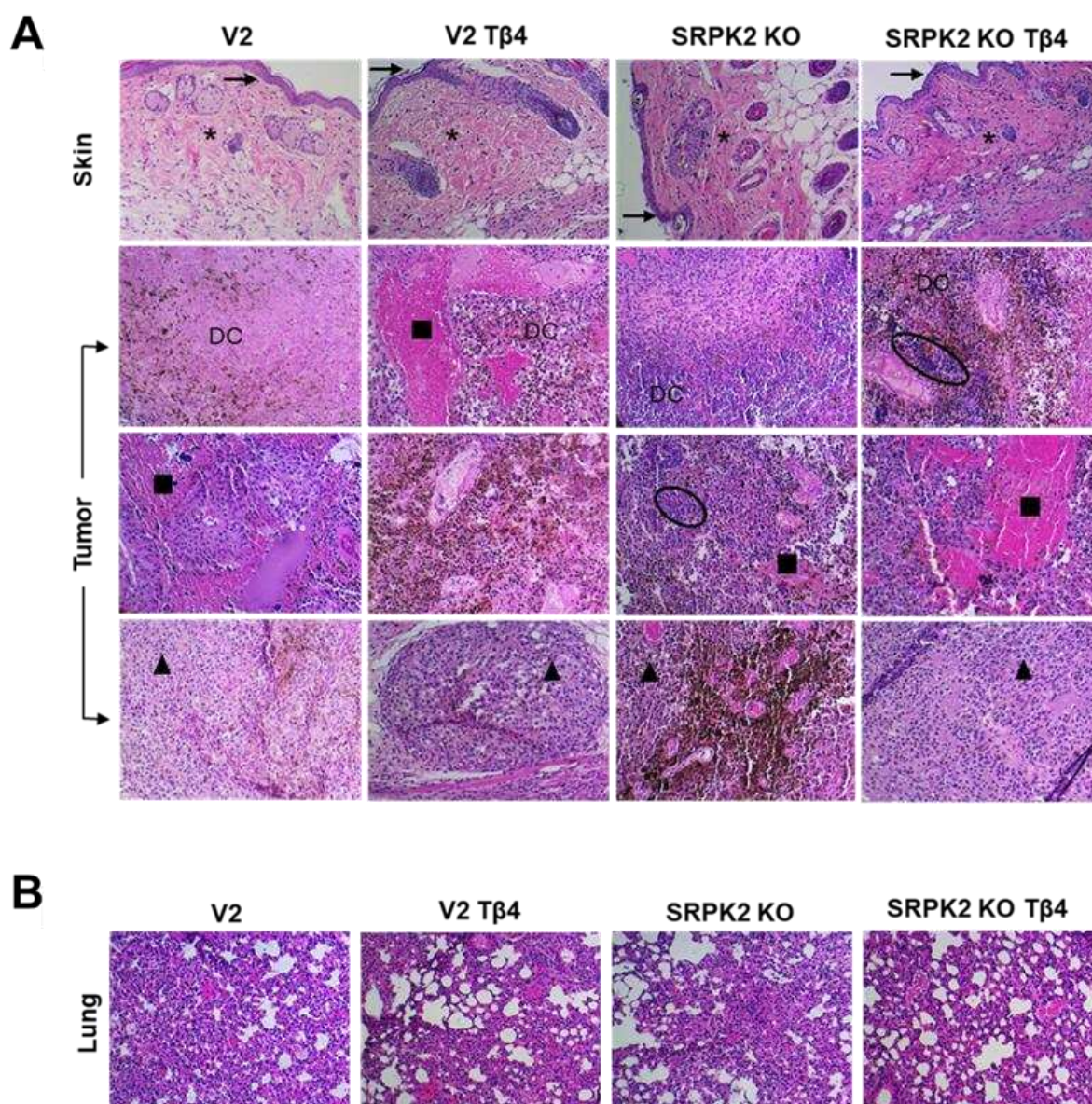
Para avaliar o potencial impacto do Tβ4 na promoção e crescimento tumoral, assim como a possível influência do SRPK2 nesses fenótipos, utilizamos células B16F10 modificadas para induzir tumores em camundongos. A partir do dia 10, o grupo controle (V2) tratado com Tβ4 apresentou volumes tumorais significativamente maiores em comparação com os outros grupos (Figura 3A-B). O efeito do Tβ4 foi prejudicado em camundongos portadores de células depletadas de SRPK2 (Figura 3A-B), confirmando os achados *in vitro*.



