

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

Serine Arginine Protein Kinases (SRPKs) em câncer: uma revisão sistemática de SRPK2 e avaliação de possíveis mecanismos estimulatórios em melanoma metastático

Samuel Inácio da Silva Paiva
Doctor Scientiae

VIÇOSA - MINAS GERAIS
2026

SAMUEL INÁCIO DA SILVA PAIVA

Serine Arginine Protein Kinases (SRPKs) em câncer: uma revisão sistemática de SRPK2 e avaliação de possíveis mecanismos estimulatórios em melanoma metastático

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

Orientador: Gustavo Costa Bressan

Coorientadores: Luiz Alberto Santana
Raoni Pais Siqueira

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2026**

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

T

Paiva, Samuel Inácio da Silva, 1990-
P149s *Serine Arginine Protein Kinases* (SRPKs) em câncer: uma
2026 revisão sistemática de SRPK2 e avaliação de possíveis
mecanismos estimulatórios em melanoma metastático / Samuel
Inácio da Silva Paiva. – Viçosa, MG, 2026.

1 tese eletrônica (97 f.): il. (algumas color.).

Texto em português e inglês.

Inclui anexos.

Orientador: Gustavo Costa Bressan.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2026.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2026.382>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Proteínas quinases. 2. Câncer - Aspectos moleculares.
3. Melanoma . I. Bressan, Gustavo Costa, 1983-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica e Biotecnologia. III. Título.

CDD 22. ed. 572.69

SAMUEL INÁCIO DA SILVA PAIVA

Serine Arginine Protein Kinases (SRPKs) em câncer: uma revisão sistemática de SRPK2 e avaliação de possíveis mecanismos estimulatórios em melanoma metastático

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

APROVADA: 9 de junho de 2026.

Assentimento:

Samuel Inácio da Silva Paiva
Autor

Gustavo Costa Bressan
Orientador

Essa tese foi assinada digitalmente pelo autor em 22/06/2026 às 16:28:01 e pelo orientador em 22/06/2026 às 17:14:01. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **B9CN.33WF.H78H** e clique no botão 'Validar documento'.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por conceder toda a saúde e força.

À Pró-Reitoria de Assuntos Comunitários (PCD) da Universidade Federal de Viçosa, especialmente ao Pró-Reitor Bruno David Henriques, obrigado pelo apoio à realização do doutorado. Agradeço também à Divisão Psicossocial (DVP), onde exerço a função de servidor público. Especialmente as chefes Débora Carvalho Ferreira e Lílian Perdigão Caixeta Reis, que não mediram esforços no incentivo e no apoio à realização do doutorado. Finalmente, a todos os amigos e amigas da PCD e da DVP, muito obrigado.

Ao Pró-Reitor de Gestão de Pessoas da Universidade Federal de Viçosa, Luiz Antônio Abrantes, agradeço as orientações e os conselhos funcionais, profissionais e pessoais. Além do apoio à realização do doutorado.

À professora Maria Goreti de Almeida Oliveira, por ter despertado em mim a vontade de entrar na pós-graduação e por acreditar na minha capacidade quando nem eu acreditava. Por me incentivar e colaborar profundamente sempre que possível. Muito obrigado.

A Bárbara Ferreira. Sou imensuravelmente grato a você. Desde a bancada, onde me salvou incontáveis vezes nos experimentos, até a amizade. Você foi fundamental para a conclusão desse doutorado.

A Juliana Ribeiro, por passar as tardes de sábado comigo no laboratório. Por ter contribuído com o trabalho e sempre me incentivado. Por ser uma amiga presente em todos os momentos. Muito obrigado.

A Luciana Ângelo, agradeço todos os conselhos, as trocas de experiências, as pontuações no trabalho e também os momentos de descontração.

A todos os companheiros e companheiras de jornada na pós-graduação, presentes ou que buscaram novos rumos, além dos alunos de iniciação científica e dos amigos da Biologia Geral e da Educação Física, agradeço pelos momentos de trabalho, ajuda e descontração.

Ao professor Gustavo Costa Bressan. Sou muito grato por há quase 6 anos ser orientado por você. Obrigado por ter contribuído genuinamente para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao coorientador Raoni Pais Siqueira, muito obrigado pelo aceite em me coorientar e por todos os valiosos conselhos e ajudas.

Agradeço imensamente à minha família (especialmente minha mãe), além dos amigos e amigas. Muito obrigado pelo apoio e pela compreensão de vocês nos momentos de ausência, estresse e diversão. Sem dúvida, foram essenciais e fortificadores.

Aos membros da banca, obrigado pelo aceite para contribuir com o trabalho.

À CAPES, CNPq e FAPEMIG, agradeço pelo financiamento do trabalho. Ao

Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa, sou grato pela gentileza em permitir e auxiliar a utilização das instalações e dos equipamentos.

A todos que participaram de alguma forma dessa trajetória, muito obrigado!

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

PAIVA, Samuel Inácio da Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2026. **Serine Arginine Protein Kinases (SRPKs) em câncer: uma revisão sistemática de SRPK2 e avaliação de possíveis mecanismos estimulatórios em melanoma metastático.** Orientador: Gustavo Costa Bressan. Coorientadores: Luiz Alberto Santana e Raoni Pais Siqueira.

O melanoma é um tipo de câncer altamente agressivo e letal. Proteínas quinases como as SRPK1 e SRPK2 são encontradas em níveis de expressão elevados nesse câncer e contribuem com a sua progressão em metástases. Por ter sido encontrada uma possível interação entre SRPK2 e um domínio citosólico de CD74 previamente no grupo, foi hipotetizado que a cascata de sinalização celular iniciada por MIF/CD74 na membrana plasmática poderia exercer influência na ativação das SRPK1/2 intracelularmente. Assim, esse estudo objetivou analisar os impactos do tratamento de células B16-F10 de melanoma knockouts ou não-knockouts para SRPK1/2 com a proteína recombinante MIF. Os tratamentos realizados revelaram que MIF não teve efeito significativo nos fenótipos metastáticos associados à atividade de SRPK1/2 analisados *in vitro*, tais como proliferação celular, polimerização de filamentos de actina e formação de colônias — pelo menos considerando a linhagem B16-F10 avaliada. Ademais, foi também elaborada uma revisão sistemática com foco no papel multifacetado da SRPK2 na oncogênese. Embora a função biológica da SRPK1 em cânceres (incluindo os efeitos antitumorais da terapia direcionada a essa molécula) esteja mais bem elucidada, com variados estudos experimentais e de revisão de literatura já publicados sobre o tema, a SRPK2 ainda carecia de uma compreensão sistematizada sobre o seu papel em diferentes tipos de câncer. Constatou-se que a hiperativação de SRPK2 favorece fenótipos tumorais e/ou metastáticos em diferentes tipos de câncer por meio de vias de sinalização oncogênicas dependentes e independentes de *splicing*, enquanto sua inibição (genética e/ou farmacológica) atenua esses comportamentos. Adicionalmente, a expressão de SRPK2 foi associada a implicações prognósticas em uma variedade de cânceres. Dessa forma, essa proteína-quinase emerge como um potencial alvo terapêutico e um possível biomarcador tumoral.

Palavras-chave: srpk; melanoma; revisão sistemática

ABSTRACT

PAIVA, Samuel Inácio da Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2026. **Serine-Arginine Protein Kinases (SRPKs) in Cancer: A Systematic Review of SRPK2 and Evaluation of Potential Stimulatory Mechanisms in Metastatic Melanoma.** Adviser: Gustavo Costa Bressan. Co-advisers: Luiz Alberto Santana and Raoni Pais Siqueira.

Melanoma is a highly aggressive and lethal form of cancer. Protein kinases such as SRPK1 and SRPK2 are highly expressed in this cancer and contribute to its progression to metastasis. Since a possible interaction between SRPK2 and a cytosolic domain of CD74 had previously been identified by the group, it was hypothesized that the cell signaling cascade initiated by MIF/CD74 at the plasma membrane could influence the intracellular activation of SRPK1/2. Thus, this study aimed to analyze the effects of treating SRPK1/2 knockout or non-knockout B16-F10 melanoma cells with recombinant MIF protein. The treatments revealed that MIF had no significant effect on the metastatic phenotypes associated with SRPK1/2 activity analyzed in vitro, such as cell proliferation, actin filament polymerization, and colony formation — at least considering the B16-F10 cell line evaluated. Furthermore, a systematic review was also conducted focusing on the multifaceted role of SRPK2 in oncogenesis. Although the biological function of SRPK1 in cancers (including the antitumor effects of therapy targeting this molecule) is better elucidated, with various experimental studies and literature reviews already published on the topic, SRPK2 still lacks a systematic understanding of its role in different types of cancer. It was found that the hyperactivation of SRPK2 favors tumor and/or metastatic phenotypes in different types of cancer through splicing-dependent and splicing-independent oncogenic signaling pathways, while its inhibition (genetic and/or pharmacological) attenuates these behaviors. Additionally, the expression of SRPK2 was associated with prognostic implications in a variety of cancers. Thus, this protein kinase emerges as a potential therapeutic target and a possible tumor biomarker.

Keywords: srpk; melanoma; systematic review

SUMÁRIO

SEÇÃO 1 - ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DE MIF (<i>MACROPHAGE INHIBITORY FACTOR</i>) NA ATIVAÇÃO DE SRPK1/2 (<i>SERINE/ARGININE PROTEIN KINASE 1/2</i>) E NOS FENÓTIPOS TUMORAIS E METASTÁTICOS ASSOCIADOS EM B16-F10 ..8	
1 INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA	8
2 REVISÃO DE LITERATURA	10
3 OBJETIVOS	26
4 METODOLOGIA.....	28
5 RESULTADOS	32
6 DISCUSSÃO.....	40
7 CONCLUSÃO.....	43
8 LIMITAÇÕES	44
9 PERSPECTIVAS FUTURAS	44
REFERÊNCIAS	45
SEÇÃO 2 – UMA REVISÃO SISTEMÁTICA SOBRE O PAPEL MULTIFACETADO DA QUINASE SRPK2 EM DIFERENTES TIPOS DE CÂNCER..... 55	
1 INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA	55
2 REVISÃO DE LITERATURA	57
3 OBJETIVOS.....	59
REFERÊNCIAS	60
ARTIGO.....	64
ANEXO	96

SEÇÃO 1 - ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DE MIF (*MACROPHAGE INHIBITORY FACTOR*) NA ATIVAÇÃO DE SRPK1/2 (*SERINE/ARGININE PROTEIN KINASE 1/2*) E NOS FENÓTIPOS TUMORAIS E METASTÁTICOS ASSOCIADOS EM B16-F10

1 INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

O melanoma é um tipo de câncer de pele originário dos melanócitos (Eddy et al., 2021). Esse câncer é conhecido por ser altamente agressivo e mortal, sendo responsável por 80% das mortes por câncer de pele, ainda que represente apenas 1% dos casos (Saginala et al., 2021).

Entre os fatores que contribuem com a elevada agressividade e mortalidade desse câncer estão as altas capacidades proliferativas e metastáticas das células tumorais, que podem ser influenciadas por moléculas-chave (Braeuer et al., 2014). Dentre essas moléculas, destacam-se as proteínas SRPK1, SRPK2 e MIF.

Em condições fisiológicas normais, tanto a SRPK1 quanto a SRPK2 são ativadas pela via de sinalização celular EGF-PI3K-Akt e desempenham função na regulação da expressão gênica, em especial no evento de *splicing* alternativo (Zhou et al., 2012). No melanoma, essas proteínas quinases estão altamente expressas. Como consequência disso, ocorre uma importante desregulação dos processos de *splicing* alternativo, a qual leva à geração de isoformas proteicas que favorecem a tumorigênese (Caetano et al., 2022; Duggan et al., 2022; Gammons et al., 2014).

Nesse contexto, a SRPK1, por meio de *splicing* alternativo alterado, está implicada na promoção da angiogênese em melanoma (Gammons et al. 2014), um importante evento para formação de novos vasos sanguíneos que nutrem o tumor e facilitam a metástase de células tumorais (Wu et al., 2022). Além disso, sugere-se que a SRPK1 esteja envolvida em comportamentos metastáticos em células B16-F10 (Moreira et al., 2018) – uma linhagem de melanoma metastático murino amplamente utilizada como modelo experimental para o estudo do melanoma humano (Vale et al., 2022). Ademais, em B16-F10, a SRPK2 parece favorecer a migração, a proliferação e a colonização metastática (Caetano et al., 2022).

O MIF, por sua vez, está relacionado com diversos processos biológicos. A interação do MIF com o receptor CD74, conhecida como eixo MIF-CD74, pode resultar na ativação das vias de

sinalização celular PI3K-Akt, ERK1/2, AMPK e NF- κ B, as quais estão associadas à proliferação e sobrevivência celular (Farr, Ghosh, Moonah, 2020).

Em melanoma, o MIF e o CD74 são encontrados altamente expressos e estão ligados à progressão e à agressividade desse câncer (Tanese et al., 2015). A expressão de MIF e CD74 em células malignas é causa de evasão, ou escape, da vigilância do sistema imunológico por meio da indução da expressão do receptor PD-L1 – que atrapalha a função de células T contra as células cancerígenas (Imaoka *et al.*, 2019). Adicionalmente, altos níveis de MIF e CD74 podem atuar sinergicamente na ativação de vias de sinalização celular cancerígenas em células tumorais, como as vias de PI3k/Akt e de MAPK, para promover a proliferação celular (Soumoy *et al.*, 2019).

Estudos prévios indicaram uma provável relação entre a transdução de sinal iniciada por MIF-CD74 e a atividade de SRPK (Mello, 2014). Nesse contexto, tendo em vista que essas moléculas estão envolvidas na progressão do melanoma e que possuem altos níveis de expressão nesse tipo de câncer (Caetano et al., 2022; Gammons et al., 2014; Nikas et al., 2019; Tanese et al., 2015; Valdez et al., 2024), levantou-se a hipótese de que o MIF pode atuar ativando as SRPK1/2 e, na presença dessas quinases, promover desfechos carcinogênicos mais expressivos.

Considerando esse cenário, objetivou-se analisar os possíveis impactos *in vitro* do tratamento de linhagens geneticamente modificadas de células B16-F10 de melanoma murino, *knockouts* ou não-*knockouts* para SRPK1/2, com a proteína recombinante MIF e a sua influência na atividade de SRPK1/2 e nos fenótipos oncogênicos associados a essas quinases, em particular os tumorais e metastáticos.

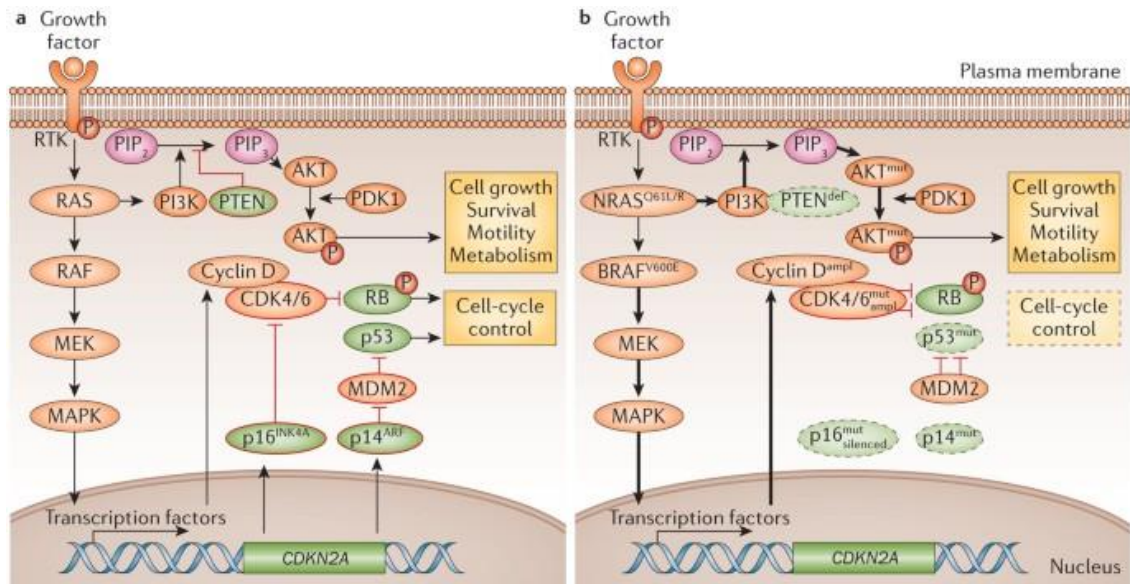
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Melanoma

O melanoma é o terceiro tipo mais comum de câncer de pele e sua incidência vem aumentando progressivamente (Long, *et al.*, 2023; Ostrowski, Fisher, 2021). As estatísticas de câncer de 2024 mostram um aumento contínuo na incidência desse câncer, além dos cânceres de mama, próstata, corpo uterino, pâncreas, orofaringe, fígado, colorretal e cervical (Siegel, Giaquinto, Jemal, 2024).

O melanoma se origina nos melanócitos, que são as células produtoras de melanina presentes na camada basal da epiderme humana (Eddy *et al.*, 2021; Ostrowski, Fisher, 2021). Habitualmente, a exposição intermitente à radiação ultravioleta (UV) da luz solar e os bronzeamentos artificiais estão intimamente associados ao desencadeamento do melanoma (Long, *et al.*, 2023). A radiação UV, proveniente da luz solar ou dos bronzeamentos artificiais, pode causar danos ao DNA dos melanócitos, levando a alterações genéticas, como as mutagêneses, que favorecem o desenvolvimento do melanoma (Ostrowski, Fisher, 2021).

A transformação de melanócitos em melanoma, decorrente de alterações ou mutações genéticas, pode desencadear desregulações de importantes vias de sinalização. Por exemplo, em condições normais, a via de PI3K/Akt regula a homeostasia celular dos melanócitos (Figura 1, a). Em contraste, a desregulação promovida pela ativação constitutiva dessa via favorece o descontrole do ciclo celular, da proliferação, do crescimento, além da sobrevivência e da motilidade celular. Adicionalmente, provoca alterações metabólicas e na expressão gênica do DNA, que cooperam para o desenvolvimento do melanoma (Figura 1, b) (Schadendorf *et al.*, 2015).



Nature Reviews | Disease Primers

Figura 1. Transformação dos melanócitos em melanoma. **a)** nos melanócitos em condições normais, a via de PI3K/Akt controla a homeostasia celular regulando o ciclo celular, além de controlar o crescimento, sobrevivência, motilidade e metabolismo celular. **b)** a ativação constitutiva de PI3K/Akt em melanócitos, promove desregulações que levam ao descontrole do ciclo celular, crescimento, sobrevivência, motilidade e metabolismo celular, favorecendo assim a transformação dos melanócitos em melanoma. Fonte: Schadendorf et al., 2015

Além das moléculas PI3K/Akt, outras também desempenham um papel expressivo no desenvolvimento e na agressividade do melanoma. Nesse sentido, as SRPK1/2 são um importante exemplo. Essas proteínas quinases alteram o mecanismo de processamento de RNA, especialmente o *splicing* alternativo, em células de melanoma, gerando diferentes proteínas que podem promover o câncer (Chen *et al.*, 2024). Estudos já evidenciaram que essas quinases estão intrinsecamente associadas ao desenvolvimento do melanoma (Caetano *et al.*, 2022; Gammons *et al.*, 2014; Moreira *et al.*, 2018).

No mesmo sentido, o eixo MIF-CD74 também é outro importante exemplo. No ambiente tumoral, a citocina pró-inflamatória MIF se liga ao seu receptor CD74 levando ao aumento da proliferação celular e da angiogênese — formação de novos vasos sanguíneos (Soumoy *et al.*, 2019). Esses novos vasos sanguíneos nutrem o tumor facilitando o seu crescimento e a disseminação das células tumorais pelo corpo (Wu *et al.*, 2022).

As SRPKs assim como o eixo MIF-CD74 serão exploradas em mais detalhes. O objetivo é entender melhor como essas moléculas atuam para promover cânceres, dentre os quais o melanoma.

2.2 *Splicing* Alternativo, SRPKs e proteínas SR

Os seres humanos possuem aproximadamente 25.000 genes codificadores de proteínas presentes no DNA, apesar disso, são geradas mais de 90.000 proteínas com diferentes funções a partir desses genes (Wang *et al.*, 2014). O *splicing* alternativo, um evento de processamento de RNA, desempenha um papel relevante nessa diversidade proteica.

Os genes humanos são divididos em duas sequências. Há as exônicas, denominadas éxons - que contêm informações para codificação de proteínas; e as intrônicas, chamadas de íntrons, que não são codificadoras (Sahu, Panda, 2011; Will, Luhrmann, 2011). Esses genes e suas sequências são transcritos em pré-mRNAs, que são os RNAs mensageiros imaturos. Esses pré-mRNAs são processados para se tornarem mRNAs, que são os RNAs mensageiros maduros, e eventualmente serem traduzidos em proteínas (Cramer, 2019; Moore, Proudfoot, 2009).

No contexto fisiológico do processamento do pré-mRNA, o *splicing* alternativo tem um destacado papel. Ao contrário do *splicing* constitutivo, onde as sequências de éxons presentes no mRNA estão na mesma ordem que a presente no gene, o *splicing* alternativo remove os íntrons do pré-mRNA e une ou emenda os éxons em diferentes combinações – combinações alternativas (Wang *et al.*, 2014). Isso resulta na formação de diferentes mRNAs e, conseqüentemente, diversas proteínas quando esses mRNAs são traduzidos (figura 2).

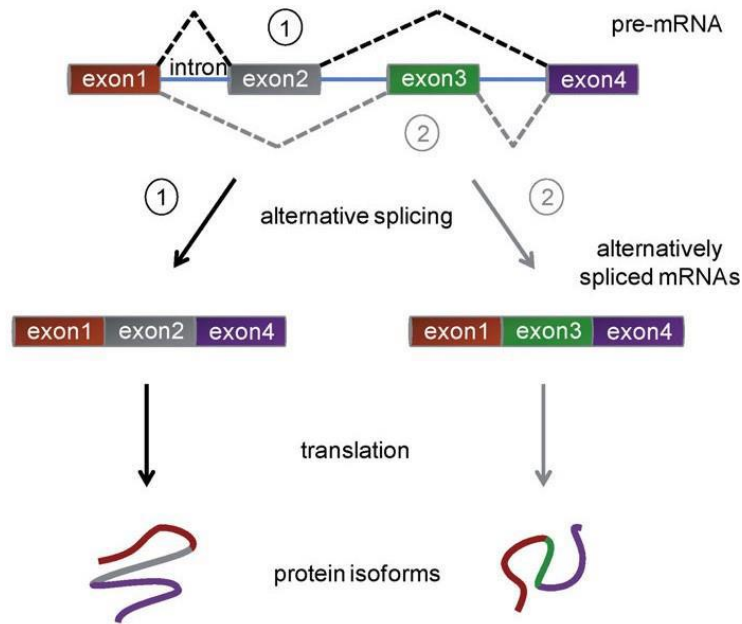


Figura 2. O *splicing* alternativo. Através do processamento de um pré-mRNA, podem ser gerados diferentes mRNAs através de diferentes combinações de éxons. Esses mRNAs podem ser traduzidos em distintas proteínas. Fonte: Dupuis *et al.*, 2012.

O *splicing* alternativo ocorre por meio do *spliceossomo*, um complexo macromolecular composto de cinco pequenos RNAs nucleares (snRNPs U1, U2, U4, U5 e U6) e diversas proteínas associadas, que catalisa a reação de *splicing* (Graveley, 2001). Esse maquinário macromolecular é montado nos sítios de *splicing*, que são regiões contendo ligações entre íntrons e éxons presentes no pré-mRNA (Yang *et al.*, 2019).

As sequências reguladoras *cis* estão presentes em um pré-mRNA e podem ser promotoras de *splicing* exônicas/intrônicas (ESEs e ISEs) ou inibidoras de *splicing* exônicas/intrônicas (ESSs e ISSs) (Wang, Burge, 2008). Essas sequências são reconhecidas por proteínas de ligação ao RNA, que atuam estimulando ou reprimindo a montagem do *spliceossomo* (Will, Luhrmann, 2011).

Entre as proteínas de ligação ao RNA, há os fatores de ação *trans* - onde emergem as famílias de proteínas SR (SRSFs) e as ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas (hnRNPs) (Dvinge, 2018; Wang, Burge, 2008). Essas proteínas agem de modo antagônico no que se refere à montagem do *spliceossomo*.

As hnRNPs reconhecem as sequências inibidoras de *splicing* (ESSs e ISSs) presentes no pré-mRNA e se ligam a elas através de seus domínios de ligação ao RNA. Desse modo, reprimem a montagem do *spliceossomo* bloqueando o acesso dos elementos *spliceossomais* aos sítios de *splicing* (Figura 4, a) (Busch, Hertel, 2012; Kędzierska, Piekiełko-Witkowska, 2017). De outro lado, as SRSFs interagem com as sequências promotoras de *splicing* (ESEs e ISEs) no pré-mRNA e recrutam os componentes do *spliceossomo*, como U1 snRNP para os sítios de *splicing* (Figura 4, b) (Busch, Hertel, 2012; Dvinge, 2018).

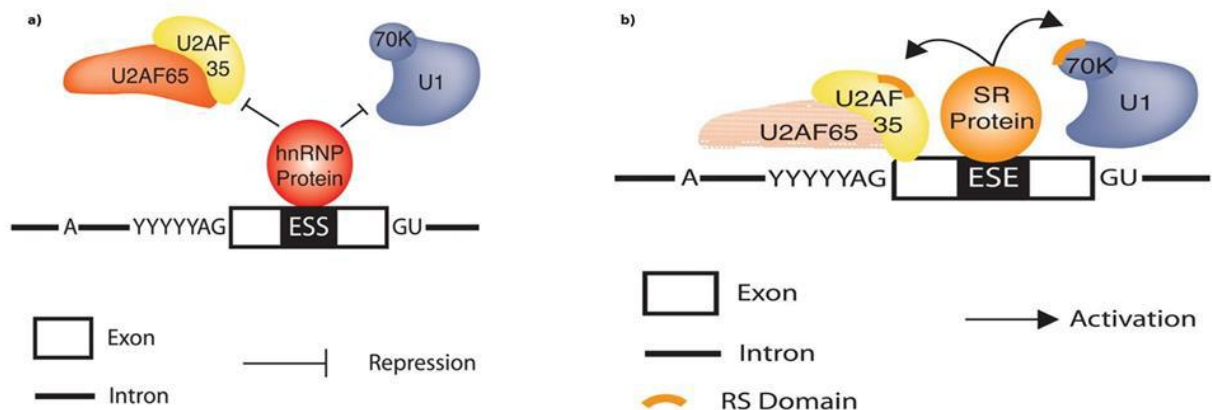


Figura 4. Papel das proteínas SR e hnRNP na montagem do spliceossomo. a) as hnRNPs se ligam a sequências silenciadoras atuam reprimindo a montagem do spliceossomo. Fonte: Adaptada de Busch, Hertel, 2012. b) as proteínas SR se associam a sequências intensificadoras e recrutam componentes do spliceossomo. Fonte: Adaptada de Busch, Hertel, 2012.

O mecanismo de *splicing* alternativo descrito até agora encontra-se desregulado ou alterado em células tumorais, o que leva à geração de diversas proteínas que contribuem com o câncer. Há

um robusto corpo de estudos demonstrando que o *splicing* alternativo aberrante contribui para a progressão do câncer, causando alterações fenotípicas pró-tumorais em células cancerígenas, que são orquestradas por proteínas oncogênicas (Venables, 2006; Zhang, Manley, 2013).

