



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo da proteína esfingosina quinase 2 em câncer de cabeça e
pescoço**

Lais Brigliadori Fugio

Ribeirão Preto

2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo da proteína esfingosina quinase 2 em câncer de cabeça e
pescoço**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia

Orientadora: Profa. Dra. Andréia Machado Leopoldino

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto em 09/03/2022. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2022

FUGIO, L. B.

**Estudo da proteína esfingosina quinase 2 em cancer de
cabeça e pescoço**

Espaço de 2,5 cm
reservado para
etiqueta de
localização da
biblioteca

DOUTORADO
FCRPUSP
2022

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

[Fugio, Lais Brigliadori](#)

Estudo da proteína esfingosina quinase 2 em câncer de cabeça e pescoço. Ribeirão Preto, 2022.
139 p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Imunologia e Fisiopatologia.

Orientador: [Leopoldino, Andréia Machado](#).

1. Esfingolipídios. 2. Esfingosina-1-fosfato. 3. Autofagia. 4. Dinâmica mitocondrial. 5. Transição epitélio-mesenquimal. 6. Tumorigênese.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lais Briigliadori Fugio

Estudo da proteína esfingosina quinase 2 em câncer de cabeça e pescoço

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Área de Concentração: Imunologia e fisiopatologia

Orientadora: Profa. Dra. Andréia Machado Leopoldino

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho aos que me trouxeram até aqui:
Minha mãe Cecília, meu pai Nivaldo e minha irmã Flávia,
pelo maior amor que eu poderia receber, por estarem sempre presentes,
e me incentivarem, todos os dias, a ser a melhor em mim.

Obrigada Deus, pela minha família.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Andréia Machado Leopoldino, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e pela confiança que sempre depositou em mim. Obrigada pelo aprendizado, pela paciência, pelo respeito e carinho. Sempre lembrarei de todas as vezes que você me incentivou e fez eu me desafiar, provando que sou capaz. Obrigada!

À Profa. Dra. Luciana Oliveira de Almeida, pelas trocas em reuniões de grupo, pelo aprendizado e pela ajuda nos experimentos com os animais.

Aos técnicos Cristiana Bernardelli, Lucas de Oliveira Sousa e Emerson Santos, pelo apoio, pela ajuda, dedicação e paciência que sempre tiveram quando precisei. Em especial, agradeço à Cris por me ajudar desde o primeiro dia e pelo carinho que sempre teve comigo.

Aos meus companheiros de laboratório, Gabriel, Raquel, Andrea e Fernanda, por estarem sempre presentes, me ajudarem e contribuírem ainda mais com meu trabalho. Em especial à minha amiga e companheira, Ana Júlia, pelas conversas, risadas e recadinhos. Obrigada pela sua amizade e por acreditar no meu potencial, não só, mas principalmente, para jogos.

À minha companheira e aluna de iniciação científica, Camila Ferraz, pela dedicação, por estar sempre presente e me ajudar nos ensaios de zimografia e *wound healing*.

À Glauce L. Trevisan, companheira do nosso grupo, LMSCC, FCFRP-USP, pela ajuda e colaboração na execução e na análise dos experimentos de imunohistoquímica.

À Fernanda Coeli-Lacchini, pós-doutoranda do nosso grupo, LMSCC, FCFRP-USP, que em com a colaboração da Dra. Tathiane Maistro Malta, jovem pesquisadora na FCFRP-USP, realizou as análises de RNA-Seq.

Ao Gabriel da Silva, pós-doutorando do nosso grupo, LMSCC, FCFRP-USP, pela colaboração na realização do ensaio de imunoprecipitação de cromatina (ChIP). Obrigada pela ajuda de sempre e por contribuir tanto com o meu trabalho.

À Profa. Dra. Cristiane Damas Gil pelas análises de microscopia eletrônica de transmissão feitas em seu laboratório no Departamento de Morfologia e Genética na UNIFESP, São Paulo.

Ao Dr. Júlio, patologista do laboratório Novolabvet de Ribeirão Preto – SP, pelo processamento e pelas análises histopatológicas dos cortes de tecidos obtidos nos nossos experimentos in vivo.

Aos meus antigos colegas de laboratório, Karina, Renata, Lays e Leandro, que estavam presentes quando cheguei. Obrigada pelos ensinamentos. Levo um pouco de cada um de vocês comigo.

Ao meu grupo aquariano da bioquímica, Verônica e Gustavo, pelas conversas, pelas trocas e pelo alívio diário com as risadas, comidas e os desabafos durante a semana. Vocês estão no meu coração.

Às minhas amigas de Ribeirão Preto e Jardinópolis, por sempre me apoiarem e transformarem meus dias turbulentos em momentos leves com nossos encontros.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À FAPESP pelo apoio financeiro concedido no processo n. 2016/19103-2 e pela bolsa de doutorado direto 2018/14225-8, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

“ (...) o que me faz correr é sempre o mesmo, uma vontade de saber mais e o de deixar contado às pessoas, nos livros, sabe. Deixar nos livros aquilo que se descobre, porque um livro, com o que contém, pode ser uma fortuna eterna (...) ”

A máquina de fazer espanhóis – Valter Hugo Mãe

RESUMO

FUGIO, L. B.; Estudo da proteína esfingosina quinase 2 em câncer de cabeça e pescoço. 2022. 138f. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

A esfingosina-1-fosfato (S1P) é produzida nas células a partir da fosforilação da esfingosina, catalisada pela esfingosina quinase 1 (SK1) e 2 (SK2), e pode atuar em vias de sinalização autócrinas e intracelulares. Alterações nos níveis de S1P e das enzimas SK1 e SK2 são descritas em diversas patologias, tais como câncer e doenças autoimunes. Embora alguns esfingolípídios e genes associados ao seu metabolismo estejam sendo sugeridos como candidatos a biomarcadores em câncer oral, ainda existem questões que precisam ser esclarecidas para propô-los como potenciais alvos terapêuticos. Por isso, neste estudo, propomos avaliar como diferentes níveis da proteína SK2 afetam a sinalização e a biologia de células epidermóides orais utilizando linhagens celulares de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP: HN13 e HN12) e de queratinócito oral não-tumoral (NOK-SI). O knockdown da proteína SK2 em células HN13 e NOK-SI foi realizado por RNA de interferência estável (short hairpin RNA), enquanto a superexpressão estável foi obtida nas células HN12 e NOK-SI usando vetor lentiviral contendo cDNA para SK2. Nossos resultados *in vitro* mostraram que a superexpressão ou knockdown da SK2 regulou proteínas de várias vias de sinalização em todas as linhagens celulares, alterando diferentes parâmetros celulares, como acetilação de histonas, proliferação, autofagia, progressão do ciclo celular, dinâmica mitocondrial e transformação celular. Além disso, experimentos em camundongos BALB/c nude de formação de tumor xenoinxerto mostraram que o acúmulo de SK2 em células NOK-SI induz transformação oncogênica. Nas células HN12, o acúmulo de SK2 acentuou o seu potencial tumorigênico, aumentando proliferação e crescimento do tumor. Assim, à medida que o acúmulo de SK2 por si é capaz de induzir a transformação maligna de queratinócitos não tumorais (NOK-SI) e alterar diversos processos celulares, concluímos que a SK2 apresenta função relevante na oncogênese oral, constituindo-se em um potencial alvo terapêutico no câncer de cabeça e pescoço.

Palavras-chave: Esfingolípídios, esfingosina-1-fosfato, autofagia, dinâmica mitocondrial, transição epitélio-mesenquimal, tumorigênese

ABSTRACT

FUGIO, L. B.; Study of sphingosine kinase 2 in head and neck cancer. 2022. 138f. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Sphingosine-1-phosphate (S1P) is produced in cells from sphingosine phosphorylation, catalyzed by sphingosine kinase 1 (SK1) and 2 (SK2), and can act in autocrine and intracellular signaling pathways. Changes in the levels of S1P and SK1 and SK2 enzymes are described in several pathologies, such as cancer and autoimmune diseases. Although some sphingolipids and genes associated with their metabolism are being suggested as candidates for biomarkers in oral cancer, there are still questions that need to be clarified to propose them as potential therapeutic targets. Therefore, in this study, we propose to evaluate how different levels of the SK2 protein affect the signaling and biology of oral squamous cells using head and neck squamous cell carcinoma (CECP: HN13 and HN12) and non-tumor oral keratinocyte (NOK-SI) cell lines. Knockdown of SK2 protein in HN13 and NOK-SI cells was performed by stable interference RNA (short hairpin RNA), while stable overexpression was obtained in HN12 and NOK-SI cells using a lentiviral vector containing cDNA for SK2. Our in vitro results showed that SK2 overexpression or knockdown regulated proteins of various signaling pathways in all cell lines, altering different cellular parameters such as histone acetylation, proliferation, autophagy, cell cycle progression, mitochondrial dynamics and cell transformation. Furthermore, experiments in xenograft tumor forming nude BALB/c mice showed that SK2 accumulation in NOK-SI cells induces oncogenic transformation. In HN12 cells, the accumulation of SK2 accentuated their tumorigenic potential, increasing proliferation and tumor growth. Thus, as the accumulation of SK2 itself is capable of inducing the malignant transformation of non-tumor keratinocytes (NOK-SI) and altering several cellular processes, we conclude that SK2 has a relevant role in oral oncogenesis, constituting a potential therapeutic target in head and neck cancer.

Keywords: Sphingolipids, sphingosine-1-phosphate, autophagy, mitochondrial dynamics, epithelial-mesenchymal transition, tumorigenesis

LISTA DE ABREVIATURAS

3-MA	3-Metil-Adenina
ALDH1	Aldeído desidrogenase 1
ATP	Adenosina 5' trifosfato
cDNA	DNA complementar
CECP	Carcinoma epidermoide de Cabeça e Pescoço
CTTs	Células tronco tumorais
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECL	<i>Enhancer chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
EGF	Fator de crescimento epidermal
TEM	Transição epitélio mesenquimal
EROs	Espécies reativas de oxigênio
HDAC	Histona deacetilase
HEK293	Células 293 de rim embrionárias humanas
Hsc70	Proteína heat shock de 70 kDa
kDa	Kilo Daltons
LAMP2A	Glicoproteína de membrane associada ao lisossomo 2
LDH	Lactato desidrogenase
Lys	Lisina
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
Mfn	Mitofusina

mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
°C	Graus Celsius
OXPPOS	Fosforilação oxidativa
p/v	Relação peso por volume
PBS	Tampão salina fosfato
qRT-PCR	PCR em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
SBF	Soro Bovino Fetal
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS
Ser	Serina
shRNA	<i>Short hairpin</i> RNA
TBS-T	Tampão salina Tris com Tween-20
TGFβ	Fator de crescimento transformador beta
Thr	Treonina
v/v	Relação volume por volume
x g	Aceleração da gravidade
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via de síntese e degradação da S1P.....	25
Figura 2. S1P medeia suas funções através dos S1PRs.....	27
Figura 3. Distribuição, regulação e ações da proteína SK2 nas células.	29
Figura 4. Vias da autofagia em mamíferos.	32
Figura 5. Via da autofagia seletiva.	35
Figura 6. Fissão e fusão mitocondrial.	39
Figura 7. Fluxograma da estratégia usada para realização do estudo.	43
Figura 8. Perfil de expressão de SK2, SK1 e S1PR1 em linhagens CECP.	64
Figura 9. Knockdown de SK2 na linhagem HN13.	65
Figura 10. Knockdown da SK2 regula proteínas relacionadas à proliferação celular e acetilação de histona em células HN13.	66
Figura 11. Knockdown de SK2 em células HN13 reduz proliferação e aumenta atividade de MMP2.....	67
Figura 12. Knockdown da SK2 nas células HN13 reduz nível de LC3 e aumenta fluxo autofágico.....	68
Figura 13. Knockdown da SK2 reduz p-DRP1 e aumenta nível de SET em células HN13.	70
Figura 14. Knockdown da SK2 em células HN13 causa alteração em mitocôndrias.....	71
Figura 15. Confirmação da superexpressão da SK2 na linhagem HN12.....	72
Figura 16. Superexpressão da SK2 nas células HN12 aumenta os níveis de proteínas relacionadas à proliferação celular.....	73
Figura 17. Superexpressão de SK2 em células HN12 reduz o potencial de migração e invasão, assim como as MMP-2 e MMP-9.....	75
Figura 18. Superexpressão da SK2 reduz o fluxo autofágico em células HN12.....	76
Figura 19. Superexpressão da SK2 na HN12 induz mitofagia.....	77
Figura 20. Superexpressão da SK2 em células HN12 aumenta os níveis de PINK1 em mitocôndrias.	78
Figura 21. Superexpressão da SK2 na HN12 reduz a interação da Beclina-1 com Bcl-2.	80
Figura 22. Microscopia eletrônica de transmissão das células HN12 com superexpressão da SK2.	81

Figura 23. Superexpressão da SK2 aumenta EROs e reduz o potencial de membrana mitocondrial.....	82
Figura 24. Superexpressão da SK2 aumenta produção de ATP nas células HN12.	83
Figura 25. Confirmação da superexpressão e knockdown da SK2 na linhagem NOK-SI.....	85
Figura 26. Superexpressão da SK2 aumenta sinalização de proteínas relacionadas à proliferação e reduz acetilação de histone H4 nas células NOK-SI.....	86
Figura 27. Superexpressão da SK2 nas células NOK leva a perda de checagem na fase G2/M do ciclo e aumenta a proliferação.....	88
Figura 28. Superexpressão da SK2 na linhagem NOK-SI induz a transição epitélio-mesenquimal.....	89
Figura 29. Superexpressão de SK2 reduz potencial migratório em linhagem de queratinócito não-tumoral NOK-SI.....	90
Figura 30. Superexpressão da SK2 nas células NOK-SI reduz a subpopulação de células CD44+ e CD44+/ALDH1 ^{hi} e aumenta a subpopulação com atividade de ALDH1 ^{hi}	91
Figura 31. Superexpressão da SK2 nas células NOK-SI aumenta a capacidade de formação de esferas.....	92
Figura 32. Superexpressão da SK2 reduz atividade de transcricional de p53 e induz senescência celular em linhagem NOK-SI.....	94
Figura 33. Superexpressão da SK2 em células NOK-SI reduz a proteína SET no núcleo e mitocôndria e aumenta a isoforma 2 da SET no citosol.....	95
Figura 34. Superexpressão da SK2 nas células NOK-SI aumenta o fluxo autofágico.....	96
Figura 35. Diferentes níveis de SK2 alteram massa mitocondrial nas células NOK-SI.....	97
Figura 36. Superexpressão da SK2 induz fissão mitocondrial em células NOK-SI.....	98
Figura 37. Células NOK-SI com superexpressão da SK2 apresentam alterações estruturais que indicam estresse celular e alterações mitocondriais.....	99
Figura 38. Células NOK-SI com Knockdown da SK2 possuem alterações estruturais como acúmulo de mitocôndrias alongadas e acúmulo de vesículas.....	100
Figura 39. Superexpressão da SK2 aumenta o nível de proteínas ubiquitinadas em células NOK-SI que podem ser degradadas tanto por autofagia quanto por proteassoma.....	101

Figura 40. Superexpressão da SK2 nas células NOK-SI reduz o potencial de membrana mitocondrial e aumenta EROs.	102
Figura 41. Superexpressão da SK2 aumenta o metabolismo mitocondrial das células NOK-SI.	103
Figura 42. Superexpressão da SK2 aumenta o potencial tumorigênico das células HN12.	104
Figura 43. Tumores xenoenxerto das células HN12 SK2 tem maior taxa de proliferação e mitoses do que tumores HN12 pLenti.	105
Figura 44. Superexpressão da SK2 transforma a linhagem celular não-tumoral NOK e induz formação de tumor.....	106
Figura 45. Tumores xenoenxerto formados pelas células NOK-SI com superexpressão da SK2 tem alta taxa proliferativa.....	107
Figura 46. Knockdown da SK2 em células NOK-SI não induz formação de tumor xenoenxerto em camundongo nude.....	108
Figura 47. Superexpressão da SK2 aumenta os níveis de S1P nos tumores xenoenxerto.....	109

SUMÁRIO

1. Introdução	22
1.1 Câncer epidermoide de cabeça e pescoço	22
1.2 Esfingolipídios.....	24
1.3 Esfingosina quinase 2 (SK2).....	28
1.4 Autofagia.....	31
1.5 Mitofagia	34
1.6 Dinâmica mitocondrial	37
2. Objetivo	41
3. Materiais e métodos	43
3.1 <i>Linhagens celulares e cultura celular</i>	43
3.2 <i>Superexpressão da esfingosina quinase 2 (SK2) em células HN12 e NOK-SI45</i>	
3.3 <i>Knockdown da SK2 em HN13 e NOK-SI</i>	45
3.4 <i>Extração de proteínas</i>	46
3.5 <i>Quantificação de proteínas</i>	46
3.6 <i>Eletroforese SDS-PAGE e Western Blot (WB)</i>	46
3.7 <i>Fracionamento subcelular</i>	48
3.8 <i>Análise por PCR em tempo real</i>	48
3.9 <i>Imunofluorescência e microscopia confocal</i>	48
3.10 <i>Imunocitoquímica</i>	49
3.11 <i>Imunohistoquímica</i>	50
3.12 <i>Ensaio de dosagem de ATP</i>	50
3.13 <i>Ensaio de dosagem de lactato</i>	51
3.14 <i>Ensaio de formação de esferas</i>	51
3.15 <i>Atividade transcricional de p53</i>	52
3.16 <i>Análises de sequenciamento de RNA (RNA-Seq)</i>	52
3.17 <i>Ensaio de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) para análise do promotor do gene P21</i>	53