**Figura 18: Efeito do T $\beta$ 4 em melanoma subcutâneo em camundongos.** (A) Volume tumoral. Inoculação de 200  $\mu$ L de uma suspensão celular a uma concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL, subcutaneamente, na região lateral direita de 40 camundongos. Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais de acordo com o tratamento recebido (10 animais por grupo): V2 (controle), V2 com T $\beta$ 4, B16F10 SRPK2 KO e B16F10 SRPK2 KO com T $\beta$ 4. "Controle" denota células transduzidas com o vetor LentiCRISPRv2 vazio (denominado aqui "V2"). As inoculações foram de 50  $\mu$ L. O gráfico foi gerado pelo GraphPad Prism 6. (B) Fotografias representativas da formação tumoral 15 dias após a inoculação com B16F10 modificadas e tratamento.

#### 5.4 Análises Histológicas da Pele e Tumores de Camundongos

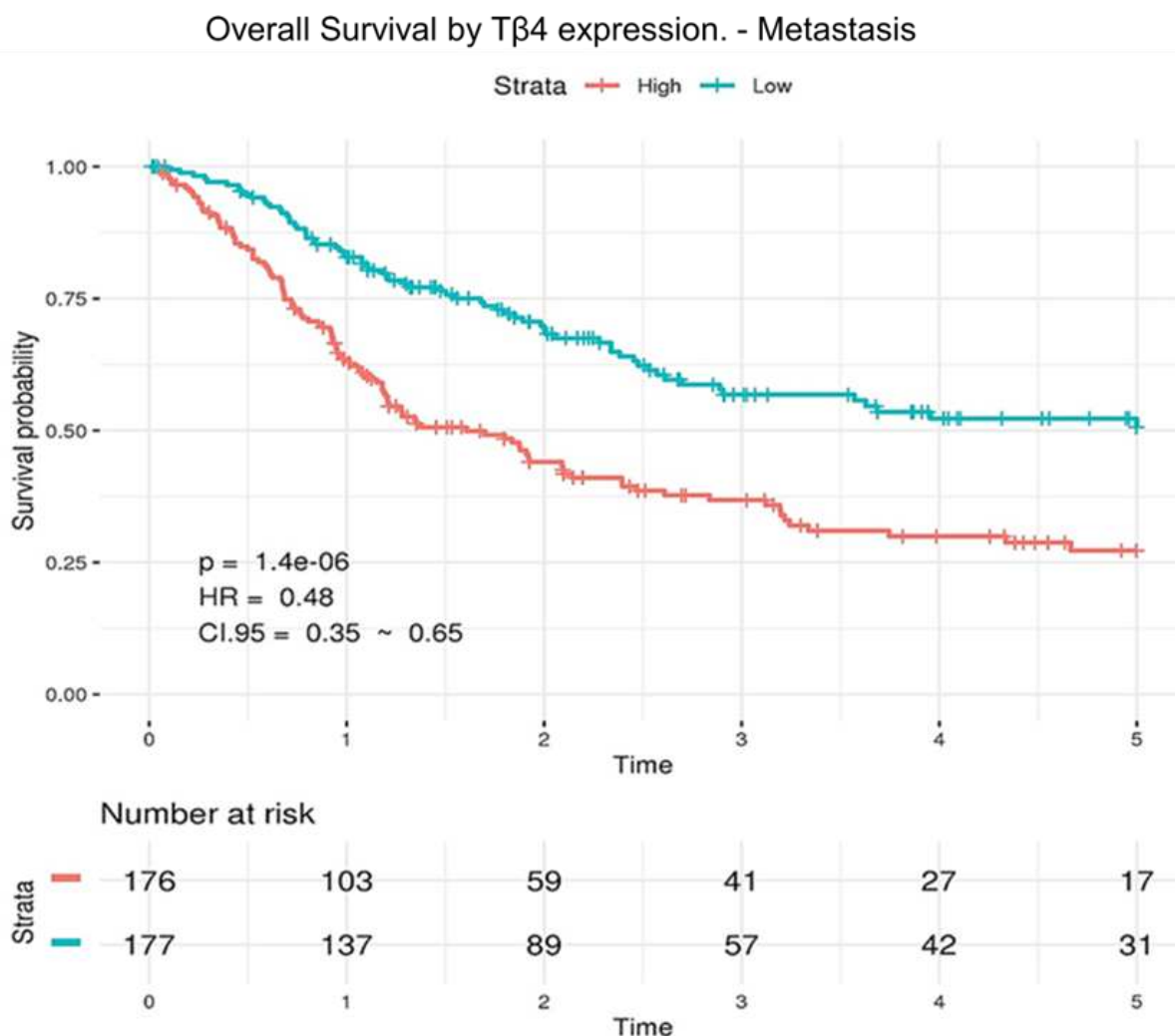
A pele dos animais apresentou arquitetura preservada; no entanto, os tumores de todos os grupos mostraram células neoplásicas, melanina, infiltrado inflamatório, vascularização significativa e áreas de morte celular. Os tumores dos animais do grupo V2/T $\beta$ 4 exibiram maior vascularização e áreas de morte celular. A presença de infiltrado inflamatório foi maior nos tumores de camundongos com células depletadas de SRPK2 (Figura 4A), semelhante às observações em tumores tratados com inibidores de SRPKs (MOREIRA, ET AL, 2022). Os pulmões dos animais de todos os grupos mostraram atelectasia, variando de leve a severa (Figura 4A). O grupo controle apresentou atelectasia severa, V2/T $\beta$ 4 mostrou atelectasia de moderada a severa, SRPK2 KO exibiu atelectasia de moderada a severa, e SRPK2 KO/T $\beta$ 4 apresentou atelectasia de leve a moderada.