Nesse cenário, a desregulação do *splicing* alternativo em células cancerígenas leva à geração de transcritos de mRNAs diferentes daqueles encontrados em um ambiente celular normal (Venables, 2006). Esses transcritos distintos de mRNAs, quando são traduzidos, resultam na produção de isoformas de proteínas cancerígenas, que cooperam com a progressão do câncer através de processos biológicos como o aumento da proliferação de células tumorais, promoção da resistência à apoptose, estímulo à angiogênese, além de contribuição com a invasão e metástase (Shilo et al., 2014; Venables, 2006; Zhang, Manley, 2013; Zhang et al., 2021). Moléculas-chave, destacando os fatores de *splicing* e seus reguladores, participam da desregulação do *splicing* alternativo em células tumorais.

Dentre essas, destacam-se as proteínas SR (SRSFs) reguladoras de *splicing* e seus reguladores como SRPKs, CLKs, DYRK1A, entre outros, que estão superexpressos em múltiplos cânceres e contribuem com a tumorigênese (Blackie, Foley, 2022; Boni et al., 2020; Duggan et al., 2022; Hogg, Findlay, 2023; Wang, et al., 2020; Wan et al., 2022).

A expressão elevada das SRSFs em células tumorais altera o *splicing* alternativo e leva à produção de isoformas aberrantes de mRNAs. Essas isoformas podem gerar proteínas pró-cancerígenas que auxiliam o crescimento tumoral através do aumento da capacidade proliferativa e do favorecimento de metástases (Wan et al., 2022). Além disso, as SRSFs alteradas em cânceres estão associadas à resistência de células tumorais à radioterapia (Wan, et al., 2022).

Especialmente as SRPKs, em particular SRPK1 e SRPK2, estão implicadas na desregulação de *splicing* alternativo e facilitação da tumorigênese. A SRPK1 é identificada como superexpressa em cânceres e, através de *splicing* alternativo anormal, causa um aumento na capacidade proliferativa de células tumorais e resistência à terapia anticâncer (Duggan et al., 2022). Da mesma forma, SRPK2 está elevada em cânceres e isso acarreta na resistência de células de carcinoma à terapia e no favorecimento de metástases (Wang et al., 2020; Zhuo et al., 2018).

Pelo fato das quinases SRPK1 e SRPK2 se mostrarem com expressão aumentada em cânceres e poderem atuar desregulando o *splicing* alternativo através da modulação da atividade das SRSFs (Naro et al., 2021; Nikolakaki et al., 2022), essas proteínas se destacam como elementos-chave na promoção tumoral.

2.3 SRPKs – participação regulada em *splicing* alternativo, desregulação, desfechos em cânceres e a repercussão no melanoma

A família de serina/arginina proteínas quinases (SRPKs) é constituída por três membros, a saber: SRPK1, SRPK2 e SRPK3 (Giannakouros et al., 2010). Estruturalmente, as SRPKs apresentam dois domínios de quinase (*Kinase Domain*) que são divididos por uma região espaçadora - SID (Figura 5) (Nakagawa et al., 2005)

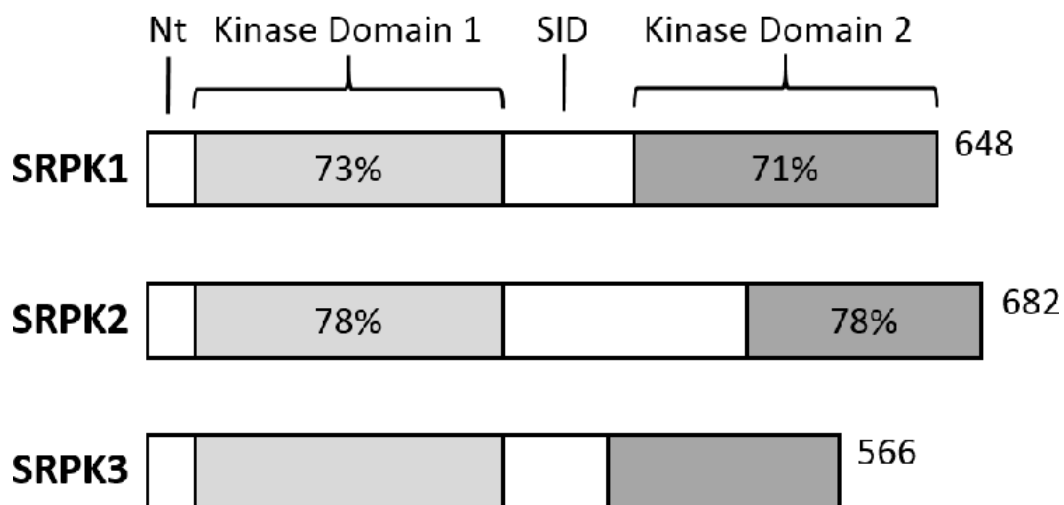


Figura 5. Figura representativa de SRPKs. As SRPKs possuem dois domínios de quinase que são divididos por uma região espaçadora - SID. Fonte: Nakagawa, et al., 2005.

As regiões espaçadoras (SID) exercem influência na localização celular das SRPKs. Essas regiões, por meio da associação com chaperonas moleculares, ancoram as SRPKs no citoplasma da célula (Nikolakaki et al., 2022). Além disso, SID pode servir de *scaffold* (andaime) para interação de outras proteínas (Huang *et al.*, 2023).

Os domínios de quinase das SRPKs fosforilam as proteínas SR (SRSFs), levando à translocação dessas proteínas para o núcleo celular (Figura 6) (Ngo et al., 2005). No núcleo, as SRSFs podem passar por um segundo processo de fosforilação, que é mediado por SRPKs e CLKs, para que possam se associar ao pré-mRNA e selecionar os sítios de *splicing* onde ocorrerão as montagens do *spliceossomo* (Figura 6) (Giannakouros et al., 2010; Zhu, 2000). A fosforilação das

proteínas SR pelas SRPKs é altamente organizada e está diretamente associada à regulação de *splicing* alternativo no núcleo (Zhou, Fu, 2013).

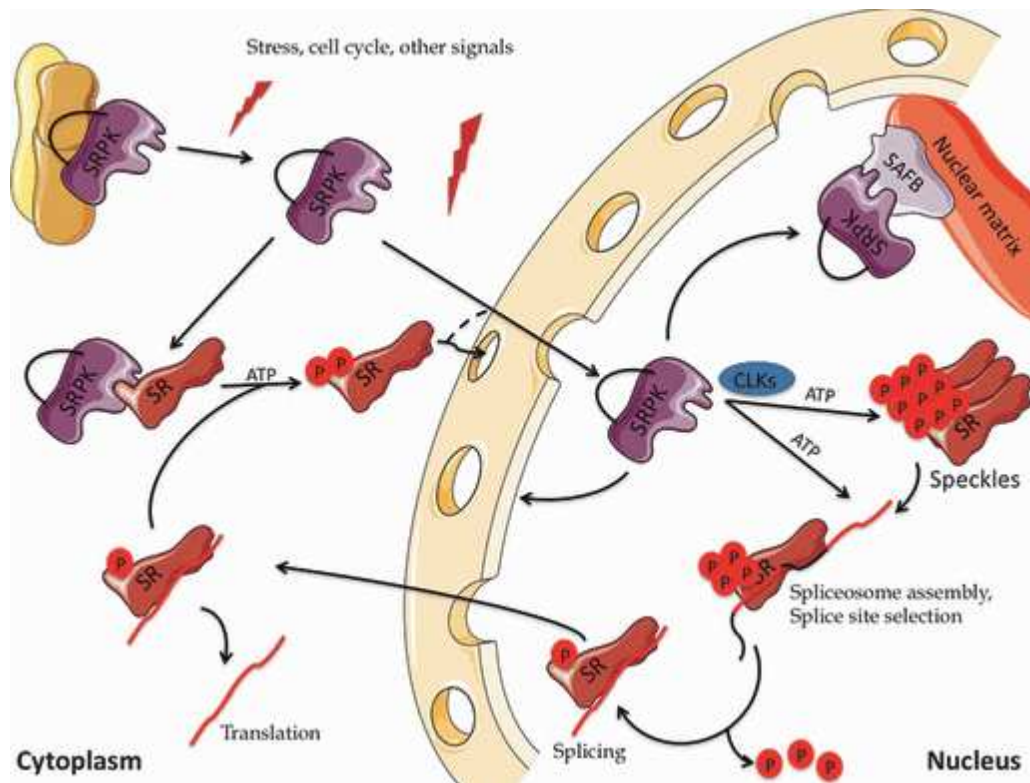


Figura 6. Fosforilação de proteínas SR por SRPKs. As SRPKs podem fosforilar as proteínas SR levando à translocação dessas proteínas para o núcleo. No núcleo, as proteínas SR podem ser novamente fosforiladas por SRPKs para atuarem na seleção dos sítios de *splicing* e na montagem do spliceossomo. Fonte: Giannakouros et al., 2010.

Nesse entendimento, foi demonstrado que a fosforilação das SRSFs é rigidamente controlada na célula, sendo fundamental para que essas proteínas atuem selecionando corretamente os sítios de *splicing* no processo de *splicing* alternativo (Zhong et al., 2009). As SRPKs desempenham um proeminente papel no controle da fosforilação das SRSFs, ou SRs, através da via de sinalização celular EGF-Akt-SRPK-SR (Figura 7), que ocasiona na translocação nuclear das SRPKs para fosforilar as SRs nucleares e regular o *splicing* alternativo (Zhou et al., 2012).

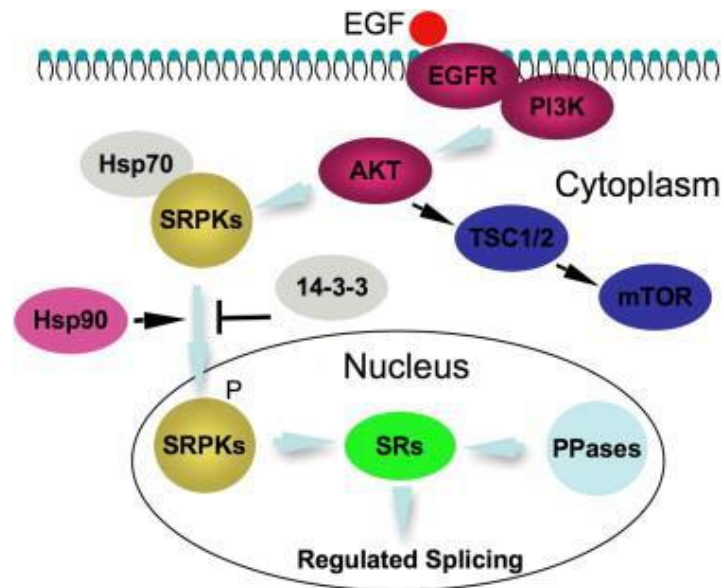


Figura 7. Via EGF-Akt-SRPK-SR. O EGF, um mediador hormonal, se associa ao seu receptor (EGFR) e estimula através dos transdutores de sinais PI3K e Akt a translocação nuclear de SRPK, que fosforila proteínas SR para regular o *splicing* alternativo. Fonte: Zhou et al., 2012.

Em contraste, o controle da fosforilação de SRSFs por SRPKs em células tumorais apresenta-se desequilibrado. Um dos fatores que se destaca e induz esse desequilíbrio é o aumento da expressão das SRPKs, particularmente no contexto tumoral as SRPK1 e SRPK2 (He et al., 2022; Jang et al., 2008; Zhou et al., 2020). Isso resulta em um padrão alterado de *splicing* alternativo que promove resultados pró-tumorais (Figura 8), sendo considerado um dos principais marcadores do câncer (Bradley, Anczuków, 2023).

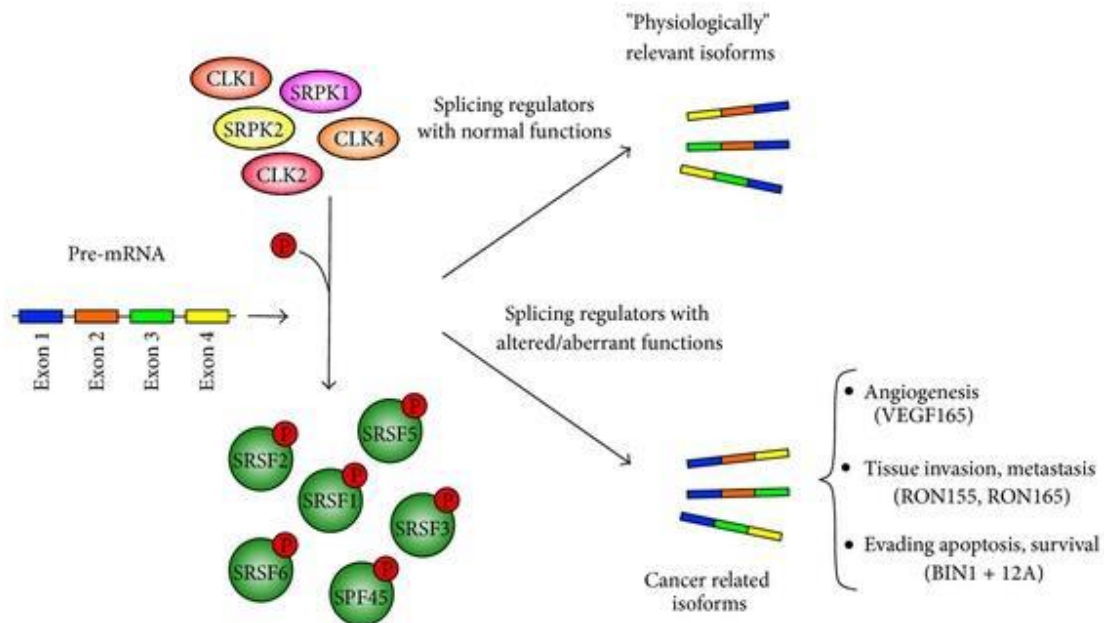


Figura 8. *Splicing* alternativo alterado em câncer. A expressão elevada de SRPKs em células tumorais resulta em desregulação de fosforilação de proteínas SR que leva à geração de mRNAs que podem ser traduzidos em proteínas oncogênicas que promovem fenótipos pró-tumorais. Fonte: Da Silva et al., 2015.

A SRPK1 encontra-se elevada em vários contextos oncológicos e está relacionada com piores desfechos em pacientes com câncer, como menor taxa de sobrevivência (Huang et al., 2021; Huang et al., 2023). Digna de destaque, a SRPK1 contribui com a resistência de células tumorais ao tratamento com agentes quimioterápicos assim como a drogas inibidoras de quinases (Huang et al., 2021; Huang et al., 2023; Wang et al., 2015). Além do mais, a elevação da expressão de SRPK1 está associada com o aumento do crescimento e da proliferação de células cancerígenas, resistência de células tumorais à morte, promoção da capacidade invasiva de células malignas, bem como do seu potencial metastático (Duggan et al., 2022).

A SRPK2 possui expressão aumentada em diversas malignidades cancerosas, e isso está associado a vários resultados tumorigênicos (Wang et al., 2016; Zhuo et al., 2018). A título de exemplo, a regulação positiva de SRPK2 é responsável pelo aumento da capacidade proliferativa de células de leucemia (Jang et al., 2008). Em carcinoma pulmonar, o aumento da expressão de SRPK2 resulta em elevação da capacidade clonogênica, indução da transição epitelial-mesenquimal e resistência a drogas anticancerígenas (Gout et al., 2012). Ademais, foi demonstrado que a superexpressão de SRPK2 dessensibiliza as células de câncer colorretal e de pâncreas ao

tratamento quimioterápico e aumenta a capacidade migratória e invasiva dessas células (Wang et al., 2019; Wang et al., 2020).

Particularmente no melanoma, as SRPKs contribuem com diversos aspectos tumorais e metastáticos. A SRPK1 é altamente expressa em células de melanoma humano e tem um papel fundamental na alteração do *splicing* alternativo (Gammons *et al.*, 2014). A expressão aumentada de SRPK1 em células de melanoma humano gera, através de *splicing* alternativo anormal, a produção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) pró-angiogênico, que contribui com a formação de novos vasos sanguíneos (Gammons *et al.*, 2014). É importante mencionar que a angiogênese favorece a progressão tumoral, já que beneficia a nutrição do tumor e contribui com a metástase, uma vez que os novos vasos sanguíneos gerados por esse processo facilitam a disseminação das células tumorais para a circulação corporal (Yang, Cao, 2022).

A SRPK2 também possui expressão elevada em melanoma e esse fenômeno está associado a pior prognóstico da doença e malignidade das células tumorais (Caetano *et al.*, 2022). De fato, o silenciamento da expressão de SRPK2 em células de melanoma reduziu a capacidade proliferativa celular, além da capacidade invasiva quando comparada às células sem alterações em SRPK2 (Caetano *et al.*, 2022). Além disso, acarretou a piora da polimerização do citoesqueleto de actina (Caetano *et al.*, 2022). A polimerização do citoesqueleto de actina é um evento que produz forças protusivas, ou de empurrões, que são necessárias para a motilidade e migração celular e para a formação de invadopódios, contribuindo, dessa forma, com metástases (Albiges et al., 2009; Oser et al., 2010; Svitkina, 2018).

Ainda não estão totalmente elucidados os papéis das SRPK1/2 em melanoma. Por um lado, há o papel de SRPK1 no melanoma e seu envolvimento em outros fenótipos cancerígenos além da angiogênese (Gammons et al., 2014), como já demonstrado (Moreira *et al.*, 2018). Por outro lado, estudos revelam que a SRPK2 tem grande significância em desfechos pró-tumorais e metastáticos nesse câncer, além de possuir maior expressão quando comparada a SRPK1 (Caetano *et al.*, 2022).

Sob essa perspectiva, considerando a implicação e a importância das SRPK1/2 em melanoma, são necessários mais estudos que investiguem as potenciais relações funcionais dessas proteínas com outras moléculas e suas consequências nesse câncer.

As relações funcionais são imprescindíveis na promoção da sinalização celular, já que nelas um grupo de proteínas trabalha em conjunto para promover uma dada resposta (ou mensagem/sinal) na célula (Nair, Chauhan, Kubatzky, 2019).

No contexto do câncer, um exemplo claro de relação funcional e de resposta celular é a expressão de genes no DNA de células tumorais, que resulta na produção de proteínas associadas ao aumento sustentado do crescimento e da proliferação celular (Sever, Brugge, 2015). Nesse panorama, a desregulação da via de sinalização celular orquestrada pelo trabalho coletivo das proteínas PI3K/Akt está intrinsecamente ligada a esses processos, ao promover a expressão de genes que codificam proteínas pró-tumorais em células de melanoma (Soumoy et al., 2019; Tanese, Ogata, 2024).

Paralelamente, a citocina inflamatória MIF (*macrophage inhibitory factor*) apresenta elevada expressão em células tumorais de melanoma e pode ativar, por meio de sua ligação ao receptor CD74 e do recrutamento do co-receptor CD44, a via de PI3K/Akt, favorecendo fenótipos proliferativos e metastáticos (Soumoy et al., 2019; Tanese, Ogata, 2024). Além disso, nosso grupo de pesquisa identificou uma interação entre a SRPK2 e o CD74 (Mello, 2014). Diante disso, especulou-se que o MIF, por meio de sua ligação com CD74, poderia ativar indiretamente as SRPK1/2. O eixo MIF-CD74 e sua relação com o câncer serão aprofundados a seguir.

2.4 Eixo MIF-CD74, seu papel no câncer e desdobramentos no melanoma.

O MIF (fator inibitório da migração de macrófagos), uma citocina pró-inflamatória, é um fator produzido por células do sistema imune (Farr et al., 2020). Além da sua produção pelas células do sistema imune, essa citocina também pode ser produzida por uma variedade de células, como as células endoteliais, mesenquimais, neuronais e tumorais (Heinrichs et al., 2011; Jankauskas et al., 2019; Noe, Mitchell, 2020).

O MIF possui uma variedade de ações celulares, dentre as quais se destacam a indução da expressão de citocinas e a inibição da apoptose (Huapeng et al., 2011). Essas ações podem ser intracelulares e/ou extracelulares (Noe, Mitchell, 2020). O mecanismo de ação intracelular promovido por MIF ocorre por meio de sua interação física com diversas proteínas e enzimas, podendo modificar suas atividades (Noe, Mitchell, 2020). Por exemplo, a interação do MIF intracelular com a proteína p53 leva ao aumento da proliferação de células cancerígenas (Jankauskas et al., 2019).

A p53, uma proteína supressora tumoral que tem como mecanismo de ação a indução de morte celular (apoptose), é inibida em células tumorais após a sua interação com MIF e,

consequentemente, ocorrem elevações na proliferação e sobrevivência celular (Jankauskas et al., 2019).

De particular interesse, há as ações extracelulares mediadas por MIF que ocorrem através de sua interação com receptores extracelulares. Nesse cenário, o receptor CD74 se sobressai. O CD74 é uma proteína transmembranar com domínios extracelulares e intracelulares e é considerado como um receptor específico de comunicação de MIF (Fey et al., 2024). Quando o MIF se liga ao seu receptor CD74 (eixo MIF-CD74), pode desencadear variadas respostas fenotípicas de acordo com o contexto e o tipo celular (Fey et al., 2024).

Especialmente em células cancerígenas, o MIF e o CD74 são encontrados superexpressos e isso leva a inúmeras respostas pró-tumorais e metastáticas (Charan et al., 2020; Li et al., 2024). Dentre essas respostas, destacam-se a inibição da morte celular, por meio da redução da expressão de genes que codificam proteínas pró-apoptóticas (Mora, Stijlemans, Van, 2023), escape do sistema imunológico (Imaoka et al. 2019), além de angiogênese, proliferação celular e metástase (Tanese, Ogata, 2024).

Em apoio a essa ideia, a interação de MIF com o seu receptor de comunicação CD74 tem papel crítico na ativação de diferentes vias de sinalização celular que promovem os fenótipos tumorais previamente mencionados. Mecanicamente, quando MIF interage com o CD74, um coreceptor, denominado CD44, é recrutado (Figura 9). Após esse recrutamento e a dimerização de CD44 com CD74, há a ativação da proteína quinase de membrana c-SRC que, em seguida, exerce sua atividade ativando as vias de sinalização celular a jusante entre as quais ERK1/2, relacionada com a sobrevivência celular, além da via de PI3K/Akt, associada à metástase e à inibição da apoptose celular e, também, a via de HIF1a que está ligada à angiogênese (Figura 9) (Tanese, Ogata, 2024).

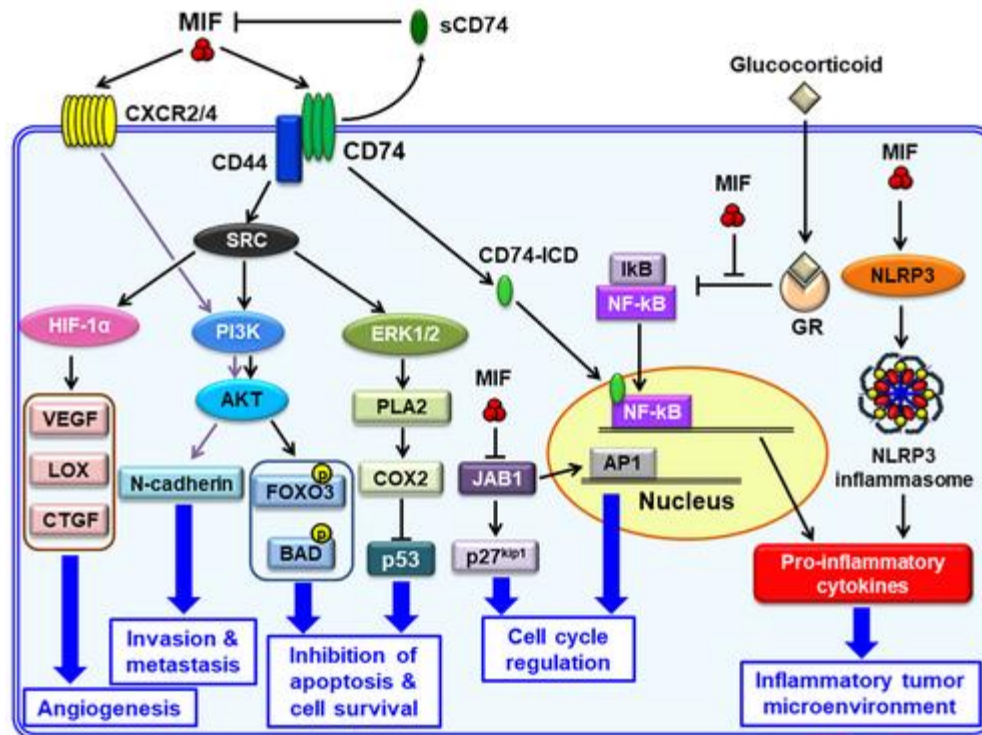


Figura 9. Vias de sinalização celular cancerígenas ativadas por meio da interação de MIF com o receptor CD74. Fonte: Tanese, Ogata, 2024.

Particularmente em melanoma, tanto o MIF quanto o CD74 contribuem com a agressividade desse câncer. O MIF está superexpresso em diferentes linhagens de células neoplásicas de melanoma que exibem fenótipos ou comportamentos agressivos, como elevado potencial proliferativo e migratório (Soumoy et al., 2019). Da mesma forma, CD74 também é altamente expresso em melanoma e está associado à resistência de células tumorais à apoptose, ou morte celular, e metástase (Ogata et al., 2020; Soumoy et al., 2019).

O eixo MIF-CD74 em melanoma vem sendo demonstrado como de substancial importância para a progressão da doença. De fato, esse eixo tem sido extensamente evidenciado como um pivô no ambiente tumoral que apoia a carcinogênese exercendo influência na imunossupressão, no escape das células cancerígenas da vigília do sistema imunológico, na proliferação celular e em metástases (Figueiredo et al., 2018; Soumoy et al., 2019; Tanese et al., 2015). A contribuição de MIF-CD74 na imunossupressão ocorre através do estímulo para a produção das citocinas IL-8 e IL-6 por células tumorais, que cria um microambiente tumoral imunossuprimido. É importante mencionar que IL-8 e IL-6 também estão implicados em metástases (Tanese et al., 2015).

Em células de melanoma, a interação entre MIF e CD74 mostrou ter um importante papel no estímulo da produção de PD-L1, através da promoção do aumento da expressão do gene que codifica essa proteína (Imaoka et al., 2019). O PD-L1 (uma proteína de superfície celular)

produzido em células tumorais pode interagir com o receptor PD-1 presente nas células T e, dessa forma, inativar e impedir a atuação dessas células de defesa contra as células cancerosas, promovendo, assim, o escape das células tumorais do sistema imunológico (Imaoka et al., 2019).

O eixo MIF-CD74 também está relacionado à proliferação celular e metástase em melanoma. A ligação de MIF a CD74 pode ativar as vias de sinalização celular de PI3K/Akt e MAPK, que estão relacionadas à proliferação celular sustentada, crescimento tumoral e metástases (Figueiredo et al., 2018; Fukuda et al., 2022; Tanese et al., 2015; Soumoy et al., 2019).

Até o momento, não há evidências publicadas que estabeleçam uma ligação funcional entre MIF-CD74 e a regulação do *splicing* alternativo mediado por SRPK1/2 em câncer. Uma investigação conduzida pelo nosso grupo de pesquisa sugeriu uma possível conexão entre o início da sinalização celular desencadeada pelo eixo MIF-CD74 e a atividade de SRPK2 (Mello, 2014). Além disso, o tratamento de células B16-F10 com o inibidor de MIF ISO-1, em combinação com o inibidor de SRPKs SRPIN340, provocou efeitos anticancerígenos *in vitro* (Moreira, 2020). Tendo em vista essas observações, especulou-se que o MIF poderia ativar, de forma indireta, via Akt, as SRPKs em melanoma e promover fenótipos cancerígenos de forma mais acentuada (Figura 10). Dessa forma, hipotetizou-se que o MIF, na presença das SRPKs, exerceria uma maior influência na tumorigênese. Baseado nisso, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos da proteína recombinante MIF (rMIF) sobre a atividade das SRPKs, bem como sobre os fenótipos tumorais e metastáticos relacionados às quinases, em células de melanoma murino B16-F10 geneticamente modificadas para expressar ou não as SRPK1/2.