3.18	<i>Análise de espécies reativas de oxigênio</i>	55
3.19	<i>Determinação da atividade de citrato sintase</i>	55
3.20	<i>Análise do potencial de membrana mitocondrial</i>	55
3.21	<i>Ensaio de senescência celular</i>	56
3.22	<i>Ensaio de migração em transwell</i>	56
3.23	<i>Ensaio de “wound healing”</i>	57
3.24	<i>Zimografia</i>	57
3.25	<i>Citometria de fluxo para ALDH e CD44</i>	58
3.26	<i>Análise do ciclo celular</i>	58
3.27	<i>Microscopia eletrônica de transmissão (MET)</i>	59
3.28	<i>Ensaio de tumorigenicidade</i>	60
3.29	<i>Quantificação de S1P por ELISA</i>	61
3.30	<i>Análises estatísticas</i>	61
4.	Resultados	63
4.1	<i>Estudo do efeito do knockdown da SK2 na linhagem tumoral HN13</i>	63
4.1.1	<i>Perfil de expressão de SK1, SK2 e de S1PR1 nas linhagens de CECP</i>	63
4.1.2	<i>Obtenção e caracterização molecular de linhagens de CECP com knockdown de SK2</i>	64
4.1.3	<i>Efeito do knockdown da SK2 na proliferação e transformação celular na linhagem tumoral HN13</i>	65
4.1.4	<i>Efeito do knockdown da SK2 no processo de autofagia na linhagem celular tumoral HN13</i>	67
4.2	<i>Estudo do efeito da superexpressão da SK2 na linhagem tumoral HN12</i>	71
4.2.1	<i>Obtenção e caracterização molecular de linhagem de CECP (HN12) com superexpressão de SK2</i>	71
4.2.2	<i>Efeito da superexpressão da SK2 na proliferação e transformação celular na linhagem tumoral HN12</i>	73
4.2.3	<i>Efeito da superexpressão da SK2 no processo de autofagia na linhagem celular tumoral HN12</i>	75
4.2.4	<i>Efeito da superexpressão da SK2 no metabolismo mitocondrial da linhagem celular tumoral HN12</i>	81
4.3	<i>Estudo do efeito da superexpressão e knockdown da SK2 em queratinócitos orais não tumorais</i>	84

4.3.1 Obtenção da linhagem de queratinócito oral não-tumoral com superexpressão e knockdown de SK2.....	84
4.3.2 Efeito da superexpressão e knockdown da SK2 na proliferação e transformação na linhagem celular de queratinócito não-tumoral NOK	86
4.3.3 Investigação do efeito do knockdown e da superexpressão da SK2 no processo de autofagia na linhagem celular de queratinócito não-tumoral NOK-SI	95
4.4 Efeito da superexpressão de SK2 na tumorigênese das células NOK-SI e HN12.....	103
5. Discussão	111
5.1 SK2 regula a fissão mitocondrial e autofagia/mitofagia em células de queratinócito oral não-tumoral e de CECP	111
5.2 Superexpressão da SK2 induz OXPHOS nas células de queratinócito oral não-tumoral e de CECP	114
5.3 SK2 regula proteínas do ciclo celular, fatores de transcrição e acetilação de histonas de células de queratinócito oral não-tumoral e de CECP	116
5.4 SK2 regula atividade das MMPs e induz a TEM	120
5.5 SK2 induz transformação celular da NOK-SI e contribui com a tumorigênese da HN12.....	122
6. Conclusão	125
7. Referências Bibliográficas	127

Introdução

1. Introdução

1.1 Câncer epidermoide de cabeça e pescoço

O carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP) é o sexto câncer mais incidente do mundo, com 890 mil novos casos novos registrados e 450 mil óbitos em 2018 (BRAY; FERLAY; SOERJOMATARAM; SIEGEL *et al.*, 2018; FERLAY; COLOMBET; SOERJOMATARAM; MATHERS *et al.*, 2019). A incidência de CECP continua subindo e segundo o *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN), é previsto um aumento de 30% em 2030 (BRAY; FERLAY; SOERJOMATARAM; SIEGEL *et al.*, 2018; FERLAY; COLOMBET; SOERJOMATARAM; MATHERS *et al.*, 2019).

O CECP engloba tumores originados da mucosa epitelial da cavidade oral (mucosa bucal, palato duro, língua, assoalho da boca e trígono retromolar), faringe (nasofaringe, orofaringe e hipofaringe) e laringe (JOHNSON; BURTNES; LEEMANS; LUI *et al.*, 2020).

Há vários fatores de risco para o desenvolvimento de CECP que incluem antecedentes genéticos, dieta, hábitos, fatores geográficos e socioeconômicos (YU; CIRILLO, 2020). Estudos epidemiológicos revelaram hábitos considerados fatores de risco, classificados pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) da Organização Mundial da Saúde (OMS), são eles: consumo de tabaco, álcool, exposição à poluentes ambientais, fatores genéticos e infecção com agentes virais (Papilomavírus Humano, HPV, e vírus Epstein-Barr, EBV) (JOHNSON; BURTNES; LEEMANS; LUI *et al.*, 2020). O consumo de tabaco e álcool aumenta em 35 vezes o risco de desenvolver CECP (BLOT; MCLAUGHLIN; WINN; AUSTIN *et al.*, 1988). Além disso, o consumo de noz de areca em alguns países da Ásia e Pacífico, como na Índia, Taiwan e algumas províncias da China, está associado ao grande número de casos de câncer de cavidade oral (BLOT; MCLAUGHLIN; WINN; AUSTIN *et al.*, 1988; ZHANG; LI; CONG; HU *et al.*, 2018). Os tratamentos atuais para esse tipo de câncer são ressecção cirúrgica, seguida de radiação adjuvante ou quimioterapia junto com radiação (conhecida como quimiorradiação ou quimiorradioterapia) dependendo do estadiamento da doença (JOHNSON; BURTNES; LEEMANS; LUI *et al.*, 2020).

Apesar dos avanços na medicina e no desenvolvimento de novos tratamentos contra o câncer, a sobrevivência de pacientes com CECP não teve melhora nas últimas décadas (MURDOCH, 2007). Isso está, em parte, relacionado à resistência ao

tratamento, que pode ser impulsionada por uma subpopulação de células-tronco tumorais, CTTs (YU; CIRILLO, 2020). Uma das hipóteses é que o câncer tenha origem em células tronco adultas normais ou células progenitoras que sofreram transformação oncogênica, gerando as CTTs com propriedades de autorrenovação e pluripotência (JOHNSON; BURTNES; LEEMANS; LUI *et al.*, 2020).

Cabe ressaltar que o microambiente tumoral é muito heterogêneo e contém células tumorais, endoteliais, do sistema imune e fibroblastos (JOHNSON; BURTNES; LEEMANS; LUI *et al.*, 2020). A produção de fatores de crescimento, como VEGF, estimula a neovascularização, o que suprime de oxigênio e nutrientes o tumor. As células endoteliais secretam fatores que auxiliam a sobrevivência e autorrenovação das CTTs (KRISHNAMURTHY; DONG; VODOPYANOV; IMAI *et al.*, 2010). No entanto, a presença de CTTs tem impacto no prognóstico e na resposta terapêutica dos tumores de cabeça e pescoço, uma vez que elas são mais resistentes aos tratamentos (YU; CIRILLO, 2020). Portanto, a principal abordagem terapêutica contra as CTTs implica em aumentar a sensibilidade aos tratamentos, promovendo a diferenciação e bloqueando vias de sinalização importantes para as CTTs de CECP, para destruir os nichos dessa subpopulação (GARVALOV; ACKER, 2011).

Já foram descritos alguns biomarcadores para as CTTs de CECP, tais como CD44 e ALDH1. O CD44 é uma glicoproteína transmembrana de cadeia única amplamente expressa em condições fisiológicas e patológicas (DESTRO RODRIGUES; SEDASSARI; ESTEVES; DE ANDRADE *et al.*, 2017), e em geral, é amplamente utilizada como marcador de CTTs quando trata-se de CECP (FABER; BARTH; HÖRMANN; KASSNER *et al.*, 2011). No entanto, há estudos mostrando que CD44 é expressa tanto em tecido glandular normal quanto em tecido neoplásico (DESTRO RODRIGUES; SEDASSARI; ESTEVES; DE ANDRADE *et al.*, 2017). Em 2005, Seino e colaboradores (SEINO; SHIGEISHI; HASHIKATA; HIGASHIKAWA *et al.*, 2016) mostraram que células positivas para CD44 e com alta atividade enzimática ALDH1 tem maior capacidade de formação de esferas tumorais, bem como maior tumorigênese.

ALDH1 é uma enzima intracelular (família de aldeído desidrogenase), utilizada na identificação de células-tronco normais e CTTs, capaz de mediar a oxidação da vitamina A e que desempenha papéis importantes no crescimento celular, diferenciação e homeostase do tecido (MA; ALLAN, 2011; YU; CIRILLO, 2020). Além

disso, o aumento da expressão ou atividade de ALDH1 está associado à invasão, metástase, autorrenovação e pode ter significância no prognóstico de CECP (YU; CIRILLO, 2020). Em geral, células de CECP com propriedades de CTTs também expressam altos níveis de marcadores de células tronco como OCT4, SOX2 e NANOG (CHIOU; YU; HUANG; LIN *et al.*, 2008).

Apesar do conhecimento sobre a instabilidade genética, como perda ou ganho de regiões cromossômicas já conhecidas, e estudos demonstrando alterações epigenéticas e expressão aberrante de RNAs/proteínas sinalizadoras e/ou ativação de vias de sinalização em tumores de CECP (NETWORK, 2015; WANG; VALERA; ZHAO; CHEN *et al.*, 2017), ainda é de extrema importância a identificação de novos biomarcadores moleculares. Os biomarcadores são úteis para definir a progressão de lesões pré-malignas, prognóstico do paciente, resposta aos agentes terapêuticos e identificar novos alvos (JOHNSON; BURTNESS; LEEMANS; LUI *et al.*, 2020).

1.2 Esfingolipídios

Esfingolipídios são lipídios compostos por uma cadeia longa de aminoálcool de 18 carbonos contendo um ácido graxo ligado a uma amida (estrutura base da esfingosina, “*backbone*”), e são sintetizados no retículo endoplasmático (via de síntese *de novo*). A cadeia principal, “*backbone*”, pode sofrer modificações para gerar novos esfingolipídios com diferentes funções, portanto, o metabolismo desta classe de lipídios é ramificado, interconectado e regulado por várias enzimas que ditam os níveis celulares dos esfingolipídios (HERNÁNDEZ-CORBACHO; SALAMA; CANALS; SENKAL *et al.*, 2017) (Figura 1). Além das propriedades lipídicas, como estabilidade mecânica, suporte estrutural, barreira protetora e locais de adesão para proteínas extracelulares, os esfingolipídios também regulam importantes processos celulares, como proliferação, migração, invasão (e/ou metástase) e morte celular, e por isso são considerados como “lipídios bioativos” (DRESSLER; MATHIAS; KOLESNICK, 1992; HANNUN; BELL, 1987; TAMASHIRO; FURUYA; SHIMIZU; IINO *et al.*, 2013).

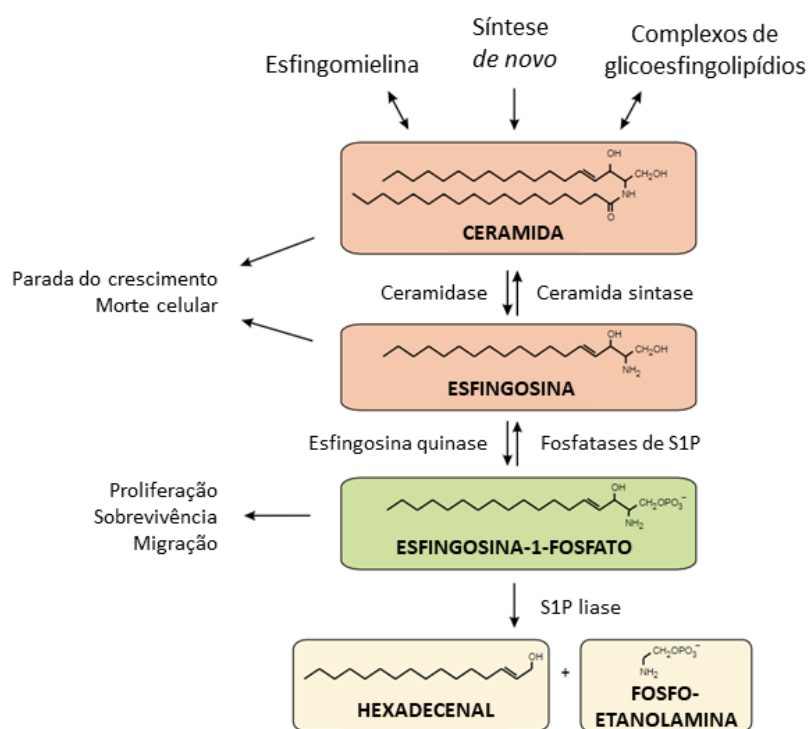


Figura 1. Via de síntese e degradação da S1P. As estruturas dos esfingolípídios são mostradas com as enzimas que catalisam a síntese e degradação da ceramida, esfingosina e S1P (Adaptado de Neubauer e Pitson, 2012).

O primeiro esfingolípido bioativo identificado foi a esfingosina, mas outros metabólitos da via, como esfingosina-1-fosfato (S1P) e ceramida, tem ganhado atenção (HANNUN; OBEID, 2008). Isso porque, a fosforilação do grupo C1-hidroxil da esfingosina pela esfingosina kinase (SK), produz S1P, enquanto a N-acilação da esfingosina pela ceramida sintase, gera ceramida (HERNÁNDEZ-CORBACHO; SALAMA; CANALS; SENKAL *et al.*, 2017). Esse balanço metabólico entre a conversão de ceramida/esfingosina em S1P pode determinar o destino celular, uma vez que esfingosina e ceramida são moléculas pró-apoptóticas e S1P induz proliferação e sobrevivência celular (CUVILLIER; PIRIANOV; KLEUSER; VANEK *et al.*, 1996; LEE; VAN BROCKLYN; THANGADA; LIU *et al.*, 1998).

A ceramida localizada nas mitocôndrias, regula e participa de processos como autofagia/mitofagia, apoptose, necroptose e senescência celular (FUGIO; COELI-LACCHINI; LEOPOLDINO, 2020; OGRETMEN; HANNUN, 2004; TANIGUCHI; KITATANI; KONDO; HASHIMOTO-NISHIMURA *et al.*, 2012; YOUNG; KESTER; WANG, 2013). Já foi descrito que em células malignas, a síntese ou acúmulo de

ceramida em resposta ao estresse, induz a morte por meio de vários mecanismos, dependendo do tipo de tecido e localização subcelular (OGRETMEN, 2018).

As ações biológicas de S1P são promover a proliferação e sobrevivência celular (PYNE; PYNE, 2020), capaz de afetar na regulação epigenética, migração, angiogênese e transformação celular, contribuindo para o desenvolvimento de doenças, como o câncer (PYNE; PYNE, 2010). Além da sua ação intracelular, a S1P pode atuar de maneira autócrina ou parácrina na célula, mecanismo definido como sinalização “inside-out”(TAKABE; PAUGH; MILSTIEN; SPIEGEL, 2008), uma vez que ela pode ser transportada para o meio extracelular, através de transportadores (SPNS2 e transportadores dependentes de ATP e cálcio, incluindo MFSD2B) (NISHI; KOBAYASHI; HISANO; KAWAHARA *et al.*, 2014; VU; ISHIZU; FOO; TOH *et al.*, 2017) e ativar receptores de S1P (S1PRs) por vias de sinalização diferencial, num processo acoplado a diversas proteínas G heterotriméricas (MACEYKA; HARIKUMAR; MILSTIEN; SPIEGEL, 2012). Cinco S1PRs (S1PR1-5) já foram identificados e são diferencialmente expressos nas células, ativando vias de sinalização específicas (HLA; BRINKMANN, 2011). Os S1PR1, S1PR2 e S1PR3 são expressos principalmente em sistemas imunológicos, nervoso central e cardiovascular, S1PR4 é em sistema linfóide tecido hematopoiético e pulmão, e o S1PR5 é predominantemente no cérebro e baço (HANNUN; OBEID, 2008; MENDELSON; ZYGMUNT; TORRES-VÁZQUEZ; EVANS *et al.*, 2013). Dentre eles, o S1PR1 é o mais explorado em câncer, uma vez que sua ativação está associada à migração e invasão celular (CUVILLIER, 2012).