**Figura 19: Análises Histológicas.** (A) Seções histológicas da pele e do tumor de camundongos C57BL/6 tratados com V2 T $\beta$ 4, SRPK2 KO T $\beta$ 4, V2 e SRPK2 KO, analisadas sob microscopia de luz. "Controle" denota células transduzidas com o vetor LentiCRISPRv2 vazio (denominado aqui "V2"). As seções da pele mostram a epiderme (seta fina) com epitélio estratificado e a derme (\*) composta por folículos pilosos rodeados por tecido conjuntivo. As seções da pele dos camundongos tratados com V2 T $\beta$ 4, SRPK2 KO T $\beta$ 4, V2 e SRPK2 KO mostraram arquitetura normal. As seções de tecido tumoral mostram células neoplásicas (triângulo), melanina, infiltrado inflamatório (círculo), sangramento (quadrado preto) e células mortas (DC). Hematoxilina-eosina, aumento de 100 $\times$ . (B) Seções histológicas do pulmão de camundongos C57BL/6 tratados com V2, V2 T $\beta$ 4, SRPK2 KO e SRPK2 KO T $\beta$ 4, analisadas sob microscopia de luz. Os pulmões mostraram atelectasia de leve a intensa. Hematoxilina-eosina, aumento de 100 $\times$ .

### 5.5 Curva de Sobrevivência de Kaplan-Meier de Pacientes Humanos

Para obter mais evidências translacionais dos resultados obtidos in vitro e em camundongos, avaliamos curvas de sobrevivência de Kaplan–Meier construídas a partir de dados de expressão gênica disponíveis para pacientes com melanoma. Embora a análise não tenha mostrado significância estatística entre os grupos para SRPK2 (dados não mostrados), a curva de sobrevivência comparando pacientes com melanoma metastático com expressão de T $\beta$ 4 maior ou igual à média ("Grupo Alto") e pacientes com expressão inferior à média ("Grupo Baixo") mostrou um impacto significativo no desfecho clínico ( $p < 0,05$ ). Pacientes com maior expressão de T $\beta$ 4 apresentaram pior prognóstico em comparação com aqueles com menor expressão (HR = 0,48, IC 95% = 0,35-0,65) (Figura 5). Esta descoberta está intimamente alinhada com os dados in vitro e in vivo descritos acima, destacando a importância da sinalização do T $\beta$ 4 para a progressão do melanoma.



**Figura 20: Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de pacientes com melanoma metastático.** A curva de sobrevivência compara pacientes com expressão de T $\beta$ 4 maior ou igual à média de expressão ("Grupo Alto" - curva vermelha) e pacientes com expressão inferior à média ("Grupo Baixo" - curva azul). O teste log-rank foi utilizado para comparar as estimativas de sobrevivência entre os dois grupos. O Hazard Ratio (HR) e os intervalos de confiança de 95% (ICs) foram obtidos usando o modelo de regressão de Cox. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 6. DISCUSSÃO

As funções das proteínas têm sido cada vez mais exploradas e são cruciais para entender os mecanismos moleculares e a participação em vias de sinalização. O papel oncogênico das SRPKs está bem estabelecido (HAYES et al, 2007; CHANG et al, 2015; GOUT et al, 2012; GONG et al, 2016; ZHOU et al, 2013; BULLOCK et al, 2016). No entanto, muito ainda precisa ser investigado sobre os mecanismos moleculares subjacentes às ações dessas quinases em diferentes tipos de câncer. Além do papel de sequestro da G-actina desempenhado pelo T $\beta$ 4, essa molécula parece ter uma função mais ampla nos tumores (WANG et al, 2004; KIM, JUNG 2015). O T $\beta$ 4 afeta o ciclo celular e promove a proliferação celular, como observado em estudos anteriores (JEON et al, 2013; ZHANG et al, 2016; CHEN et al, 2013; HAO et al, 2018). Portanto, a relação funcional entre SRPK2 e T $\beta$ 4 é importante não apenas para entender a biologia tumoral, mas também para o desenvolvimento de terapias adequadas para o câncer.