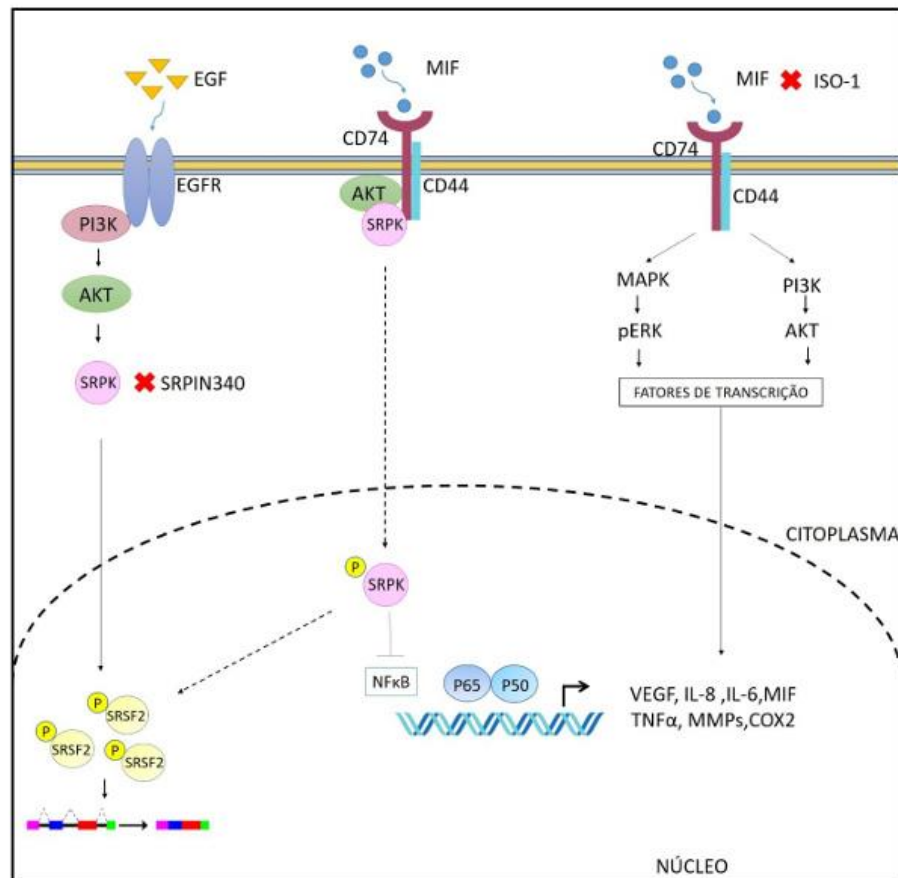


Figura 10. Eixo hipotético MIF/CD74/CD44/Akt/SPK. Representação mecânica da hipótese de que o MIF ativa indiretamente as SRPKs, por meio de Akt (linhas tracejadas). Fonte: adaptada de Moreira (2020, p. 119).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

O presente estudo teve como objetivo geral analisar os possíveis impactos do tratamento de duas linhagens de células modificadas de melanoma murino B16-F10, *knockouts* ou não para SRPK1/2, com a proteína recombinante MIF (rMIF), na atividade das SRPKs e nos fenótipos tumorais e metastáticos relacionados às quinases.

3.2 Objetivos específicos:

1. Validar o *knockout* de SRPK1/2 em células B16-F10 KO e a expressão de SRPK1 e SRPK2 nas células B16-F10 V2 através de ensaio de RT-qPCR;
2. Analisar o efeito do tratamento de células B16-F10 e B16-F10 KO com proteína recombinante MIF (rMIF) na atividade de SRPK1/2, através da fosforilação de proteínas SR, por meio de ensaio de imunofluorescência;
3. Analisar o impacto proliferativo do tratamento de células B16-F10 V2 e B16-F10 KO rMIF, através do ensaio de exclusão de azul de tripan;
4. Analisar o efeito do tratamento de células B16-F10 V2 e B16-F10 KO com rMIF na dinâmica do citoesqueleto de actina, mediante ensaio de coloração de citoesqueleto com rodamina faloidina;
5. Avaliar a influência do tratamento de células B16-F10 V2 e B16-F10 KO com rMIF na capacidade clonogênica, através do ensaio de formação de colônias.
6. Avaliar a implicação do tratamento de rMIF na expressão de VEGF-A, por RT-qPCR.

4 METODOLOGIA

4.1 Cultivo celular

Foram cultivadas as linhagens B16-F10 V2, transduzidas com vetor vazio, e B16-F10 KO, submetidas à edição gênica via sistema CRISPR-Cas9 para atingir os genes SRPK1 e SRPK2. Essas células foram estabelecidas anteriormente por Caetano et al. (2022).

As células foram cultivadas em RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS, LGC Biotecnologia), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma), com pH 7,2 e 37 °C sob atmosfera de 5% de CO₂.

4.2 Extração de RNA e RT-qPCR

A análise da expressão gênica foi conduzida em duas condições experimentais distintas. Para a validação do *knockout*, avaliou-se a expressão basal de SRPK1 e SRPK2 em células B16-F10 V2 e B16-F10 KO mantidas apenas em meio de cultura e sem tratamento. Já para investigar a expressão de VEGF-A, as células foram expostas ou não ao tratamento com proteína recombinante MIF (rMIF) [100 ng/mL]. Independentemente do grupo experimental, realizou-se a extração de RNA total das linhagens celulares utilizando o reagente TRIzol (*Sigma-Aldrich*), conforme as instruções do fabricante. A concentração e a pureza das amostras foram determinadas por espectrofotometria (NanoDrop, razão A260/280), enquanto a integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 2%. Posteriormente, o RNA foi tratado com DNase (Invitrogen) a 37 °C por 40 minutos, seguido de incubação para inativação enzimática por 10 minutos a 65 °C. Após, o material tratado foi submetido à síntese de cDNA utilizando-se de kit comercial de transcrição reversa de alta capacidade (*Applied Biosystems*) seguindo as instruções do fabricante. A reação em cadeia da polimerase em tempo real foi realizada com o kit *SYBR Green PCR Master Mix 2X*. Cada reação conteve 200 ng de cDNA. As condições de ciclagem térmica foram: desnaturação inicial a 95 °C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos compostos por desnaturação a 95 °C por 15 segundos e anelamento/extensão a 60 °C por 1 minuto. A expressão gênica foi quantificada pelo método do Ct comparativo, com base no cálculo de $2^{-\Delta Ct}$ para determinar os níveis relativos de expressão (Rizzacasa et al., 2020). O gene de referência utilizado para a normalização dos dados foi o RPL13, que não apresentou variações significativas de expressão entre as linhagens B16-F10 V2 e B16-F10 KO. Os *primers* de RPL13 (Gong et al., 2016),

SRPK1 (origene, NM_016795), SRPK2 (origene, NM_009274) e VEGF-A (Quan et al., 2020) utilizados nas análises foram:

RPL13: sequência direta, 5' AGGGGCAGGTTCTGGTATTG 3'; **sequência reversa** 5' TGTTGATGCCTTCACAGCGT 3'.

SRPK1: sequência direta, 5' GAGGAGAGCATTCGGGCAGATA 3'; **sequência reversa**, 5' GTCTGCGATCTTCACTTGGAGC 3'.

SRPK2: sequência direta, 5' CCACTTACCGAGCAGGAGGAAA 3'; **sequência reversa** 5' ATCCAGAGGGTTCACCAACAGG 3'.

VEGF-A: sequencia direta, 5' CTGCTGTAACGATGAAGCCCTG 3'; **sequência reversa** 5' GCTGTAGGAAGCTCATCTCTCC 3'

4.3 Ensaio de Imunofluorescência

As células B16-F10 V2 ou B16-F10 KO foram plaqueadas em duplicata na concentração de 2×10^4 células/poço em placas de 24 poços contendo lamínulas em um volume total de 500 μ L de meio de cultura completo e, posteriormente, foram incubadas por 24 h a 37°C e 5% de CO₂ para adaptação e adesão. Após, as células foram expostas a diferentes tempos de tratamento com a proteína recombinante MIF (Preprotech), por 1 hora ou 2 horas, na concentração de 100 ng/mL. O tempo de tratamento e a concentração foram determinados com base em estudos anteriores (Li et al., 2009; Lue et al., 2017; Moreira et al., 2018; Taranto et al., 2019; Zhou et al., 2012). As células tratadas com o PBS (0,4% v/v) foram utilizadas como controle. Quando encerrados os períodos dos tratamentos, os meios contendo MIF [100 ng/mL] ou PBS (0,4% v/v) foram removidos e os poços foram imediatamente lavados 1x com PBS. Após a lavagem, as células foram fixadas e permeabilizadas em 4% v/v de paraformaldeído e 0,5% v/v de Triton X-100 por 30 minutos. Em seguida, foram lavadas 3x com PBS e bloqueadas com 3% m/v de Albumina do Soro Bovino (BSA) (Merck) diluída em PBS por 1 hora. Então, as células foram lavadas 3x com PBS e foram incubadas com os anticorpos primários anti-fosfoproteínas SR mAb1H4 (1:100, Sigma-Aldrich) durante 1 hora. Em seguida, as células foram lavadas 4x com PBS e foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG-Alexa Fluor 488 de camundongo ou coelho (Invitrogen) por 1 hora. Em sequência, as células foram lavadas 4x com PBS. O composto 4', 6-diamidino-2-fenilindole

(DAPI, Invitrogen) foi usado como um contracolorante nuclear. A fluorescência foi visualizada utilizando microscópio invertido de fluorescência EVOS FL.

4.4 Coloração do citoesqueleto de actina com rodamina faloidina

As células B16-F10 V2 ou B16-F10 KO foram plaqueadas em duplicata em placas de 24 poços contendo lamínulas na densidade de 2×10^4 células/poços. Após foram incubadas 24 h para adaptação e adesão, onde então foram tratadas com 100 ng/mL de proteína recombinante MIF (Peprotech) diluído em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) por 1h (Li et al., 2009; Lue et al., 2017; Moreira et al., 2018; Taranto et al., 2019). As células tratadas com PBS (0,4% v/v) foram utilizadas como controle. Posteriormente ao tratamento, os meios contendo rMIF [100 ng/mL] ou PBS (0,4% v/v) foram removidos dos poços e os poços foram imediatamente lavados 1x com PBS. Após, as células foram fixadas e permeabilizadas conforme descrito no item 3. Em seguida, foram aplicados 0,5 μ L de rodamina faloidina (*Thermo Fisher Scientific*) diluídos em 200 μ L de PBS/poço e então a placa foi incubada no escuro por 30 min. Em seguida, as lâminas foram montadas usando DAPI (*Thermo Fisher Scientific*) como um contracolorante nuclear. A fluorescência foi registrada utilizando-se de Microscópio Confocal de Varredura a Laser Zeiss, LSM510 META.

4.5 Ensaio de proliferação celular

As células B16-F10 V2 e B16-F10 KO foram plaqueadas em triplicata na densidade de 1×10^5 células/poço em placas contendo 24 poços. Após 24 horas, as células foram submetidas ao tratamento com rMIF (Peprotech), na concentração de 100 ng/mL, ou PBS (0,4% v/v) – controle, pelos períodos de 24, 48 ou 72 horas. A escolha da concentração de tratamento foi determinada seguindo um estudo anterior (Taranto et al., 2019). Decorridos os tempos de tratamento, as células aderentes foram removidas com tripsina, coradas com azul de tripano (0,4% p/v; Sigma-Aldrich) e contadas em triplicata em um microscópio óptico invertido.

4.6 Ensaio de formação de colônias

Células B16-F10 V2 e B16-F10 KO foram plaqueadas em triplacata em placas de 6 poços na densidade de 1×10^3 células/poço em um volume total de 2 mL de meio de cultura/poço (Caetano et al., 2022). Então, foram incubadas por 24 h a 37 °C e 5% de CO₂ para adaptação e adesão. Após o período de incubação, as células foram expostas ao tratamento com proteína recombinante MIF

(PeproTech), na concentração de 100 ng/mL (Taranto et al., 2019), ou PBS (0,4% v/v) – controle, pelos tempos de 24, 48 ou 72 horas. Findados os períodos de tratamentos, os meios completos contendo SFB (10% v/v) foram trocados por meio completo com SFB (2% v/v) e as células foram cultivadas por 7 dias. Após, as colônias formadas foram fixadas por 30 minutos com paraformaldeído (4% v/v). Posteriormente à fixação, as células foram coradas utilizando-se solução de azul de toluidina (1% v/v) e metanol (20% v/v) por 30 minutos. Após a coloração, as células foram contadas manualmente.

4.7 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o programa *GraphPad Prism 8* (*GraphPad Software Inc.*) e expressos como média \pm desvio padrão de experimentos independentes realizados duas vezes em triplicata. A significância estatística foi avaliada por meio do teste t de *Student* para comparações entre dois grupos (independentes) ou por análise de variância (ANOVA), seguida de *post hoc* de Tukey, considerando-se estatisticamente significativos os valores de * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

4.8 Declaração de Uso de Inteligência Artificial Generativa

No desenvolvimento desta tese, foram utilizadas as ferramentas de Inteligência Artificial Generativa Gemini (Google) e ChatGPT, exclusivamente para revisão gramatical dos textos e aprimoramento da escrita acadêmica produzidos pelo autor. Todo o conteúdo científico, incluindo concepção e seções do estudo, delineamento metodológico, coleta e análise de dados, interpretação dos resultados e conclusões, foi elaborado integralmente pelo autor, sem participação de ferramentas de IA. O uso da ferramenta foi restrito ao suporte linguístico, com revisão crítica e validação de todas as sugestões pelo autor, que assume plena responsabilidade intelectual, ética e científica pelo conteúdo apresentado. Nenhuma ferramenta de IA foi utilizada para geração, fabricação ou manipulação de dados, imagens ou resultados.

Esta declaração está em conformidade com a Portaria CNPq nº 2.664/2026, que institui a Política de Integridade na Atividade Científica, e com as diretrizes da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) para a pós-graduação *stricto sensu*.

5 RESULTADOS

5.1 Validação do *knockout* de SRPK1 e SRPK2

Para validar o duplo *knockout* de SRPK1/2 nas células B16-F10 KO e confirmar a expressão em B16-F10 V2, foi realizada a quantificação da expressão gênica por meio de RT-qPCR.

Observou-se uma redução significativa na expressão do mRNA de SRPK1 (***) e do mRNA de SRPK2 (**p<0,01) nas células B16-F10 KO em comparação às B16-F10 V2 (Figura 11).

Esses dados validam a eficácia do duplo *knockout* de SRPK1/2 nas células B16-F10 KO e a manutenção da expressão dessas quinases nas B16-F10 V2.

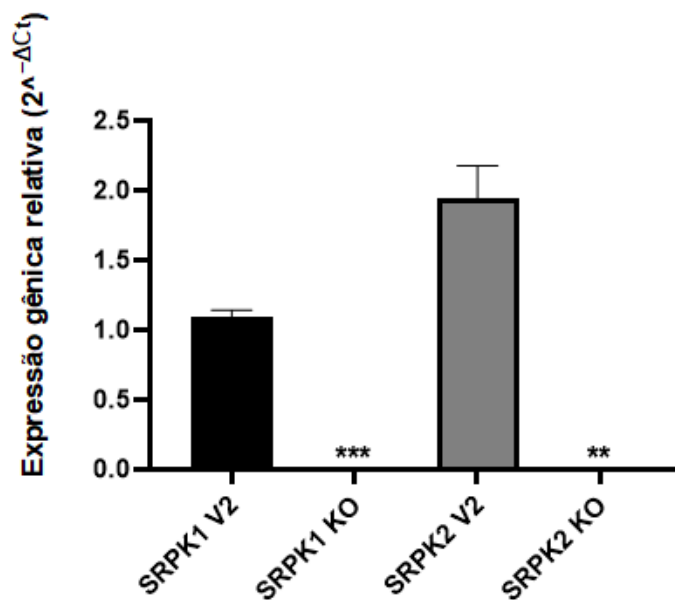


Figura 11. Avaliação da expressão gênica relativa de SRPK1 e SRPK2 em B16-F10 KO e em B16-F10 V2. A expressão gênica foi quantificada por RT-qPCR nas células B16-F10 (V2) e B16-F10 (KO). Os dados foram normalizados pelo gene de referência RPL13 e calculados pelo método $2^{-\Delta Ct}$. Os resultados representam a média \pm desvio padrão por teste t de *Student* independente. **p<0,01 e ***p<0,001. Fonte: elaborado pelo autor (2025).

5.2 Efeitos de MIF no estado de fosforilação de proteínas SR

Considerando o papel do MIF na progressão tumoral do melanoma e a importância das SRPK1/2 na agressividade dessa doença (Moreira et al.,2018; Soumoy et al., 2019), foi investigado

se o MIF exerce influência na ativação dessas proteínas-quinases. Para isso, avaliou-se o estado de fluorescência das proteínas SR, conhecidas por serem fosforiladas pelas SRPKs (Giannakouros et al., 2011), tanto em células B16-F10 V2, que expressam as SRPK1 e SRPK2, bem como nas B16-F10 KO, que não expressam essas quinases. Para tal, as células B16-F10 V2 além das B16-F10 KO foram submetidas ao tratamento com proteína recombinante MIF (rMIF), na concentração de 100 ng/mL, ou com o PBS 0,4% v/v, que foi utilizado como controle. Os tratamentos foram realizados em diferentes tempos: 1 ou 2 horas.

Observou-se que o tratamento com rMIF [100 ng/mL], nos diferentes tempos, não exerceu influência no estado fosforilação das proteínas SR (Figura 12, A e B). As células mantiveram seus estados basais de fosforilação de proteínas SR na presença de rMIF, sem diferenças em relação ao controle - PBS. Esses resultados apontam que o tratamento com rMIF, na presença ou ausência de SRPK1/2, não foi capaz de exercer influência notável na alteração do estado de fosforilação das proteínas SR.

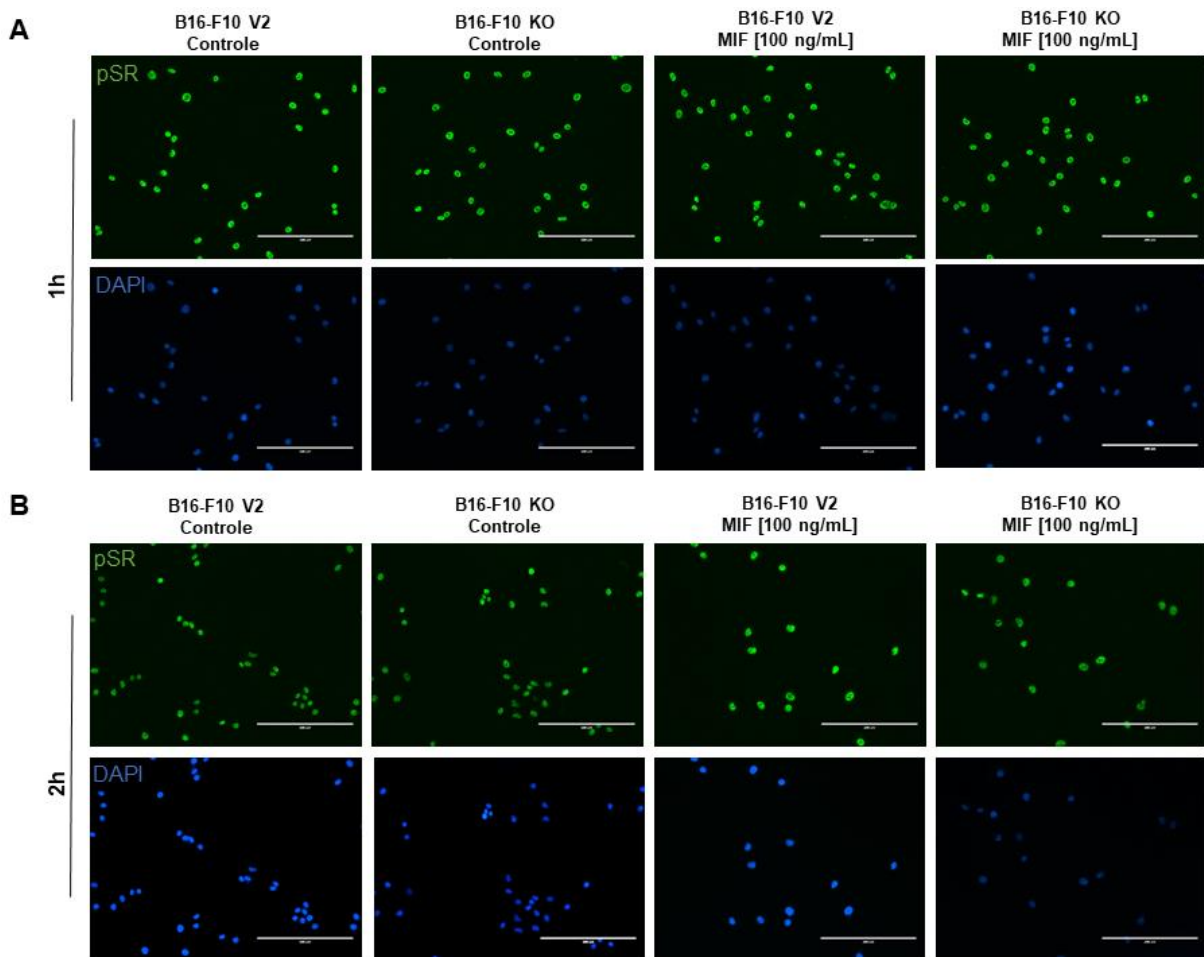


Figura 12. Efeitos do tratamento de células B16-F10 V2 ou *knockouts* para SRPK1/2 (KO) com rMIF no estado basal de fosforilação de proteínas SR. O estado de fosforilação foi analisado por imunofluorescência utilizando-se o anticorpo anti-fosfo-SR (clone mAb1H4), que reconhece um fosfoepítipo comum a variadas proteínas SR fosforiladas (Moreira et al., 2018; Siqueira et al., 2015). As células foram tratadas com rMIF [100 ng/mL] ou PBS (controle) por (A) 1 hora ou (B) 2 horas. O regime de tratamento baseou-se em estudos anteriores (Li et al., 2009; Lue et al., 2017; Moreira et al., 2018; Taranto et al., 2019; Zhou et al., 2012). O DAPI foi utilizado como contracolorante nuclear e a captura das imagens foi realizada em microscópio de fluorescência invertido (EVOS FL). São mostradas imagens representativas de dois experimentos independentes. Não foram observadas alterações notórias no padrão de fosforilação das proteínas SR nos tempos avaliados. Barra de escala: 200 μ m. Fonte: elaborado pelo autor (2025).

5.3 Impacto de MIF na proliferação celular

Estudos anteriores demonstraram o papel das SRPKs na proliferação celular de B16-F10 (Caetano et al., 2022). Adicionalmente, foi mostrado o efeito pró-proliferativo do MIF em melanoma (Oliveira et al., 2014).

Para investigar se a sinalização de MIF ativa as SRPKs para beneficiar esses eventos, as células B16-F10 V2 e B16-F10 KO foram tratadas com proteína recombinante MIF (rMIF) em

diferentes tempos. Após isso, avaliou-se o impacto dos tratamentos na proliferação celular pelo ensaio de exclusão de azul de tripan.

Para a análise proliferativa, as células B16-F10 V2 e B16-F10 KO foram expostas a 24, 48 ou 72 horas de tratamento com rMIF [100 ng/mL] ou PBS 0,4% v/v (Controle). Após 24 horas de tratamento, não houve diferenças estatisticamente significativas entre B16-F10 V2 e B16-F10 KO (Figura 12, A). Em contraste, a partir de 48 horas de tratamento, a proliferação celular de B16-F10 V2, tanto no grupo controle quanto nos grupos tratados, foi significativamente superior à de B16-F10 KO (** $p < 0,01$) (Figura 13, A). Esse aumento proliferativo também foi observado após 72 horas de exposição (* $p < 0,05$) (Figura 13, A).

Na comparação entre os grupos B16-F10 V2 Controle e B16-F10 V2 MIF, o tratamento com rMIF [100 ng/mL] aumentou a proliferação celular de forma não significativa, com efeitos mais notáveis em 48 e 72 horas (Figura 13, A). Já para as B16-F10 KO, o tratamento tendeu a aumentar a proliferação celular apenas em 72 horas, sem significância (Figura 13, A).

Em conjunto, estes dados indicam que as SRPK1/2 exercem papel no aumento da proliferação celular basal de células B16-F10. Além disso, evidenciam que a resposta proliferativa induzida por MIF não foi significativa tanto na presença quanto na ausência de SRPK1/2.

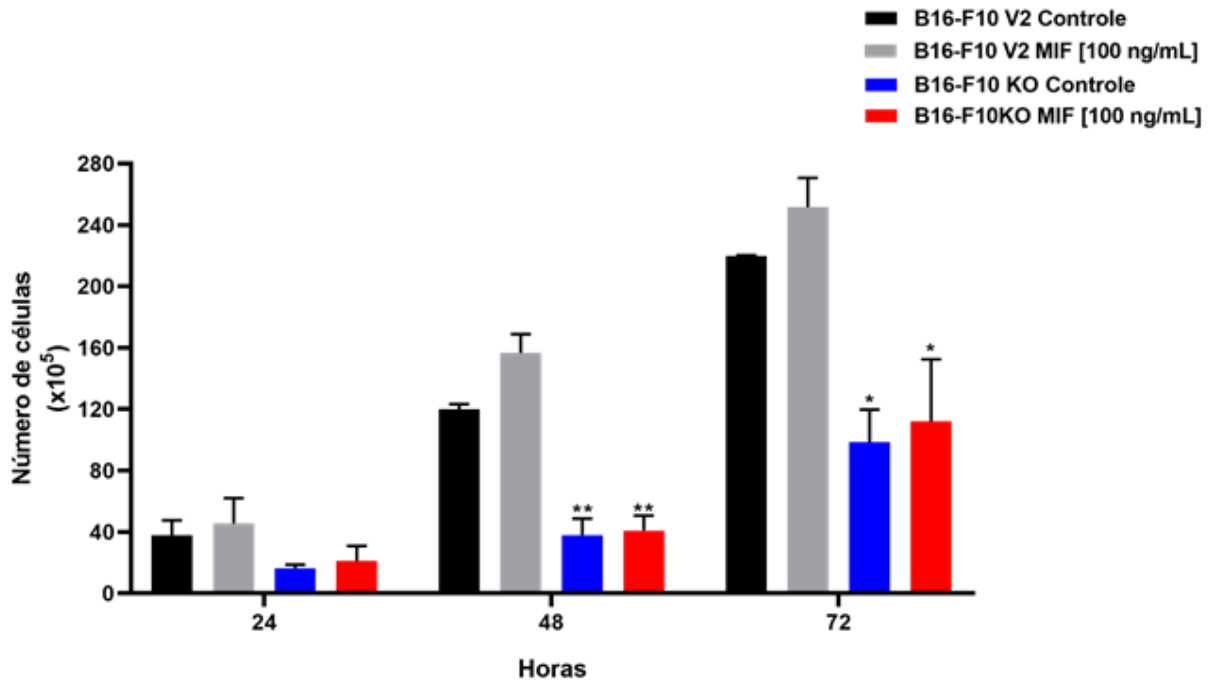


Figura 13. Impacto do tratamento de células B16-F10 (V2) ou *knockouts* para SRPK1/2 (KO) com rMIF na proliferação celular. As células B16-F10 V2 e KO foram expostas a 24, 48 ou 72 horas de tratamento com rMIF [100 ng/mL]. A proliferação celular foi avaliada por exclusão de azul de tripan. A concentração de tratamento utilizada baseou-se em Taranto et al. (2019). Diferenças significativas foram observadas após 48 e 72 horas. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão por ANOVA com *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$. Fonte: elaborado pelo autor (2025).