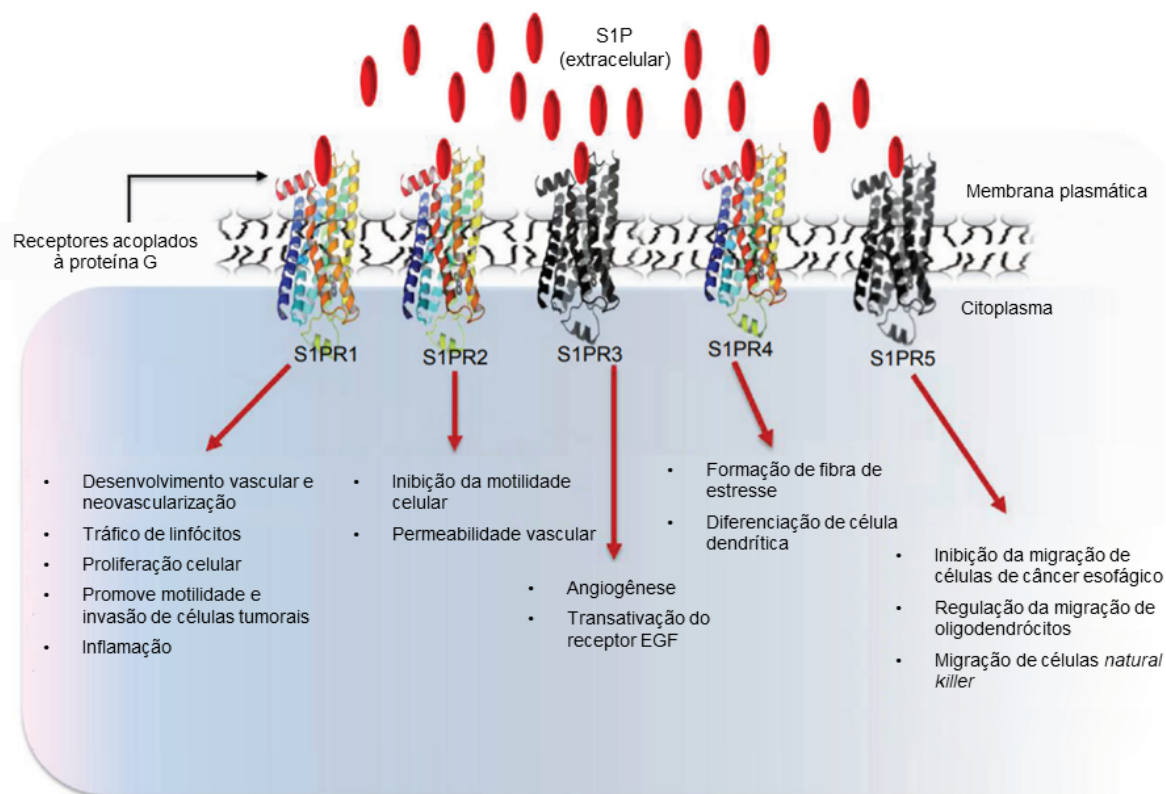


Figura 2. S1P medeia suas funções através dos S1PRs. S1P extracelular se liga aos S1PRs (1-5) e ativa diversas vias de sinalização que regulam processos celulares e fisiológicos (Adaptado de Nema *et al.*, 2016).

No entanto, a função de S1P varia de acordo com o tipo de célula, o local onde é acumulada e dos níveis de S1PRs presentes na célula. A fosforilação de esfingosina para gerar S1P depende de duas enzimas: esfingosina quinase 1 e 2 (SK1 e SK2, respectivamente), isoformas que se diferem em expressão tecidual, localização subcelular e propriedades bioquímicas (CHU; GAO; QU, 2014). Os níveis ou atividades dessas quinases podem ser pontos-chave para o controle do destino celular, tornando-as alvos potenciais no desenvolvimento de terapias contra o câncer (NEUBAUER; PITSON, 2013).

A SK1 está localizada no citosol e, dentre as duas isoformas de SK, é a principal enzima responsável pela geração de S1P nesta localização, onde pode ser ativada por fosforilação pela ERK e estimulada por diversos fatores de crescimento, o que leva à sua translocação para a membrana plasmática e, conseqüente, fosforilação da esfingosina para produzir S1P (HERNÁNDEZ-CORBACHO; SALAMA; CANALS; SENKAL *et al.*, 2017). Já é descrito que SK1 induz proliferação e sobrevivência celular, sendo considerado um oncogene e descrito como superexpresso em vários

tipos de câncer, como próstata, mama, estômago, pulmão, cólon e CECP (NEMA; VISHWAKARMA; AGARWAL; PANDAY *et al.*, 2016; PYNE; PYNE, 2010; TAMASHIRO; FURUYA; SHIMIZU; KAWAMORI, 2014).

A superexpressão de SK1 tem sido também associada à invasão celular e alteração morfológica em carcinoma de células escamosas de esôfago (PAN; TAO; ZHOU; CAO *et al.*, 2011), enquanto o knockdown de SK1 reduz o crescimento de tumores de CECP e o uso do seu inibidor monoclonal específico, SKI-II, aumenta a sensibilidade à radiação (SINHA; SCHORN; HOCHSTIM; CHINN *et al.*, 2011; TAMASHIRO; FURUYA; SHIMIZU; IINO *et al.*, 2013). Além disso, sabe-se que a S1P produzida por SK1 induz invasão de células de CECP pela ativação de STAT3 via S1PR1 (NEMA; VISHWAKARMA; AGARWAL; PANDAY *et al.*, 2016; TAMASHIRO; FURUYA; SHIMIZU; KAWAMORI, 2014). No entanto, os mecanismos por trás da função e regulação da SK2 no câncer permanecem pouco compreendidos (NEUBAUER; PITSON, 2013).

1.3 Esfingosina kinase 2 (SK2)

A SK2, assim como a SK1, pode ser ativada por uma variedade de fatores e condições, incluindo fator de crescimento epidérmico (EGF) em células malignas (PYNE; PYNE, 2020), TNF-alfa, IL-1beta e hipóxia em células endoteliais microvasculares cerebrais (WACKER; PARK; GIDDAY, 2009). A SK2 pode ser fosforilada pela ERK1 nos resíduos Ser351 e Thr578 (HAIT; BELLAMY; MILSTIEN; KORDULA *et al.*, 2007), pela proteína quinase D (PKD) em Ser419 e Ser421 exportando-a para o núcleo (DING; SONODA; YU; KAJIMOTO *et al.*, 2007) e por PKC no núcleo (HAIT; BELLAMY; MILSTIEN; KORDULA *et al.*, 2007) levando ao aumento da acetilação de histona H3 e H4 (EBENEZER; BERDYSHEV; BRONOVA; LIU *et al.*, 2019).

Apesar de SK1 e SK2 terem suas semelhanças e catalisarem a mesma reação, elas se diferem quanto à especificidade do substrato, tamanho, função celular e localização (MACEYKA; SANKALA; HAIT; LE STUNFF *et al.*, 2005). Enquanto a SK1 é uma enzima citosólica, que pode estar presente também na membrana plasmática (JOHNSON; BECKER; FACCHINETTI; HANNUN *et al.*, 2002), a SK2 está localizada no citoplasma, núcleo, retículo endoplasmático e na mitocôndria (HAIT; ALLEGOOD;

MACEYKA; STRUB *et al.*, 2009; HASANIFARD; SHEERVALILOU; MAJIDINIA; YOUSEFI, 2019) (Figura 2).

O papel da SK2 no câncer ainda não está muito bem estabelecido, pois alguns estudos sugerem que a SK2 desempenha um papel oposto ao da SK1. A superexpressão de SK2 em células de glândulas adrenais (PC12) e fibroblastos (NIH 3T3) induziu a apoptose via ativação de BAK e, subsequente, permeabilização da membrana mitocondrial, liberação de *citocromo c* e ativação da caspase-3 (IGARASHI; OKADA; HAYASHI; FUJITA *et al.*, 2003; LIU; TOMAN; GOPARAJU; MACEYKA *et al.*, 2003). Além disso, durante o estresse celular causado pela perturbação da homeostase do cálcio, a SK2 presente no retículo endoplasmático exerce funções pró-apoptóticas em células embrionárias humanas de rim (HEK 293) e fibroblastos (NIH3T3) (MACEYKA; SANKALA; HAIT; LE STUNFF *et al.*, 2005). Outro estudo ainda descreveu que a enzima SK2 também possui um papel na regulação de histonas via produção nuclear de S1P, que inibe HDAC1/2, aumentando acetilação de histonas e, conseqüente, transcrição de p21 e c-fos (HAIT; ALLEGOOD; MACEYKA; STRUB *et al.*, 2009).

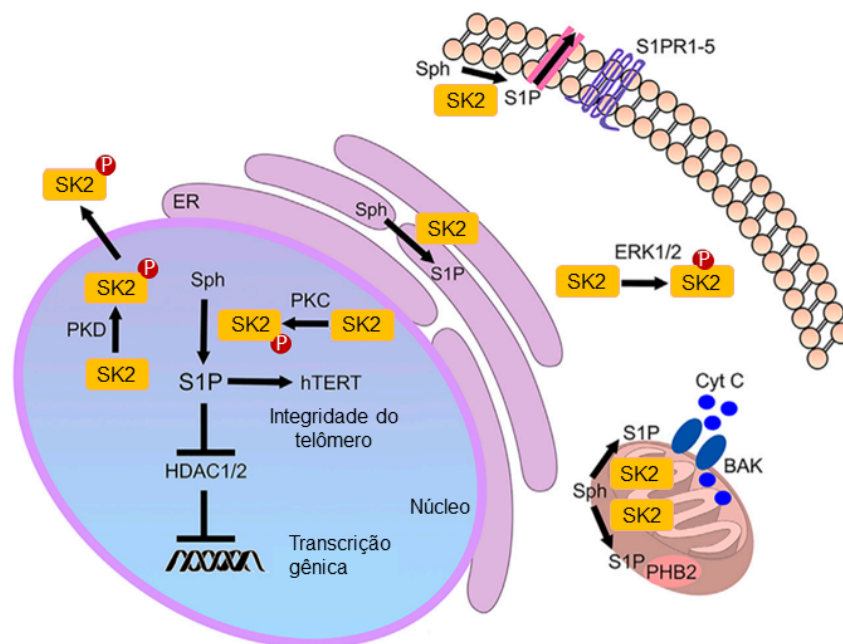


Figura 3. Distribuição, regulação e ações da proteína SK2 nas células. A ativação da SK2 é mediada por ERK1/2 no citosol e pode ser translocada para o núcleo. No núcleo, S1P inibe HDAC1/2, promovendo a transcrição gênica. Em resposta à deprivação de soro ou densidade celular, SK2 produz S1P no retículo endoplasmático (ER). Na mitocôndria, S1P regula proibitina 2 (PHB2) e pode mediar apoptose pela permeabilização da membrana via BAK, conseqüentemente, liberando *citocromo c*. S1P

secretada ou transportada para a membrana plasmática, se liga aos receptores (S1PRs) e ativa vias de sinalização, podendo atuar de forma autócrina ou parácrina (Adaptado de Escarcega *et al.*, 2021).

Em contrapartida, há estudos demonstrando que a SK2 promove leucemia linfoblástica aguda pela indução da expressão de MYC (WALLINGTON-BEDDOE; POWELL; TONG; PITSON *et al.*, 2014) e também, desempenha papel na migração de células de câncer de esôfago induzidas por TGF β e de células de câncer da mama induzidas por EGF, sugerindo que a SK2 atua na metástase (HAIT; SARKAR; LE STUNFF; MIKAMI *et al.*, 2005; MILLER; ALVAREZ; SPIEGEL; LEBMAN, 2008). Experimentos *in vivo* mostraram que o crescimento do tumor é atenuado pelo knockdown de SK2 em tumores xenoenxerto de mama MCF-7, e pelo uso de inibidores de SK2 em modelos tumorais de camundongos, incluindo rim (BELJANSKI; KNAAK; ZHUANG; SMITH, 2011), mama (ANTOON; WHITE; DRIVER; BUROW *et al.*, 2012; FRENCH; ZHUANG; MAINES; GAO *et al.*, 2010; WEIGERT; SCHIFFMANN; SEKAR; LEY *et al.*, 2009), fígado (BELJANSKI; LEWIS; SMITH, 2011) e câncer de cólon (CHUMANEVICH; POUDYAL; CUI; DAVIS *et al.*, 2010). Como citado acima alguns compostos com ação de inibição de SK2 têm sido desenvolvidos e testados como potencial terapia para alguns tipos de câncer e outras doenças (PITMAN; PITSON, 2010). Isso sugere um papel oncogênico para SK2.

As duas isoformas de esfingosina quinases (SK1 e SK2) variam consideravelmente em tamanho (384 e 618 aminoácidos para SK1 e SK2, respectivamente), mas compartilham 5 regiões altamente conservadas (LECLERCQ; PITSON, 2006). A SK2 possui uma região N-terminal e uma região central rica em prolina não encontrada na SK1 ou qualquer outra proteína (NEUBAUER; PITSON, 2013). Além disso, foi identificado um domínio BH3 putativo na SK2, o qual acredita-se mediar as funções pró-apoptóticas por meio de sua interação direta com Bcl-xL (LIU; TOMAN; GOPARAJU; MACEYKA *et al.*, 2003).

A superexpressão de SK2 (mas não de SK1) induz a morte celular através da liberação de citocromo c da mitocôndria, ativando caspase-3 e levando à apoptose em diferentes linhagens celulares: HEK 293, NIH 3T3, MCF7 e PC12 (LIU; TOMAN; GOPARAJU; MACEYKA *et al.*, 2003). Além disso, os efeitos pró-apoptóticos de SK2 demonstraram ser independentes dos receptores de superfície celular de S1P,

sugerindo um papel intracelular de SK2 na regulação da morte por apoptose (LIU; TOMAN; GOPARAJU; MACEYKA *et al.*, 2003).

Devido ao duplo papel da SK2 (supressor tumoral e oncogênico) e ao envolvimento em diversos processos celulares, é necessário elucidar melhor os seus mecanismos de ação bem como seu papel em CECP.

1.4 Autofagia

A autofagia é um processo catabólico altamente regulado e conservado no qual componentes citoplasmáticos, como proteínas, organelas, patógenos e lipídios são sequestrados para serem degradados e reciclados no autolisossomo (YOUNG; WANG, 2018). Há diferentes tipos de autofagia que se diferem morfológica e mecanicamente nas células: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperona (XIE; KLIONSKY, 2007). Na macroautofagia ocorre a formação das vesículas de dupla membrana, chamadas autofagossomos, que envolvem os componentes citoplasmáticos. Estes autofagossomos se fundem a lisossomos, dando origem aos autolisossomos onde ocorre a degradação (KAUR; DEBNATH, 2015).

Microautofagia refere-se à invaginação da membrana lisossomal, resultando no envolvimento direto dos substratos que são degradados pelas proteases lisossomais. E por fim, a autofagia mediada por chaperona difere-se, pois a carga não é sequestrada dentro de uma vesícula, ao invés disso, as proteínas alvo que contêm um motivo pentapeptídeo semelhante a KERFQ, é reconhecido pela chaperona HSC70, a qual promove a translocação desses alvos para a membrana do lisossomo via receptor LAMP2A (CUERVO; WONG, 2014) (Figura 4). Dentre os tipos, a macroautofagia é referida como autofagia (GLICK; BARTH; MACLEOD, 2010).

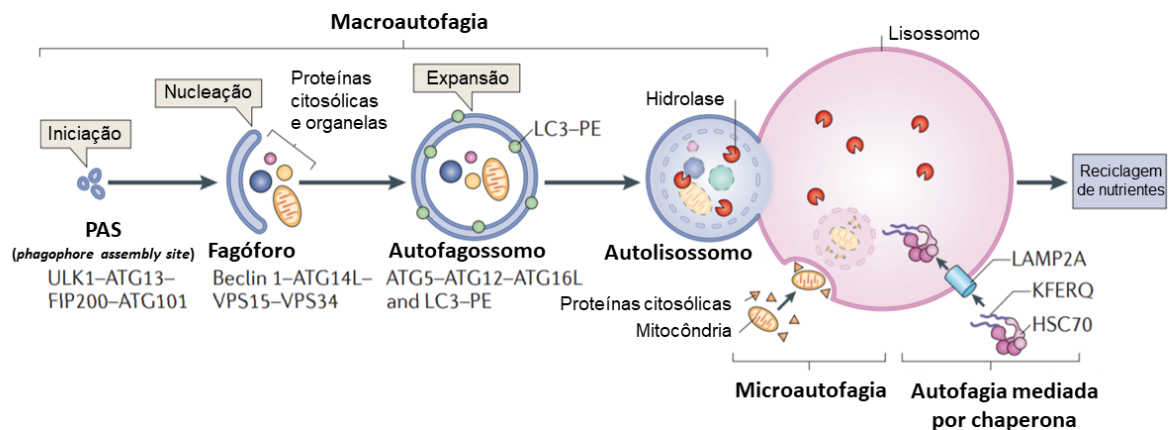


Figura 4. Vias da autofagia em mamíferos. Na macroautofagia ocorre a formação de vesículas de dupla-membrana, chamadas autofagossomos, que envolvem proteínas e organelas citoplasmáticas danificadas. A fusão do autofagossomo com o lisossomo (autolisossomo), é o momento em que a carga sequestrada é degradada. Na microautofagia ocorre a invaginação da membrana lisossomal diretamente nos substratos que são posteriormente degradados por proteases lisossomais. A autofagia mediada por chaperonas difere-se, pois, os substratos contêm um motivo pentapéptido KFERQ que é reconhecido pela chaperona HSC70, promovendo a translocação desses alvos para o lisossomo com o auxílio da proteína LAMP2A (Adaptado de Kaur e Debnath, 2015).