Neste estudo, mostramos que o efeito pró-tumoral do T $\beta$ 4 em melanoma depende, pelo menos em parte, da função do SRPK2. Esta é uma descoberta significativa e pode revelar funções novas para ambas as proteínas, como o envolvimento do T $\beta$ 4 no splicing e o potencial papel do SRPK2 na remodelação da actina, que deve ser investigado mais a fundo em estudos futuros.

Nossos dados indicam que o SRPK2 pode receber um sinal do T $\beta$ 4, potencialmente por meio de interação direta, como sugerido pelo ELISA. Embora essa descoberta exija validação bioquímica e biofísica adicional, especulamos que o T $\beta$ 4 possa regular a atividade do SRPK2, afetando os alvos downstream do SRPK2 no splicing e potencialmente na inflamação e remodelação da actina. Esta hipótese está alinhada com nossos dados *in vitro* e *in vivo* e estudos anteriores (CAETANO et al, 2022; MOREIRA et al, 2022; HUFF et al, 2001; MANNHERZ, HANNAPPEL, 2009).

A depleção genética de SRPK2 diminuiu a proliferação e migração celular, mas não afetou significativamente a formação de colônias. No entanto, o papel das SRPKs na formação de colônias foi observado em alguns tipos de câncer. Por exemplo, o silenciamento do SRPK2 diminuiu a formação de colônias no câncer de cabeça e pescoço (RADHAKRISHNAN et al, 2016) e no carcinoma espinocelular do cólon (WANG et al, 2016). Em células de melanoma (B16F10), a inibição farmacológica das SRPKs pelo SRPIN340 prejudicou a formação de colônias

apenas em concentrações mais altas (MOREIRA et al, 2018), sugerindo que tanto o SRPK1 quanto o SRPK2 deveriam ser afetados. De forma consistente, observamos uma diminuição na formação de colônias em células B16F10 apenas quando tanto o SRPK1 quanto o SRPK2 foram depletados (CAETANO et al, 2022).

O T $\beta$ 4 está intimamente associado à tumorigenese, e sua expressão elevada é frequentemente observada durante a progressão tumoral (MORITA, HAYASHI, 2018). A superexpressão do SRPK2 está implicada no crescimento tumoral e está fortemente associada a um prognóstico ruim (CAETANO et al, 2022; WANG et al, 2016; WANG et al, 2019). Em melanoma, a depleção do T $\beta$ 4 isoladamente demonstrou prejudicar o potencial tumorigênico em células A375 (MAZURKIEWICZ et al, 2021), enquanto a depleção do SRPK2, mas não do SRPK1, dificultou a progressão do melanoma (CAETANO et al, 2022). Nossos resultados in vivo demonstraram que a ação pró-tumoral do T $\beta$ 4 foi prejudicada pela depleção do SRPK2, confirmando todos os ensaios in vitro realizados e indicando que ambas as proteínas poderiam atuar em conjunto na progressão do melanoma.

Curiosamente, enquanto ambas as proteínas parecem desempenhar um papel na progressão do melanoma, apenas o T $\beta$ 4 esteve significativamente associado à pior sobrevida global nas análises de Kaplan-Meier. Isso é intrigante, especialmente considerando nossas descobertas anteriores relacionando o SRPK2 ao prognóstico ruim dos pacientes (CAETANO et al, 2022). Análises mais específicas envolvendo amostras de pacientes devem ser exploradas em estudos futuros, utilizando um conjunto de dados de pacientes mais amplo e estratégias experimentais adicionais para confirmação.

## 7. CONCLUSÕES

Nosso estudo demonstra que os efeitos pró-tumorígenos da timosina beta-4 (T $\beta$ 4) são significativamente diminuídos tanto pela inibição farmacológica com SRPIN340 quanto pela depleção genética de SRPK2. Essa redução foi observada em múltiplos ensaios fenotípicos *in vitro*, incluindo proliferação celular, migração e formação de colônias. Além disso, a formação de lamelipódios induzida por T $\beta$ 4 e as atividades pró-tumorais foram igualmente atenuadas pela depleção de SRPK2 *in vivo*. Esses resultados sugerem que SRPK2 desempenha um papel crítico na mediação das vias de sinalização de T $\beta$ 4 que contribuem para a tumorigenese do melanoma. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo a elucidar a interação funcional entre SRPK2 e T $\beta$ 4 no contexto do melanoma, destacando SRPK2 como um alvo potencial para estratégias terapêuticas voltadas ao combate do melanoma.