5.4 Efeito de MIF na polimerização de citoesqueleto de actina

Considerando que as alterações no citoesqueleto de actina têm associações com metástases (Arumugam et al., 2021) e que as SRPK1/2 estão implicadas no rearranjo do citoesqueleto e na migração de células B16-F10 (Moreira et al., 2018; Caetano et al., 2022), propôs-se investigar se o estímulo com MIF induz uma polimerização de actina mais acentuada e se esse fenótipo depende da presença das SRPKs. Com esse objetivo, as células B16-F10 V2 e as células B16-F10 KO foram tratadas por 1 hora com proteína recombinante MIF (rMIF).

Foi visto que, na ausência de tratamento com rMIF, as células B16-F10 KO apresentaram uma baixa polimerização de filamentos de actina (Figura 14, C), enquanto as células B16-F10 V2 exibiram uma maior polimerização (Figura 14, A). Em contraste, o tratamento de ambas as linhagens celulares com rMIF resultou em um aumento robusto da polimerização dos filamentos de actina (Figura 14, B e D).

No geral, esses dados sugerem que as SRPK1/2 podem desempenhar função no remodelamento do citoesqueleto de actina em células B16-F10. Além disso, sugerem que o rMIF exerce papel na polimerização de filamentos de actina de maneira independente de SRPK1/2.

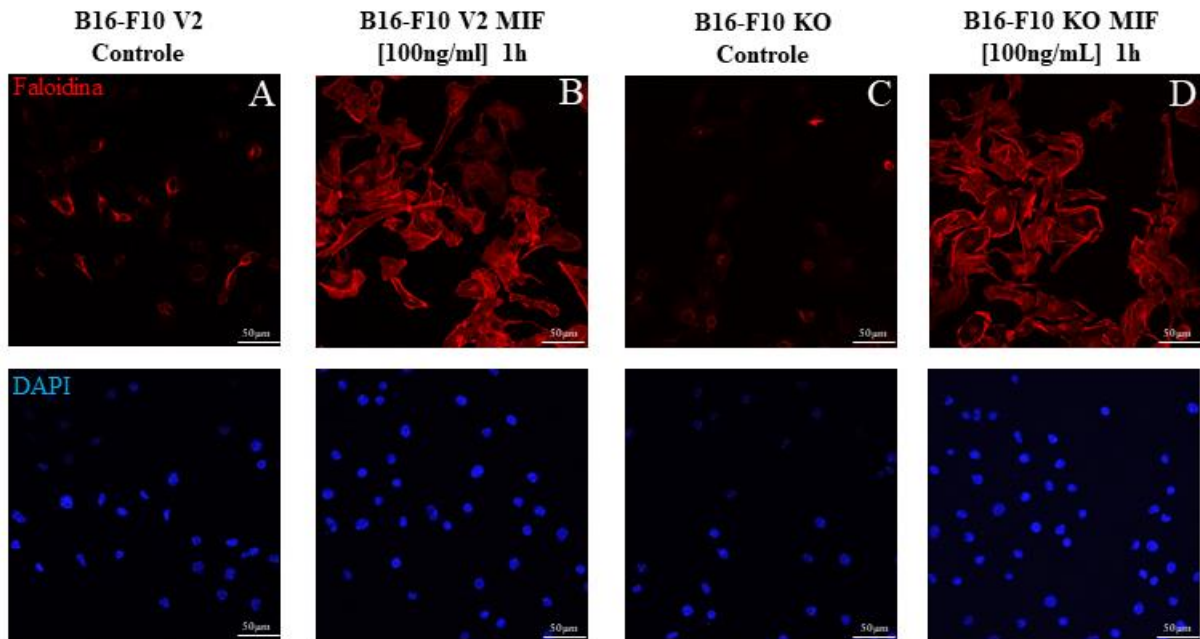


Figura 14. Influência do tratamento de células B16-F10 V2 ou *knockouts* para SRPK1/2 (KO) com rMIF na polimerização de filamentos de actina. O efeito do tratamento foi analisado por meio da marcação com rodamina-faloidina. As células foram tratadas com rMIF [100 ng/mL] ou PBS (controle) por 1 hora. O regime de tratamento baseou-se em trabalhos anteriores (Li et al., 2009; Lue et al., 2017; Moreira et al., 2018; Taranto et al., 2019). O DAPI foi usado como um contracolorante nuclear. As imagens foram adquiridas em microscópio confocal de varredura a laser (Zeiss LSM510 META). São apresentadas imagens representativas de dois experimentos independentes. (A) na ausência de tratamento, apenas as células V2 exibiram organização evidente de filamentos de actina polimerizados. (B, D) após o tratamento com rMIF, ambas as linhagens (V2 e KO) apresentaram aumento na polimerização dos filamentos de actina. Barra de escala: 50 µm. Fonte: elaborado pelo autor (2025).

5.5 Influência de MIF na capacidade clonogênica

Para avaliar o efeito de rMIF sobre o potencial clonogênico, definido como a capacidade de células únicas formarem colônias *in vitro* com pelo menos 50 células descendentes (Brix et al., 2021), e se esse efeito pode ser mais pronunciado na presença de SRPK1/2, as células B16-F10 V2 e B16-F10 KO foram expostas ao tratamento com rMIF por 48 e 72 horas. Esses tempos de tratamento foram escolhidos com base nos resultados prévios deste trabalho, que indicaram sua maior eficácia (ver Figura 13).

Observou-se que, tanto em 48 como em 72 horas, as células B16-F10 KO exibiram um menor potencial de formação de colônias em comparação às B16-F10 V2 (Figura 15, B e D). Além

disso, após 72 horas de tratamento com rMIF, as células B16-F10 KO mostraram uma redução significativa na capacidade clonogênica em relação às B16-F10 V2 (Figura 15, D).

Na comparação entre os grupos de células B16-F10 V2 controle e B16-F10 V2 tratadas com rMIF [100 ng/mL], o tratamento não promoveu aumento na capacidade de formação de colônias (Figura 15, B e D). Da mesma forma, nas células B16-F10 KO, o tratamento com rMIF [100 ng/mL] também não resultou em aumento do potencial clonogênico em relação ao controle (Figura 15, B e D).

Em suma, os resultados indicam que as SRPK1/2 podem influenciar a capacidade clonogênica das células B16-F10, enquanto que o tratamento com rMIF potencialmente não exerce efeito significativo nesse contexto.

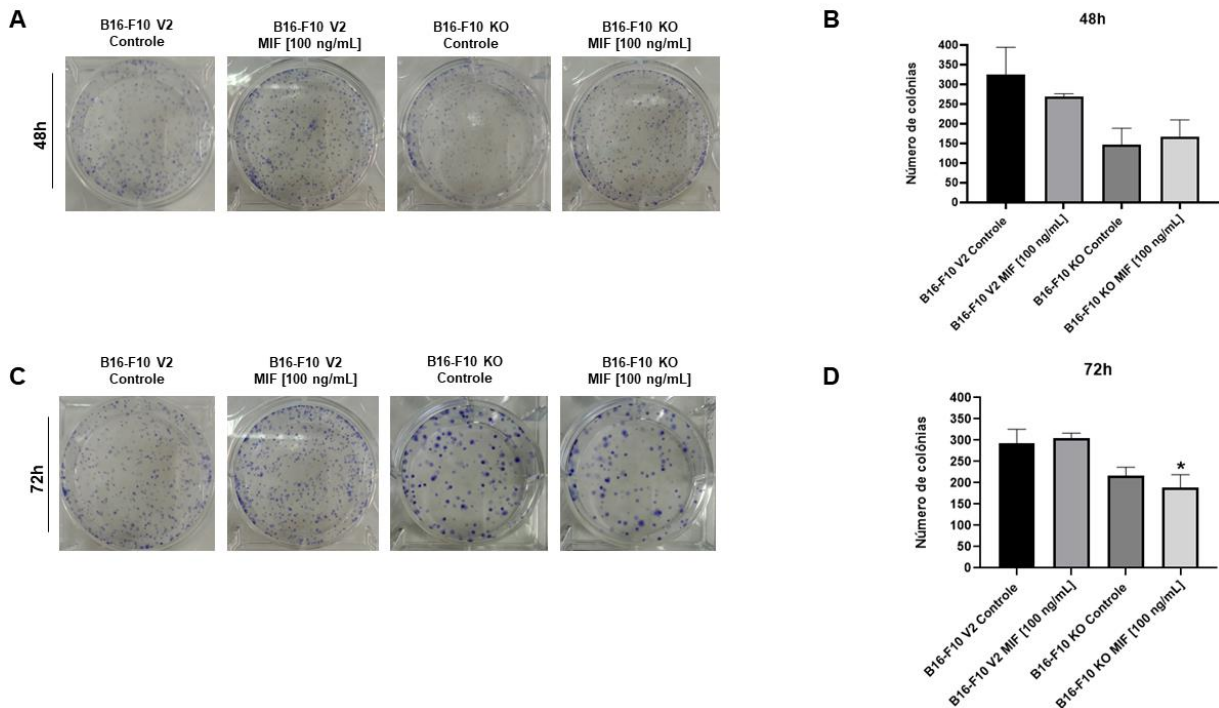


Figura 15. Influência do tratamento de células B16-F10 V2 ou *knockouts* para SRPK1/2 (KO) com rMIF na capacidade clonogênica. As células B16-F10 V2 e B16-F10 KO foram tratadas com rMIF [100 ng/mL] por 48 ou 72 horas. A concentração do tratamento baseou-se em estudos anteriores (Taranto et al., 2019). A formação de colônias foi avaliada por coloração com azul de toluidina após 7 dias (A, C) imagens representativas de dois experimentos independentes (B) após 48 horas, observou-se menor formação de colônias nas células B16-F10 KO em comparação às B16-F10 V2, sem diferença estatisticamente significativa (D) após 72 horas, as células B16-F10 KO tratadas com rMIF [100 ng/mL] apresentaram capacidade clonogênica significativamente reduzida em comparação às B16-F10 V2 tratadas. Os dados são mostrados como média ± desvio padrão por ANOVA com *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$. Fonte: elaborado pelo autor (2025).

5.6 Implicação de MIF na expressão de VEGF-A

Estudos prévios evidenciaram que a SRPK1 modula o *splicing* alternativo de VEGF-A no melanoma metastático (Gammons et al., 2014). A via PI3K/Akt é conhecida por ativar as SRPKs (Zhou et al., 2012). O MIF pode estimular essa via por meio de sua interação com o receptor CD74 bem como com o CXCR (reconhecidamente expresso em B16-F10) (Andre et al., 2016; Tanese, Ogata 2024; Xu et al., 2019). Para investigar se o MIF pode atuar na ativação das SRPK1/2 e favorecer a expressão de VEGF-A, as células B16-F10 V2 e B16-F10 KO foram submetidas ao tratamento com rMIF [100 ng/mL] por 48 ou 72 horas. Os tempos de exposição ao tratamento foram estabelecidos com base em resultados prévios deste estudo (ver Figuras 13 e 15).

A análise revelou que os tratamentos não promoveram alterações estatisticamente significativas nos níveis de mRNA de VEGF-A nestas linhagens, que se mantiveram estáveis em todas as condições testadas (Figura 16). Em conjunto, os dados indicam que, nas condições avaliadas, o tratamento com rMIF não afetou a expressão gênica de VEGF-A em células B16-F10, independentemente da presença (expressão) de SRPK1/2.

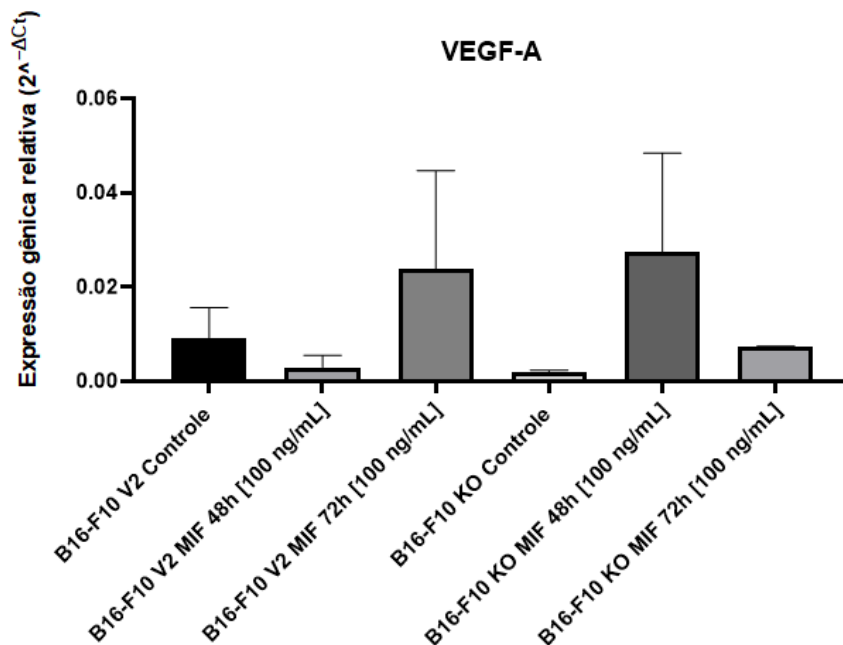


Figura 16. Influência de MIF na expressão relativa de transcritos de VEGF-A. Células B16-F10 V2 e B16-F10 KO foram tratadas com rMIF [100 ng/mL] por 48 ou 72 horas. A concentração de tratamento utilizada foi definida com base em estudos prévios (Taranto et al., 2019). Os níveis relativos de mRNA de VEGF-A foram determinados por RT-qPCR utilizando o método $2^{-\Delta Ct}$, com normalização pelo gene de referência RPL13. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão por ANOVA com *post-hoc* de Tukey. Sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Fonte: elaborado pelo autor (2025).

6 DISCUSSÃO

A identificação e o estudo de proteínas aberrantemente expressas em cânceres são fundamentais para compreender os papéis biológicos exercidos por essas moléculas no desenvolvimento tumoral e em metástases (Jarnuczak et al., 2021; Papier et al., 2024; Wang et al., 2022). Tanto o MIF, como as SRPKs, são proteínas que apresentam expressão significativamente elevada no melanoma (Caetano et al., 2022; Moreira et al., 2018; Soumoy et al., 2019). Com base nisso, hipotetizou-se que o MIF ative indiretamente as SRPKs e, na presença dessas quinases, promova alterações fenotípicas tumorais e metastáticas mais acentuadas. Assim, foi investigado o impacto do tratamento com a proteína recombinante MIF (rMIF) em células B16-F10 de melanoma geneticamente modificadas, denominadas B16-F10 V2, que expressam as SRPK1 e SRPK2, ou B16-F10 KO, que não expressam as SRPK1/2. Avaliaram-se os efeitos de rMIF na ativação das SRPKs, na proliferação celular, na formação de colônias e no rearranjo do citoesqueleto de actina, importantes eventos tumorigênicos (Tufail, Wu, 2023; Zhang et al., 2024), assim como na expressão de VEGF-A.

Observou-se que, nessas células, o tratamento com rMIF não influenciou a atividade das SRPKs nem promoveu efeito significativo na expressão de VEGF-A. Além disso, na presença de SRPK1/2, o rMIF afetou discretamente a capacidade clonogênica e proliferativa celular, porém sem diferença estatisticamente significativa. Em contraste, o rMIF foi capaz de promover rearranjos no citoesqueleto de actina de forma independente de SRPK1/2.

As SRPKs, em particular SRPK1 e SRPK2, possuem expressão alterada em diversos tipos de câncer e podem contribuir com a agressividade da doença (Nikas et al., 2019). Em melanoma, o aumento da expressão de SRPK1/2 está associado à angiogênese, mau prognóstico, estágios tumorais avançados e baixa sobrevida (Caetano et al., 2022; Duggan et al., 2022, Gammons et al., 2014). As elevações na expressão dessas quinases desregulam o *splicing* alternativo em células tumorais, que conseqüentemente passam a produzir isoformas de mRNAs aberrantes relacionados à geração de proteínas pró-tumorais (Da Silva et al., 2015). Um dos mecanismos que levam a perturbações de eventos de *splicing* alternativo em câncer é a alteração da fosforilação das proteínas SR, especialmente a hiperfosforilação, que pode ser promovida por SRPKs (Changphasuk et al., 2024).

Com isso em vista, as células B16-F10 V2 e B16-F10 KO foram expostas a diferentes tempos de tratamento com rMIF [100 ng/mL] e analisadas quanto ao estado de fosforilação das proteínas SR. Intrigantemente, os diferentes tempos de exposição ao rMIF não promoveram alterações notáveis na fosforilação dessas proteínas. Assim, no painel das células B16-F10, o MIF parece não exercer influência sobre a ativação de SRPK1/2 e, ao que tudo indica, a ausência dessas quinases em B16-F10 KO provavelmente pode ser compensada por outras proteínas, como as Akt CLKs e DYRK1A, que também têm como alvo as proteínas SR (Bei, Shu, 2024; Hogg, Findlay, 2023). Essa especulação, no entanto, merece investigação em futuros estudos.

Paralelamente, a exposição dessas células ao tratamento com rMIF não afetou a expressão de VEGF-A, um importante fator pró-angiogênico conhecido por ser modulado por SRPK1 e que está associado ao crescimento e à metástase em melanoma (Gammons et al., 2014). Ressalta-se que a inibição da atividade de SRPK1 em diferentes tipos de câncer, incluindo o melanoma, resulta na atenuação de VEGF-A (Gammons et al., 2014; Supradit et al., 2025). Portanto, esse resultado apoia a noção de que o rMIF provavelmente não induz a ativação de SRPKs em B16-F10.

É importante destacar que investigações conduzidas anteriormente identificaram uma interação entre SRPK2 e o receptor CD74 (Mello, 2014). Adicionalmente, o tratamento combinado de células B16-F10 com os inibidores de MIF, ISO-1, e de SRPKs, SRPIN340, comprometeu fenótipos tumorais (Moreira, 2020). Essas descobertas sugerem que o início da transdução de sinal mediada pela interação entre MIF e CD74 poderia ativar indiretamente as SRPKs por meio de Akt. No entanto, um estudo relatou que em B16-F10 não há presença de CD74 nem de CD44, um correceptor imprescindível recrutado para promover a sinalização mediada pelo complexo MIF-CD74 (Culp et al., 2007; Tanese, Ogata, 2024). Dado esse contexto, não se pode descartar que o MIF possa influenciar a ativação de SRPKs em outras linhagens tumorais que reconhecidamente expressem CD74/CD44. Portanto, recomenda-se que pesquisas futuras analisem a potencial influência de MIF na ativação de SRPK1/2, que, até o momento, permanece obscura.

A manutenção e/ou aumento da proliferação celular, assim como as alterações ou rearranjos no citoesqueleto de actina, são fenótipos cancerígenos amplamente reconhecidos como marcas (*hallmarks*) do câncer e desempenham papéis relevantes no crescimento tumoral e nas metástases (Hanahan, 2022; Keibler et al., 2016). Dada a participação das SRPK1/2 e do MIF nesses eventos, este estudo avaliou o impacto de rMIF nos comportamentos proliferativos e de polimerização dos filamentos de actina em células B16-F10 V2 e B16-F10 KO.

Evidenciou-se que os grupos de células B16-F10 V2, tratados ou não com rMIF, apresentaram um aumento significativo de proliferação celular quando comparados aos de B16-F10 KO. Esses resultados estão de acordo com investigações anteriores que mostraram que a inativação genética de SRPK1/2, bem como a inibição farmacológica dessas quinases, reduz a taxa proliferativa dessas células (Caetano et al., 2022; Moreira et al., 2018).

Por outro lado, embora o MIF já tenha sido demonstrado como capaz de aumentar a proliferação de células de melanoma (Oliveira et al., 2014), não foram observadas elevações proliferativas significativas nos grupos de células B16-F10 V2 e KO tratados com rMIF quando comparados aos controles não tratados. Estudos prévios relataram que a linhagem celular B16-F10 apresenta alta expressão de MIF e que sua redução resultou em atraso da duplicação dessas células *in vitro* e no estabelecimento tumoral *in vivo* (Culp et al., 2007). Apesar disso, o mesmo estudo observou que, após o estabelecimento do tumor, a cinética de crescimento não foi alterada (Culp et al., 2007). Um estudo de Girard e colaboradores (2012) reportou que a atenuação de MIF em B16-F10 não promoveu alterações na taxa proliferativa *in vitro*, nem afetou o crescimento tumoral em modelo animal. Em conjunto, as evidências sugerem que as SRPK1/2 exercem papel relevante na proliferação das células B16-F10. Em contraste, os dados indicam que o MIF não influencia significativamente esse processo (independentemente da presença dessas quinases), o que está em consonância com estudos anteriores (Girard et al., 2012).

A polimerização do citoesqueleto de actina é um importante evento para a metástase (Arumugam et al., 2021). Em células tumorais, as dinâmicas de polimerização e o rearranjo do citoesqueleto de actina facilitam a motilidade celular (Kita et al., 2021). Além disso, a reorganização da actina aumenta a formação de estruturas invasivas, como os invadopódios, que favorecem a invasão (Izdebska et al., 2018). Os dados de imunocoloração com rodamina-faloidina mostraram que as células B16-F10 V2 não tratadas com rMIF apresentaram uma organização mais evidente dos filamentos de actina quando comparadas às células B16-F10 KO. Esse achado é consistente com pesquisas anteriores que documentaram que a manipulação genética de SRPK2, especificamente o seu silenciamento, diminui a polimerização de filamentos de actina em células B16-F10 (Caetano et al., 2022).

Em contrapartida, o tratamento com rMIF promoveu um visível rearranjo dos filamentos de actina (F-actina) tanto nas células B16-F10 V2 quanto nas B16-F10 KO. Uma possível explicação para esse fenômeno é o aumento da expressão de F-Actina que pode ser influenciado

positivamente por MIF (Hu et al., 2015). Ademais, já foi demonstrado que o MIF pode induzir rápidos aumentos na polimerização de filamentos de actina (Klasen et al., 2014). Desse modo, os achados corroboram o envolvimento das SRPK1/2 e sugerem a participação do MIF na promoção da polimerização dos filamentos de actina em B16-F10. Além disso, os dados apontam que, particularmente nessa linhagem celular, o MIF supostamente atua nesse processo de maneira independente de SRPKs.

O ensaio clonogênico está relacionado à avaliação da capacidade de células tumorais individuais de sobreviver e formar colônias (Franken et al., 2006). Em um ambiente cancerígeno, as células neoplásicas podem invadir tecidos, sobreviver e formar colônias metastáticas, o que pode resultar na formação de novos tumores (Massagué, Obenauf, 2016). Aqui, mostrou-se que as células B16-F10 KO tratadas com rMIF por 72 horas apresentaram uma redução significativa na capacidade clonogênica em comparação às B16-F10 V2, que mantiveram um estado proliferativo aumentado. Além disso, após 48 horas de tratamento, houve uma tendência de diminuição da habilidade de formar colônias nas B16-F10 KO. Esses achados estão em consonância com outros estudos que constataram que tanto a inativação genética quanto a inibição farmacológica de SRPK1/2 podem prejudicar a formação de colônias em B16-F10 (Caetano et al., 2022; Moreira et al., 2018), reforçando a atuação dessas proteínas-quinases no contexto tumorigênico. Dessa forma, as SRPK1/2, mas não o MIF, parecem ser as principais responsáveis por promover um maior potencial clonogênico em B16-F10.

Em suma, as descobertas indicam que, no contexto das células B16-F10, o MIF não parece influenciar a atividade de SRPK1/2 nem promover alterações fenotípicas tumorais significativas na modulação da expressão de VEGF-A, na proliferação celular e na formação de colônias, processos que podem ser modulados pela atividade dessas quinases. Além disso, os achados reforçam o papel de SRPK1/2 no apoio à manutenção dos fenótipos tumorais e metastáticos nessa linhagem celular. Por fim, sugerem o MIF como um possível modulador do rearranjo do citoesqueleto de actina em B16-F10.

7 CONCLUSÃO

A presente investigação aponta que, especialmente no contexto das células B16-F10, as quinases SRPK1 e SRPK2 contribuem positivamente tanto para a promoção de fenótipos tumorais, promovendo maior proliferação celular, quanto para os fenótipos metastáticos, ao modular a

polimerização do citoesqueleto de actina, além de favorecer a formação de colônias. Em relação ao MIF, os dados indicam seu provável envolvimento no rearranjo de actina, processo que aparenta ocorrer de maneira independente das SRPKs. Por outro lado, o tratamento com MIF não alterou a ativação dessas quinases ou a expressão de VEGF-A. Além disso, não influenciou a capacidade proliferativa e clonogênica. Assim, as evidências sinalizam que, nessa linhagem celular, o MIF não parece potencializar os fenótipos tumorais e metastáticos avaliados neste estudo, mesmo na presença de SRPK1/2.

8 LIMITAÇÕES

Embora o uso de dois experimentos independentes nos ensaios com rMIF seja uma limitação, os resultados obtidos foram consistentes em demonstrar a ausência de efeito do tratamento sobre as SRPKs e os fenótipos tumorais associados a essas quinases na linhagem B16-F10. Esse cenário é reforçado pelo fato dessa linhagem não expressar os receptores CD74/CD44 (Culp et al., 2007). Dado que a interação entre SRPK2 e CD74 já foi sugerida em estudos prévios (Mello, 2014), é provável que a ativação das SRPKs pelo rMIF dependa da presença desse receptor. No mesmo sentido, já se evidenciou que o MIF não promove alterações fenotípicas tumorais em B16-F10 *in vitro* (Girard et al., 2012). Portanto, a falta de resposta ao rMIF está de acordo com as evidências disponíveis, embora outras hipóteses não possam ser totalmente descartadas.

9 PERSPECTIVAS FUTURAS

Esta investigação teve como foco principal avaliar se o MIF é capaz de ativar as proteínas-quinase SRPK1/2 em células B16-F10 e se essa ativação está associada a efeitos tumorais e metastáticos mais agressivos. Considerando a ausência dos receptores CD74/CD44 nessas células (Culp et al., 2007), bem como uma possível interação entre SRPK2 e CD74 (Mello, 2014), recomenda-se que estudos futuros utilizem linhagens de células tumorais que comprovadamente expressem esses receptores, a fim de esclarecer o papel do eixo MIF/CD74 na ativação das SRPKs e seus potenciais desdobramentos oncogênicos.

REFERÊNCIAS

ALBIGES-RIZO, C. et al. Actin machinery and mechanosensitivity in invadopodia, podosomes and focal adhesions. **J Cell Sci**, v. 122, n. 17, p. 3037-3049, 2009.

ANDRÉ, N. D. et al. Knockdown of chemokine receptor CXCR4 gene by RNA interference: Effects on the B16-F10 melanoma growth. **Oncol Rep**, v. 35, n. 4, p. 2419-2424, 2016.

ARUMUGAM, A.; SUBRAMANI, R.; LAKSHMANASWAMY, R. Involvement of actin cytoskeletal modifications in the inhibition of triple-negative breast cancer growth and metastasis by nimbolide. **Molecular Therapy Oncolytics**, v. 20, p. 596-606, 2021.

BEI, M.; XU, J. SR proteins in cancer: function, regulation, and small inhibitor. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 29, n. 1, p. 78, 2024.

BLACKIE, A. C.; FOLEY, D. J. Exploring the roles of the Cdc2-like kinases in cancers. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 70, p. 116914, 15 set. 2022.

BONI, J. et al. The DYRK family of kinases in cancer: molecular functions and therapeutic opportunities. **Cancers**, v. 12, p. 2106, 2020.

BRADLEY, R. K.; ANCZUKÓW, O. RNA splicing dysregulation and the hallmarks of cancer. **Nature Reviews Cancer**, 10 jan. 2023.

BRAEUER, R. R. et al. Why is melanoma so metastatic? **Pigment Cell Melanoma Res**, v. 27, n. 1, p. 19-36, 2014.

BRIX, N. et al. Analysis of clonogenic growth in vitro. **Nat Protoc**, v. 16, p. 4963–4991, 2021.

BUSCH, A.; HERTEL, K. J. Evolution of SR protein and hnRNP splicing regulatory factors. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 3, n. 1, p. 1–12, 2 set. 2011.