No início da autofagia ocorre a formação do autofagossomo, a qual é dividida em três principais etapas: iniciação, nucleação e expansão da membrana de isolamento (KAUR; DEBNATH, 2015). Na iniciação, proteínas do complexo ULK (composto por ULK1/2, ATG13, FIP200 e ATG101) reúnem-se para formar o autofagossomo (LAMB; YOSHIMORI; TOOZE, 2013). Em seguida, na nucleação, ocorre o recrutamento do complexo de classe III de PI3K (composto por beclina-1, VPS15, VPS34 e ATG14) para promover a produção de fosfatidilinositol-3-fosfato específico para autofagossomos. E, por fim, durante a fase de expansão, o complexo ATG12-ATG15-ATG16 são recrutados para a membrana do autofagossomo para facilitar a lipidação de LC3 com fosfatidiletanolamina. A proteína LC3 é essencial para a expansão da membrana do autofagossomo, reconhecimento dos conteúdos degradados e fusão com o lisossomo. O autofagossomo então se funde com compartimentos lisossomais, forma-se o autolisossomo e o conteúdo autofágico é degradado via hidrolases lisossomais (KAUR; DEBNATH, 2015).

A indução da autofagia pode ser desencadeada por estímulos intracelulares e extracelulares, um deles, por exemplo, é a depleção de nutrientes (KAUR; DEBNATH, 2015). A via de mTOR tem função principal na regulação do metabolismo, crescimento e proliferação celular, bem como prevenção da autofagia. mTOR atua em 2 complexos

distintos: complexo 1 e 2 de mTOR (mTORC1 e mTORC2, respectivamente) (FANTUS; ROGERS; GRAHAMMER; HUBER *et al.*, 2016). mTORC1 é descrito como sensor nutricional, uma vez que ele pode ser ativado por aminoácidos e inibido sob estresse oxidativo e depleção de fonte de energia (FANTUS; ROGERS; GRAHAMMER; HUBER *et al.*, 2016). Dessa forma, sob condições nutricionais, mTORC1 ativo, hiperfosforila ATG13 e bloqueia a formação do complexo da iniciação de ULK1 e FIP200 para formar o autofagossomo, inibindo a autofagia (KAUR; DEBNATH, 2015). Por outro lado, condições de estresse como a depleção de glicose pode ativar AMPK (*AMP-activated protein kinase*), a qual diretamente fosforila e inibe mTORC1, levando à ativação de ULK1 e indução da autofagia (EGAN; SHACKELFORD; MIHAYLOVA; GELINO *et al.*, 2011; KIM; KUNDU; VIOLLET; GUAN, 2011). Outra proteína que induz autofagia em condições de *starving* é a PP2A (*protein phosphatase 2A*), a qual desfosforila ULK1 induzindo sua ativação (WONG; FENG; WANG; SHI *et al.*, 2015).

Alguns metabólitos dos esfingolipídios regulam os complexos ULK1/2 via mTORC1, AMPK e PP2A (YOUNG; WANG, 2018). Já foi descrito que a depleção de aminoácidos aumenta os níveis de ceramida, levando a inibição de mTORC1 via PP2A, e em células de câncer de mama foi mostrado que a atividade de SK1 aumenta em condições de privação nutricional, enquanto sua diminuição reduz autofagia levando à morte celular (LAVIEU; SCARLATTI; SALA; CARPENTIER *et al.*, 2006; TANIGUCHI; KITATANI; KONDO; HASHIMOTO-NISHIMURA *et al.*, 2012). Já em relação à SK2, foi relatado que a SK2 ativa autofagia em células neuronais como mecanismo de proteção contra isquemia, pois devido ao seu domínio putativo BH3, é capaz de se ligar diretamente à Bcl-2, liberando beclina-1 para ativação do processo (SONG; ZHANG; CHEN; XIA *et al.*, 2017). Outro trabalho mostrou que a SK2 evita o acúmulo de colesterol nos macrófagos e a aterosclerose, estimulando a degradação autofágica de lipídios (lipofagia) (ISHIMARU; YOSHIOKA; KANO; KURANO *et al.*, 2019). Por outro lado, em modelo animal usando células tumorais de rim, o inibidor seletivo de SK2, ABC294640, promoveu autofagia e atrasou o crescimento do tumor (BELJANSKI; KNAAK; SMITH, 2010). Há poucos trabalhos relatando o papel da SK2 na autofagia mas assim como na carcinogênese, parece ter duplo mecanismo de ação. Por isso, são necessários novos estudos elucidando a contribuição dessa quinase neste processo, principalmente em câncer.

Questiona-se muito sobre o efeito da ativação ou inibição do processo autofágico para terapia de câncer (YOUNG; WANG, 2018), isso porque sua desregulação é considerada um “*hallmark of cancer*” (HANAHAN; WEINBERG, 2011). No entanto, a autofagia tem funções paradoxais tanto como supressor e promotor tumoral, promovendo ou suprimindo a morte celular (LEVY; TOWERS; THORBURN, 2017). Já é descrito que, durante o desenvolvimento do câncer, a autofagia restringe a formação do tumor removendo organelas danificadas, disfuncionais, como a mitocôndria, o que regula a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que levam à transformação maligna (YANG; WANG; CONTINO; LIESA *et al.*, 2011). Por outro lado, o processo autofágico pode ser ativado como tentativa de sobrevivência celular em tumores, fornecendo nutrientes para atender às altas demandas proliferativas e metabólicas do microambiente tumoral (GALLUZZI; PIETROCOLA; BRAVO-SAN PEDRO; AMARAVADI *et al.*, 2015; REBECCA; AMARAVADI, 2016; ZHI; ZHONG, 2015).

1.5 Mitofagia

A autofagia pode ser ativada por diversos estímulos intracelulares e extracelulares, e o estresse oxidativo pode induzir o processo para reciclar organelas danificadas, como mitocôndrias e eliminar agregados proteicos (URESHINO; ROCHA; LOPES; BINCOLETTO *et al.*, 2014). Devido a isso, sabe-se que a autofagia pode ser um processo seletivo (ANDING; BAEHRECKE, 2017).

Em geral, a autofagia seletiva é mediada por receptores de conteúdo de autofagia (*autophagy cargo receptors*) que sinalizam a organela, muitas vezes por meio de ubiquitinação através do domínio de ligação à ubiquitina, para destruição (ANDING; BAEHRECKE, 2017). Esses receptores também possuem uma região de interação com LC3, a qual medeia a ligação dos receptores com a LC3 já presente no autofagossomo em formação (KAUR; DEBNATH, 2015) (Figura 4). Como resultado, os receptores de conteúdo de autofagia atuam como pontes moleculares que capturam proteínas ubiquitinadas direcionadas para degradação pela via de autofagia. Alguns receptores de conteúdo de autofagia são: p62 (também conhecido como SQSTM1), NBR1 (próximo à proteína do gene 1 BRCA1) e histona desacetilase 6 (HDAC6) (ROGOV; DÖTSCH; JOHANSEN; KIRKIN, 2014; STOLZ; ERNST; DIKIC, 2014).

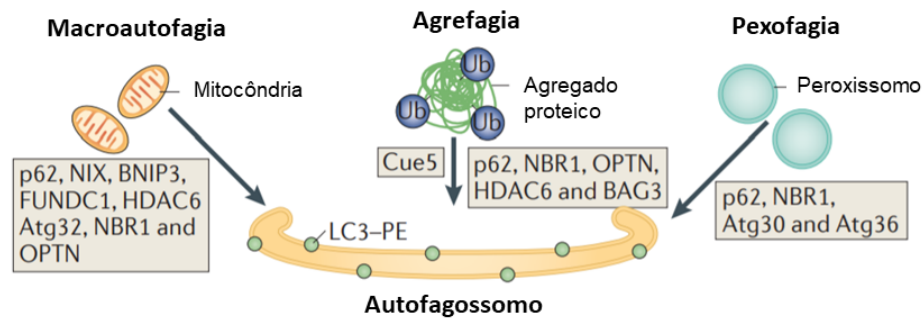


Figura 5. Via da autofagia seletiva. A autofagia seletiva de proteínas e organelas é mediada por receptores de carga de autofagia (p62, NIX, BNIP3, FUNDC1, HDAC6, Atg30/32/36, NBR1, OPTN, Cue5 e BAG3), que interagem com o substrato autofágico e o autofagossomo em desenvolvimento por meio de uma região de interação LC3 (Adaptado de Kaur e Debnath, 2015).

Um tipo de autofagia seletiva bem estudado é a mitofagia, a qual medeia a remoção de mitocôndrias (YOULE; NARENDRA, 2011). Sabe-se que o processo mitofágico pode ser induzido durante a morte celular (apoptose), onde ocorre a permeabilização da membrana mitocondrial externa, e além disso, para atender à demanda metabólica como forma de controle de qualidade para remover mitocôndrias danificadas (YOULE; NARENDRA, 2011).

Uma das vias mais bem caracterizadas é a de PINK/Parkina. PINK (*PTEN-induced putative kinase 1*) é uma proteína quinase mitocondrial que, em condições normais, é translocada para o interior da mitocôndria e degradada no interior da organela (JIN; LAZAROU; WANG; KANE *et al.*, 2010). Porém, quando a membrana mitocondrial está despolarizada, PINK se acumula na membrana externa das mitocôndrias e associa-se ao complexo TOM20 (*Translocase of Outer Membrane*) ou à proteína Mitofusina 2 (Mfn2) (JIN; LAZAROU; WANG; KANE *et al.*, 2010). A proteína Parkina então é recrutada e fosforilada em seu domínio semelhante à ubiquitina (Ubiquitin like), levando à atividade E3 ligase de Parkina e à poliubiquitinação da mitocôndria. As mitocôndrias ubiquitinadas por Parkina interagem com HDAC6 (*Histone deacetylase 6*) e p62/SQSTM1, as quais se ligam a LC3 e formam a maquinaria autofágica para eliminar as organelas danificadas (KAUR; DEBNATH, 2015).

Assim como a autofagia, a mitofagia tem papel duplo na tumorigênese, pode contribuir com a sobrevivência celular ou promover a morte celular (PANIGRAHI; PRAHARAJ; BHOL; MAHAPATRA *et al.*, 2020). Como as mitocôndrias disponibilizam

energia para as células eucarióticas, sua manutenção é crucial para a sobrevivência celular e a mitofagia elimina as que estão disfuncionais para reduzir o estresse celular (PANIGRAHI; PRAHARAJ; BHOL; MAHAPATRA *et al.*, 2020). Dessa forma, a mitofagia pode levar à supressão tumoral pela eliminação da mitocôndria disfuncional, que poderia ter transformado as células e promovido a tumorigênese, mas em contrapartida, a eliminação da mitocôndria por mitofagia pró-apoptótica pode ser citoprotetora para células de câncer e progressão tumoral (GUAN; WANG; LI; SHEN *et al.*, 2021; PANIGRAHI; PRAHARAJ; BHOL; MAHAPATRA *et al.*, 2020).

Poucos trabalhos mostraram o papel dos esfingolipídios na mitofagia. Foi demonstrado que a enzima ceramida C18, produzida pela ceramida sintase 1 (CerS1), induz mitofagia letal em carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço, que ocorreram independentemente de BAK, BAX ou caspases (SENTELLE; SENKAL; JIANG; PONNUSAMY *et al.*, 2012). No trabalho, os autores relataram que a superexpressão de CerS1 foi associado ao aumento de LC3-II, que interage com a ceramida nas membranas mitocondriais, e essa ligação desencadeia o direcionamento mitocondrial por autofagossomo (SENTELLE; SENKAL; JIANG; PONNUSAMY *et al.*, 2012). Além disso, recentemente foi relatado que a sinalização de S1P regula a mitofagia durante a diferenciação eritróide terminal (SANDOVAL; THIAGARAJAN; DASGUPTA; SCHUMACHER *et al.*, 2008). A inibição de SK1, e consequente redução de S1P, reduziu a expressão de PINK1 e suprimiu o recrutamento de p62 para mitocôndrias em eritroblastos tardios. Essas células com níveis elevados de EROs apresentaram redução na depuração mitocondrial, resultando em aumento de células eritróides apoptóticas. Este mecanismo propõe que S1P contribui para a diferenciação terminal por meio da regulação da mitofagia mediada por Pink1-p62- e Nix / Bnip31 (YANG; HASHIMOTO; LIN; TAN *et al.*, 2019). O papel de ceramida e S1P na homeostase mitocondrial indica que o desequilíbrio dos esfingolipídios e/ou sua sinalização como transdutores pode levar a um distúrbio na saúde (FUGIO; COELI-LACCHINI; LEOPOLDINO, 2020).

A desregulação da mitofagia é um importante mecanismo do metabolismo energético do câncer. Sabe-se que as células cancerosas produzem energia pela glicólise aeróbia mesmo sob condição de normóxia e reduzem a fosforilação oxidativa (OXPHOS), este metabolismo é conhecido como efeito Warburg (KOPPENOL; BOUNDS; DANG, 2011; LIBERTI; LOCASALE, 2016). Recentemente, foi relatado que as mitocôndrias na maioria dos tumores não são defeituosas em sua capacidade de

conduzir a OXPHOS. Além disso, tornou-se claro que, além da glicólise aeróbica, OXPHOS também desempenha papéis críticos na sobrevivência e progressão celular, revelando plasticidade metabólica em vez da fisiopatologia de Warburg estabelecida (MELSER; LAVIE; BÉNARD, 2015). Por exemplo, em linhagens celulares metastáticas de câncer de mama triplo-negativo (TNBC) foi visto altos níveis de ATP por meio de oxidação de ácidos graxos (JIA; LU; JUNG; PARK *et al.*, 2019; PARK; VITHAYATHIL; KUMAR; SUNG *et al.*, 2016). Da mesma forma, células 4T1 derivadas de camundongo exibem OXPHOS aprimorado, bem como atividades glicolíticas aumentadas (JIA; LU; JUNG; PARK *et al.*, 2019). Estes fenótipos metabólicos híbridos facilitam a plasticidade metabólica nas células cancerosas e podem estar associados à progressão e metástase do câncer (YU; LU; JIA; MA *et al.*, 2017). A biogênese mitocondrial contribui para o aumento de OXPHOS para promover o crescimento do câncer. No entanto, o papel da mitofagia na regulação de OXPHOS para o crescimento do câncer ainda é pouco elucidado (PANIGRAHI; PRAHARAJ; BHOL; MAHAPATRA *et al.*, 2020).

1.6 Dinâmica mitocondrial

Os esfingolipídios podem modificar a morfologia mitocondrial por efeitos biofísicos nas membranas mitocondrial externa e interna (PATWARDHAN; BEVERLY; SISKIND, 2016). Os efeitos que eles causam na mitocôndria são altamente relevantes pois, além dela ser responsável pela bioenergética, alterações nas funções mitocondriais têm sido associadas à sinalização de morte celular, autofagia, quimiorresistência e estresse celular (NAKANO; VOUSDEN, 2001; SU; LO; YAN; LIAO *et al.*, 2012). Além da mitofagia, dois processos controlam rigorosamente a massa mitocondrial e a homeostase: fissão e fusão mitocondrial.

A fissão e a fusão mitocondrial desempenham papéis críticos na manutenção das mitocôndrias funcionais quando as células passam por estresses metabólicos ou ambientais. A fusão ajuda a mitigar o estresse tóxico, aumentando a capacidade oxidativa celular e unindo o conteúdo das mitocôndrias parcialmente danificadas como uma forma de complementação. Já a fissão é necessária para criar novas mitocôndrias e contribuir para o controle de qualidade ao permitir a remoção de mitocôndrias danificadas (YOULE; VAN DER BLIEK, 2012).

O processo de fissão é mediado por um membro da família dinamina citosólica (Drp1). Drp1 é recrutado do citosol para formar espirais em torno das mitocôndrias que se contraem para cortar as membranas internas e externas (YOULE; VAN DER BLIEK, 2012). A fusão entre as membranas mitocondriais externas é mediada por membros da família dinamina ancorados na membrana, denominados mitofusina 1 e 2 (Mfn1 e Mfn2), enquanto a fusão entre as membranas mitocondriais internas é mediada por um único membro da família dinamina denominado Opa1 (YOULE; VAN DER BLIEK, 2012).

A fissão foi relatada como um mecanismo que pode preceder a mitofagia (PANIGRAHI; PRAHARAJ; BHOL; MAHAPATRA *et al.*, 2020). Na mitofagia, a fissão divide as mitocôndrias alongadas em tamanhos manejáveis para o encapsulamento e segregação de controle de qualidade do material mitocondrial danificado para a remoção seletiva. Por outro lado, a fusão dilui as mitocôndrias prejudicadas e evita a mitofagia (PANIGRAHI; PRAHARAJ; BHOL; MAHAPATRA *et al.*, 2020).