## REFERÊNCIAS

- ALEXANDROV LB, NIK-ZAINAL S, WEDGE DC, APARICIO SA, BEHJATI S, BIANKIN AV, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* (2013) 500(7463):415–21. 10.1038/nature12477
- 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.
- 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.
- 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, S. Serine-arginine protein kinase 1 (SRPK1), a determinant of angiogenesis, is upregulated in prostate cancer and correlates with disease stage and invasion. *Journal of Clinical Pathology*, v. 69, p.171–175, 2016.
- 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.
- CAETANO MMM, MOREIRA GA, DA SILVA MR, GUIMARÃES GR, SANTOS LO, PACHECO AA, SIQUEIRA RP, MENDES FC, MARQUES DA SILVA EA, JUNIOR AS, RANGEL FIETTO JL, SAITO Â, BORONI M, BRESSAN GC. Impaired expression of serine/arginine protein kinase 2 (SRPK2) affects melanoma progression. *Front Genet*. 2022 Sep 23;13:979735. doi: 10.3389/fgene.2022.979735. PMID: 36212152; PMCID: PMC9537589.
- CHA, H. J.; JEONG, M. J.; KLEINMAN, H. K. Role of thymosin beta 4 in tumor metastasis and angiogenesis. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 95, p. 1674–1680, 2003.

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 Biology*, v. 36, p. 6083–6093, 2015.

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

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 protein-specific kinases in mammalian cells. *Molecular Biology of the Cell*, v. 17, p. 876–885, 2006.

EDDY K, SHAH R, CHEN S. Decoding Melanoma Development and Progression: Identification of Therapeutic Vulnerabilities. *Front Oncol.* 2021 Feb 4;10:626129. doi: 10.3389/fonc.2020.626129. PMID: 33614507; PMCID: PMC7891057.

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

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

FU, X.; CUI, P.; CHEN, F.; XU, J.; GONG, L.; JIANG, L.; ZHANG, D.; XIAO, Y. Thymosin beta4 promotes hepatoblastoma metastasis via the induction of epithelial-mesenchymal transition. *Molecular Medicine Reports*, v. 12, p. 127–132, 2015.

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.

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. *The FEBS Journal*, v. 278, p. 570–586, 2011.

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).

GONG, L.; SONG, J.; LIN, X.; WEI, F.; ZHANG, C.; WANG, Z.; ZHU, J.; WU, S.; CHEN, Y.; LIANG, J.; FU, X.; LU, J.; ZHOU, C.; SONG, L. Serine-arginine protein kinase 1 promotes a cancer stem cell-like phenotype through activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signalling in NSCLC. *Journal of Pathology*, v. 240, p. 184–196, 2016.

GOUT, S.; BRAMBILLA, E.; BOUDRIA, A. DRISSI, R.; LANTUEJOUL, S.; GAZZERI, S.; EYMIN, B. Abnormal Expression of the Pre-mRNA Splicing Regulators SRSF1, SRSF2, SRPK1 and SRPK2 in Non Small Cell Lung Carcinoma. *Plos One*, v. 7, n. 46539, 2012.

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

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

HAO Q, HE L, ZHOU J, YUAN Y, MA X, PANG Z, et al.. Um Dimeric Thymosin Beta 4 com nova bio-atividade protege a função cardíaca pós-isquêmica acelerando a proliferação de células endoteliais vasculares . *Int J Cardiol* (2018) 261 :146–54. doi: 10.1016/j.ijcard.2018.03.052

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

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 Research*, v.67, p. 2072-2080, 2007.

HOGG EKJ, FINDLAY GM. Functions of SRPK, CLK and DYRK kinases in stem cells, development, and human developmental disorders. *FEBS Lett.* 2023 Oct;597(19):2375-2415. doi: 10.1002/1873-3468.14723. Epub 2023 Sep 4. PMID: 37607329.

HONG, K. O.; LEE, J. I.; HONG, S. P.; HONG, S. D. Thymosin  $\beta$ 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 1alpha is mediated by an O<sub>2</sub>-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 95, p. 7987–7992, 1998

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.

INCA. Câncer de pele melanoma. Disponível em <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/pele-melanoma>>. Acessado em 20 de maio de 2024.

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, S. W.; YANG, S. J.; EHLÉN, A.; DONG, S.; KHOURY, H.; CHEN, J.; PERSSON, J. L.; YE, K. Serine/arginine protein-specific kinase 2 promotes leukemia cell proliferation by phosphorylating acinus and regulating cyclin A1. *Cancer Research*, v. 68, n. 12, p. 4559-4570, 2008. 25

JANG, S.W.; 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. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 284, p. 24512–24525, 2009.