CAETANO, M. M. M. et al. Impaired expression of serine/arginine protein kinase 2 (SRPK2) affects melanoma progression. **Front Genet**, v. 13, p. 979735, 2022.

CHANGPHASUK, P. et al. SRPK Inhibitors Reduce the Phosphorylation and Translocation of SR Protein Splicing Factors, thereby Correcting BIN1, MCL-1 and BCL2 Splicing Errors and Enabling Apoptosis of Cholangiocarcinoma Cells. **Front Biosci (Schol Ed)**, v. 16, n. 3, p. 17, 2024.

CHARAN, M. et al. Macrophage migration inhibitory factor inhibition as a novel therapeutic approach against triple-negative breast cancer. **Cell Death Dis**, v. 11, p. 774, 2020.

CHEN, W. et al. Roles and mechanisms of aberrant alternative splicing in melanoma — implications for targeted therapy and immunotherapy resistance. **Cancer Cell Int**, v. 24, p. 101, 2024.

CRAMER, P. Organization and regulation of gene transcription. **Nature**, v. 573, n. 7772, p. 45–54, 28 ago. 2019.

CUI, H. W. et al. Synthesis and biological evaluation of D-ring fused 1,2,3-thiadiazole dehydroepiandrosterone derivatives as antitumor agents. **Eur J Med Chem**, v. 111, p. 126-137, 2016.

CULP, W. D. et al. Interference of macrophage migration inhibitory factor expression in a mouse melanoma inhibits tumor establishment by up-regulating thrombospondin-1. **Mol Cancer Res**, v. 5, n. 12, p. 1225-1231, 2007.

DA SILVA, M. R. et al. Splicing Regulators and Their Roles in Cancer Biology and Therapy. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 150514, 2015.

DUGGAN, W. P. et al. Serine-Arginine Protein Kinase 1 (SRPK1): a systematic review of its multimodal role in oncogenesis. **Mol Biol Rep**, v. 477, n. 10, p. 2451–2467, 18 maio 2022.

DUPUIS, J. et al. Insights from honeybee (*Apis mellifera*) and fly (*Drosophila melanogaster*) nicotinic acetylcholine receptors: from genes to behavioral functions. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 36, n. 6, p. 1553-64, 2012.

DVINGE, H. Regulation of alternative mRNA splicing: old players and new perspectives. **FEBS Letters**, v. 592, n. 17, p. 2987–3006, 16 jun. 2018.

EDDY, K.; SHAH, R.; CHEN, S. Decoding Melanoma Development and Progression: Identification of Therapeutic Vulnerabilities. **Front Oncol**, v. 10, p. 626129, 2021.

FAN, C. C. et al. EFHD2 promotes epithelial-to-mesenchymal transition and correlates with postsurgical recurrence of stage I lung adenocarcinoma. **Scientific Reports**, v. 7, p. 14617, 2017.

FAN, H. et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor and CD74 Regulate Macrophage Chemotactic Responses via MAPK and Rho GTPase. **J Immunol**, v. 186, n. 8, p. 4915–4924, 2011.

FARR, L.; GHOSH, S.; MOONAH, S. Role of MIF Cytokine/CD74 Receptor Pathway in Protecting Against Injury and Promoting Repair. **Front Immunol**, v. 11, p. 1273, 2020.

FEY, R. M. et al. MIF and CD74 as Emerging Biomarkers for Immune Checkpoint Blockade Therapy. **Cancers**, v. 16, n. 9, p. 1773, 2024.

FIGUEIREDO, C. R. et al. Blockade of MIF-CD74 Signalling on Macrophages and Dendritic Cells Restores the Antitumour Immune Response Against Metastatic Melanoma. **Front Immunol**, v. 9, p. 1132, 2018.

FRANKEN, N. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nat Protoc**, v. 1, p. 2315–2319, 2006.

FUKUDA, Y. et al. Interplay between soluble CD74 and macrophage-migration inhibitory factor drives tumor growth and influences patient survival in melanoma. **Cell Death Dis**, v. 13, p. 117, 2022.

GAMMONS, M. V. et al. Targeting SRPK1 to control VEGF-mediated tumour angiogenesis in metastatic melanoma. **British Journal of Cancer**, v. 111, n. 3, p. 477–485, 2014.

GASTONGUAY, A. et al. The role of Rac1 in the regulation of NF- κ B activity, cell proliferation, and cell migration in non-small cell lung carcinoma. **Cancer Biology & Therapy**, v. 13, n. 8, p. 647-656, jun. 2012.

GIANNAKOUROS, T. et al. Serine-arginine protein kinases: a small protein kinase family with a large cellular presence. **FEBS Journal**, v. 278, n. 4, p. 570-586, 2011.

GIRARD, E. et al. Macrophage migration inhibitory factor produced by the tumour stroma but not by tumour cells regulates angiogenesis in the B16-F10 melanoma model. **Br J Cancer**, v. 107, n. 9, p. 1498-505, 2012.

GONG, H. et al. Evaluation of candidate reference genes for RT-qPCR studies in three metabolism related tissues of mice after caloric restriction. **Sci Rep**, v. 6, p. 38513, 2016.

GOUT, S. et al. Abnormal Expression of the Pre-mRNA Splicing Regulators SRSF1, SRSF2, SRPK1 and SRPK2 in Non Small Cell Lung Carcinoma. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. e46539, 10 out. 2012.

GRAVELEY, B. R. Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. **Trends Genet**, v. 17, n. 2, p. 100–107, 1 fev. 2001.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31-46, 2022.

HEINRICHS, D. et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) exerts antifibrotic effects in experimental liver fibrosis via CD74. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 42, p. 17444-9, 2011.

HOGG, E. K. J.; FINDLAY, G. M. Functions of SRPK, CLK and DYRK kinases in stem cells, development, and human developmental disorders. **FEBS Letters**, v. 597, n. 19, p. 2375-2415, out. 2023.

HU, C. T. et al. MIF, secreted by human hepatic sinusoidal endothelial cells, promotes chemotaxis and outgrowth of colorectal cancer in liver prometastasis. **Oncotarget**, v. 6, n. 26, p. 22410-23, 2015.

HUANG, J. Q. et al. SRPK1/AKT axis promotes oxaliplatin-induced anti-apoptosis via NF- κ B activation in colon cancer. **Journal of Translational Medicine**, v. 19, n. 1, p. 280, 2021.

HUANG, J. Q. et al. Serine-arginine protein kinase 1 (SRPK1) promotes EGFR-TKI resistance by enhancing GSK3 β Ser9 autophosphorylation independent of its kinase activity in non-small-cell lung cancer. **Oncogene**, v. 42, p. 1233–1246, 2023.

IMAOKA, M. et al. Macrophage migration inhibitory factor-CD74 interaction regulates the expression of programmed cell death ligand 1 in melanoma cells. **Cancer Sci**, v. 110, n. 7, p. 2273-2283, 2019.

IVES, A. et al. Macrophage migration inhibitory factor promotes the migration of dendritic cells through CD74 and the activation of the Src/PI3K/myosin II pathway. **FASEB J**, v. 35, n. 5, p. e21418, 2021.

IZDEBSKA, M. et al. The Role of Actin Dynamics and Actin-Binding Proteins Expression in Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Its Association with Cancer Progression and Evaluation of Possible Therapeutic Targets. **Biomed Res Int**, v. 2018, p. 4578373, 16 jan. 2018.

JANG, S. W. et al. Serine/Arginine Protein-Specific Kinase 2 Promotes Leukemia Cell Proliferation by Phosphorylating Acinus and Regulating Cyclin A1. **Cancer Res**, v. 68, n. 12, p. 4559–4570, 15 jun. 2008.

JANKAUSKAS, S. S. et al. Evolving complexity of MIF signaling. **Cell Signal**, v. 57, p. 76-88, 2019.

JARNUCZAK, A. F. et al. An integrated landscape of protein expression in human cancer. **Scientific Data**, v. 8, p. 115, 2021.

KĘDZIERSKA, H.; PIEKIELKO-WITKOWSKA, A. Splicing factors of SR and hnRNP families as regulators of apoptosis in cancer. **Cancer Letters**, v. 396, p. 53–65, jun. 2017.

KEIBLER, M. A. et al. Metabolic requirements for cancer cell proliferation. **Cancer Metabolism**, v. 4, p. 16, 2016.

KIM, M. J. et al. Macrophage migration inhibitory factor interacts with thioredoxin-interacting protein and induces NF- κ B activity. **Cell Signal**, v. 34, p. 110-120, 2017.

KITA, K. et al. Cytoskeletal Actin Structure in Osteosarcoma Cells Determines Metastatic Phenotype via Regulating Cell Stiffness, Migration, and Transmigration. **Curr Issues Mol Biol**, v. 43, p. 1255-1266, 2021.

KLASEN, C. et al. MIF promotes B cell chemotaxis through the receptors CXCR4 and CD74 and ZAP-70 signaling. **J Immunol**, v. 192, n. 11, p. 5273-84, 2014.

KOBOLD, S. et al. The macrophage migration inhibitory factor (MIF)-homologue D-dopachrome tautomerase is a therapeutic target in a murine melanoma model. **Oncotarget**, v. 5, n. 1, p. 103-107, jan. 2014.

LI, G. Q. et al. Macrophage migration inhibitory factor regulates proliferation of gastric cancer cells via the PI3K/Akt pathway. **World Journal of Gastroenterology**, v. 15, n. 44, p. 5541-5548, 28 nov. 2009.

LI, R. Q. et al. CD74 as a prognostic and M1 macrophage infiltration marker in a comprehensive pan-cancer analysis. **Sci Rep**, v. 14, p. 8125, 2024.

LONG, G. V. et al. Cutaneous melanoma. **Lancet**, v. 402, n. 10400, p. 485-502, 2023.

LUE, H. et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promotes cell survival by activation of the Akt pathway and role for CSN5/JAB1 in the control of autocrine MIF activity. **Oncogene**, v. 26, n. 35, p. 5046-5059, 2 ago. 2007.

LUO, Y. et al. Macrophage migration inhibitory factor in the pathogenesis of leukemia (Review). **International Journal of Oncology**, v. 59, n. 2, p. 62, ago. 2021.

MASSAGUÉ, J.; OBENAU, A. Metastatic colonization by circulating tumour cells. **Nature**, v. 529, p. 298–306, 2016.

MELLO, Aline Oliveira. **Identificação de parceiros de interação para a cinase reguladora de *splicing* SRPK2**. 2014. 91 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) – Departamento de Biologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

MOORE, M. J.; PROUDFOOT, N. J. Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 688–700, 20 fev. 2009.

MORA BARTHELMESS, R.; STIJLEMANS, B.; VAN GINDERACHTER, J. A. Hallmarks of Cancer Affected by the MIF Cytokine Family. **Cancers**, v. 15, n. 2, p. 395, 2023.

MOREIRA, G. A. et al. Antimetastatic effect of the pharmacological inhibition of serine/arginine-rich protein kinases (SRPK) in murine melanoma. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 356, p. 214-223, 2018.

MOREIRA, Gabriela Alves. **Inibição farmacológica das Serine Arginine Protein Kinases (SRPKs): potencial papel na metástase e na atividade imunológica no microambiente do melanoma murino**. 2020. 126 f. Tese (Doutorado em Bioquímica Aplicada) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2020.

NAIR, A. et al. Conceptual Evolution of Cell Signaling. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 13, p. 3292, 2019.

NAKAGAWA, O. Centronuclear myopathy in mice lacking a novel muscle-specific protein kinase transcriptionally regulated by MEF2. **Genes & Development**, v. 19, n. 17, p. 2066–2077, 1 set. 2005.

NARO, C.; BIELLI, P.; SETTE, C. Oncogenic dysregulation of pre-mRNA processing by protein kinases: challenges and therapeutic opportunities. **FEBS Journal**, v. 288, n. 21, p. 6250–6272, 27 jun. 2021.

NGO, J. C. K. et al. Interplay between SRPK and Clk/Sty Kinases in Phosphorylation of the Splicing Factor ASF/SF2 Is Regulated by a Docking Motif in ASF/SF2. **Molecular Cell**, v. 20, n. 1, p. 77–89, out. 2005.

NIKAS, I. P. et al. Serine-Arginine Protein Kinase 1 (SRPK1) as a Prognostic Factor and Potential Therapeutic Target in Cancer: Current Evidence and Future Perspectives. **Cells**, v. 9, n. 1, p. 19, 2019.

NIKOLAKAKI, E.; SIGALA, I.; GIANNAKOUROS, T. Good Cop, Bad Cop: The Different Roles of SRPKs. **Frontiers in Genetics**, v. 13, 2 jun. 2022.

NOE, J. T.; MITCHELL, R. A. MIF-Dependent Control of Tumor Immunity. **Front Immunol**, v. 11, p. 609948, 2020.

OGATA, D. et al. The Expression of CD74-Regulated Inflammatory Markers in Stage IV Melanoma: Risk of CNS Metastasis and Patient Survival. **Cancers**, v. 12, n. 12, p. 3754, 2020.

OH, D. Y. et al. Toward a better understanding of T cells in cancer. **Cancer Cell**, v. 39, n. 12, p. 1549-1552, 2021.

OLIVEIRA, C. S. et al. Macrophage migration inhibitory factor engages PI3K/Akt signalling and is a prognostic factor in metastatic melanoma. **BMC Cancer**, v. 14, p. 630, ago. 2014.

OSER, M. et al. Specific tyrosine phosphorylation sites on cortactin regulate Nck1-dependent actin polymerization in invadopodia. **J Cell Sci**, v. 123, n. 21, p. 3662-73, 2010.

OSTROWSKI, S. M.; FISHER, D. E. Biology of Melanoma. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 35, n. 1, p. 29-56, 2021.

PAPIER, K. et al. Identifying proteomic risk factors for cancer using prospective and exome analyses of 1463 circulating proteins and risk of 19 cancers in the UK Biobank. **Nature Communications**, v. 15, p. 4010, 2024.

QUAN, J. H. et al. VEGF Production Is Regulated by the AKT/ERK1/2 Signaling Pathway and Controls the Proliferation of *Toxoplasma gondii* in ARPE-19 Cells. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 10, p. 184, 2020.

RIZZACASA, B. et al. MiR-423 is differentially expressed in patients with stable and unstable coronary artery disease: A pilot study. **PLoS One**, v. 14, n. 5, p. e0216363, 6 maio 2019.

SAGINALA, K. et al. Epidemiology of Melanoma. **Med Sci (Basel)**, v. 9, n. 4, p. 63, 2021.

SAHU, S. S.; PANDA, G. Identification of Protein-Coding Regions in DNA Sequences Using A Time-Frequency Filtering Approach. *Genomics*, **Proteomics & Bioinformatics**, v. 9, n. 1-2, p. 45–55, abr. 2011.

SCHADENDORF, D. et al. Melanoma. **Nat Rev Dis Primers**, v. 1, p. 15003, 2015.

SCHAKS, M.; GIANNONE, G.; ROTTNER, K. Actin dynamics in cell migration. **Essays Biochem**, v. 63, n. 5, p. 483-495, 2019.

SEVER, R.; BRUGGE, J. S. Signal transduction in cancer. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 5, n. 4, p. a006098, 2015.

SHILO, A.; SIEGFRIED, Z.; KARNI, R. The role of splicing factors in deregulation of alternative splicing during oncogenesis and tumor progression. **Molecular & Cellular Oncology**, v. 2, n. 1, p. e970955, dez. 2014.

SIEGEL, R. L.; GIAQUINTO, A. N.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2024. **CA Cancer J Clin**, v. 74, n. 1, p. 12-49, 2024.

SIQUEIRA, R. P. et al. Potential Antileukemia Effect and Structural Analyses of SRPK Inhibition by N-(2-(Piperidin-1-yl)-5-(Trifluoromethyl)Phenyl)Isonicotinamide (SRPIN340). **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. e0134882, 5 ago. 2015.

SOUMOY, L. et al. Role of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in Melanoma. **Cancers**, v. 11, n. 4, p. 529, 2019.

SUPRADIT, K. et al. Inhibition of serine/arginine-rich protein kinase-1 (SRPK1) prevents cholangiocarcinoma cells induced angiogenesis. **Toxicol In Vitro**, v. 82, p. 105385, 2022.

SVITKINA, T. The Actin Cytoskeleton and Actin-Based Motility. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 10, n. 1, p. a018267, 2 jan. 2018.

TANESE, K. et al. Cell Surface CD74-MIF Interactions Drive Melanoma Survival in Response to Interferon- γ . **J Invest Dermatol**, v. 135, n. 11, p. 2775-2784, 2015.

TANESE, K.; OGATA, D. The role of macrophage migration inhibitory factor family and CD74 in the pathogenesis of melanoma. **Exp Dermatol**, v. 33, n. 6, p. e15122, 2024.

TANG, J. et al. A critical update on the strategies towards small molecule inhibitors targeting Serine/arginine-rich (SR) proteins and Serine/arginine-rich proteins related kinases in alternative splicing. **Bioorg Med Chem**, v. 70, p. 116921, 2022.

TARANTO, E. et al. Modulation of expression and cellular distribution of p21 by macrophage migration inhibitory factor. **J Inflamm (Lond)**, v. 6, p. 24, 2009.

TUFAIL, M.; WU, C. SRPKs: a promising therapeutic target in cancer. **Clin Exp Med**, v. 23, n. 7, p. 3093-3112, 2023.

VALDEZ, C. N. et al. Prognostic and therapeutic insights into MIF, DDT, and CD74 in melanoma. **Oncotarget**, v. 15, p. 507-520, 2024.

VALE, J. A. D. et al. Synthesis of cinnamic acid ester derivatives with antiproliferative and antimetastatic activities on murine melanoma cells. **Biomed Pharmacother**, v. 148, p. 112689, abr. 2022.

VAN ROOSMALEN, W. et al. Tumor cell migration screen identifies SRPK1 as breast cancer metastasis determinant. **Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 4, p. 1648-1664, abr. 2015.

VENABLES, J. P. Unbalanced alternative splicing and its significance in cancer. **BioEssays**, v. 28, n. 4, p. 378–386, 2006.

WAN, L.; DENG, M.; ZHANG, H. SR Splicing Factors Promote Cancer via Multiple Regulatory Mechanisms. **Genes**, v. 13, p. 1659, 2022.

WANG, C. et al. SRPK1 acetylation modulates alternative splicing to regulate cisplatin resistance in breast cancer cells. **Communications Biology**, v. 3, n. 1, 27 maio 2020.

WANG, F. et al. Involvement of SRPK1 in cisplatin resistance related to long non-coding RNA UCA1 in human ovarian cancer cells. **Neoplasma**, v. 62, n. 3, p. 432–438, 2015.

WANG, G. et al. Cooperation of SRPK2, Numb and p53 in the malignant biology and chemosensitivity of colorectal cancer. **Biosci Rep**, v. 40, n. 1, 1 jan. 2020.

WANG, G. et al. Serine/arginine protein-specific kinase 2 promotes the development and progression of pancreatic cancer by downregulating Numb and p53. **FEBS J**, v. 286, n. 9, p. 1668–1682, 1 mar. 2019.

WANG, J. et al. CD74-AKT Axis Is a Potential Therapeutic Target in Triple-Negative Breast Cancer. **Biology**, v. 13, n. 7, p. 481, 2024.

WANG, J. et al. SRPK2 promotes the growth and migration of the colon cancer cells. **Cancer Science**, v. 586, n. 1, p. 41–47, 1 jul. 2016.

WANG, S. et al. RNA-binding proteins and cancer metastasis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 86, Pt 2, p. 748-768, nov. 2022.

WANG, Y. et al. Mechanism of alternative splicing and its regulation. **Biomedical Reports**, v. 3, n. 2, p. 152–158, 17 dez. 2014.

WANG, Z.; BURGE, C. B. Splicing regulation: From a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. **RNA**, v. 14, n. 5, p. 802–813, 27 mar. 2008.

WILL, C. L.; LUHRMANN, R. Spliceosome Structure and Function. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 7, p. a003707, 30 dez. 2010.

WU, Z. et al. The role of angiogenesis in melanoma: Clinical treatments and future expectations. **Front Pharmacol**, v. 13, p. 1028647, 15 dez. 2022.

XU, S. et al. CXCR7 promotes melanoma tumorigenesis via Src kinase signaling. **Cell Death Dis**, v. 10, p. 191, 2019.

YANG, Q. et al. Aberrant alternative splicing in breast cancer. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 10, p. 920–929, 8 maio 2019.

YANG, Y.; CAO, Y. The impact of VEGF on cancer metastasis and systemic disease. **Semin Cancer Biol**, v. 32, p. 251–261, 2022.

ZHANG, F. et al. MIF aggravates experimental autoimmune prostatitis through activation of the NLRP3 inflammasome via the PI3K/AKT pathway. **Int Immunopharmacol**, v. 141, p. 112891, 15 nov. 2024.

ZHANG, J.; MANLEY, J. L. Misregulation of Pre-mRNA Alternative Splicing in Cancer. **Cancer Discovery**, v. 3, n. 11, p. 1228–1237, 21 out. 2013.

ZHANG, L. et al. CD74 is a functional MIF receptor on activated CD4+ T cells. **Cell Mol Life Sci**, v. 81, n. 1, p. 296, 11 jul. 2024.

ZHANG, S. et al. Tumor initiation and early tumorigenesis: molecular mechanisms and interventional targets. **Sig Transduct Target Ther**, v. 9, p. 149, 2024.

ZHANG, Y. et al. Alternative splicing and cancer: a systematic review. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, p. 1–14, 24 fev. 2021.

ZHONG, X. Y. et al. Regulation of SR protein phosphorylation and alternative splicing by modulating kinetic interactions of SRPK1 with molecular chaperones. **Genes & Development**, v. 23, n. 4, p. 482–495, 15 fev. 2009.

ZHOU, Z. et al. Emerging Roles of SRSF3 as a Therapeutic Target for Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 10, 25 set. 2020.

ZHOU, Z. et al. The Akt-SRPK-SR axis constitutes a major pathway in transducing EGF signaling to regulate alternative splicing in the nucleus. **Mol Cell**, v. 47, n. 3, p. 422-33, 10 ago. 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, 1 jun. 2013.

ZHU, J. Pre-mRNA splicing in the absence of an SR protein RS domain. **Genes & Development**, v. 14, n. 24, p. 3166–3178, 15 dez. 2000.

ZHU, S. et al. Comprehensive systems biology analysis reveals splicing factor contributions to cutaneous melanoma progression. **Sci Rep**, v. 15, p. 9486, 2025.

ZHUO, Y. et al. Enhanced expression of SRPK2 contributes to aggressive progression and metastasis in prostate cancer. **Biomed Pharmacother**, v. 102, p. 531–538, 1 jun. 2018.

SEÇÃO 2 – UMA REVISÃO SISTEMÁTICA SOBRE O PAPEL MULTIFACETADO DA QUINASE SRPK2 EM DIFERENTES TIPOS DE CÂNCER

1 INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

O câncer é uma doença caracterizada por células malignas que crescem, proliferam e sobrevivem de forma desregulada (Pavel et al., 2018; Shen et al., 2020). Essas características estão intimamente associadas a alterações no metabolismo celular e na expressão gênica, as quais favorecem a produção de macromoléculas essenciais ao crescimento celular e influenciam a geração de proteínas relacionadas ao câncer (Boroughs, DeBerardinis, 2015; Boussios et al., 2023).

Tanto as modificações metabólicas quanto as mudanças na expressão de genes, como as alterações epigenéticas, promovem distúrbios no controle genético (Ilango et al., 2020; Tran et al., 2017). Como consequência, erros no reparo de danos ao DNA, além de rearranjos cromossômicos aleatórios, são comumente observados nas células cancerígenas (Alhmoud et al., 2020; Torgovnick, Schumacher, 2015; Yoshioka et al., 2021). Esses fatores contribuem para o acúmulo de mutações e o desenvolvimento de instabilidade genômica, um processo que favorece a carcinogênese (Alhmoud et al., 2020; Yoshioka et al., 2021).

Nos cânceres, além das alterações genéticas, a regulação pós-transcricional da expressão gênica, especialmente o *splicing* alternativo, um evento de processamento de pré-mRNAs, também se encontra desregulada (Zhang et al., 2021). Em geral, há um aumento da expressão de proteínas-chave que controlam o *splicing*, o que gera distúrbios nesse evento (Sciarrillo et al., 2020). Tais desordens provocam erros no processamento de transcritos primários de RNA, resultando na produção de isoformas de mRNAs aberrantes que levam à produção de proteínas associadas ao câncer (Choi et al., 2023).

Já está bem documentado que as alterações no *splicing* alternativo, que são reconhecidas como uma característica (*hallmark*) do câncer, podem contribuir para a resistência das células tumorais às terapias antineoplásicas, além de favorecerem a ocorrência de metástases e a tumorigênese (Deng et al., 2021; Ladomery et al., 2013; Marzese et al., 2018; Oltean, Bates, 2014). Diante disso, a compreensão de proteínas-chave que regulam essas modificações e suas potenciais participações funcionais em vias de sinalização celular é importante para elucidar os mecanismos moleculares que favorecem o desenvolvimento de diferentes tipos de câncer.

Dentre as proteínas implicadas nas alterações do *splicing* alternativo em células cancerígenas, destacam-se as quinases SRPK1 e SRPK2 (Wang et al., 2019; Wang et al., 2020). Essas proteínas pertencem à família das proteínas quinases específicas de serina/arginina (SRPKs) e atuam no controle do *splicing* por meio da fosforilação de proteínas da família SR (SRSFs), que são proteínas de ligação ao RNA (Aubol et al., 2016; Long et al., 2019; Zhou et al., 2012). As SRSFs, ao se associarem ao pré-mRNA, selecionam os sítios de *splicing* e auxiliam na montagem do *spliceossomo*, que catalisa a reação de *splicing* (Shepard, Hertel, 2009).

Um vasto corpo de literatura, incluindo pesquisas experimentais e artigos de revisão, tem se dedicado à investigação da SRPK1 no contexto do câncer (Bullock; Oltean, 2017; He et al., 2022; Huang et al., 2021; 2023; Nikas et al., 2019; Patel et al., 2019). Recentemente, Duggan e colaboradores (2022) publicaram uma revisão sistemática sobre essa quinase em neoplasias, demonstrando que a SRPK1 atua não apenas no *splicing* alternativo, mas também em outras vias de sinalização para promover a progressão tumoral. Assim, os papéis oncogênicos da SRPK1 são relativamente bem caracterizados.

Particularmente quanto à SRPK2, apesar de existirem diversos estudos investigando sua função em uma ampla gama de cânceres (Caetano et al., 2022; McClellan et al., 2022), há uma carência na literatura de revisões sistemáticas abrangentes sobre o papel dessa proteína no contexto oncológico, que abordem sua participação em múltiplos mecanismos de progressão tumoral, como em vias de sinalização cancerígenas, bem como suas implicações prognósticas e os potenciais efeitos terapêuticos decorrentes de sua inibição. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo realizar uma revisão sistemática sobre o papel multivariado da SRPK2 em diferentes tipos de câncer, com o objetivo de elucidar essa complexa questão.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SRPK1/2 e seus papéis diversificados em cânceres

Um crescente número de estudos vem sendo realizado a fim de investigar a participação das SRPKs em diferentes tipos de câncer (Tufail, Wu, 2023). Tanto a SRPK1 quanto a SRPK2 têm se mostrado como importantes atores no orquestramento oncológico.

A maior parte das pesquisas concentra-se no papel da SRPK1. Essa proteína tem sido apontada como fundamental para o desenvolvimento de diversos tipos de câncer além de metástases, sendo seu nível de expressão frequentemente associado a piores prognósticos de sobrevida e à resistência a tratamentos antineoplásicos (Duggan et al., 2022; Nikas et al., 2019).

Nesse contexto, estudos já demonstraram que a expressão elevada de SRPK1 está associada à menor sobrevida de pacientes oncológicos e a estágios tumorais mais avançados (He et al., 2022; Huang et al., 2021; Xu et al., 2017; Yi et al., 2018). Ademais, essa proteína-quinase tem sido implicada na promoção de metástases e na progressão tumoral (Malvi et al., 2020; Van et al., 2015).