Uma das regulações já descrita dos esfingolipídios na dinâmica mitocondrial é a ativação endógena de RhoA (Ras homolog family member A) pela S1P via receptores S1PR2 e S1PR3 (ou agonista). RhoA regula ativação de Drp1, aumentando sua fosforilação e, conseqüentemente, induzindo o processo de fissão mitocondrial (BRAND; TAN; BROWN; MIYAMOTO, 2018; FUGIO; COELI-LACCHINI; LEOPOLDINO, 2020).

Além disso, quando localizada na mitocôndria, SK2 produz S1P, a qual se liga com especificidade e alta afinidade a proibitina 2 (PHB2), proteína conservada presente na membrana mitocondrial interna e que regula a funcionalidade da organela (STRUB; PAILLARD; LIANG; GOMEZ *et al.*, 2011). Essa associação está envolvida na formação da cadeia transportadora de elétrons e da respiração mitocondrial, indicando o envolvimento de SK2 e S1P na dinâmica e metabolismo mitocondrial (STRUB; PAILLARD; LIANG; GOMEZ *et al.*, 2011).

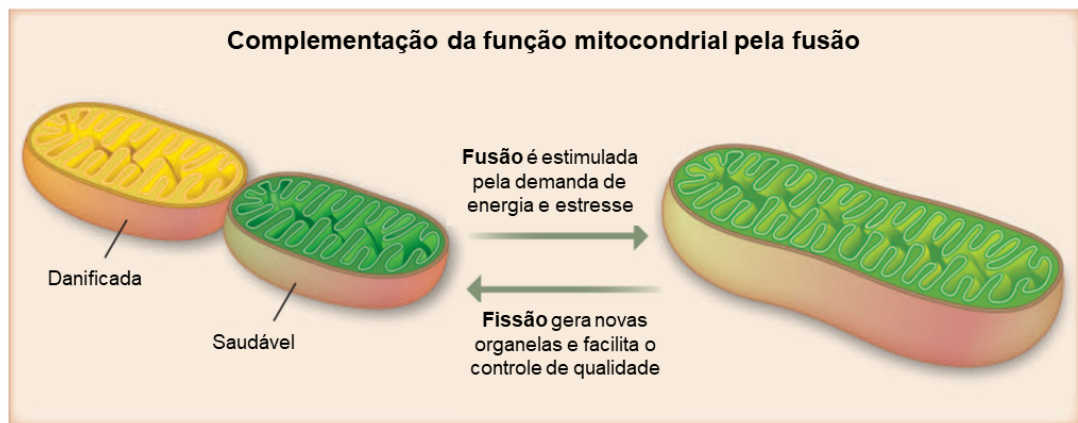


Figura 6. Fissão e fusão mitocondrial. A fusão reduz o estresse, permitindo que as mitocôndrias saudáveis e funcionais (verdes) complementem as mitocôndrias danificadas (amarelas) por difusão e compartilhamento de componentes entre as organelas. A fissão fornece uma forma de controle de qualidade ao segregar partes danificadas da mitocôndria (Adaptado de Youle e van der Bliek, 2012).

Apesar do avanço no conhecimento dos diversos papéis dos esfingolipídios, os mecanismos de ação e a contribuição da SK2 na carcinogênese ainda não são bem elucidados. Por isso, nosso estudo visa elucidar a contribuição de SK2 na autofagia/mitofagia, na dinâmica mitocondrial, no metabolismo e na transformação de células não tumorais e no CECP.

Objetivo

2. Objetivo

Avaliar o papel funcional da esfingosina quinase 2 (SK2) em linhagens de CECP e de queratinócito oral não-tumoral imortalizado (NOK-SI), com ênfase em sinalização, proliferação, transformação celular e metabolismo celular.

Para desenvolver o projeto foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Obter linhagens de CECP e de queratinócitos imortalizados (NOK-SI) com knockdown estável (shRNA) e/ou superexpressão estável da SK2.
- Caracterizar os perfis das principais vias de sinalização envolvidas em CECP e esfingolípídios quando há superexpressão/acúmulo (SK2) e knockdown da SK2 (shSK2) nas diferentes linhagens celulares selecionadas para o estudo.
- Determinar o perfil das proteínas relacionadas com autofagia, mitofagia bem como a massa mitocôndrial nas células com SK2 e shSK2 para estudar a relação da SK2/autofagia/mitofagia.
- Determinar parâmetros relacionados com metabolismo celular para investigar potenciais efeitos causados pela superexpressão da SK2 nas células epidermóides orais tumoral e não-tumoral.
- Caracterizar o potencial de proliferação, migração e invasão das células selecionadas com SK2 e shSK2.
- Realizar o transplante das células selecionadas com SK2 e shSK2 em camundongos Balb/c nude para avaliar como as alterações nos níveis de SK2 afetam a formação de tumores xenoinxerto (linhagem CECP) e a transformação maligna (queratinócitos não tumorais).

Materiais e métodos

3. Materiais e métodos

O delineamento experimental utilizado no projeto está esquematizado no fluxograma abaixo (Figura 7).

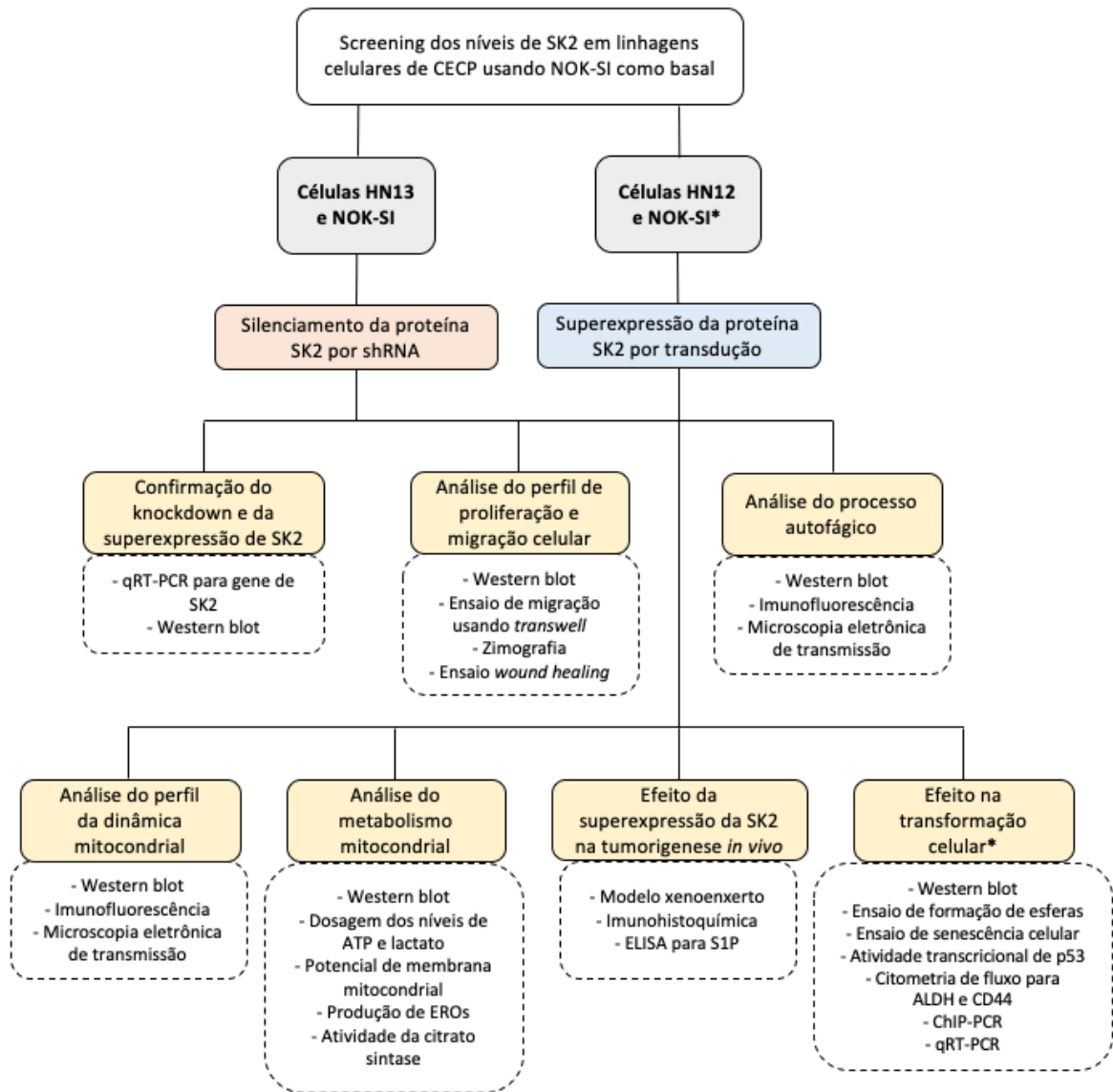


Figura 7. Fluxograma da estratégia usada para realização do estudo.

3.1 Linhagens celulares e cultura celular

As linhagens celulares HN6, HN12, HN13 (linhagens celulares humanas de carcinoma epidermoide oral), e NOK-SI (queratinócito oral humano espontaneamente imortalizado derivado de tecido normal) foram doadas pelo Dr. Silvio Gutkind (National

Institute of Craniofacial and Dental Research - NICDR, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA). A linhagem HN6 provém de um carcinoma epidermoide de base de língua de um paciente do sexo masculino, sendo um tumor primário de grau 3. A linhagem HN13 é proveniente de um carcinoma epidermoide de língua de uma paciente do sexo feminino, sendo um tumor primário de grau 2. Já a linhagem HN12 é metastática e tumorigênica, proveniente de células tumorais obtidas de linfonodo de um paciente com carcinoma epidermoide de cavidade oral primário presente na base da língua (CARDINALI; PIETRASZKIEWICZ; ENSLEY; ROBBINS, 1995).

A linhagem NOK-SI foi estabelecida *in vitro* a partir de amostras do tecido gengival de pacientes saudáveis, obtidos no National Institute of Dental and Craniofacial Research (NIH). Após realização do protocolo de isolamento de queratinócitos orais, estes foram mantidos nas devidas condições de cultivo. Após 55 dias, observou-se que a maioria dos queratinócitos estava em senescência, enquanto um número reduzido conseguiu manter a capacidade replicativa, tornando-se espontaneamente imortalizados (linhagem nomeada como NOK-SI). Essas células foram mantidas em cultura por 2 anos, e após esse período continuaram apresentando características morfológicas de células epiteliais, capacidade proliferativa, além da expressão de marcadores típicos, como citoqueratina e E-caderina (CASTILHO; SQUARIZE; LEELAHAVANICHKUL; ZHENG *et al.*, 2010).

Todas as linhagens celulares foram cultivadas em meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Sigma) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF – Gibco, Life Technologies) e 1% penicilina e estreptomicina (Sigma Aldrich). Durante o período de cultura as células foram mantidas em incubadora umidificada, à 37°C e na presença de 5% CO₂. Durante o cultivo das células, elas foram tripsinizadas para que a confluência não ficasse acima de 90%. Nesse processo, as células eram lavadas com PBS1x (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 9,1 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,4; Sigma Aldrich), e removidas com uso da solução de Tripsina-EDTA 1x (tripsina 0,25% (p/v), EDTA 0,02% (p/v); Sima Aldrich). Após as células se soltarem da placa de cultura, a solução de Tripsina-EDTA era inativada com meio DMEM suplementado com SBF 10% (v/v), o tubo contendo as células era submetido a centrifugação (200xg por 5 minutos), e por fim, as células ressuspensas em meio novo. A contagem das células era realizada em câmara de Neubauer ou contador automático após adição do corante azul de tripan e distribuídas em novas placas de acordo com os

experimentos ou para manutenção em cultura. Os compostos utilizados na cultura de células foram: MK2206 (inibidor de Akt; 5 μ M – Cayman); hidroxicloroquina (inibidor de autofagia; 20 μ M – Sigma Aldrich); MG132 (inibidor de degradação proteossomal; 5 μ M – Sigma Aldrich)

3.2 Superexpressão da esfingosina quinase 2 (SK2) em células HN12 e NOK-SI

O vetor lentiviral pLenti6.3-SK2/V5-DEST foi produzido a partir da recombinação *in vitro* e seleção em bactéria *E. coli* do vetor comercial pLENTI6.3/V5-DEST (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific) com o plasmídeo pENTR™221 contendo cDNA SK2 (NM_021972.3) (catálogo# IOH13586; Thermo Fisher Scientific). Na reação de recombinação foi utilizado o kit Gateway™ LR Clonase™ II enzyme (Invitrogen) e seguidas as recomendações do fabricante. O vetor pLENTI 6.3 contendo a sequência correta para o cDNA SK2 foi confirmado por sequenciamento automático de DNA.

As linhagens celulares HN12 e NOK-SI contendo SK2 e o controle (vetor vazio, pLENTI6.3) foram mantidas em cultura com meio DMEM contendo blasticidina (Sigma Aldrich) até a morte de 100% das respectivas células selvagens (sem o vetor; NOK-SI_WT). Após a seleção, as linhagens com SK2 e controle foram expandidas, de forma que várias aliquotas de células foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas para uso nos futuros experimentos. A eficiência de superexpressão de SK2 foi avaliada tanto para RNAm por PCR quantitativo em tempo real quanto a proteína SK2 por Western blot com anticorpo anti-SK2.

3.3 Knockdown da SK2 em HN13 e NOK-SI

Foram testados clones contendo quatro sequências diferentes de shRNA para SK2 (shSK2): sh1 (NM_020196.3-705) e sh3 (NM_020196.3-1266), sendo o respectivo vetor de controle negativo (shTRC1) (pLKO.1puro; SHC002, SIGMA); e sh2 (NM_020196.3-911) e sh5 (NM_020196.3-2450) sendo o respectivo vetor de controle negativo (shTRC2) (pLKO.1puro; SHC202, SIGMA). Ambos plasmídeos shTRC1 e shTRC2 possuem sequências de shRNA que não reconhecem qualquer alvo em mamíferos. As linhagens celulares HN13 e NOK-SI contendo as diferentes sequências para shRNA para SK2 humano (shSK2), foram mantidas em cultura em meio contendo

puromicina (Sigma Aldrich) até a morte de 100% das respectivas células selvagens (sem vetor; WT). Após a seleção, as linhagens com shSK2 e sh controle negativo foram expandidas, de forma que várias alíquotas das células foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas para uso nos futuros experimentos. A eficiência de knockdown de SK2 foi avaliada quanto a RNAm por PCR quantitativo em tempo real, visto que os níveis endógenos da proteína SK2 não eram detectados por Western blot.

3.4 Extração de proteínas

Para a extração de proteínas, as células foram lisadas em tampão de lise comercial CelLytic™ M (Sigma Aldrich) adicionado de inibidores de proteases e fosfatases (Sigma Aldrich), conforme protocolo do fabricante. Brevemente, após adição do tampão de lise, as células foram mantidas por 10 minutos sob agitação em geladeira. O lisado celular total foi armazenado em freezer -80°C.

3.5 Quantificação de proteínas

A concentração de proteínas dos lisados celulares foi determinada pelo método de Bradford, utilizando o reagente QuickStart™ Bradford, seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram diluídas (5x, 10x ou 20x) em água MiliQ e 10 µL de cada amostra diluída foram transferidos para poços em placa de 96 poços em triplicata. A seguir, 200 µL do reagent QuickStart™ Bradford (BioRad) foram adicionados e a mistura incubada por 5 minutos. A leitura da absorvância foi realizada no equipamento *BioRad Microplate reader model 680 XR 9* (BioRad) em 595 nm. O cálculo da concentração de proteínas nas amostras foi feito a partir da curva padrão utilizando albumina sérica bovina (BSA, Sigma Aldrich; 25-2000 µg/mL).

3.6 Eletroforese SDS-PAGE e Western Blot (WB)

Para o preparo das amostras, adicionou-se 3 µL do tampão de amostra 5x (Glicerol 50%, Tris 312,5 mM, DTT 250 mM, SDS 10%, azul de Bromofenol 0,05%) em 10-80 µg de proteína. Em seguida, as amostras foram incubadas por 5 minutos à 98°C no aparelho Thermomixer Comfort (Eppendorf) e separadas eletroforicamente

em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). O tampão de corrida utilizado foi Tris-glicina (Tris 25 mM, glicina 250 mM, SDS 0,1% (p/v), pH 8,3, Sigma Aldrich) usando 90 volts constante durante 120 minutos. O padrão de proteínas utilizado foi o *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (ThermoFisher Scientific). As proteínas separadas eletroforéticamente foram transferidas para uma membrana de PVDF (GE HealthCare) utilizando tampão bicarbonato (bicarbonato de sódio 10 mM; SIGMA Aldrich) ou metanol gelado com 350 mA/gel por 90 minutos. Após a transferência, a membrana foi bloqueada em solução de TBS-T (Tris 0,1 M pH7,5, NaCl 0,9% p/v, Tween-20 0,1% v/v) contendo 5% de leite em pó desnatado por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi lavada com TBS-T e incubada sob agitação com anticorpos primários por aproximadamente 16 horas em câmara fria. Os anticorpos primários utilizados foram: Akt (#9272), p-Akt^{Thr308} (#2965), c-Myc (#5605), p21 (#2947), histone-H3 (#9715), acetyl-histone H3^{Lys9} (#9649), histone-H4 (#2935), acetyl-histone H4^{Lys12} (#2591), p-GSK3β^{Ser9} (#5558), STAT3 (#9139), p-STAT3^{Tyr705} (#9145), E-caderina (#3195), Snail (#3895), mitofusina-2 (#9482), p53 (#2527), acetyl-p53^{Lys382} (#2525), p-DRP1^{Ser616} (#3455), PINK1 (#6946), LC3 (#3868), β-tubulin (#2128), fibrillarin (#2639), GAPDH (#2118) (Cell Signaling Technology), ERK (#M5670) (Sigma), SQSTM1(D-3)/p62 (sc-28359), SK2 (sc-366378), Vimentina (sc-32322), p-ERK^{Tyr204} (sc-7383), β-actin (sc-47778) (Santa Cruz) SET. Após 3 lavagens de 5 minutos com TBS-T, a membrana foi incubada com anticorpos secundários (anti-mouse, anti-rabbit ou anti-goat) conjugados com horsedish peroxidase por 1 h à temperatura ambiente sob agitação. Após 3 lavagens de 5 minutos em TBS-T, a membrana incubada com o reagente ECL[™] (GE - HealthCare) por 120 segundos e exposta em filmes de Raio-X. A imunomarcação foi adquirida em filmes radiográficos, os quais foram escaneados (ChemiDoc[™] MP System – BioRad) para aquisição das imagens e análise das bandas correspondentes às proteínas de interesse. A quantificação das bandas foi realizada por densitometria usando o software ImageJ.