JEON BJ, YANG Y, KYUNG SHIM S, YANG HM, CHO D, IK BANG S. Timosina Beta-4 Promove a Proliferação de Células-Tronco Mesenquimais através de um Mecanismo Dependente de Interleucina-8. *Exp Cell Res* (2013) 319 :2526–34. doi: 10.1016/j.yexcr.2013.04.014

JI, P.; DIEDERICHS, S.; WANG, W.; BOING, S.; METZGER, R.; SCHNEIDER, P. M.; TIDOW, N.; BRANDT, B.; BUERGER, H.; BULK, E.; THOMAS, M.; BERDEL, W. E.; SERVE, H.; MULLER-TIDOW, C. 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  $\beta$ 4 induces the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in a hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$ -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, 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

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.

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

LAWRENCE MS, STOJANOV P, POLAK P, KRYUKOV GV, CIBULSKIS K, SIVACHENKO A, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* (2013) 499(7457):214–8. 10.1038/nature12213

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.

LIU, Y; SHEIKH, M.S. Melanoma: Molecular Pathogenesis and Therapeutic Management. *Mol Cell Pharmacol*. Author manuscript; available in PMC 2015 March 02

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

LV S, CAI H, XU Y, DAI J, RONG X, ZHENG L. Thymosin- $\beta$  4 induces angiogenesis in critical limb ischemia mice via regulating Notch/NF- $\kappa$ B pathway. *Int J Mol Med*. 2020 Oct;46(4):1347-1358. doi: 10.3892/ijmm.2020.4701. Epub 2020 Aug 11. PMID: 32945357; PMCID: PMC7447324.

LV S, CHENG G, ZHOU Y, XU G. Thymosin Beta4 Induces Angiogenesis Through Notch Signaling in Endothelial Cells. *Mol Cell Biochem* (2013) 381:283–90. doi: 10.1007/s11010-013-1713-8

MANNHERZ, H. G., HANNAPPEL, E. The  $\beta$ -Thymosins: Intracellular and Extracellular Activities of a Versatile Actin Binding Protein Family. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, v. 66, p. 839–851, 2009.

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

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

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.

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

MAZURKIEWICZ E, MAKOWIECKA A, MRÓWCZYŃSKA E, KOPERNYK I, NOWAK D, MAZUR AJ. Gelsolin Contributes to the Motility of A375 Melanoma Cells and This Activity Is Mediated by the Fibrous Extracellular Matrix Protein Profile. *Cells*. 2021 Jul 21;10(8):1848. doi: 10.3390/cells10081848. PMID: 34440617; PMCID: PMC8394273.

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.

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

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.

MOREIRA GA, CAETANO MMM, DO VALE JA, DE PAIVA JC, GONÇALVES VHS, ALMEIDA AA, SILVA LVG, MARTIM FRG, DE ANDRADE BARROS MV, GUIMARÃES GR, DE OLIVEIRA SANTOS L, DE SOUZA APM, MACHADO-NEVES M, TEIXEIRA RR, SILVA-JÚNIOR A, FIETTO JLR, BORONI M, DE OLIVEIRA LL, BRESSAN GC. The SRPK inhibitor N-(2-(piperidin-1-yl)-5-(trifluoromethyl)phenyl)isonicotinamide (SRPIN340) increases the immune response against metastatic melanoma in mice. *Biochem Pharmacol.* 2022 Sep;203:115161. doi: 10.1016/j.bcp.2022.115161. Epub 2022 Jul 2. PMID: 35787994.

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.

MORITA,T; HAYASHI,K. Tumor Progression Is Mediated by Thymosin-β4 through a TGFβ/MRTF Signaling Axis. *Molecular Cancer Research.* 10.1158/1541-7786.MCR-17-0715. 2018.

MOROOKA, S.; et al. Identification of a Dual Inhibitor of SRPK1 and CK2 That Attenuates Pathological Angiogenesis of Macular Degeneration in Mice. *Molecular Pharmacology*, v. 88, n. 2, p. 316-325, 2015.

NAKAGAWA, O.; ARNOLD, M.; NAKAGAWA, M.; HAMADA, H.; SHELTON, J. M.; KUSANO, H.; HARRIS, T. M.; CHILDS, G.; CAMPBELL, K. P.; RICHARDSON, J. A.; NISHINO, I. N.; OLSON, E. N. Centronuclear myopathy in mice lacking a novel muscle-specific protein kinase transcriptionally regulated by MEF2. *Genes & Development*, v. 19, p. 2066–2077, 2005.

NEMOLATO, S.; RESTIVO, A.; CABRAS, T.; CONI, P.; ZORCOLO, L.; ORRÙ, G.; FANARI, M.; CAU, F.; GEROSA, C.; FANNI, D.; MESSANA, I.; CASTAGNOLA, M.; 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.