Ainda nesse cenário, foi reportado que a SRPK1 pode contribuir com a resistência de células cancerígenas de pulmão à terapia com inibidores de receptores de tirosina quinase. Mecanicamente, a SRPK1, através de sua região espaçadora, interage com GSK3 β , promovendo sua autofosforilação. A GSK3 β autofosforilada atua na fosforilação dos receptores de tirosina quinase, desregulando assim vias de sinalização celular associadas a esses receptores e aumentando a viabilidade celular. Além disso, paralelamente, promove a ativação da β -Catenina, induzindo a expressão de genes antiapoptóticos. Assim, o eixo SRPK1-GSK3 β - β -Catenina induz a resistência das células tumorais ao tratamento com inibidores de tirosina quinase (Huang et al., 2023).

De forma complementar, numerosos estudos têm reportado que a SRPK1 está envolvida na resistência de células tumorais a tratamentos quimioterápicos (He et al., 2022; Huang et al., 2021; Wang et al., 2020). Foi revelado que a SRPK1 é capaz de fosforilar a Akt, que por sua vez fosforila o NF-kB. Como consequência, a subunidade p65, que é uma parte integrante do fator transcricional NF-kB, é translocada para o núcleo celular, onde regula a expressão de genes que promovem a resistência das células tumorais de câncer de cólon ao quimioterápico oxaliplatina (Huang et al., 2021).

Vários estudos de revisão têm sido conduzidos com o intuito de aprofundar o entendimento sobre o potencial prognóstico da SRPK1 em diversos tipos de câncer e de compreender sua

participação em diferentes vias de sinalização celular envolvidas na tumorigênese (Duggan et al., 2022; Nikas et al., 2019; Patel et al., 2019). Dessa forma, o entendimento atual sobre SRPK1 encontra-se mais consolidado.

Em relação à SRPK2, pesquisas também apontam para uma forte associação com o câncer, sugerindo um papel importante dessa quinase no ambiente tumoral (Lee et al., 2017; Li et al., 2019; McClellan et al., 2022; Wang et al., 2016; Wang et al., 2020; Zhuo et al., 2018). Por exemplo, um estudo conduzido por Caetano e colaboradores (2022) mostrou, através de análise de células individuais de pacientes de melanoma, que a expressão da SRPK2 supera a da SRPK1. Além disso, o silenciamento da SRPK2 em células de melanoma murino, inoculadas em modelo animal, resultou em menor crescimento tumoral e redução da capacidade metastática (Caetano et al., 2022), sugerindo seu envolvimento na agressividade tumoral.

Ademais, foi evidenciado que a expressão elevada da SRPK2 favorece a agressividade do câncer de próstata, além de promover metástases e estar relacionada com uma menor sobrevida dos pacientes (Zhuo et al., 2018). De modo semelhante, em câncer de cólon, foi relatado que a superexpressão da SRPK2 favorece o crescimento e a migração de células tumorais por meio da ativação da via de sinalização de ERK - conhecida por participar da resistência de células tumorais a drogas anticancerígenas (Wang et al., 2016).

Em pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas, a elevação na expressão de SRPK2 correlaciona-se com pior prognóstico e maior proliferação celular (Li et al., 2019).

No câncer de mama, estudos indicam que a SRPK2 favorece a expressão do mRNA da ácido graxo sintase FASN, a qual está associada à agressividade da doença (McClellan et al., 2022). Mecanicamente, o fator de crescimento IGF-1 ativa o complexo mTORC1, o qual ativa a SRPK2. Então, a SRPK2 promove a ativação de proteínas SR reguladoras de *splicing*, especialmente a SRSF1, para promover o processamento de pré-mRNAs de FASN (McClellan et al., 2022). A FASN, por sua atuação no metabolismo lipídico, pode induzir o crescimento de células tumorais mamárias (Lee et al., 2017).

Embora existam evidências consistentes sobre o papel pleiotrópico da SRPK2 e os efeitos terapêuticos decorrentes de sua inibição em variados tipos de câncer (Caetano et al., 2022, Zhuo et al., 2018), torna-se necessário um esforço sistemático para sintetizar esse conhecimento. Nesse sentido, destaca-se a importância das revisões sistemáticas.

A revisão sistemática é um método reproduzível que sintetiza evidências relevantes sobre um determinado assunto por meio de etapas rigorosas e metodologia reproduzível, incluindo a definição de critérios de elegibilidade, extração de dados, avaliação do risco de viés, síntese dos resultados e interpretação dos achados. Trata-se de uma ferramenta importante para o entendimento e aprofundamento de questões críticas relacionadas à saúde (Al-Khabori et al., 2022; Brignardello-Petersen et al., 2025).

Sob essa perspectiva, a presente pesquisa objetiva realizar uma revisão sistemática sobre o papel multifacetado da SRPK2 em diferentes tipos de câncer, sintetizando as evidências que relacionam essa quinase aos fenótipos tumorais e metastáticos e às vias de sinalização oncogênicas potencialmente envolvidas, além de abordar suas implicações prognósticas. Busca-se, ainda, sumarizar os efeitos das terapias antitumorais direcionadas à SRPK2, com o propósito de aprofundar a compreensão sobre sua atuação em variados contextos tumorais e os desfechos decorrentes de sua inibição.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Analisar sistematicamente o papel multifacetado da SRPK2 em diferentes tipos de câncer.

3.2 Objetivos Específicos:

1. Identificar as implicações prognósticas de SRPK2 em cânceres;
2. Sintetizar as vias de sinalização celular nas quais a SRPK2 atua para favorecer a tumorigênese;
3. Compreender o impacto da expressão da SRPK2 nos fenótipos tumorais e/ou metastáticos em distintos tipos de câncer
4. Sumarizar os efeitos terapêuticos promovidos pela inibição de SRPK2, mediados por intervenções farmacológicas e/ou genéticas, sobre os desfechos antitumorais e antimetastáticos em diferentes tipos de câncer.

REFERÊNCIAS

- ALHMOUD, J. F. et al. DNA Damage/Repair Management in Cancers. **Cancers (Basel)**, v. 12, n. 4, p. 1050, 23 abr. 2020.
- AL-KHABORI, M.; RASOOL, W. Introduction to Systematic Reviews and Meta-analyses of Therapeutic Studies. **Oman Med J**, v. 37, n. 5, p. e428, 30 set. 2022.
- AUBOL, B. E. et al. Release of SR Proteins from CLK1 by SRPK1: A Symbiotic Kinase System for Phosphorylation Control of Pre-mRNA Splicing. **Mol Cell**, v. 63, n. 2, p. 218-228, 21 jul. 2016.
- BOROUGHES, L.; DEBERARDINIS, R. Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. **Nat Cell Biol**, v. 17, p. 351–359, 2015.
- BOUSSIOS, S.; SANCHEZ, E.; SHERIFF, M. Frontiers of Molecular Biology of Cancer. **Int J Mol Sci**, v. 24, n. 24, p. 17187, 6 dez. 2023.
- BRIGNARDELLO-PETERSEN, R.; SANTESSO, N.; GUYATT, G. H. Systematic reviews of the literature: an introduction to current methods. **Am J Epidemiol**, v. 194, n. 2, p. 536-542, 5 fev. 2025.
- BULLOCK, N.; OLTEAN, S. The many faces of SRPK1. **J Pathol**, v. 241, n. 4, p. 437-440, mar. 2017.
- CAETANO, M. M. M. et al. Impaired expression of serine/arginine protein kinase 2 (SRPK2) affects melanoma progression. **Front Genet**, v. 13, p. 979735, 23 set. 2022.
- CHOI, S. et al. The role of alternative pre-mRNA splicing in cancer progression. **Cancer Cell Int**, v. 23, p. 249, 2023.
- DENG, K. et al. Abnormal alternative splicing promotes tumor resistance in targeted therapy and immunotherapy. **Transl Oncol**, v. 14, n. 6, p. 101077, jun. 2021.
- DUGGAN, W. P. et al. Serine-Arginine Protein Kinase 1 (SRPK1): a systematic review of its multimodal role in oncogenesis. **Mol Cell Biochem**, v. 477, n. 10, p. 2451-2467, out. 2022.
- HE, C. et al. Inhibition of SRPK1, a key splicing regulator, exhibits antitumor and chemotherapeutic-sensitizing effects on extranodal NK/T-cell lymphoma cells. **BMC Cancer**, v. 22, p. 1100, 2022.
- HUANG, J. Q. et al. SRPK1/AKT axis promotes oxaliplatin-induced anti-apoptosis via NF- κ B activation in colon cancer. **J Transl Med**, v. 19, n. 1, p. 280, 30 jun. 2021.

HUANG, J. Q. et al. Serine-arginine protein kinase 1 (SRPK1) promotes EGFR-TKI resistance by enhancing GSK3 β Ser9 autophosphorylation independent of its kinase activity in non-small-cell lung cancer. **Oncogene**, v. 42, p. 1233–1246, 2023.

ILANGO, S. et al. Epigenetic alterations in cancer. **Front Biosci (Landmark Ed)**, v. 25, n. 6, p. 1058-1109, 1 mar. 2020.

LADOMERY, M. Aberrant alternative splicing is another hallmark of cancer. **Int J Cell Biol**, v. 2013, p. 463786, 2013.

LEE, G. et al. Post-transcriptional Regulation of De Novo Lipogenesis by mTORC1-S6K1-SRPK2 Signaling. **Cell**, v. 171, n. 7, p. 1545-1558, 14 dez. 2017.

LI, X. et al. Downregulation of SRPK2 promotes cell cycle arrest through E2F1 in non-small cell lung cancer. **European Journal of Histochemistry**, v. 63, n. 4, p. 229-239, 2019.

LONG, Y. et al. Distinct mechanisms govern the phosphorylation of different SR protein splicing factors. **J Biol Chem**, v. 294, n. 4, p. 1312-1327, 25 jan. 2019.

MALVI, P. et al. LIMK2 promotes the metastatic progression of triple-negative breast cancer by activating SRPK1. **Oncogenesis**, v. 9, p. 77, 2020.

MARZESE, D. M. et al. Alternative splicing and cancer metastasis: prognostic and therapeutic applications. **Clin Exp Metastasis**, v. 35, n. 5-6, p. 393-402, ago. 2018.

MCCLELLAN, B. et al. An IGF-1R-mTORC1-SRPK2 signaling Axis contributes to FASN regulation in breast cancer. **BMC Cancer**, v. 22, n. 1, p. 976, 2022.

NIKAS, I. P. et al. Serine-Arginine Protein Kinase 1 (SRPK1) as a Prognostic Factor and Potential Therapeutic Target in Cancer: Current Evidence and Future Perspectives. **Cells**, v. 9, n. 1, p. 19, 19 dez. 2019.

OLTEAN, S.; BATES, D. O. Hallmarks of alternative splicing in cancer. **Oncogene**, v. 33, n. 46, p. 5311-8, 13 nov. 2014.

PATEL, M.; SACHIDANANDAN, M.; ADNAN, M. Serine arginine protein kinase 1 (SRPK1): a moonlighting protein with theranostic ability in cancer prevention. **Molecular Biology Reports**, v. 46, n. 1, p. 1487-1497, fev. 2019.

PAVEL, M. et al. Contact inhibition controls cell survival and proliferation via YAP/TAZ-autophagy axis. **Nat Commun**, v. 9, p. 2961, 2018.

SCIARRILLO, R. et al. The role of alternative splicing in cancer: From oncogenesis to drug resistance. **Drug Resist Updat**, v. 53, p. 100728, dez. 2020.

SHEN, S.; VAGNER, S.; ROBERT, C. Persistent Cancer Cells: The Deadly Survivors. **Cell**, v. 183, n. 4, p. 860-874, 12 nov. 2020.

SHEPARD, P. J.; HERTEL, K. J. The SR protein family. **Genome Biol**, v. 10, p. 242, 2009.

TORGOVNICK, A.; SCHUMACHER, B. DNA repair mechanisms in cancer development and therapy. **Front Genet**, v. 6, p. 157, 23 abr. 2015.

TRAN, T. Q.; LOWMAN, X. H.; KONG, M. Molecular Pathways: Metabolic Control of Histone Methylation and Gene Expression in Cancer. **Clin Cancer Res**, v. 23, n. 15, p. 4004-4009, 1 ago. 2017.

TUFAIL, M.; WU, C. SRPKs: a promising therapeutic target in cancer. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 23, n. 4, p. 3093-3112, 2023.

VAN ROOSMALEN, W. et al. Tumor cell migration screen identifies SRPK1 as breast cancer metastasis determinant. **J Clin Invest**, v. 125, n. 4, p. 1648-64, abr. 2015.

WANG, C. et al. SRPK1 acetylation modulates alternative splicing to regulate cisplatin resistance in breast cancer cells. **Commun Biol**, v. 3, p. 268, 2020.

WANG, G. et al. Serine/arginine protein-specific kinase 2 promotes the development and progression of pancreatic cancer by downregulating Numb and p53. **FEBS Journal**, v. 286, n. 9, p. 1668-1682, maio 2019.

WANG, G. et al. Cooperation of SRPK2, Numb and p53 in the malignant biology and chemosensitivity of colorectal cancer. **Bioscience Reports**, v. 40, n. 1, p. BSR20191488, 31 jan. 2020.

WANG, J. et al. SRPK2 promotes the growth and migration of the colon cancer cells. **Gene**, v. 586, n. 1, p. 41-47, 15 jul. 2016.

XU, X. et al. Serine-arginine protein kinase 1 (SRPK1) is elevated in gastric cancer and plays oncogenic functions. **Oncotarget**, v. 8, n. 37, p. 61944-61957, 28 jun. 2017.

YI, N. et al. SRPK1 is a poor prognostic indicator and a novel potential therapeutic target for human colorectal cancer. **Onco Targets Ther**, v. 11, p. 5359-5370, 3 set. 2018.

YOSHIOKA, K. I. et al. Genomic Instability and Cancer Risk Associated with Erroneous DNA Repair. **Int J Mol Sci**, v. 22, n. 22, p. 12254, 12 nov. 2021.

ZHANG, Y.; QIAN, J.; GU, C. et al. Alternative splicing and cancer: a systematic review. **Sig Transduct Target Ther**, v. 6, p. 78, 2021.

ZHOU, Z. et al. The Akt-SRPK-SR Axis Constitutes a Major Pathway in Transducing EGF Signaling to Regulate Alternative Splicing in the Nucleus. **Molecular Cell**, v. 71, n. 5, p. 872, 10 ago. 2012.

ZHUO, Y. J. et al. Enhanced expression of SRPK2 contributes to aggressive progression and metastasis in prostate cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 102, p. 531-538, jun. 2018.

ARTIGO

Artigo publicado no *Journal of Cellular and Molecular Medicine* (ANEXO).

Oncogenic role of SRPK2 in different types of cancer: a systematic review

Samuel Inácio da Silva Paiva¹; Bárbara Braga Ferreira¹; Alexandre Martins Oliveira Portes²; Sebastião Felipe Ferreira Costa²; Luiz Otávio Guimarães Ervilha³; Raoni Pais Siqueira¹; Juliana Regina Ribeiro de Souza¹; Luciana Ângelo de Souza¹; Gustavo Costa Bressan^{1,4*}

Affiliations

¹ Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil;

² Departamento de Educação Física, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil;

³ Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil;

⁴ Instituto Nacional de Investigação em Mucosas e Pele (INCT Mucosa e Pele), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

***Corresponding author:** Gustavo Costa Bressan. Phone (+55) 31 3612-5116

Department of Biochemistry and Molecular Biology – Federal University of Viçosa, Av. P. H. Rolfs s/n, Viçosa, Minas Gerais, CEP: 36570-900, Brazil. E-mail: gustavo.bressan@ufv.br.

ORCID: orcid.org/0000-0002-9741-4554

Funding: This work was founded by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES (grant: Finance Code-001), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Minas Gerais/FAPEMIG (grants: APQ-01084-21; RED00096-22/Rede de Investigação em Mucosas e Pele; BPD-00827-22; RED-00067-23/Rede de Imunobiológicos and APQ-05143-23) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq (grants: 408484/2024-1/Instituto Nacional de Investigação em Mucosas e Pele/INCT Mucosa e Pele and 311163/2022-0).

Abstract:

A systematic review was conducted to evaluate the available evidence regarding the tumorigenic and metastatic roles of Serine/Arginine Protein Kinase 2 (SRPK2) across different cancer types. A range of preclinical studies was included, generally addressing four main aspects: cancer-related signaling pathways involving SRPK2; its prognostic associations; its impact on metastatic and/or tumor phenotypes; and the antitumor and/or antimetastatic effects resulting from its inhibition. Here, we summarize and discuss the mechanisms through which SRPK2 exerts its oncogenic functions, as well as the therapeutic potential of targeting this kinase. SRPK2 may promote cancer development through its canonical role in alternative splicing, as well as through its involvement in diverse cellular signaling pathways. Moreover, elevated SRPK2 expression across multiple human malignancies consistently correlates with poor clinical outcomes. Collectively, these findings highlight SRPK2 as a promising therapeutic target and potential tumor biomarker.

Keywords: Serine/Arginine Protein Kinase 2 (SRPK2), Cancer, Targeted Therapy, Tumor, Metastasis.

1. Introduction

Alternative splicing (AS) is a finely regulated post-transcriptional process in which introns are removed from primary mRNA transcripts and exons are joined in different combinations, resulting in the generation of distinct mature messenger RNA (mRNA) isoforms [1]. Under physiological conditions, AS contributes to the regulation of cellular functions and the maintenance of tissue homeostasis [2,3]. However, when dysregulated, AS can lead to the development of various diseases, including cancer [4,5].

In cancer, AS dysregulation promotes tumorigenesis by generating oncogenic mRNA isoforms that encode pro-tumorigenic proteins [6–8]. These proteins support uncontrolled cell proliferation, evasion of apoptosis, migration, invasion, and metabolic reprogramming [9–11]. In addition, alterations in AS may contribute to resistance to anticancer therapies [11]. Therefore, understanding the molecules involved in AS dysregulation, their roles in cellular signaling pathways, and their impact on tumorigenesis and metastasis is essential for deciphering this complex process in cancer biology.

In this context, serine/arginine protein kinase 1 and 2 (SRPK1 and SRPK2) play a central role in AS regulation [12]. These kinases are classically activated by the EGF/PI3K/Akt signaling pathway and function by phosphorylating serine/arginine-rich (SR) proteins, which regulate splice site selection and facilitate spliceosome assembly [13,14]. Both SRPK1 and SRPK2 are overexpressed in multiple cancer types and are directly associated with aberrant AS events that drive disease progression [15–17].

The oncogenic functions of SRPK1 are relatively well characterized. Its overexpression promotes carcinogenesis by enhancing cell proliferation, resistance to apoptosis, and chemoresistance [18–20]. The multifaceted roles of SRPK1 have been comprehensively reviewed elsewhere [21,22], including evidence that multiple signaling pathways regulate SRPK1 activity and contribute to cancer progression, supporting its relevance as a potential therapeutic target and prognostic biomarker [23].

In contrast, SRPK2 remains less well understood. Although elevated SRPK2 expression has been associated with aggressive tumor phenotypes [17,24–26] and involvement in diverse signaling pathways that promote tumor progression [27,28], a systematic understanding of its oncogenic functions and the effects of its inhibition is still lacking. This systematic review aims to synthesize the available evidence on SRPK2-related signaling pathways in cancer, their prognostic

implications, roles in tumor progression, and the potential antitumor and antimetastatic effects resulting from its inhibition.

2 Materials and Methods

2.1 Protocol and registration

This systematic review was conducted in accordance with the PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews) guidelines [31]. The methodological protocol was registered on the Open Science Framework (OSF) platform and is available at: <https://doi.org/10.17605/OSF.IO/W34RB>

2.2 Guiding questions

The primary guiding question of this review was: *What is the oncogenic role of SRPK2 in different types of cancer?*

The secondary questions were: (i) SRPK2 promotes what tumorigenic and metastatic impacts; (ii) through which cellular signaling pathways does this kinase act to favor tumor progression; and (iii) what antitumor and antimetastatic effects result from its inhibition.

2.3 Search Strategy

All studies published up to July 2025 that investigated the oncogenic role of SRPK2 were included. Standardized descriptors from the MeSH and Emtree vocabularies were used to develop the search strategy. The search term, which combined the two descriptors, employed in the database searches was: (("Serine-Arginine Protein Kinase 2" OR "Serine/Arginine Protein Kinase 2" OR "Serine Arginine Protein Kinase 2" OR SRPK2 OR "SRPK 2") AND (cancer OR adenocarcinoma OR neoplasia OR neoplasm)).

2.4 Inclusion and exclusion criteria

Inclusion and exclusion criteria were defined using the PICO framework (Table S1). Studies investigating the tumorigenic and metastatic roles of SRPK2 in cancer, the cellular signaling pathways through which SRPK2 promotes tumor progression, or the effects of genetic or pharmacological interventions targeting SRPK2 were included.

Conference papers, review articles, and studies addressing SRPK2 in benign or non-cancer-related pathological contexts were excluded. Studies focused exclusively on the structural, chemical, or physicochemical characterization of SRPK2 inhibitors without biological validation in cell lines and/or animal models were also excluded. There were no restrictions on the language of the publications.

2.5 Study selection

Studies were retrieved from the Embase, Scopus, ScienceDirect, PubMed, and Web of Science databases (Table S2). After duplicate removal, records were subjected to a two-step screening process. Screening and selection were conducted independently by two authors (Samuel Inácio da Silva Paiva and Bárbara Braga Ferreira). Initially, studies were screened based on title and abstract, followed by full-text evaluation. Discrepancies were resolved by consensus or, when necessary, by consultation with a third author (Raoni Pais Siqueira). All procedures were performed using Rayyan [32].

2.6 Data extraction

Data extraction from studies was independently performed by two authors (Samuel Inácio da Silva Paiva and Bárbara Braga Ferreira). Extracted data included general study characteristics, SRPK2-related oncogenic signaling pathways, tumorigenic and metastatic outcomes associated with SRPK2, antitumor and antimetastatic effects resulting from its inhibition, and prognostic implications. Data on oncogenic and prognostic outcomes were grouped according to cancer type.

2.7 Risk of bias and methodological quality assessment *in vivo* studies

Risk of bias in *in vivo* studies was independently assessed by two authors (Alexandre Martins Oliveira Portes and Sebastião Felipe Ferreira Costa), with each bias domain evaluated according to SYRCLE's (Systematic Review Centre for Laboratory Animal Experimentation) tool [33]. Review Manager software was used for visualization.

Methodological quality was assessed using the CAMARADES (Collaborative Approach to Meta-Analysis and Review of Animal Data from Experimental Studies) checklist [34], which comprises 10 items (maximum score: 10 points). Studies were classified as low (1–3 points),

moderate (4–7 points), or high quality (8–10 points). Analyses were conducted independently by the same two authors (Alexandre Martins Oliveira Portes and Sebastião Felipe Ferreira Costa).

2.8 Disclosure of Artificial Intelligence use

Grammarly, Gemini (Google), and ChatGPT (OpenAI) were used to improve the clarity and grammar of the text. All AI-generated suggestions were critically reviewed and incorporated, when appropriate, into the final text by the authors, who retain full responsibility for the content of this manuscript.

3 Results and Discussion

3.1 Search results and study characteristics

The initial database search (Embase, PubMed, ScienceDirect, Scopus, and Web of Science), covering publications up to July 2025, identified 475 records. After duplicate removal, 331 studies entered in Screening Phase 1 (title and abstract reading), resulting in the exclusion of 284 records. The remaining 47 articles underwent full-text reading (Phase 2), leading to the exclusion of 25 studies. Ultimately, 22 studies met the eligibility criteria and were included in this systematic review. The complete process, including reasons for exclusion, is presented in the PRISMA flow diagram (Figure 1).

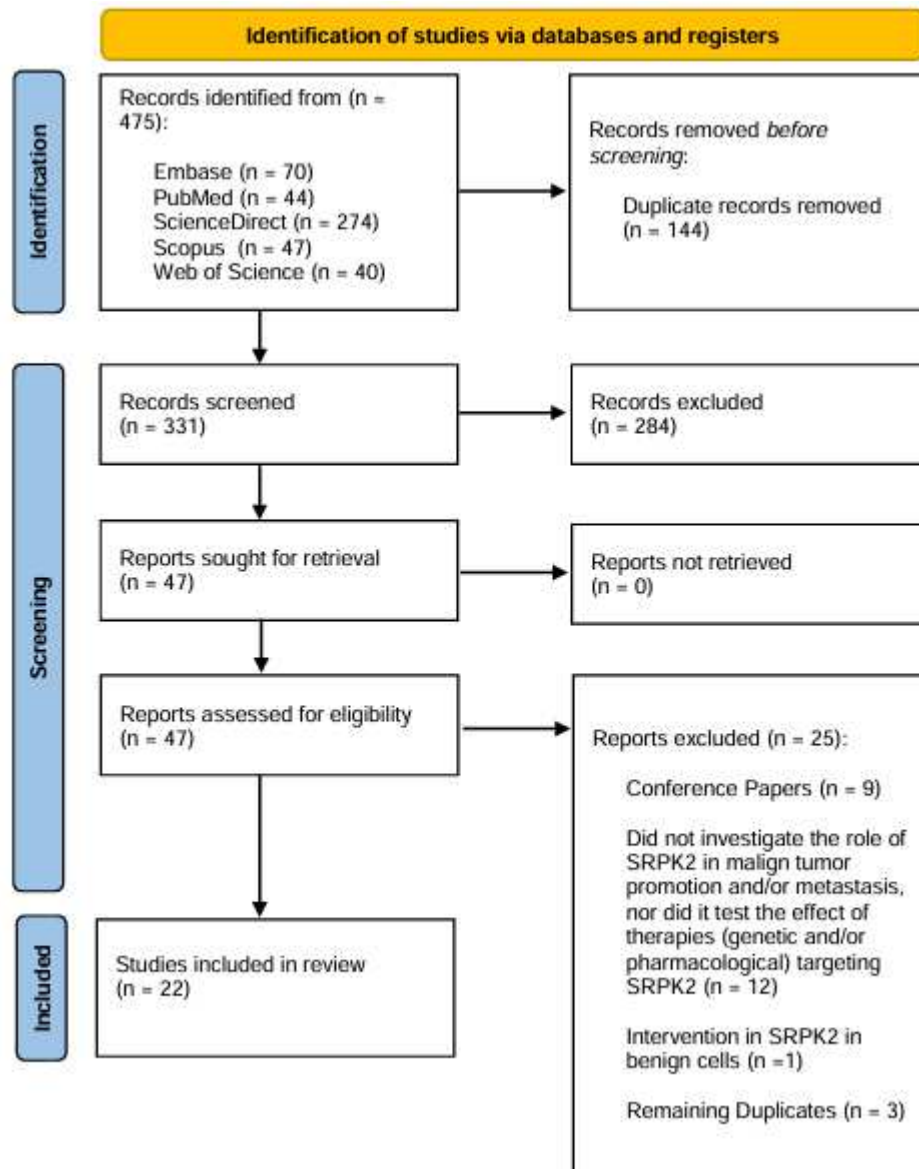


Figure 1. PRISMA flow diagram for literature search and study selection.

Regarding study characteristics, eighteen studies used human cancer cell lines, including breast, bladder, colon, head and neck, leukemia, liver, pancreatic, prostate, and lung cancers [17,25–30,35–44,47]. Three studies used murine melanoma cell lines [15,45,46] (Table 1), while one study did not employ cell lines [24] (Table 1). Eight studies used animal models [15,17,25,29,30,38,45,46].

Eight studies induced SRPK2 overexpression, and one study employed a phosphomimetic mutant [17,25,26,29,30,36,43,47] (Table 1). Two studies used kinase-dead or phosphodeficient mutants [17,27] (Table 1). One study indirectly stimulated SRPK2 expression [28] (Table 1), while three studies evaluated SRPK2 activity using recombinant protein [27,38,43] (Table 1).