3.7 Fracionamento subcelular

As subfrações das linhagens celulares foram nomeadas como mitocondrial (M), citoplasmática (C) e nuclear (N), foram obtidas com uso do kit de fracionamento *Cell fractionation Kit – Standard* (Abcam) seguindo o protocolo do fabricante. Após a extração, todas as subfrações foram quantificadas pelo método de Bradford e quantidades iguais das amostras foram analisadas por Western blotting. Foi utilizado como controle de subfracionamento celular as proteínas calnexina para fração mitocondrial, GAPDH para citosólica e fibrilarina para nuclear.

3.8 Análise por PCR em tempo real

O RNA total das linhagens foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, Life Technologies) seguindo o protocolo do fabricante. O RNA foi quantificado no Nanodrop (260 e 230 nm). 1 µg de RNA foi convertido em cDNA (DNA complementar), utilizando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcriptase* (ThermoFisher Scientific). As reações de síntese de cDNAs foram realizadas conforme recomendado pelo fabricante. Os ensaios de quantificação de RNAm/cDNA por PCR em tempo real (qRT-PCR) foram realizados utilizando ensaios do sistema TaqMan para: SK1 (Hs00184211_m1, Applied Biosystems), SK2 (Hs01016543_g1, Applied Biosystems), S1PR1 (Hs00173499_m1, Applied Biosystems) e B2M (Hs99999907_m1, Applied Biosystems) foi usado como gene constitutivo (*housekeeping*). Foi utilizado 100 ng de cDNA e as reações foram realizadas conforme protocolo recomendado pelo fabricante. A expressão relativa de mRNA foi calculada usando $2^{-\Delta\Delta CT}$ e apresentada como média ± desvio padrão a partir de experimentos realizados em triplicata.

3.9 Imunofluorescência e microscopia confocal

As células (2×10^4) foram plaqueadas em placa de 24 poços contendo lamínulas de vidro. No dia seguinte, as células foram fixadas com metanol gelado por 15 minutos e mantidas à -20°C . Em seguida, os poços foram lavados com PBS 1x (3x de 5 minutos) e as células foram incubadas por 10 minutos com solução de PBS 1x contendo 0,5% Triton x-100 para permeabilização. Os poços foram lavados com PBS 1x (3x de 5 minutos) e adicionou-se a solução de PBS 1x contendo 3% BSA (Sigma

Aldrich) para o bloqueio por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, os poços foram lavados com PBS 1x (3x de 5 minutos) e as células incubadas por 16 horas à 4°C com os anticorpos primários diluídos em solução de bloqueio. Os anticorpos primários utilizados foram anti-SK2 (#sc366378, Santa Cruz), anti-LC3 (#3868, Cell Signaling), anti-TOM20, anti-p-DRP1(#3455, Cell Signaling), anti-gama-H2AX (#2592, Cell Signaling Technology). Para a marcação mitocondrial foi utilizado o MitoTracker™ Deep Red (ThermoFisher Scientific). No dia seguinte, os poços foram lavados com PBS 1x (3x de 5 minutos) e adicionou-se os anticorpos secundários diluídos em solução de bloqueio (1:100) por 1 hora a temperatura ambiente. Os anticorpos secundários utilizados foram anti-rabbit-Alexa 488 e anti-mouse-Alexa 555 (Invitrogen). Em seguida, os poços foram lavados com PBS 1x (3x de 5 minutos) e incubados por 10 minutos com solução de DAPI (Sigma Aldrich) diluída em PBS 1x (concentração final de 1,5 µg/mL) para a marcação nuclear. As células foram lavadas com PBS 1x (3x de 5 minutos) e as lamínulas montadas com *Fluorescent mounting medium* (Dako) em lâminas histológicas. As imagens foram obtidas no microscópio confocal Leica TCS SP8 (Leica Microsystem, Alemanha) usando a lente objetiva de 63x e com zoom digital de 3x. A barra de escala utilizada foi 50 µm.

3.10 Imunocitoquímica

Inicialmente, as células foram fixadas com metanol gelado por 15 minutos e mantidas à -20°C. Em seguida, as células foram incubadas por 10 minutos com solução de PBS 1x contendo 0,5% Triton x-100 (SIGMA) para permeabilização e depois incubadas com solução de bloqueio (PBS 1x contendo 3% BSA; SIGMA). A incubação com anticorpo primário para Ki67 (Dako) foi realizada overnight a 4 °C. Após lavagem com PBS 1x, foi adicionada a solução anti-rabbit/mouse HRP Polymer Reaction Kit (ImmunohistoProbe Plus por X minutos. O substrato DAB Chromogen (ScyTek) foi utilizado para a visualização da imunomarcação. Os cortes histológicos foram contra-corados com Hematoxilina de Harrys (Sigma Aldrich). As imagens foram obtidas em campo claro no microscópio óptico com aumento de 10X (Zeiss Axiovert 40).

3.11 Imunohistoquímica

Os cortes histológicos foram: desparafinizados em estufa à 58°C, seguido de lavagens em xilol, reidratados com lavagens em etanol 100%, 95%, 80%, 70%, e finalizado em água destilada. Após, foi feita a recuperação antigênica, incubando as lâminas em tampão citrato pH 6,0, por 2 minutos na potência máxima do micro-ondas, e em seguida, por 18 a 28 minutos na potência de 10% (o tempo variou conforme o anticorpo). Foi realizado o bloqueio das peroxidases endógenas adicionando a Solução I do *Kit Two Step Polymer Immunohistoprobe Plus - Advanced Biosystems ao tecido por 15 minutos. Após esse tempo, foram feitas lavagens com tampão TBS-T e bloqueio com a Solução II (*Kit) à temperatura ambiente durante 10 minutos. Em seguida, foi adicionado o anticorpo primário com a respectiva diluição em solução diluente (*Kit) e as lâminas foram incubadas overnight a 4°C. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em tampão TBS-T e incubadas com o reagente 1 - Amplificador (*Kit) durante 15 minutos à temperatura ambiente. Novamente, as lâminas foram lavadas em tampão TBS-T 1x e, em seguida, incubadas com o reagente 2 - Polímero HRP (*Kit) durante 15 minutos à temperatura ambiente. Após novas lavagens em tampão TBS-T [1x], as lâminas foram incubadas com 3,3' -Diaminobenzidina tetrahidroclorato (DAB - Kit), tempo de acordo com o anticorpo, seguido de banho em água destilada. As lâminas foram contra coradas com hematoxilina, desidratadas em banhos de álcool com concentrações crescentes, clareadas em xilol e montadas com lamínula para análise em microscópio de campo claro (Zeiss Axiovert 40).

3.12 Ensaio de dosagem de ATP

Para determinar os níveis intracelulares de ATP foi realizado ensaio de bioluminescência (Sigma Aldrich). As células foram lisadas com tampão de lise (CellLytic, Sigma Aldrich) adicionado de inibidores de proteases (Sigma Aldrich). Em seguida, os lisados protéicos foram incubados por dois minutos a 100°C para inibir a ação de ATPases, centrifugados a 14.000 x g por 10 minutos e armazenados em freezer -20°C. A concentração de proteínas foi determinada por Bradford (BioRad assay, Bio-Rad Laboratories) e 10µg de proteínas de cada amostra foram utilizados no ensaio. Uma curva padrão de ATP também foi preparada para o cálculo dos valores das amostras. O reagente de ensaio (ATP assay mix) foi diluído 100 vezes em tampão

e adicionados 100 μ L desta solução em cada poço da placa de 96 poços contendo a amostra. A leitura foi realizada imediatamente em luminômetro de placas (Spectra MaxL). Estes ensaios foram realizados em triplicata biológica e experimental; os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão.

3.13 Ensaio de dosagem de lactato

A determinação de lactato liberado pela célula para o meio extracelular foi realizada com base na reação bioquímica de conversão de lactato a piruvato pela desidrogenase láctica (LDH) com produção de NADH, que é tem absorvância em comprimento de onda de 340 nm. As células foram plaqueadas em placas de 12 poços, mantidas em cultura por 16 hs, seguindo-se a troca do meio inicial por meio DMEM completo livre de vermelho de fenol (1,0 mL). Após 24 hs, o meio de cultura foi recolhido e armazenado em freezer -20°C até a realização do experimento. O ensaio foi realizado em placa de 96 poços acrescentando-se 10 μ L do sobrenadante à 200 μ L do reagente de trabalho (10 mg NAD (N7004), 0,1mL de LDH (L3916), 2,0 mL tampão glicina 0,6M/hidrazina 0,5M pH 9,2 e 4,0 mL água milliQ, todos os reagentes foram adquiridos da Sigma Aldrich). A placa foi incubada a 37°C por 15 minutos e a leitura da absorvância foi realizada em leitor de microplacas (Bio-Rad Laboratories) em 546 nm. Os resultados foram calculados a partir de uma curva padrão de lactato (Sigma Aldrich), normalizados por miligrama de proteínas das células da placa de cultura e os valores apresentados como mM lactato/mg de proteínas. Estes ensaios foram realizados em triplicata biológica e experimental; os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão.

3.14 Ensaio de formação de esferas

Foram plaqueadas $2,5 \times 10^3$ células em placa de 6 poços de *ultra low adhesion* e mantidas em incubadora umidificada (37°C) na presença de 5% CO₂ por 7 dias. Cada linhagem celular foi plaqueada em triplicata. As esferas foram visualizadas e fotografadas em microscópio invertido no modo contraste de fase ou plasDic (Zeiss Axiovert 40). Além disto, as esferas foram classificadas conforme descrito previamente na literatura em holosferas, merosferas e parasferas, e contadas para caracterizar o perfil de células tronco tumorais (CTT) de cada linhagem (ALMEIDA;

GUIMARÃES; MARTINS; MARTINS et al., 2017). Neste trabalho de Almeida e colaboradores (ALMEIDA; GUIMARÃES; MARTINS; MARTINS et al., 2017), foi mostrado em câncer oral que em holosferas há aumento de uma subpopulação de CTT com maior potencial invasivo e “stemness”. Estes ensaios foram realizados em triplicata experimental; os dados foram apresentados como média ± desvio padrão.

3.15 Atividade transcricional de p53

A atividade transcricional de p53 foi determinada utilizando-se o kit colorimétrico *p53 Transcription Factor Assay Kit* (ab207225, ABCAM). O ensaio foi realizado conforme descrito pelo fabricante, sendo utilizado em cada reação 10 µg de proteína do extrato nuclear das células. Estes ensaios foram realizados em triplicata experimental; os dados foram apresentados como média ± desvio padrão.

3.16 Análises de sequenciamento de RNA (RNA-Seq)

O RNA-Seq foi realizado por empresa terceirizada nos Estados Unidos (Admera, USA). O RNA total foi extraído das células NOK-SI e NOK-SI/SK2 pelo método do Trizol (conforme protocolo do fabricante), a partir de três amostras biológicas de cada linhagem celular. Somente após a confirmação no Bioanalyzer da alta qualidade do RNA obtido, as amostras foram enviadas para a empresa para realizar a estratégia de RNA-seq. Brevemente, a biblioteca foi preparada com o kit RNAseq TruSeq Stranded com seleção por PolyA (Illumina Inc., San Diego, CA). Os parâmetros de sequenciamento para as leituras pair-end 2x150 (20M em cada direção) foram seguidos segundo instrução do fabricante. Após a obtenção dos “reads”, os adaptadores foram removidos com o auxílio do software Trimomatic, e então os “reads” foram alinhados com o genoma humano (hg19) com o software STAR aligner. Os genes diferencialmente expressos foram obtidos pelo pacote Deseq2 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014) em ambiente R, os parâmetros usados foram: p value ajustado <0.05 e fold-change (Fc)>1,5|FC<-1,5. As análises de bioinformática dos dados obtidos por RNA-seq. Estes ensaios foram realizados em triplicata experimental; os dados foram apresentados como média ± desvio padrão.

3.17 Ensaio de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) para análise do promotor do gene P21

As células foram submetidas ao “cross-link” com 1% de formaldeído por 10 minutos e interrupção com glicina (125 mM) por 5 minutos. As células foram lavadas com PBS gelado e coletadas em tampão Farnham gelado (5 mM PIPES pH 8,0; 85 mM KCl; 0,5% NP-40) suplementado com inibidores de protease. Em seguida, as células foram centrifugadas a 448 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimentado foi ressuscitado em 300 µL de tampão RIPA gelado (PBS 1X; 1% NP-40; 0,5% desoxicolato de sódio; 0,1% SDS) suplementado com inibidores de protease. Em seguida, a cromatina foi fragmentada com sonicador, utilizando 6 ciclos de 30 segundos de sonicação, com um intervalo de 45 segundos sob o gelo entre cada ciclo para evitar o aquecimento das amostras. A cromatina fragmentada (200-600 pb) foi centrifugada a 12000 x g por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante foi coletado e o volume ajustado para 1 ml com tampão RIPA. A seguir, foram adicionados cinco microgramas de anticorpo anti-P53 (#2527S) ou IgG controle à 950 µL da cromatina previamente fragmentada (40 µg), e as amostras foram incubadas em plataforma giratória overnight a 4°C. No dia seguinte, foram adicionados 40 µL de esferas magnéticas contendo proteína G às amostras, seguido de incubação em plataforma giratória a 4°C por 2 horas. Em seguida, as esferas contendo cromatina imunoprecipitada foram coletadas por magnetismo e o sobrenadante foi descartado.

As esferas foram lavadas 5 vezes com 1 mL de tampão LiCl gelado (100 mM Tris pH 7,5; 500 mM LiCl; 1% NP-40; 1% desoxicolato de sódio), com 3 minutos de agitação a 4°C para cada lavagem. Por fim, as esferas foram lavadas com 1 mL de tampão TE gelado (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,1 mM Na₂EDTA) por 1 minuto. Em seguida, as esferas foram ressuscitadas em 200 µL de tampão IP (1% SDS; 0,1 M NaHCO₃) e incubadas em banho-maria a 65°C por 1 hora, com agitação a cada 15 minutos, para a eluição da cromatina imunoprecipitada. As amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 3 minutos, colocadas em suporte magnético, e o sobrenadante contendo o DNA imunoprecipitado foi coletado. Foi adicionado 10 µL de NaCl 5M ao sobrenadante e este foi incubado overnight em banho maria a 65°C, para a completa reversão do *cross-link*. Posteriormente, foi adicionado 2 µL de RNase (10 mg/ml) e incubou-se a 37°C por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se 10 µL de Proteinase K (20 mg/ml) e as amostras foram incubadas a 55°C por 1 hora. Após a incubação, 3 volumes de tampão PB (Qiagen PCR cleanup kit) foram adicionados

para 1 volume de DNA imunoprecipitado. Essa mistura foi transferida para coluna Qiagen PCR Cleanup e seguiu-se o protocolo descrito pelo fabricante. Finalmente, o DNA foi eluído da coluna com 50 µL de tampão EB previamente aquecido (55°C), e posteriormente utilizado nas reações de qPCR.

Análises de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) foram feitas utilizando o kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) que contém *SYBR Green dye*, e primers para a região promotora de *P21*. As reações de qRT-PCR foram realizadas conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1- Componentes da reação de PCR quantitativo em tempo real.

Reagente	Volume (µL)
GoTaq® qPCR Master Mix (2X)	6
Forward Primer (5 µM)	1
Reverse Primer (5 µM)	1
Nuclease-free H ₂ O	2
DNA	2
Volume total	12

Após o preparo das reações, os tubos foram colocados no termociclador Mastercycler® RealPlex® (Eppendorf) com as seguintes condições de ciclo térmico:

1° Ciclo 95°C 10 minutos	1 ciclo
2° Ciclo 95°C 15 segundos	40 repetições
3° Ciclo 60°C 1 minuto	
4° Ciclo	Curva de Melting

P21 promotor Fwd	TGCATTGGGTAAATCCTTGCC
P21 promotor Rev	ATGAGTTGGCACTCTCCAGG

Esses experimentos foram realizados em triplicata experimental.