OH, J. M.; RYOO, I. J.; YANG, Y.; KIM, H. S.; YANG, K. H.; MOON, E. Y. Hypoxia-inducible transcription factor (HIF)-1a 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

PANG YS. Effect and Mechanism of Thymosin  $\beta$ 4 on Angiogenesis After Focal Cerebral Ischemia Reperfusion in Rats. Chongqing: Chongqing Medical University; (2010)

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

PETIT I, JIN D, RAFII S. The SDF-1-CXCR4 Signaling Pathway: A Molecular Hub Modulating Neo-Angiogenesis. *Trends Immunol* (2007) 28:299–307. doi: 10.1016/j.it.2007.05.007

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.

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.

QIU FY. Effect of Thymosin  $\beta$ 4 on Peripheral Blood Endothelial Progenitor Cell Function and its Mechanism. Zhejiang: School of Medicine, Zhejiang University; (2019)

QUAN Z, WANG QL, ZHOU P, WANG GD, TAN YZ, WANG HJ. Thymosin Beta 4 Promotes the Survival and Angiogenesis of Transplanted Endothelial Progenitor Cells in the Infarcted Myocardium. *Int J Mol Med* (2017) 39:1347–56. doi: 10.3892/ijmm.2017.2950

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

RADHAKRISHNAN, A.; NANJAPPA, V.; RAJA, R.; SATHE, G.; CHAVAN, S.; NIRUJOGI, S. R.; PATIL, A. H.; SOLANKI, H.; RENUSE, S.; SAHASRABUDDHE, N. A.; MATHUR, P. P.; PRASAD, T. S. K.; KUMAR, P.; CALIFANO, J. A.; SIDRANSKY, D.; PANDEY, A.; GOWDA, H.; CHATTERJEE, A. Dysregulation of splicing proteins in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Biology & Therapy*, v. 17, n. 2, p. 219–229, 2016.

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

ROOSMALEN, W. V.; DÉVÉDEC, S. E. L.; GOLANI, O.; SMID, M.; PULYAKHINA, I.; TIMMERMANS, A. M.; LOOK, M. P.; ZI, D.; PONT, C.; GRAAUW, M.; NAFFAR-ABUAMARA, S.; KIRSANOVA, C.; RUSTICI, G.; T HOEN, P. A. C.; MARTENS, J. W. M.; FOEKENS, J. A.; GEIGER, B.; WATER B. V. Tumor cell migration screen identifies SRPK1 as breast cancer metastasis determinant. *Journal of Clinical Investigation*, v. 125, p. 1648– 1664, 2015.

SANDERS MC, GOLDSTEIN AL, WANG YL. Thymosin beta 4 (Fx peptide) is a potent regulator of actin polymerization in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 May 15;89(10):4678-82. doi: 10.1073/pnas.89.10.4678. PMID: 1584803; PMCID: PMC49146.

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.

SHEPARD, P.J; HERTEL,K.J. The SR protein family. *Genome Biology*. 10: 242. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-10-242>. 2009

SIEGEL RL, MILLER KD, FUCHS HE, JEMAL A. Cancer statistics, 2021. *CA Cancer J Clin* (2021) 70(1):7–33. 10.3322/caac.21654

SIQUEIRA, R. P.; BARBOSA, É. de A.; POLÊTO, M. D.; RIGHETTO, G. L.; SERAPHIM, T. V.; SALGADO, R. L.; FERREIRA, J. G.; BARROS, M. V.; DE OLIVEIRA, L. L.; LARANJEIRA, A. B.; ALMEIDA, M. R.; JÚNIOR, A. S.; FIETTO, J. L. R.; KOBARG, J.; OLIVEIRA, E. B.; TEIXEIRA, R. R.; BORGES, J. C.; YUNES, J. A.; BRESSAN, G. C. 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,, 2015.

SHUMIN, LV , CAI H, XU Y, DAI J, RONG X, ZHENG L. Thymosin- $\beta$  4 induces angiogenesis in critical limb ischemia mice via regulating Notch/NF- $\kappa$ B pathway. *Int J Mol Med*. 2020 Oct;46(4):1347-1358. doi: 10.3892/ijmm.2020.4701. Epub 2020 Aug 11. PMID: 32945357; PMCID: PMC7447324.

SOSNE, G.; QIU, P.; CHRISTOPHERSON, P. L.; WHEATER, M. K. Thymosin beta 4 suppression of corneal NF kappa B: a potential anti-inflammatory pathway, *Experimental Eye Research*, v. 84, p. 663–669, 2007.

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.