Finally, fourteen studies performed genetic interventions targeting SRPK2 expression, including knockdown or knockout approaches [15,17,25–27,29,35–39,43,44,47] and ten studies investigated pharmacological inhibitors [17,26,35,38–42,45,46]. Among these, five combined pharmacological and genetic approaches to validate SRPK2 involvement in oncogenic processes, while the remaining five focused on the effects of pharmacological inhibition (Table 1).

3.2 Prognostic Implications

Elevated SRPK2 expression has been consistently associated with poor clinical outcomes across multiple solid tumors (Table S3). Higher SRPK2 levels correlate with advanced pathological stage and higher tumor grade in colon, pancreatic, and prostate cancers, as well as in lung adenocarcinoma [24,30,36,47].

SRPK2 is also linked to metastatic progression, including lymph node dissemination in colon and pancreatic cancers, liver metastasis in pancreatic carcinoma [36,47] and metastasis in prostate cancer [30]. In melanoma, high SRPK2 expression is associated with poor prognosis [15], reduced inflammatory response scores, and enrichment of pathways related to Wnt/ β -catenin signaling and epithelial–mesenchymal transition (EMT) [45].

Collectively, these findings support SRPK2 as a relevant prognostic factor and highlight the need for further evaluation of its potential clinical applicability.

3.3 Oncogenic Roles of SRPK2

Table 1 summarizes the tumorigenic and metastatic mechanisms associated with SRPK2, the signaling pathways involved, and the antitumor and antimetastatic effects observed following its targeting *in vitro* and *in vivo*. These mechanisms are discussed in detail in the following sections (Sections 3.3.1–3.3.4 and Section 4).

Table 1. Summary of carcinogenic signaling pathways related to SRPK2 activity.

Author, Year	Cancer Type	Signaling Pathway	Tumor/Metastatic Outcomes	Antitumor/Antimetastatic Outcomes	Cell Type	Animal Model	SRPK2 intervention method
McClellan et al., 2022 [35]	Breast cancer	IGF-1R/ mTORC1/ SRPK2/SRSF1/ FASN	<i>In vitro:</i> ↑FASN mRNA expression and stability, ↑palmitate synthesis	<i>In vitro:</i> ↓FASN mRNA expression and stability, ↓palmitate synthesis	Human Breast Cancer Lineage	N/A	Knockdown, pharmacological inhibition (SRPIN340)
Liu et al., 2021 [17]	Colon cancer	SRPK1/2/SRSF1/ MKNK2b	<i>In vitro:</i> ↑MKNK2b, ↑proliferation, ↑colony formation. <i>In vivo:</i> ↑tumor growth, ↑Ki67	<i>In vitro:</i> ↓MKNK2b, ↓proliferation, ↓colony formation. <i>In vivo:</i> ↓tumor growth, ↓Ki67	Human Colon Cancer Lineage	Balb/c nude mice	Knockdown, kinase-dead mutants, pharmacological inhibition (SRPIN340), overexpression
Wang et al., 2020 [36]	Colon cancer	SRPK2/Numb/ p53	<i>In vitro:</i> ↑chemoresistance, ↑migration, ↑invasion	<i>In vitro:</i> ↓chemoresistance, ↓migration, ↓invasion	Human Colon Cancer Lineage	N/A	Knockdown, overexpression
Wang et al., 2016 [29]	Colon cancer	SRPK2/B-RAF/ ERK	<i>In vitro:</i> ↑cell growth, ↑cell migration. <i>In vivo:</i> ↑tumor growth	N/A	Human Colon Cancer Lineage	Nude mice	Knockdown, overexpression
Yang et al., 2018 [37]	Colon Cancer	SRPK2/TWIST	N/A	<i>In Vitro:</i> ↓TWIST, ↓vimentin, ↑E-cadherin	Human Colon Cancer Lineage	N/A	Knockdown
Lee et al., 2017 [38]	Diverses: Bladder, Breast, Lung	mTORC1/S6K1/ SRPK2	N/A	<i>In vitro:</i> ↓expression of lipogenic genes, ↓cell growth. <i>In vivo:</i> ↓tumor growth	Human Bladder, Breast and Lung Cancer Lineage	Nude CD-1 mice, CB17-scid mice	Knockdown, pharmacological inhibition (SRPIN340), insulin stimulation
Radhakrishnan et al., 2016 [39]	Head and neck cancer	N/A	N/A	<i>In vitro:</i> ↓colony formation, ↓invasion	Human Head and Neck Cancer Lineage	N/A	Knockdown, pharmacological inhibition (SRPIN340)

Jang et al., 2008 [43]	Leukemia	SRPK2/Acinus/ Cyclin A1	<i>In vitro:</i> ↑Cyclin A1, Accumulation in the G2-M phase, ↑proliferation	<i>In vitro:</i> ↓Cyclin A1, cell cycle arrest in the G1 phase, ↓proliferation	Human Leukemia Lineage	N/A	Knockdown, overexpression, recombinant protein stimulation (EGF)
Siqueira et al., 2015 [41]	Leukemia	N/A	N/A	<i>In vitro:</i> ↓cell viability, ↑apoptosis, ↓MAP2K1, ↓VEGF, ↑FAS	Human Leukemia Lineage	N/A	Pharmacological inhibition (SRPIN340)
Siqueira et al., 2017 [42]	Leukemia	N/A	N/A	<i>In vitro:</i> ↓cell viability, ↑apoptosis, ↑autophagy, ↓MAP2K1, ↓MAP2K2, ↓VEGF, ↓RON	Human Leukemia Lineage	N/A	Pharmacological inhibition (SRPIN340, SRVICs)
Siqueira et al., 2020 [40]	Leukemia	AKT/SRPK2	N/A	<i>In vitro:</i> Synergism in SRPK and AKT inhibition (T-ALL), ↓cell viability, ↑apoptosis	Human Leukemia Lineage	N/A	Pharmacological inhibition (SRPIN340)
Zhou et al., 2022 [28]	Leukemia	BP1/ SGMS1-AS1/ miR-181d-5p/ SRPK2	<i>In vitro:</i> ↑SRPK2	N/A	Human Leukemia Lineage	N/A	Indirect modulation via overexpression of the BP1 protein
Lu et al., 2015 [44]	Liver cancer	Hsp90/SRPK2/ Numb	<i>In vitro:</i> ↑Numb PRR ^L	<i>In vitro:</i> ↓Numb PRR ^L ↑Numb PRR ^S	Human Liver Cancer Lineage	N/A	Knockdown
Wu et al., 2024 [26]	Liver cancer	LINC01446/ SRPK2/SRSF1/ VEGFA ₁₆₅	<i>In vitro:</i> ↑cell growth, ↑colony formation, ↑VEGFA ₁₆₅ , ↑sorafenib resistance	<i>In vitro:</i> ↓cell growth, ↓colony formation, ↓VEGFA ₁₆₅ , ↓sorafenib resistance	Human Liver Cancer Lineage	N/A	Knockdown, pharmacological inhibition (SRPKIN-1), overexpression

Gout et al., 2012 [24]	Lung cancer	N/A	<i>Ex vivo:</i> ↑SRPK2 in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) ↑pSRSF2 (NSCLC, ADC subtype)	N/A	N/A	N/A	N/A
Li et al., 2019 [25]	Lung Cancer	SRPK2/SC35/E2F1	<i>In Vitro:</i> Cell cycle progression, ↑proliferation, ↑Cyclin E1, ↑p45 ^{SKP2}	<i>In Vitro:</i> Cell cycle arrest, ↓proliferation <i>In vivo:</i> ↓tumor growth, ↓Ki67	Human Lung Cancer Lineage	Balb/c nude mice	Knockdown, Overexpression
Caetano et al., 2022 [15]	Melanoma	N/A	N/A	<i>In vitro:</i> ↓proliferation, ↓invasion, ↓actin polymerization. <i>In vivo:</i> ↓tumor growth, ↓lung metastasis	Murine Melanoma Lineage	C57BL/6	Knockout
Moreira et al., 2018 [46]	Melanoma	N/A	N/A	<i>In vitro:</i> ↓migration, ↓invasion, ↓adhesion, ↓colony formation. <i>In vivo:</i> ↓lung metastasis	Murine Melanoma Lineage	C57BL/6	Pharmacological inhibition (SRPIN340, SRVICs)
Moreira et al., 2022 [45]	Melanoma	N/A	N/A	<i>In vivo:</i> ↓tumor growth, ↓metastasis, ↑apoptosis, ↓N-cadherin, ↑E-cadherin. ↑CD4 and CD8 infiltration, ↑expression of pro-inflammatory cytokines, stimulation of CD80 and CD86. <i>In vitro:</i> ↑MHCI, ↑MHCII, attraction of splenocytes	Murine Melanoma Lineage	C57BL/6	Pharmacological inhibition (SRPIN340)

Fonteneau et al., 2022 [27]	Pancreatic cancer	IGF-1/IGF1-R/S6K1/SRPK2	<i>In vitro:</i> ↑SG formation	<i>In vitro:</i> ↓SG formation	Human Pancreatic Cancer Lineage	N/A	Knockdown, phosphodeficient mutants, phosphomimic mutants, stimulation with recombinant protein (IGF-1)
Wang et al., 2019 [47]	Pancreatic cancer	SRPK2/Numb/p53	<i>In vitro:</i> ↑chemoresistance, ↑migration, ↑invasion	<i>In vitro:</i> ↓chemoresistance, ↓migration, ↓invasion	Human Pancreatic Lineage	N/A	Knockdown, overexpression
Zhuo et al., 2018 [30]	Prostate cancer	N/A	<i>In vitro:</i> Cell cycle progression, ↑proliferation, ↑migration, ↑invasion, ↓apoptosis. <i>In vivo:</i> ↑tumor growth	N/A	Human Prostate Cancer Lineage	Nude mice	Overexpression

↑ increase; ↓ decrease; N/A – Not Applicable.

3.3.1 Regulation of Cell Cycle, Proliferation, and Migration Mediated by SRPK2

SRPK2 regulates cell cycle progression through distinct signaling mechanisms, depending on the tumor type. In leukemia, EGF-induced activation of SRPK2 promotes Acinus phosphorylation and increases Cyclin A1 expression, resulting in G2/M phase accumulation (Figure 2a) [43]. In lung cancer, SRPK2-mediated phosphorylation of SC35 activates the transcription factor E2F1, leading to increased expression of Cyclin E and p45^{Skp2} (Figure 2b) [25].

In colon cancer, SRPK2 overexpression promotes cell growth via ERK phosphorylation through its interaction with B-RAF (Figure 2c) [29], while in prostate carcinoma, it enhances cell cycle progression and proliferation and suppresses apoptosis [30]. In colorectal cancer, elevated SRPK1/2 expression leads to SRSF1 phosphorylation and increased production of the oncogenic isoform MKNK2b, which is associated with enhanced proliferation (Figure 2d) [17]. This effect is reversed by the expression of catalytically inactive mutants, genetic knockdown, or pharmacological inhibition with SRPIN340 [17].

In liver cancer, SRPK2 interacts with the chaperone HSP90 to regulate Numb alternative splicing, favoring the long isoform (PRR^L) - associated with increased invasion and migration - over the short isoform (PRR^S) [44]. Additionally, in colon cancer, SRPK2 upregulation promotes cell migration, whereas its silencing reduces cell motility [29].

Functional disruption of SRPK2 impairs cell proliferation and cell cycle progression across multiple tumor models. Genetic targeting of SRPK2 induces G1 phase arrest in leukemia and reduces proliferation and invasion in melanoma [15,43], consistent with findings from pharmacological inhibition studies using SRPK inhibitors [40–42,46]. Furthermore, SRPK2 depletion in colon and lung xenograft models results in reduced tumor volume and decreased Ki-67 expression [17,25].

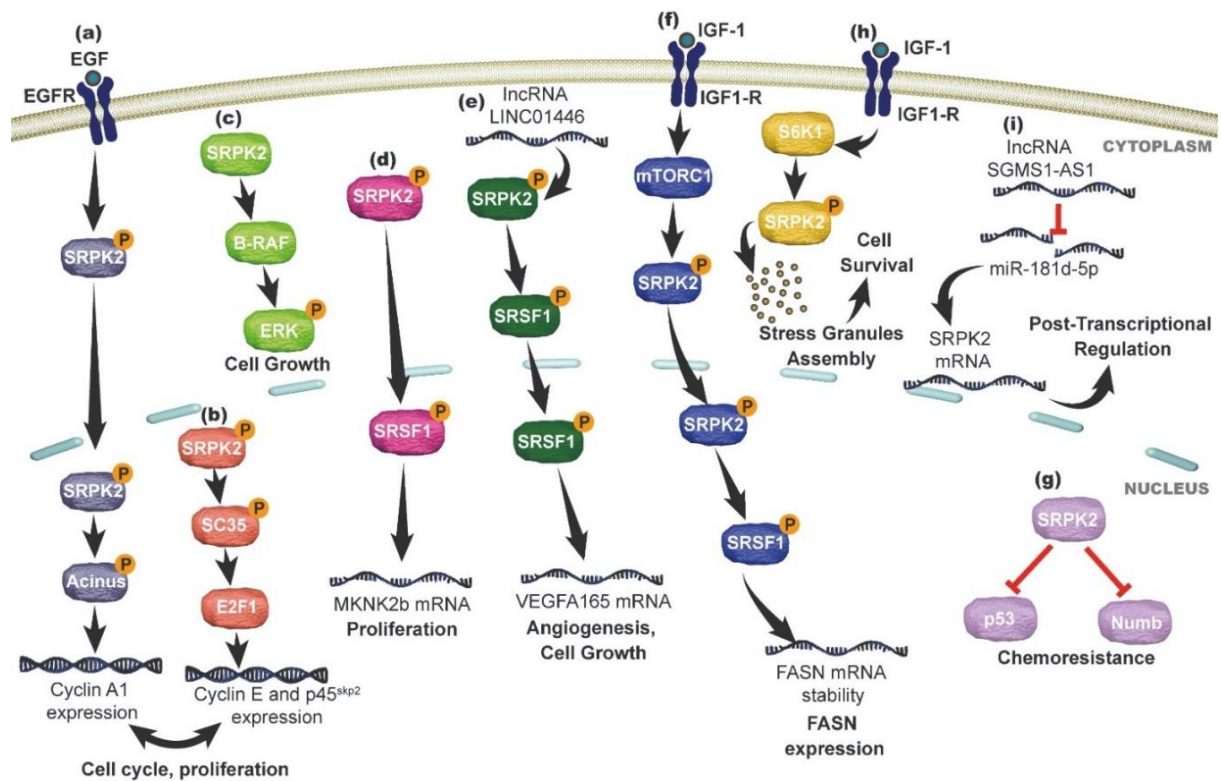


Figure 2. Proposed integrative model of the SRPK2 regulatory network and its dysregulation in cancer cell signaling. The schematic illustrates a conceptual framework highlighting the functional diversity of SRPK2. Under physiological conditions, SRPK2 contributes to molecular homeostasis by regulating key cellular processes. However, its dysregulation activates a complex signaling network across different tumor contexts: **(a, b)** In leukemia and lung cancer cells, SRPK2 modulates the expression of genes associated with cell cycle progression and proliferation [25,43]. **(c)** In colon cancer, SRPK2 promotes cell growth through modulation of ERK phosphorylation [29]. **(d - f)** SRPK2 regulates alternative splicing events in breast, colon, and liver cancer cells, favoring the production of pro-tumorigenic mRNA isoforms that enhance angiogenesis, proliferation, and cell growth, while also supporting tumor lipid metabolism via FASN expression [17,26,35]. **(g)** The kinase negatively regulates Numb and the tumor suppressor p53 in colon and pancreatic carcinomas, contributing to resistance to chemotherapeutic agents [36,47]. **(h)** In pancreatic cancer, SRPK2 associates with stress granules and promotes their assembly, supporting tumor cell survival under stress conditions [27]. **(i)** In leukemia, the IncRNA SGMS1-AS1 modulates the post-transcriptional regulation of SRPK2 by sequestering miR-181d-5p. Inhibition of this microRNA stabilizes SRPK2 mRNA, protecting it from translational repression [28].

3.3.2 Role of SRPK2 in Tumor Lipid Metabolism

Beyond its role in regulating cell cycle progression, proliferation, and migration, SRPK2 also contributes to metabolic reprogramming in cancer cells, particularly by modulating lipid biosynthesis pathways.

SRPK2 has been identified as a regulator of *de novo* lipid synthesis in breast, bladder, and lung cancer cell lines [35,38]. In triple-negative breast cancer cells, exposure to IGF-1 activates the mTORC1 pathway, leading to SRPK2 phosphorylation, activation, and nuclear translocation. This

process enhances SRSF1 phosphorylation and promotes its interaction with FASN mRNA, resulting in increased transcript stability, elevated FASN expression, and enhanced *de novo* palmitate synthesis (Figure 2f) [35]. Conversely, treatment with the SRPK inhibitor SRPIN340 or genetic knockdown attenuates this activity and reduces FASN expression levels [35].

Consistent with these findings, similar inhibitory effects on lipogenic enzyme expression and cell growth have been observed in bladder cancer cell lines following treatment with SRPIN340 [38]. *In vivo*, both pharmacological inhibition and xenograft models using SRPK2-silenced cells resulted in reduced tumor growth in bladder and lung cancer models [38].

3.3.3 Implications of SRPK2 in Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) and Invasion

In addition to its roles in metabolic reprogramming, SRPK2 also contributes to tumor cell plasticity and invasive behavior. In colon cancer, SRPK2 expression promotes EMT, characterized by increased levels of vimentin and TWIST and reduced E-cadherin expression, which can be reversed upon genetic silencing of the kinase [37]. Consistently, treatment of melanoma-bearing mice with the SRPK inhibitor SRPIN340 shifts this profile, decreasing N-cadherin and increasing E-cadherin expression [45]. However, as SRPIN340 inhibits both SRPK1 and SRPK2, the specific contribution of SRPK2 to the N-/E-cadherin expression pattern in melanoma requires further investigation using selective genetic targeting approaches.

Genetic targeting of SRPK2 using CRISPR/Cas9 or RNA interference produces effects comparable to pharmacological inhibition in invasion assays across colorectal, head and neck, melanoma, and pancreatic cancer models [15,36,39,47]. In *in vivo* melanoma models, both pharmacological inhibition and inoculation of SRPK2 knockout cells reduce pulmonary metastatic burden, consistent with the reduced invasive capacity observed *in vitro* [15,45,46].

3.3.4 Cooperation of SRPK2 in Cell Survival and Therapeutic Resistance

Beyond its roles in tumor cell plasticity and invasion, SRPK2 also contributes to cell survival under stress conditions and to resistance to anticancer therapies. In colon and pancreatic cancer cell lines, SRPK2 overexpression decreases sensitivity to 5-fluorouracil, cisplatin, gemcitabine, and oxaliplatin [36,47]. This chemoresistant phenotype is mechanistically linked to the downregulation of the tumor suppressors p53 and Numb (Figure 2g), whose expression and function are restored following kinase silencing, thereby resensitizing tumor cells to treatment [36,47].

Consistently, SRPK2 regulates the formation of stress granules (SGs) - cytoplasmic structures associated with cell survival under stress - in pancreatic carcinoma cells [27]. This process

is mediated by the IGF-1R/S6K1 pathway, which promotes SRPK2 phosphorylation and its accumulation within these protective structures (Figure 2h) [27]. Disruption of this axis, through S6K1 inhibition, SRPK2 knockdown, or the use of phosphodeficient mutants, impairs SG assembly, whereas expression of wild-type SRPK2 or phosphomimetic mutants restores SG formation [27].

These findings are correlated by studies investigating SRPK inhibitors. Pharmacological treatment of leukemia cells increases sensitivity to AKT inhibitors and vincristine, while also enhances autophagy and apoptosis mediated by the upregulation of FAS and RON, and the downregulation of MAP2K1, MAP2K2 [41,42]. Similarly, treatment with SRPIN340 enhances the immunogenicity of melanoma cells by increasing the infiltration of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes into tumors and promoting the expression of pro-inflammatory mediators, including IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-1ra, and iNOS [45]. Although pharmacological inhibitors present inherent limitations, and considering the potentially more prominent role of SRPK2 relative to SRPK1 in melanoma and leukemia [15,41], these findings provide additional support for the involvement of SRPK2 in tumor cell survival and therapeutic resistance. These hypotheses certainly warrant further validation in future studies.

Collectively, the evidence discussed in Sections 3.3.1 - 3.3.4 highlights the multifaceted role of SRPK2 in cancer, encompassing the regulation of cell cycle progression, metabolic reprogramming, epithelial–mesenchymal transition, invasion, and therapeutic resistance. These diverse oncogenic functions suggest that sustained SRPK2 activity is a critical determinant of tumor progression across multiple cancer types. Given this broad functional impact, understanding the molecular mechanisms that regulate SRPK2 overexpression becomes essential to fully elucidate its role in cancer biology and to identify additional potential points of therapeutic intervention.

4. Regulation of SRPK2 Expression and Stability in Cancers

The maintenance of elevated SRPK2 levels has been shown to be regulated by distinct molecular mechanisms, depending on the biochemical tumor context. Regulatory mechanisms involving non-coding RNAs have been described in leukemia, where the oncoprotein BP1 increases the expression of the lncRNA SGMS1-AS1 [28]. This lncRNA sequesters miR-181d-5p, thereby preventing the translational repression of SRPK2 mRNA (Figure 2i) and increasing SRPK2 expression [28].

In hepatic carcinoma cells, direct interaction with the lncRNA LINC01446 stabilizes SRPK2, increasing its protein half-life and overall levels [26]. This interaction-dependent stabilization promotes SRSF1 phosphorylation and its binding to VEGF-A pre-mRNA, resulting in increased VEGF-A₁₆₅ expression and secretion, as well as enhanced angiogenesis (Figure 2e) [26]. These molecular events are accompanied by increased cell growth, colony formation, and resistance to sorafenib [26]. Moreover, silencing of LINC01446 reduces SRPK2 levels, while SRPK2 knockdown disrupts the interaction between SRSF1 and VEGF-A pre-mRNA, leading to decreased VEGF-A₁₆₅ expression, reduced cell growth and colony formation, and increased sensitivity to sorafenib [26].

5. Concluding Remarks

SRPK2 drives oncogenesis and metastasis through multiple signaling pathways, both dependent on and independent of its role in pre-mRNA splicing. It promotes epithelial–mesenchymal transition (EMT) [37], enhances tumor cell invasiveness, stimulates cell migration and proliferation, and contributes to chemoresistance by supporting cell survival under stress conditions and suppressing apoptosis [27,29,30,36,47]. Taken together, these findings position SRPK2 as a central integrator of key oncogenic processes, linking alternative splicing regulation to broader signaling networks that sustain tumor progression.

The involvement of SRPK2 in tumorigenesis and metastatic mechanisms across diverse signaling pathways underscores its relevance as a therapeutic target. This is supported by studies demonstrating that genetic targeting of SRPK2, through knockdown or knockout approaches, suppresses tumor growth and metastatic phenotypes [15,17,25,38]. Moreover, although highly selective SRPK2 inhibitors are not yet available, pharmacological inhibition of SRPK recapitulates many of the effects observed with genetic approaches. These interventions have shown consistent efficacy in preclinical *in vitro* and *in vivo* models, including reduced tumor growth [38,45], decreased cell proliferation [41,42], increased tumor infiltration by CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes [45,46], and enhanced sensitivity to conventional chemotherapeutic agents [17,26,35,40–42].

In addition to its therapeutic potential, SRPK2 has emerged as a promising prognostic biomarker across multiple malignancies [15,17,24,25,30,36,45,47]. Its consistent association with adverse clinical outcomes, such as metastasis, disease recurrence, and reduced overall survival, highlights its potential clinical relevance and supports further investigation in translational settings.

Overall, the evidence presented in this systematic review supports SRPK2 as a multifunctional oncogenic regulator with significant potential as both therapeutic target and prognostic biomarker. Future efforts should focus on the development of highly selective SRPK2 inhibitors and on the

validation of its potential prognostic utility in large-scale studies, which will be essential for translating these findings into improved patient outcomes.

6. Assessments of risk of bias and methodological quality of *in vivo* studies

For these assessments, only studies that modulated SRPK2 in animal models through genetic interventions [15,17,25,29,30,38] or using SRPK inhibitors [38,45,46] were considered. Results of the risk of bias assessment are presented in Figure 3 and Figure S1. The risk of selection bias was rated as unclear in all studies due to the absence of reported random sequence generation. Most studies (n = 6) were classified as having a high risk of bias regarding baseline characteristics (e.g., body mass, age, and sex), owing to incomplete reporting. Exceptions were two studies classified as low risk, in which animals served as their own controls [29,30].

Allocation bias was similarly rated as unclear or high risk in most studies, with only two studies [29,30] classified as low risk for the same reason (self-controlled experimental design). All studies were rated as unclear for performance bias, due to the lack of reporting on random housing and blinding of caregivers and investigators, and for detection bias, due to the absence of information on random outcome assessment or blinding of evaluators. Regarding attrition bias, the majority of studies (n = 5) were classified as low risk, as they reported the number of animals in both the Methods and Results sections [17,25,29,30,45]. In addition, all studies were rated as low risk for selective reporting and other potential sources of bias.

Overall, the risk of bias assessment indicates that studies investigating SRPK2 modulation in animal models present important reporting limitations, particularly regarding randomization procedures and blinding. These limitations, together with insufficient control of baseline characteristics in most studies (with the exception of self-controlled designs), result in predominantly unclear or high risk of selection, performance, and detection biases. In contrast, attrition and selective reporting biases appear to be consistently low across the analyzed studies. Regarding methodological quality, all studies were classified as having moderate quality according to the CAMARADES criteria, with scores ranging from 5 to 6 points (Table S4).

In summary, future studies using animal models should rigorously report randomization and blinding procedures to improve the reliability and reproducibility of the evidence.

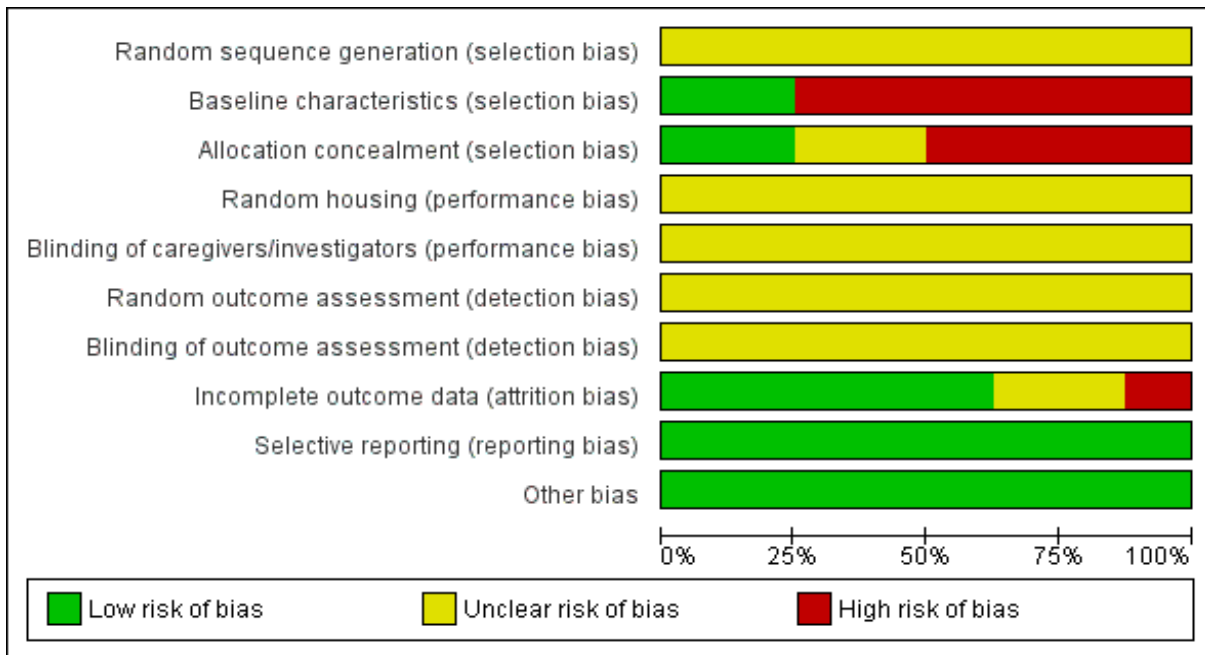


Figure 3. Risk of bias assessment of the included in vivo studies. Summary chart illustrating the methodological quality and reporting of risk of bias domains for the studies included in the systematic review, based on the SYRCLE tool.