3.18 Análise de espécies reativas de oxigênio

O nível intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi avaliado utilizando a sonda fluorescente 5,6 clorometila-2,7 diclorofluoresceína diacetato (CM-H2-DCFDA, Thermo Fisher Scientific). As células foram plaqueadas em placa de 96 poços e mantidas em cultura, a seguir foram incubadas com a sonda DCFDA (5 μ M) por 30 minutos. Como controle positivo do experimento, as células foram tratadas com 1 mM de peróxido de hidrogênio (Sigma Aldrich). A determinação de absorvância foi realizada com Ex/Em: ~492–495/517–527 nm após 30 minutos, 1 e 2 horas no leitor de placas (BioTek Synergy). Estes ensaios foram realizados em triplicata biológica e experimental; os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão.

3.19 Determinação da atividade de citrato sintase

A atividade de citrato sintase foi determinada utilizando-se o kit comercial *Citrate Synthase Assay* (CS0720 - SIGMA). A citrato sintase catalisa a reação entre acetil coenzima A (acetil-CoA) e ácido oxaloacético (OAA) para formar ácido cítrico. A acetil-CoA contribui com 2 carbonos para os 4 carbonos do oxaloacetato resultando em citrato com 6 carbonos. A hidrólise do tioéster de acetil-CoA resulta na formação de CoA com um grupo tiol (CoA-SH) e o tiol reage com o DTNB na mistura de reação para formar ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB). Este produto amarelo (TNB) pode ser observado espectrofotometricamente medindo a absorvância a 412 nm. Nos ensaios foram utilizadas 8 μ g de proteína total das linhagens celulares e a leitura da placa foi feita no equipamento BioTek Synergy HTX. Estes ensaios foram realizados em triplicata biológica e experimental; os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão.

3.20 Análise do potencial de membrana mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) foi analisado por meio da sonda fluorescente JC-1 (Thermo Fisher). O acúmulo de JC-1 é dependente do $\Delta\Psi_m$, indicado por uma emissão de fluorescência verde (529 nm) para a forma monomérica da sonda, que muda para vermelho (590 nm) com uma formação dependente da concentração de fluorescente vermelha J-agregados. A despolarização mitocondrial

é indicada por uma diminuição na relação de intensidade de fluorescência vermelho/verde. Foram plaqueadas 1×10^4 células da NOK e 5×10^3 da HN12 em placa de 96 poços, incubadas por 30 minutos com $5 \mu\text{M}$ da sonda JC-1 e lavadas com PBS 1x para fazer a leitura em leitor de placas (BioTek Synergy 2 HTX) com comprimento de onda de 568 nm de excitação e 590 nm de emissão. A valinomicina (desacoplador mitocondrial) foi usada como controle positivo do experimento ($1 \mu\text{M}$ por 1 hora). Estes ensaios foram realizados em triplicata biológica e experimental; os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão.

3.21 Ensaio de senescência celular

O ensaio de senescência foi realizado utilizando o *Senescence β -Galactosidase Staining Kit* conforme protocolo descrito pelo fabricante (Cell Signaling Technology #9860). Foram plaqueadas 5×10^4 células das linhagens NOK pLenti e NOK SK2 em placa de 24 poços. No dia seguinte, o meio foi retirado, os poços lavados com PBS 1X, as células fixadas com 500 μL de 1x Fixative Solution e incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente. Depois de lavadas com PBS 1X, as células foram incubadas com 300 μL de *β -Galactosidase Staining Solution* por 24 horas a 37°C . As fotos foram obtidas por microscopia de campo claro no microscópio invertido (Zeiss Axiovert 40). As determinações foram realizadas em duplicata biológica e triplicata experimental.

3.22 Ensaio de migração em transwell

Para o ensaio de migração, as células (5×10^4) foram adicionadas em 250 μL de meio livre de soro e plaqueadas no compartimento superior do *transwell*, no compartimento inferior foi adicionado meio DMEM contendo 10% de soro bovino fetal (FBS), o qual foi utilizado para estimular a invasão. Após 24 h, o meio sem soro de dentro do *transwell* foi removido, as células que migraram foram fixadas com 10% de formol por 5 minutos e com metanol gelado por 15 minutos. Após serem lavadas com solução PBS 1x, as células foram coradas com cristal violeta por 15 minutos, seguido de lavagem com PBS 1X. As células que migraram foram fotografadas utilizando microscopia de campo claro. As imagens obtidas de 5 ou 10 campos aleatórios (aumento 5X) de cada *transwell* foram analisadas utilizando o programa Image J e o

dados apresentados como número de células/campo. Estes ensaios foram realizados em triplicata biológica e experimental; os dados foram apresentados como média ± desvio padrão.

3.23 Ensaio de “wound healing”

As células foram plaqueadas em placa de 24 poços para atingirem 100% de confluência no dia seguinte, quando foi feito um risco correspondente ao diâmetro do poço, com auxílio da ponteira P1000 e de uma régua, para criar um “espaço vazio” na monocamada de células aderidas na placa de cultura. Os poços foram lavados para retirar as células soltas e adicionado meio novo completo. As fotos foram adquiridas em microscópio invertido (Zeiss Axiovert 40) em campo claro no tempo zero (momento do risco) e após 24 horas. Para determinação da área não fechada do risco, foi usado o software Image J e os valores obtidos foram utilizados na fórmula: $\frac{A_{inicial} - A_{final}}{(A_{inicial})} \times 100 = \% \text{ de fechamento do risco}$, sendo A a medida da área entre as bordas (Yue *et al.*, 2010). Estes ensaios foram realizados em triplicata biológica e triplicata experimental; os dados foram apresentados como média ± desvio padrão.

3.24 Zimografia

Após 16 h que as células foram plaqueadas em placa de 6 poços contendo meio com soro bovino fetal, os poços foram lavados com tampão PBS 1X e adicionado meio de cultura sem soro. Após 24 h, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C até a realização do experimento. As amostras foram separadas em géis de poliacrilamida 8% contendo gelatina segundo protocolo padronizado no laboratório (SOBRAL; SOUSA; COLETTA; CABRAL *et al.*, 2014). Após eletroforese, os géis foram imersos sob agitação leve em solução de Triton (2,5% Triton X-100 em água milli-Q), três lavagens de 15 minutos. A seguir, os géis foram imersos em solução de reação para as MMP2 e MMP9, à temperatura de 37 °C por 42 horas. Ao final, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue G-250 durante 1 hora sob agitação. No processo de descoloração, os géis foram lavados em solução contendo 35% Metanol e 10% ácido acético. Para análise, as imagens foram obtidas utilizando o fotodocumentador Bio-Rad ChemiDoc Imager. As bandas referentes às MMP2 (72

kDa) e MMP9 (92 kDa) foram analisadas por densitometria. Estes ensaios foram realizados em triplicata biológica e triplicata experimental; os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão.

3.25 Citometria de fluxo para ALDH e CD44

Para a citometria de fluxo foram utilizadas 4×10^5 células por tubo (4 para cada linhagem), coletadas com 80% de confluência. As células foram lavadas com PBS e centrifugadas por 5 minutos a $161 \times g$ a 4°C . Em todas as análises de citometria de fluxo, foram incluídos: controle (somente a célula sem tratamento e sem marcação, apenas em PBS 1x), controle negativo de ALDH1 (adição de DEAB, inibidor da atividade de ALDH1) e marcação para CD44 e ALDH1 (sem DEAB nomeado de 'teste'), leitura em triplicata no citômetro de fluxo. Para atividade de ALDH1 foi usado o *ALDEFLUOR™ Kit for ALDH Assays* (STEMCELL Technologies) seguindo o protocolo do fabricante. Primeiramente, foi preparado um mix contendo ALDEFLUOR buffer 1 mL para cada 5 μL da enzima ALDH1. As células foram ressuspensas em 250 μL do mix, e no tubo controle negativo foi adicionado 5 μL do DEAB. Os tubos com as células/amostras foram incubados a 37°C protegidos da luz por 45 minutos. Em seguida, foram centrifugados a $161 \times g$ por 5 minutos e as células lavadas com 500 μL de PBS 1x. Em cada tubo (teste e controle negativo) foi adicionado o anticorpo CD44 conjugado à APC e incubado a 4°C sob agitação suave durante 25 minutos. A seguir, as células foram lavadas com PBS 1x. ressuspensas em tampão Aldefluor. Foram analisados 15.000 eventos em triplicata no equipamento BD FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA) na Facility de Citometria de fluxo da FCFRP-USP. Estes ensaios foram realizados em duplicata biológica e triplicata experimental; os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão.

3.26 Análise do ciclo celular

Para a análise de ciclo celular, as células foram plaqueadas em placas de 6 poços a 60% de confluência e mantidas em incubadora. Após 24 horas, o meio de cultura foi substituído por meio de cultura completo contendo 1 μM de nocodazol, inibidor da formação de microtúbulos, para sincronização das células na fase G2/M do ciclo celular por mais 24 horas (BLAJESKI; PHAN; KOTTKE; KAUFMANN, 2002).

Em seguida, as células foram lavadas com PBS 1X e mantidas em meio de cultura completo (contendo 10% de soro fetal bovino) para avaliar a progressão ao longo das fases do ciclo celular. Para a análise da distribuição das células no ciclo celular, as células foram retiradas da placa com tripsina, transferidas para tubo de citometria de fluxo, fixadas em etanol gelado a 70% (v/v) a -20° C durante 1 hora. Em seguida, procedeu-se a centrifugação a 1372 x g por 5 minutos e as células foram incubadas com iodeto de propídio (50 µg/mL) e RNase A (10 mg/mL) a 37 ° C, por 30 minutos. O conteúdo de DNA nas células, que indica a fase do ciclo celular, foi avaliado usando o citômetro de fluxo BD FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA). A porcentagem de células em cada fase do ciclo celular foi estimada usando o software ModFit LT. Estes ensaios foram realizados em triplicata experimental; os dados foram apresentados como média ± desvio padrão.

3.27 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para detecção e análise estrutural de mitocôndrias e autofagossomos foi realizada a microscopia eletrônica de transmissão (MET). As células foram recuperadas da placa de cultura e fixadas em tampão cacodilato (paraformaldeído 4%, glutaraldeído 0,5%, tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4) por 24 h, a 4°C. A seguir, procedeu-se a lavagem das células com o mesmo tampão (3x, 10 min cada); incubação em uma série crescente de metanol (*Merck-Germany*) 70%, 90% e 100% (2x, 15 min cada), e pré-infiltradas numa mistura de metanol 100% e resina LRGold (1:1) (London Resin Co., Reading, Berkshire, UK) por 18 h, a -20°C, sob agitação constante. As trocas de soluções foram realizadas após centrifugação das células a 600 x g por 10 ou 15 min. Por fim, as células foram infiltradas por 2 h em LRGold, transferidas para cápsulas de gelatina contendo LRGold, centrifugadas a 600 g por 15 min, e finalmente polimerizadas sob luz UV por 24 h, a -20 °C. Cortes ultrafinos (~70 nm) das células foram coletados em telas de níquel, e contrastados em acetato de uranila 2% e citrato de chumbo, por 15 min cada. A análise ultraestrutural das amostras foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM900 (Carl Zeiss).

3.28 Ensaio de tumorigenicidade

Para avaliar o potencial tumorigênico das células foi realizado o ensaio de formação de tumor xenoenxerto em camundongos Balb/c nude. Foram transplantadas 2×10^6 células HN12 pLenti (n = 4) e HN12 SK2 (n = 5), e 5×10^6 células da NOK pLenti (n = 5) e NOK SK2 (n = 6) de forma subcutânea no dorso (esquerdo e direito) em camundongos Balb/c nude de 6 a 8 semanas de idade (GOTO; SOBRAL; STRINGHETTA-PADOVANI; GARCIA et al., 2020; SOBRAL; COLETTA; ALBERICI; CURTI et al., 2017). Os animais foram adquiridos no Biotério de Criação/Manutenção Faculdade de Medicina – USP São Paulo. Para a experimentação, os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e o protocolo utilizado foi aprovado pelo CEUA da FCFRP-USP (processo 18.1.338.60.4).

Após o transplante das células, os animais foram acompanhados e o tamanho da massa celular (tumor) foi medido com um paquímetro digital. O volume foi reportado como mm^3 e calculado usando a fórmula de volume = $0,5 \times \text{comprimento} \times \text{largura}^2$. Quando os tumores atingiram tamanho próximo de 2 cm, os camundongos foram eutanasiados com sobredose anestésica (quetamina e xilasina, 180mg/Kg e 25mg/Kg, respectivamente) e exsanguinação. Os tumores foram coletados e mantidos em formalina (10%) para fixação e, em seguida, embebidos em parafina. Amostras de sangue dos animais foram coletadas e armazenadas para futuras análises moleculares. Cortes histológicos foram obtidos e corados com hematoxilina-eosina (HE) para análise histopatológica, assim como para análises por imuno-histoquímica de proteínas de interesse. Os animais eutanasiados foram colocados em sacos plásticos apropriados e acomodados em freezer para posterior encaminhamento para o biotério Central do Campus para descarte biológico adequado. Os cortes foram corados com H&E e analisados. As análises de imunohistoquímica foram realizadas no nosso laboratório na FCFRP-USP, seguindo protocolo previamente estabelecido (GOTO; SOBRAL; STRINGHETTA-PADOVANI; GARCIA et al., 2020) e anticorpos para esfingosina quinase 2 (SK2; 1:100 – Santa Cruz), Ki67 (1:100 – Dako) e SET (1:1000 – Sigma Aldrich).

3.29 Quantificação de S1P por ELISA

Para quantificar a S1P por ELISA, os tumores foram macerados previamente utilizando nitrogênio líquido e uma quantidade do homogenato foi separada e pesada para solubilizar em Cell lytic™ específico para tecido (Sigma Aldrich). A quantidade total de proteína obtida foi quantificada pelo método de Bradford e foi utilizado 1500 µg de proteína total de cada tumor (3 de cada grupo). Para determinar o nível de S1P nas amostras, foi utilizado o *Sphingosine 1-Phosphate Assay Kit* (S1P – ELISA, K1900 – Echelon). Este é um ensaio competitivo em que o sinal colorimétrico é inversamente proporcional à quantidade de S1P presente na amostra. A concentração de S1P na amostra foi determinada usando uma curva padrão de quantidades conhecidas de S1P. Este ensaio foi lido a 450 nm no leitor de placas (BioTek Synergy 2 HTX). Este ensaio foi realizado em triplicata experimental; os dados foram apresentados como média ± desvio padrão.

3.30 Análises estatísticas

Para as análises estatísticas e construção dos gráficos foi utilizado o programa GraphPad Prism. O teste utilizado nas comparações do controle *versus* teste foi o Teste *t* de Student. Valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Resultados

4. Resultados

Os resultados foram organizados e apresentados de acordo com a linhagem celular estudada e a abordagem experimental utilizada para compreender o papel da esfingosina quinase 2 (SK2) em câncer oral. Desta forma, serão apresentados os resultados na seguinte ordem: a) knockdown de SK2 na HN13, b) superexpressão de SK2 na HN12 e c) superexpressão e knockdown de SK2 na NOK-SI (linhagem não tumoral).

4.1 Estudo do efeito do knockdown da SK2 na linhagem tumoral HN13

4.1.1 Perfil de expressão de SK1, SK2 e de S1PR1 nas linhagens de CECP

Inicialmente, determinamos os níveis de RNAm de esfingosina quinase 2 (SK2) em linhagens de câncer oral (HN6, HN12 e HN13) por qRT-PCR. A linhagem de queratinócito oral não-tumoral, NOK-SI, foi utilizada como referência na quantificação relativa. Os nossos resultados mostraram que a linhagem HN13 possui o maior nível de RNAm para SK2 enquanto a HN12 o mais baixo (Figura 8A). Para obter o perfil de como a S1P pode estar sendo produzida nestas células, investigamos também os níveis de RNAm da SK1. O nível de SK1 mostrou-se maior na linhagem HN6 e menor na HN13 (Figura 8B). Considerando que a sinalização “inside-out” de S1P pelo receptor 1 (S1PR1) tem sido associada com migração, progressão tumoral e metástase em outros tipos de câncer (CUVILLIER, 2012; TAKABE; PAUGH; MILSTIEN; SPIEGEL, 2008), analisamos também o nível de S1PR1. As células HN6 possuem o nível mais elevado de S1PR1 RNAm, depois a HN12, e por último a HN13 com o menor nível das 3 linhagens (Figura 8C). Por western blotting (WB) confirmamos os níveis proteicos de SK1 e SK2 nas linhagens de CECP (Figura 8D).