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.

TRENKWALDER T, DEINDL E, BONGIOVANNI D, LEE S, SCHUNKERT H, KUPATT C, et al.. Thymosin- $\beta$ 4-Mediated Therapeutic Neovascularization: Role of the PI3K/AKT Pathway. *Expert Opin Biol Ther* (2015) 15:175–85. doi: 10.1517/14712598.2015.1011122

TUFAIL, M., WU, C. SRPKs: a promising therapeutic target in cancer. *Clin Exp Med* 23, 3093–3112 (2023). <https://doi.org/10.1007/s10238-023-01054-9>

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

WANG, H. Y.; LIN, W.; DYCK, J. A.; YEAKLEY, J. M.; SONGYANG, Z.; CANTLEY, L. C.; FU, X. D. SRPK2: A Differentially Expressed SR Protein-specific Kinase Involved in Mediating the Interaction and Localization of Pre-mRNA Splicing Factors in Mammalian Cells. *The Journal of Cell Biology*, v. 140, p. 737-750, 1998. 29

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.; WU, H. F.; SHEN, W.; XUD, D. I.; RUANE, T. Y.; TAO, G.Q.; LU, P. H. SRPK2 promotes the growth and migration of the colon cancer cells. *Gene*, v. 586, p. 41–47, 2016.

WANG, P.; ZHOU, Z.; HU, A.; ALBUQUERQUE, C. P.; ZHOU, Y.; HONG, L.; SIERECKI, E.; AJIRO, M.; KRUHLAK, M.; HARRIS, C.; GUAN, K. L.; ZHENG, Z. M.; NEWTON, A. C.; SUN, P.; ZHOU, H.; FU, X. D. Both Decreased and Increased SRPK1 Levels Promote Cancer by Interfering with PHLPP-Mediated Dephosphorylation of Akt. *Molecular Cell*, v. 54, n. 3, p. 378 – 391. 2014.

WANG G, SHENG W, SHI X, LI X, ZHOU J, DONG M. Serine/arginine protein-specific kinase 2 promotes the development and progression of pancreatic cancer by downregulating Numb and p53. *FEBS J*. 2019 May;286(9):1668-1682. doi: 10.1111/febs.14778. Epub 2019 Mar 1. PMID: 30724469.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Skin Cancer. Disponível em <<https://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html>> Acessado em 24 abril 2024

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

XING Y, Ye Y, Zuo H, Li Y. Progress on the Function and Application of Thymosin  $\beta$ 4. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:767785. Published 2021 Dec 21. doi:10.3389/fendo.2021.767785

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, ZHANG ZG, LI Y, LU M, ZHANG Y, ELIAS SB, et al.. Timosina Beta4 Promove Oligodendrogênese no Sistema Nervoso Central Desmielinizante. *Neurobiol Dis* (2016) 88 :85-95. doi: 10.1016/j.nbd.2016.01.010

ZHONG, X. Y.; DING, J. H.; ADAMS, J. A.; GHOSH, G.; FU, X. D. Regulation of SR protein phosphorylation and alternative splicing by modulating kinetic interactions of SRPK1 with molecular chaperones. *Genes & Development*, v. 23, p. 482–495, 2009.

ZHOU, B.; LI, Y.; DENG, Q.; WANG, H.; WANG, Y.; CAI, B.; HAN, Z. G. SRPK1 contributes to malignancy of hepatocellular carcinoma through a possible mechanism involving PI3K/Akt. *Molecular and Cellular Biology*, v. 379, p. 191–199, 2013.

ZHOU, Z.; QIU, J.; LIU, W.; ZHOU, Y.; PLOCINIK, R. M.; LI, H.; HU, Q.; GHOSH, G.; ADAMS, J. A.; ROSENFELD, M. G.; FU, X. D. The Akt-SRPK-SR Axis Constitutes a Major Pathway in Transducing EGF Signaling to Regulate Alternative Splicing in the Nucleus. *Molecular Cell*, v. 47, n. 3, p. 422-433, 2012.

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. C.; LICCIULLI, S.; AVILA, J. L.; CHO, M.; TROUTMAN, S.; JIANG, P.; KOSSENKOV, A. V.; SHOWE, L. C.; LIU, Q.; VACHANI, A.; ALBELDA, S. M.; KISSIL, J. L. The Rac1 splice form Rac1b promotes K-ras-induced lung tumorigenesis. *Oncogene*, v. 32, n. 7, p. 903–909, 2013.

ZHOU L, GAO XP, MEI-LUN H. Effect of P13k/Akt Signaling Pathway on the Biological Behaviors of Brain Microvessel Endothelial Cells. *Chin J Modern Med* (2010) 15:2272–2.

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.