7. Limitations

This systematic review has limitations that should be considered when interpreting and extrapolating the findings.

First, most of the included studies investigated tumorigenic and metastatic phenotypes *in vitro* and should therefore be interpreted with caution. It is well established that tumor cells cultured *in vitro* do not fully recapitulate the complexity of the tumor microenvironment or adequately represent tumor heterogeneity [48,49]. In addition, there is currently no validated tool for assessing the risk of bias in *in vitro* studies included in systematic reviews [50]. Consequently, the absence of a comprehensive methodological evaluation, including quality and risk-of-bias assessments, limits the generalizability of these findings.

Studies employing animal models were also included. Among these, syngeneic models [15,45,46], in which tumor cells from the same species are inoculated [51], warrant particular consideration. Although these models are valuable for investigating immune responses, since they do not require immunosuppression, they do not adequately reflect the heterogeneity of human tumors [51]. Xenograft models [17,25,29,30,38], which involve the use of tumor cells from different species (typically human cells), generally require immunosuppression and, despite more closely approximating certain aspects of human tumor heterogeneity [51,52], should also be interpreted with caution. These models may fail to capture the complex interactions between tumors and the immune

system and often present a tumor microenvironment that differs from that observed in patients with intact immune function [53,54]. Furthermore, considering the risk of bias and methodological quality assessments presented (Figure 3, Figure S1, and Table S4), more detailed reporting of experimental procedures in animal studies is strongly encouraged to reduce potential sources of bias.

Finally, the pharmacological inhibitors SRPIN340, SRVICs, and SRPKIN-1 target both SRPK1 and SRPK2 [41,42,46,55]. Therefore, the effects observed with these compounds cannot be exclusively attributed to SRPK2 inhibition, representing an important limitation in the interpretation of pharmacological evidence.

Author Contributions

Samuel Inácio da Silva Paiva: Conceptualization, formal analysis, methodology, investigation, writing – original draft preparation, writing – review & editing. **Bárbara Braga Ferreira:** Formal analysis, investigation, writing – review & editing. **Alexandre Martins Oliveira Portes:** Formal analysis, writing – review & editing. **Sebastião Felipe Ferreira Costa:** Formal analysis, writing – review & editing. **Luiz Otávio Guimarães Ervilha:** Methodology, writing – review & editing. **Raoni Pais Siqueira:** Supervision, writing – review & editing. **Juliana Regina Ribeiro de Souza:** Writing – review & editing. **Luciana Ângelo de Souza:** Writing – review & editing. **Gustavo Costa Bressan:** Resources, supervision, validation, writing – review & editing, funding acquisition.

Acknowledgments

We thank Fabio Jaderson Miguel Reis, Central Library at the Federal University of Viçosa, for the support in the development and creation of the search terms. The authors also thanks CAPES (Finance Code-001), FAPEMIG and CNPq for financial support: FAPEMIG - APQ-01084-21, FAPEMIG - Rede de Investigação em Mucosas e Pele (RED00096-22), BPD-00827-22, Rede de Imunobiológicos/RED-00067-23, APQ-05143-23); CNPq – Instituto Nacional de Investigação em Mucosas e Pele (INCT Mucosa e Pele) 408484/2024-1; CNPq - 311163/2022-0.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Data Availability

Data available on request from the authors.

References

1. MARASCO, L. E.; KORNBLIHTT, A. R. The physiology of alternative splicing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 24, n. 4, p. 242-254, 2023. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00545-z>
2. GUO, Z. et al. Splicing to keep splicing: A feedback system for cellular homeostasis and state transition. *Clinical and Translational Medicine*, v. 15, n. 6, p. e70369, Jun. 2025. <https://doi.org/10.1002/ctm2.70369>
3. PARONETTO, M.; PASSACANTILLI, I.; SETTE, C. Alternative splicing and cell survival: from tissue homeostasis to disease. *Cell Death and Differentiation*, v. 23, n. 12, p. 1919-1929, 2016. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.91>
4. LIU, Q.; FANG, L.; WU, C. Alternative Splicing and Isoforms: From Mechanisms to Diseases. *Genes*, v. 13, n. 3, p. 401, Feb. 2022. <https://doi.org/10.3390/genes13030401>
5. ZHANG, Y. et al. Alternative splicing and cancer: a systematic review. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 6, n. 1, p. 78, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00486-7>
6. DU, J. X. et al. Splicing factors: Insights into their regulatory network in alternative splicing in cancer. *Cancer Letters*, v. 501, p. 83-104, 31 Mar. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.11.043>
7. PENG, Q. et al. Impacts and mechanisms of alternative mRNA splicing in cancer metabolism, immune response, and therapeutics. *Molecular Therapy*, v. 30, n. 3, p. 1018-1035, 2 Mar. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.11.010>
8. SHENG, M. et al. Decoding the role of aberrant RNA alternative splicing in hepatocellular carcinoma: a comprehensive review. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, v. 149, n. 19, p. 17691-17708, Dec. 2023. <https://doi.org/10.1007/s00432-023-05474-8>
9. ANCZUKÓW, O.; KRAINER, A. R. Splicing-factor alterations in cancers. *RNA*, v. 22, n. 9, p. 1285-1301, Sept. 2016. <https://doi.org/10.1261/rna.057919.116>
10. OUYANG, J. et al. The role of alternative splicing in human cancer progression. *American Journal of Cancer Research*, v. 11, n. 10, p. 4642-4667, 15 Oct. 2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34765285/>

11. SCIARRILLO, R. et al. The role of alternative splicing in cancer: From oncogenesis to drug resistance. *Drug Resistance Updates*, v. 53, p. 100728, Dec. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2020.100728>
12. GIANNAKOUIROS, T. et al. Serine-arginine protein kinases: a small protein kinase family with a large cellular presence. *FEBS Journal*, v. 278, n. 4, p. 570-586, Feb. 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07987.x>
13. 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. <https://doi.org/10.1007/s00412-013-0407-z>
14. ZHOU, Z. et al. The Akt-SRPK-SR Axis Constitutes a Major Pathway in Transducing EGF Signaling to Regulate Alternative Splicing in the Nucleus. *Molecular Cell*, v. 71, n. 5, p. 872, 10 Aug. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.05.014>
15. CAETANO, M. M. M. et al. Impaired expression of serine/arginine protein kinase 2 (SRPK2) affects melanoma progression. *Frontiers in Genetics*, v. 13, p. 979735, 23 Sept. 2022. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.979735>
16. HUANG, J. Q. et al. Serine-arginine protein kinase 1 (SRPK1) promotes EGFR-TKI resistance by enhancing GSK3 β Ser9 autophosphorylation independent of its kinase activity in non-small-cell lung cancer. *Oncogene*, v. 42, n. 14, p. 1233-1246, 2023. <https://doi.org/10.1038/s41388-023-02645-2>
17. LIU, H. et al. SRPK1/2 and PP1 α exert opposite functions by modulating SRSF1-guided MKNK2 alternative splicing in colon adenocarcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, v. 40, n. 1, p. 75, 2021. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-01877-y>
18. GONG, Y. et al. SRPK1 promotes cell proliferation and tumor growth of osteosarcoma through activation of the NF- κ B signaling pathway. *Biological Chemistry*, v. 403, n. 7, p. 653-663, 29 Dec. 2021. <https://doi.org/10.1515/hsz-2020-0394>
19. TZELEPIS, K. et al. SRPK1 maintains acute myeloid leukemia through effects on isoform usage of epigenetic regulators including BRD4. *Nature Communications*, v. 9, n. 1, p. 5378, 19 Dec. 2018. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07620-0>
20. WANG, C. et al. SRPK1 acetylation modulates alternative splicing to regulate cisplatin resistance in breast cancer cells. *Communications Biology*, v. 3, n. 1, p. 268, 2020. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0983-4>

21. NIKAS, I. P. et al. Serine-Arginine Protein Kinase 1 (SRPK1) as a Prognostic Factor and Potential Therapeutic Target in Cancer: Current Evidence and Future Perspectives. *Cells*, v. 9, n. 1, p. 19, 19 Dec. 2019. <https://doi.org/10.3390/cells9010019>
22. PATEL, M.; SACHIDANANDAN, M.; ADNAN, M. Serine arginine protein kinase 1 (SRPK1): a moonlighting protein with theranostic ability in cancer prevention. *Molecular Biology Reports*, v. 46, n. 1, p. 1487-1497, Feb. 2019. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4545-5>
23. DUGGAN, W. P. et al. Serine-Arginine Protein Kinase 1 (SRPK1): a systematic review of its multimodal role in oncogenesis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 477, n. 11, p. 2451-2467, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11010-022-04456-7>
24. GOUT, S. et al. Abnormal expression of the pre-mRNA splicing regulators SRSF1, SRSF2, SRPK1 and SRPK2 in non small cell lung carcinoma. *PLoS One*, v. 7, n. 10, p. e46539, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046539>
25. LI, X. et al., Downregulation of SRPK2 promotes cell cycle arrest through E2F1 in non-small cell lung cancer. *European Journal of Histochemistry*, v. 63, n. 4, art. 3067, p. 229-239, 2019. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6945924/>
26. WU, Y. et al. LTR retrotransposon-derived LncRNA LINC01446 promotes hepatocellular carcinoma progression and angiogenesis by regulating the SRPK2/SRSF1/VEGF axis. *Cancer Letters*, v. 598, p. 217088, 28 Aug. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2024.217088>
27. FONTENEAU, G. et al. Stress Granules Determine the Development of Obesity-Associated Pancreatic Cancer. *Cancer Discovery*, v. 12, n. 8, p. 1984-2005, 5 Aug. 2022. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-21-1672>
28. ZHOU, J. D. et al. DNA methylation-mediated differential expression of DLX4 isoforms has opposing roles in leukemogenesis. *Cellular and Molecular Biology Letters*, v. 27, n. 1, p. 59, 2022. <https://doi.org/10.1186/s11658-022-00358-0>
29. WANG, J. et al. SRPK2 promotes the growth and migration of the colon cancer cells. *Gene*, v. 586, n. 1, p. 41-47, 15 Jul. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.03.051>
30. ZHUO, Y. J. et al. Enhanced expression of SRPK2 contributes to aggressive progression and metastasis in prostate cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 102, p. 531-538, Jun. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.079>

31. MOHER, D. et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. *Systematic Reviews*, v. 4, n. 1, p. 1, 2015. <https://doi.org/10.1186/2046-4053-4-1>
32. OUZZANI, M. et al. Rayyan—a web and mobile app for systematic reviews. *Systematic Reviews*, v. 5, n. 1, p. 210, 2016. <https://doi.org/10.1186/s13643-016-0384-4>
33. HOOIJMANS, C. R. et al. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. *BMC Medical Research Methodology*, v. 14, n. 43, 26 Mar. 2014. <https://doi.org/10.1186/1471-2288-14-43>
34. MACLEOD, M. R. et al. Pooling of animal experimental data reveals influence of study design and publication bias. *Stroke*, v. 35, n. 5, p. 1203-1208, May. 2004. <https://doi.org/10.1161/01.str.0000125719.25853.20>
35. MCCLELLAN, B. et al. An IGF-1R-mTORC1-SRPK2 signaling Axis contributes to FASN regulation in breast cancer. *BMC Cancer*, v. 22, n. 1, p. 976, 2022. <https://doi.org/10.1186/s12885-022-10062-z>
36. WANG, G. et al. Cooperation of SRPK2, Numb and p53 in the malignant biology and chemosensitivity of colorectal cancer. *Bioscience Reports*, v. 40, n. 1, p. BSR20191488, 31 Jan. 2020. <https://doi.org/10.1042/bsr20191488>
37. YANG, Z. et al. Serine/arginine (SR)-rich-specific-protein kinase 2 promotes the epithelial-mesenchymal transition by upregulating Twist-related protein 1 expression in colon cancer cells. *Int J Clin Exp Med*, v. 11, n. 1, p. 262-268, Jan. 2018
38. LEE, G. et al. Post-transcriptional Regulation of De Novo Lipogenesis by mTORC1-S6K1-SRPK2 Signaling. *Cell*, v. 171, n. 7, p. 1545-1558.e18, 14 Dec. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.037>
39. RADHAKRISHNAN, A. et al. Dysregulation of splicing proteins in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Biology & Therapy*, v. 17, n. 2, p. 219-229, 2016. <https://doi.org/10.1080/15384047.2016.1139234>
40. SIQUEIRA, R. P. et al. Combined SRPK and AKT pharmacological inhibition is synergistic in T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Toxicology in Vitro*, v. 65, p. 104777, Jun. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104777>
41. SIQUEIRA, R. P. et al. Potential Antileukemia Effect and Structural Analyses of SRPK Inhibition by N-(2-(Piperidin-1-yl)-5-

- (Trifluoromethyl)Phenyl)Isonicotinamide (SRPIN340). *PLoS One*, v. 10, n. 8, p. e0134882, 5 Aug. 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134882>
42. SIQUEIRA, R. P. et al. Trifluoromethyl arylamides with antileukemia effect and intracellular inhibitory activity over serine/arginine-rich protein kinases (SRPKs). *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 134, p. 97-109, 7 Jul. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.03.078>
43. JANG, S. W. et al. 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, 15 Jun. 2008. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0021>
44. LU, Y. et al. Alternative splicing of the cell fate determinant Numb in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, v. 62, n. 4, p. 1122-1131, Oct. 2015. <https://doi.org/10.1002/hep.27923>
45. MOREIRA, G. A. et al. The SRPK inhibitor N-(2-(piperidin-1-yl)-5-(trifluoromethyl)phenyl) isonicotinamide (SRPIN340) increases the immune response against metastatic melanoma in mice. *Biochemical Pharmacology*, v. 203, p. 115161, Sept. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115161>
46. MOREIRA, G. A. et al. Antimetastatic effect of the pharmacological inhibition of serine/arginine-rich protein kinases (SRPK) in murine melanoma. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 356, p. 214-223, 1 Oct. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.08.012>
47. WANG, G. et al. Serine/arginine protein-specific kinase 2 promotes the development and progression of pancreatic cancer by downregulating Numb and p53. *FEBS Journal*, v. 286, n. 9, p. 1668-1682, May. 2019. <https://doi.org/10.1111/febs.14778>
48. JUBELIN, C. et al. Three-dimensional in vitro culture models in oncology research. *Cell & Bioscience*, v. 12, n. 1, p. 155, 11 Sept. 2022. <https://doi.org/10.1186/s13578-022-00887-3>
49. PINTO, B. et al. Three-Dimensional Spheroids as In Vitro Preclinical Models for Cancer Research. *Pharmaceutics*, v. 12, n. 12, p. 1186, 6 Dec. 2020. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121186>
50. TRAN, L. et al. Quality assessment tools used in systematic reviews of in vitro studies: A systematic review. *BMC Medical Research Methodology*, v. 21, n. 1, p. 101, 2021. <https://doi.org/10.1186/s12874-021-01295-w>

51. ZHANG, C. et al. In vitro and in vivo experimental models for cancer immunotherapy study. *Current Research in Biotechnology*, v. 7, p. 100210-100210, 1 Jan. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2024.100210>
52. DAS, S. et al. Advancing breast cancer research: a comprehensive review of in vitro and in vivo experimental models. *Medical Oncology*, v. 42, n. 3, p. 316, 2025. <https://doi.org/10.1007/s12032-025-02865-4>
53. JIN, J. et al. Challenges and Prospects of Patient-Derived Xenografts for Cancer Research. *Cancers*, v. 15, n. 17, p. 4352, 2023. <https://doi.org/10.3390/cancers15174352>
54. YOU, Q. et al. Animal models of T-cell acute lymphoblastic leukemia: mimicking the human disease. *Journal of Bio-X Research*, v. 1, n. 1, p. 32-40, Jun. 2018. <https://doi.org/10.1097/JBR.0000000000000001>
55. HATCHER, J. M. et al. SRPKIN-1: A Covalent SRPK1/2 Inhibitor that Potently Converts VEGF from Pro-angiogenic to Anti-angiogenic Isoform. *Cell Chemical Biology*, v. 25, n. 4, p. 460-470.e6, 19 Apr. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.01.013>

Supporting Information**Supplemental Table 1 (Table S1). PICO statement****PICO table**

Population (P)	Malignant tumor cells from different lines. Animal models of cancer. Tumor tissue samples from patients.
Intervention (I)	Targeted modulation of SRPK2 expression or activity by recombinant protein, overexpression, knockdown, knockout, pharmacological inhibition, or analysis of its expression levels.
Comparison (C)	Control cells or wild-type cells. Control animals. Non-tumor tissue samples.
Outcome (O)	Tumor and metastatic phenotypic impacts of SRPK2. Cancer cell signaling pathways involving SRPK2. Antitumor and/or antimetastatic results.

Supplemental Table 2 (Table S2). Search Strategy

Database	Search term	Articles found	Date of search	Time
Embase	((“Serine-Arginine Protein Kinase 2” OR “Serine/Arginine Protein Kinase 2” OR “Serine Arginine Protein Kinase 2” OR SRPK2 OR “SRPK 2”) AND (cancer OR adenocarcinoma OR neoplasia OR neoplasm))	(<i>n</i> = 70)	07/14/2025	09h30
PubMed	((“Serine-Arginine Protein Kinase 2” OR “Serine/Arginine Protein Kinase 2” OR “Serine Arginine Protein Kinase 2” OR SRPK2 OR “SRPK 2”) AND (cancer OR adenocarcinoma OR neoplasia OR neoplasm))	(<i>n</i> = 44)	07/14/2025	09h28
ScienceDirect	((“Serine-Arginine Protein Kinase 2” OR “Serine/Arginine Protein Kinase 2” OR “Serine Arginine Protein Kinase 2” OR SRPK2 OR “SRPK 2”) AND (cancer OR adenocarcinoma OR neoplasia OR neoplasm))	(<i>n</i> = 274)	07/14/2025	09h36
Scopus	((“Serine-Arginine Protein Kinase 2” OR “Serine/Arginine Protein Kinase 2” OR “Serine Arginine Protein Kinase 2” OR SRPK2 OR “SRPK 2”) AND (cancer OR adenocarcinoma OR neoplasia OR neoplasm))	(<i>n</i> = 47)	07/14/2025	09h31
Web of Science	((“Serine-Arginine Protein Kinase 2” OR “Serine/Arginine Protein Kinase 2” OR “Serine Arginine Protein Kinase 2” OR SRPK2 OR “SRPK 2”) AND (cancer OR adenocarcinoma OR neoplasia OR neoplasm))	(<i>n</i> = 40)	07/14/2025	09h32

Supplemental Table 3 (Table S3). Prognostic Implications

Author, Year	Cancer Type	Prognostic implications
Liu et al., 2021 [17]	Colon cancer	↑SRPK1/2 in tumor tissues ↓overall survival
Wang et al., 2020 [36]	Colon cancer	↑SRPK2 in tumor tissues, ↑tumor differentiation, ↑T stage, lymph node metastasis, and advanced UICC stage
Gout et al., 2012 [24]	Lung Cancer	↑SRPK2 in tumor tissues, most advanced stage of lung adenocarcinoma
Li et al., 2019 [25]	Lung Cancer	↑SRPK2 in tumor tissues, ↓overall survival
Caetano et al. 2022 [15]	Melanoma	↑SRPK1/2 in single-cell analysis, indicator of poor prognosis
Moreira et al., 2022 [45]	Melanoma	↑SRPK2 in single-cell analysis, ↓ inflammatory response score, enrichment of Wnt/β-catenin and epithelial/mesenchymal transition
Wang et al., 2019 [47]	Pancreatic cancer	↑SRPK2 in tumor tissues, ↑T stage, ↓overall survival, lymph node and liver metastasis, advanced UICC stage
Zhuo et al., 2018 [30]	Prostate cancer	↑SRPK2 in tumor tissues, ↑tumor grade, advanced pathological stage, tumor metastasis, ↓biochemical recurrence-free survival

↑ increase; ↓ decrease

Supplemental Figure 1 (Figure S1).

	Random sequence generation (selection bias)	Baseline characteristics (selection bias)	Allocation concealment (selection bias)	Random housing (performance bias)	Blinding of caregivers/investigators (performance bias)	Random outcome assessment (detection bias)	Blinding of outcome assessment (detection bias)	Incomplete outcome data (attrition bias)	Selective reporting (reporting bias)	Other bias
Caetano et al. (2022)	?	-	-	?	?	?	?	?	+	+
Lee et al. (2017)	?	-	?	?	?	?	?	-	+	+
Li et al. (2019)	?	-	-	?	?	?	?	+	+	+
Liu et al. (2021)	?	-	-	?	?	?	?	+	+	+
Moreira et al. (2018)	?	-	-	?	?	?	?	?	+	+
Moreira et al. (2022)	?	-	?	?	?	?	?	+	+	+
Wang et al. (2016)	?	+	+	?	?	?	?	+	+	+
Zhuo et al. (2018)	?	+	+	?	?	?	?	+	+	+

Figure S1. Risk of bias assessment of the included studies according to the SYRCLE tool. The symbol (+) indicates low risk of bias, (-) indicates no high risk of bias, and (?) indicates unclear risk of bias.

Supplemental Table 4 (Table S4). CAMARADES assessment of the methodological quality of the included studies

Study	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	Score
Caetano et al. (2022) [15]	✓	✓				✓	✓		✓	✓	6
Liu et al. (2021) [17]	✓		✓			✓	✓		✓	✓	6
Li et al. (2019) [25]	✓					✓	✓		✓	✓	5
Wang et al. (2016) [29]	✓		✓			✓	✓		✓	✓	6
Zhuo et al. (2018) [30]	✓		✓			✓	✓		✓	✓	6
Lee et al. (2017) [38]	✓		✓			✓	✓		✓		5
Moreira et al. (2022) [45]	✓	✓				✓	✓		✓	✓	6
Moreira et al. (2018) [46]	✓	✓				✓	✓		✓	✓	6

(1) Publication in peer-reviewed journal, (2) statement of control of temperature, (3) randomization of treatment or control, (4) blinded induction of cancer, (5) blinded assessment of outcome, (6) Avoidance of anesthetics with significant effects on tumor growth or progression, (7) appropriate animal model, (8) sample size calculation, (9) statement of compliance with regulatory requirements, (10) statement regarding possible conflict of interest.

ANEXO
ANEXO A



Journal of Cellular and Molecular Medicine

WILEY

REVIEW OPEN ACCESS

Oncogenic Role of SRPK2 in Different Types of Cancer: A Systematic Review

Samuel Inácio da Silva Paiva¹ | Bárbara Braga Ferreira¹ | Alexandre Martins Oliveira Portes² | Sebastião Felipe Ferreira Costa² | Luiz Otávio Guimarães Ervilha³ | Raoni Pais Siqueira¹ | Juliana Regina Ribeiro de Souza¹ | Luciana Ângelo de Souza¹ | Gustavo Costa Bressan^{1,4}

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil | ²Departamento de Educação Física, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil | ³Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil | ⁴Instituto Nacional de Investigação em Mucosas e Pele (INCT Mucosa e Pele), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Correspondence: Gustavo Costa Bressan (gustavo.bressan@ufv.br)

Received: 25 November 2025 | **Revised:** 29 April 2026 | **Accepted:** 4 May 2026

Keywords: cancer | metastasis | serine/arginine protein kinase 2 (SRPK2) | targeted therapy | tumour

ABSTRACT

A systematic review was conducted to evaluate the available evidence regarding the tumorigenic and metastatic roles of serine/arginine protein kinase 2 (SRPK2) across different cancer types. A range of preclinical studies was included, generally addressing four main aspects: cancer-related signalling pathways involving SRPK2; its prognostic associations; its impact on metastatic and/or tumour phenotypes; and the antitumor and/or antimetastatic effects resulting from its inhibition. Here, we summarise and discuss the mechanisms through which SRPK2 exerts its oncogenic functions, as well as the therapeutic potential of targeting this kinase. SRPK2 may promote cancer development through its canonical role in alternative splicing, as well as through its involvement in diverse cellular signalling pathways. Moreover, elevated SRPK2 expression across multiple human malignancies consistently correlates with poor clinical outcomes. Collectively, these findings highlight SRPK2 as a promising therapeutic target and potential tumour biomarker.

ANEXO B

Participação em co-autoria de artigo científico publicado.

Artigo publicado no *Journal of Molecular Structure*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2026.146020>

Received 18 October 2025; Received in revised form 4 March 2026; Accepted 16 March 2026.



Antimetastatic activity evaluation of diamides inspired by SRPK inhibitor *N*-[2-(piperidin-1-yl)-5-(trifluoromethyl) phenyl] isonicotinamide (SRPIN340)

Michelle Peixoto Rodrigues^{a,1}, Samuel Inácio da Silva Paiva^{b,1},
 Juliana Regina Ribeiro de Souza^{b,1}, Raoni Pais Siqueira^{b,1},
 Éverton de Almeida Alves Barbosa^c, Alex Ramos de Aguiar^a,
 Marcus Vinícius de Andrade Barros^a, Deborah Campos Thomaz^a,
 Laís Azevedo Rodrigues^b, Juliana Lopes Rangel Fietto^b,
 Giovanni Wilson Amarante^c, Fabrício Marques de Oliveira^d,
 Adilson Vidal Costa^e, Osmair Vital de Oliveira^f,
 Gustavo Costa Bressan^{b,*}, Róbson Ricardo Texeira^{h,4}

^a Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

^b Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

^c Departamento de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

^d Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de Minas Gerais, Campus Ouro, Ouro Branco, Minas Gerais, Brazil

^e Departamento de Química e Física, Universidade Federal do Espírito Santo, Campus Alegre, Espírito Santo, Brazil

^f Instituto Federal de São Paulo, Caranduaçu, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
 Diamides
 Azlactone ring-opening
 SRPK
 SRPIN340
 Antimetastatic activity
In silico study

ABSTRACT

This study reports the synthesis and cytotoxic evaluation of twenty-two diamides inspired by *N*-[2-(piperidin-1-yl)-5-(trifluoromethyl)phenyl]isonicotinamide (SRPIN340), an ATP-competitive inhibitor of the oncogenic serine/arginine protein kinases SRPK1 and SRPK2. The diamides were synthesized via Brønsted acid-catalyzed azlactone ring-opening and characterized by IR, HRMS, and NMR (¹H and ¹³C) techniques. Their cytotoxicity was assessed using MTT assays against HeLa, HepG2, and 4T1 tumor cell lines, as well as non-tumor VERO and HEK293 cells. Among them, *N*-[2-((2-((4-fluorophenyl)amino)-5-(trifluoromethyl)phenyl)amino)-2-oxoethyl]benzamide (**4h**) exhibited significant cytotoxicity, reducing 4T1 cell migration and colony formation. Moreover, **4h** impaired SRPK1 nuclear shuttling, suggesting anti-SRPK activity, corroborated by molecular docking, which shows that **4h** binds to the ATP site of SRPK1/2. Molecular dynamics simulations for 70 ns demonstrate that the inhibitors **4h** and SRPIN340, when complexed with SRPK1 and SRPK2, maintain structural stability throughout the simulation, remaining within the ATP-binding region. The lowest binding free energy, as predicted by the MM/PBSA method for compound **4h** in both kinases, suggests the potential for dual inhibition of these enzymes. Overall, this study highlights a promising diamide scaffold for developing antitumor and antimetastatic agents, reinforcing the relevance of SRPK1/2 as therapeutic targets.