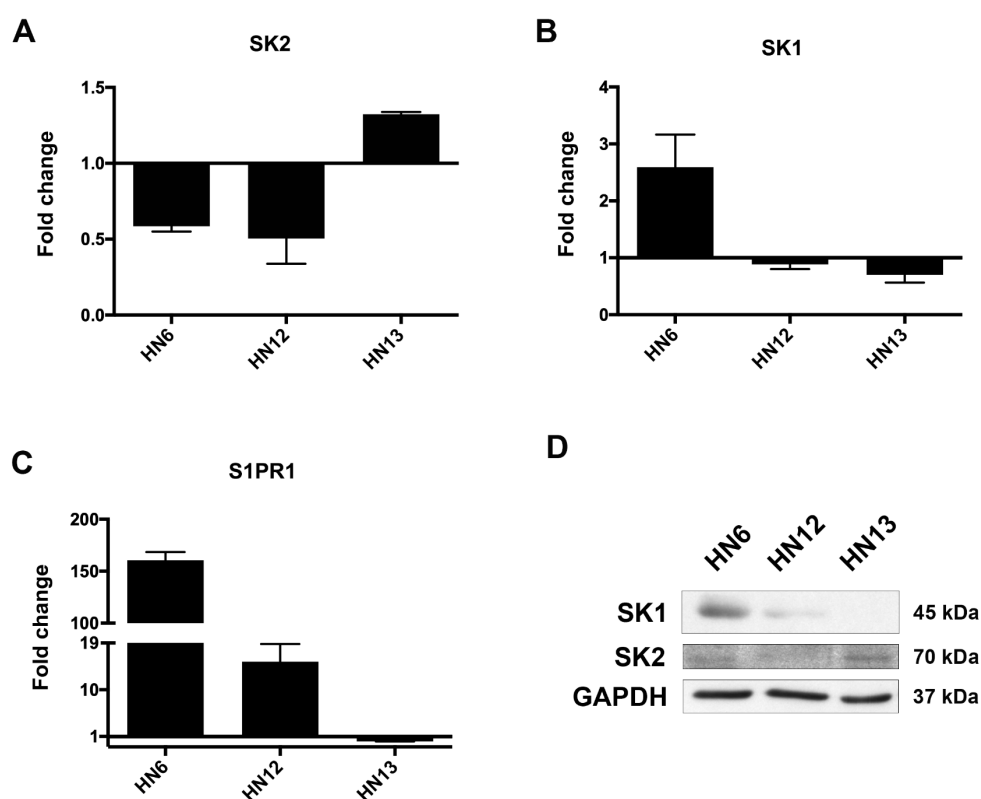


Figura 8. Perfil de expressão de SK2, SK1 e S1PR1 em linhagens CECP. Os níveis de RNAm da SK2 (A), SK1 (B) e do S1PR1 (C) foram determinados por qRT-PCR em três linhagens celulares de câncer epidermoide de cabeça e pescoço, HN6, HN12 e HN13. A linhagem não-tumoral NOK-SI foi utilizada como referência para o cálculo da expressão relativa. (D) Nível proteico de SK1 e SK2 foram determinados por WB. GAPDH foi utilizado como controle de loading do experimento.

4.1.2 Obtenção e caracterização molecular de linhagens de CECP com knockdown de SK2

A partir dos resultados obtidos, selecionamos a linhagem HN13 para realizar o silenciamento estável de RNA (short hairpin, shRNA) de SK2, uma vez que ela apresentou maior nível de mRNA. Para o knockdown, nós testamos quatro sequências shRNAs (nomeadas *sh1*, *sh2*, *sh3* e *sh5*), enquanto a célula controle foi transduzida com o vetor vazio (TRC1, controle do *sh1* e *sh2*, e TRC2 do *sh3* e *sh5*). A eficiência de knockdown foi confirmada por qRT-PCR (Figura 9A). Além disso, analisamos os níveis de RNAm da SK1 e do S1PR1 nestas células, procurando algum mecanismo compensatório (Figura 9B-C). Dentre as sequências de shRNA testadas, as que tiveram maior eficiência no knockdown da SK2, apresentaram também maior redução de S1PR1. Desta forma, baseado nos níveis de RNAm de SK1, SK2 e S1PR,

escolhemos dois clones para seguir nos próximos experimentos: clones *sh1* e *sh5*. Entretanto, observamos que as células HN13 *sh1* apresentaram maior nível de redução de SK2/SK1/S1PR1 comparadas com o controle, por isso optamos por continuar os experimentos com o clone *sh1*, linhagem celular nomeada como HN13 shSK2.

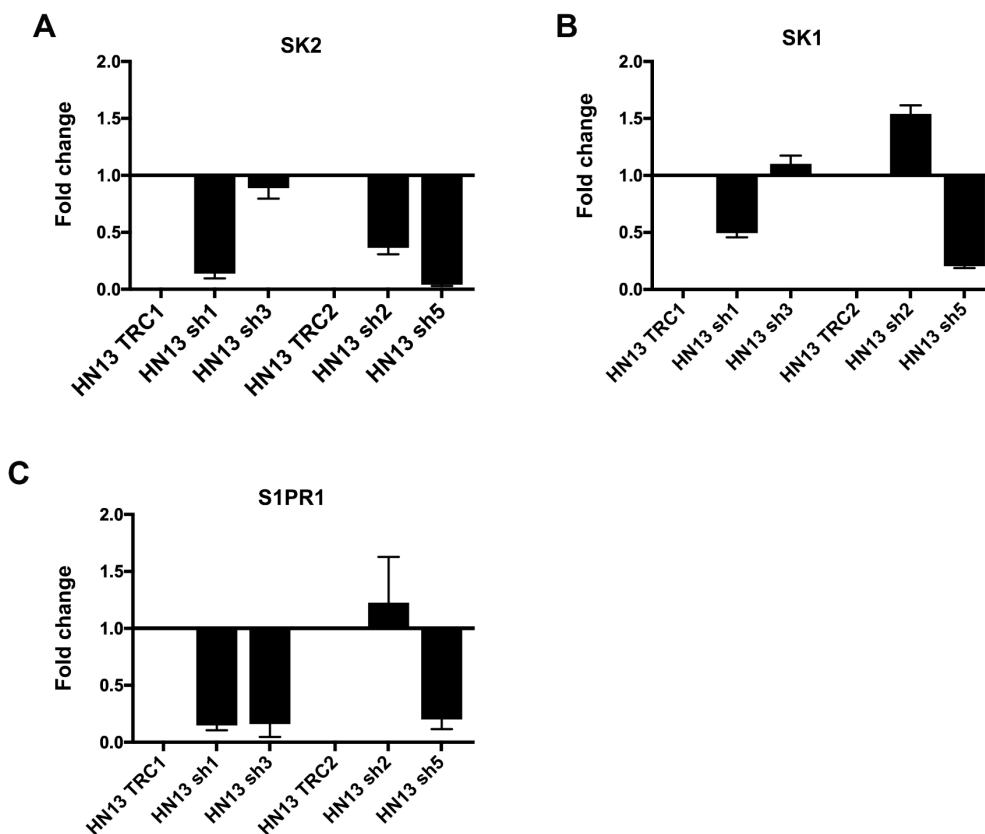


Figure 9. Knockdown de SK2 na linhagem HN13. As células HN13 contendo quatro sequências diferentes de shRNAs para SK2 (nomeadas *sh1*, *sh3*, *sh2* e *sh5*) e os dois vetores de shRNA controles negativos (nomeadas TRC1 e TRC2) foram selecionadas com puromicina. A seguir, os níveis de RNAm de SK2 (A), SK1 (B) e S1PR1 (C) foram determinados por qRT-PCR. A expressão relativa foi estimada por $2^{-\Delta\Delta CT}$, sendo a amostra referência para *sh1* e *sh3* o controle negativo TCR1 e para *sh3e sh5* o TCR2. Os resultados estão apresentados como média±SD.

4.1.3 Efeito do knockdown da SK2 na proliferação e transformação celular na linhagem tumoral HN13

Para avaliar se o knockdown da SK2 alterou vias de sinalização importantes em câncer oral, investigamos o nível de algumas proteínas por Western blotting.

Observamos que o knockdown da SK2 na linhagem HN13 levou à redução de p-Akt(308) e aumento de p-STAT3 (Figura 10A). Além disso, houve aumento de p21 e diminuição de Rb e p-Rb, importantes reguladores do ciclo celular, e redução do nível do oncogene c-myc, p-GSK3 β e p53 (Figura 10B). Uma ação da SK2 descrita é regulação de acetilação de histonas, desta forma avaliamos os níveis de acetilação de histonas H3^{Lys9} and H4^{Lys12} e verificamos que o knockdown da SK2 levou ao aumento da acetilação destas histonas (Figura 10C). Estes resultados sugerem que a redução da SK2 pode levar à diminuição na proliferação e no ciclo celular nessas células, visto que diminuiu p-Akt e p-Rb, e aumentou p21.

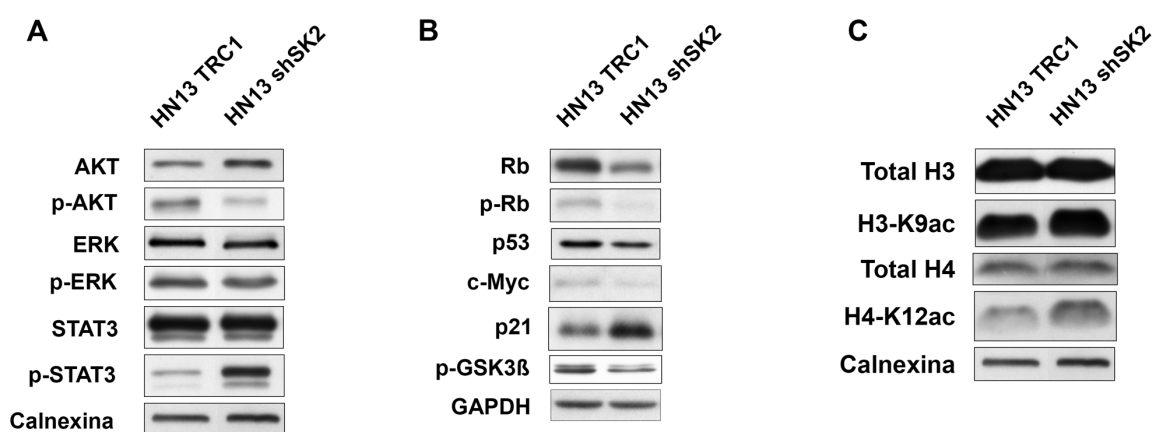


Figura 10. Knockdown da SK2 regula proteínas relacionadas à proliferação celular e acetilação de histona em células HN13. Análise por WB dos níveis de as proteínas Akt, p-Akt, ERK, p-ERK, STAT3, p- STAT3 (A), Rb, p-Rb, p53, c-myc, p21, p-GSK3 β (B), Histona H3 e H4, histonas H3 e H4 acetiladas (C). Calnexina e GAPDH foram usados como controle de carregamento do experimento.

Analisamos como estaria o potencial migratório das células com knockdown da SK2 utilizando as técnicas com sistema *transwell* e o ensaio de “*wound healing*” em placa de 24 poços. Em ambos os ensaios, não foi observado diferença significativa quanto ao potencial migratório das células HN13 shSK2 em relação ao controle (Figura 11A e B, respectivamente). No entanto, quando avaliamos a atividade das metaloproteinases, identificamos que as células com o knockdown da SK2 tiveram aumento significativo de MMP2 quando comparadas ao controle, e uma tendência de aumento de MMP9 (Figura 11C). Estes dados sugerem que as células HN13 shSK2 tem maior potencial de invasão.

Por fim, analisamos por Western blot, os níveis das proteínas E-caderina e Sox-2, como marcadores de TEM, pois devido a análises prévias, sabemos que a linhagem

celular HN13 não expressa a proteína vimentina (SOBRAL; SOUSA; COLETTA; CABRAL *et al.*, 2014). O resultado mostrou que o knockdown da SK2 na HN13 levou ao aumento de E-caderina e redução de Sox-2, coerente com um perfil mais epitelial (Figura 11D).

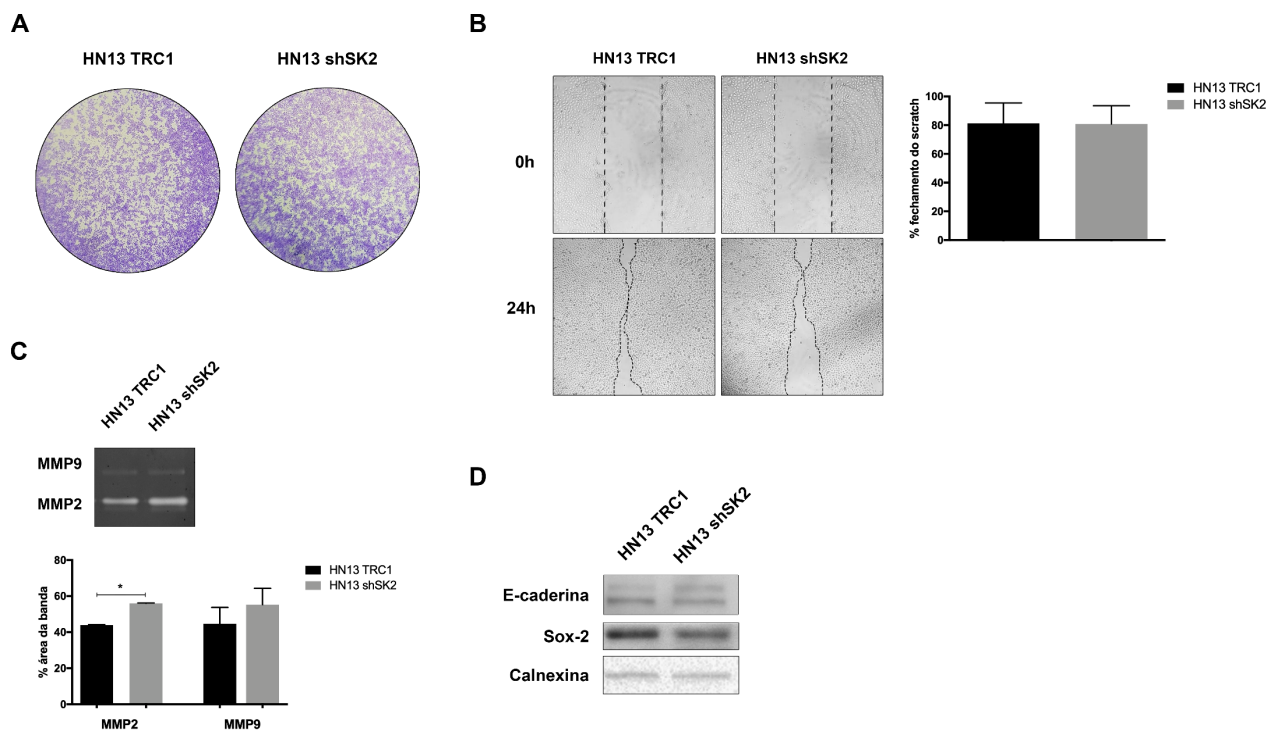


Figura 11. Knockdown de SK2 em células HN13 reduz proliferação e aumenta atividade de MMP2.

(A) No ensaio de migração, as células foram plaqueadas em transwell contendo meio de cultura sem soro. Após 24h, as células foram fixadas e coradas com hematoxilina e as imagens foram obtidas em microscópio óptico no aumento de 2x. (B) No ensaio de “wound healing” estão mostradas imagens representativas do tempo zero (T0) e após 24 horas (T24) Cálculo da porcentagem de área fechada foi feito usando a ferramenta MRI Wound Healing Tool no software ImageJ. (C) Ensaio de zimografia para análise da atividade das MMP2 e MMP9 utilizando os sobrenadantes das células HN13 shSK2 e HN13 TCR1 coletados após 24 horas de cultura. (D) Análise por WB dos níveis das proteínas E-Caderina e Sox-2 nas células HN13 shSK2 e HN13 TCR1. Calnexina foi utilizada como controle de carregamento de proteínas no gel. A quantificação da intensidade de fluorescência da SET foi realizada no ImageJ. Os valores mostrados no gráfico são média±SD. As diferenças estatísticas são indicadas como * p <0,05 (calculado usando teste t de Student não pareado).

4.1.4 Efeito do knockdown da SK2 no processo de autofagia na linhagem celular tumoral HN13

Outro efeito investigado do silenciamento da SK2 na linhagem HN13 foi o potencial impacto na alteração dos níveis de LC3 nestas células, uma vez que há

estudos relatando a relação da SK1/S1P no processo autofágico (TANIGUCHI; KITATANI; KONDO; HASHIMOTO-NISHIMURA *et al.*, 2012). Para este ensaio, as células HN13 shSK2 e HN13 TCR1 foram mantidas em cultura com e sem cloroquina (inibidor da autofagia na etapa final de degradação lisossomal) para avaliarmos o fluxo autofágico (KLIONSKY; ABDELMOHSEN; ABE; ABEDIN *et al.*, 2016). Segundo nossos resultados de WB, nas células HN13 shSK2 houve redução dos níveis de LC3 em relação ao controle, mas na presença de cloroquina, há maior acúmulo de LC3II (Figura 12A). Por imunofluorescência confirmamos o resultado, sugerindo que o fluxo autofágico é maior nas células com knockdown da SK2 (Figura 12C). Além dessas proteínas, analisamos os níveis de outra proteína relacionada com o processo de autofagia, a P62. Em níveis basais a HN13 shSK2 possui menos P62 do que a HN13 TCR1, mas na presença da cloroquina, houve maior acúmulo de P62 (Figura 12B), reforçando o resultado de maior fluxo autofágico.

Como em outros estudos, foi descrito que a SK2 pode estar localizada no núcleo e na mitocôndria (NEUBAUER; PITSON, 2013), e que há relação de esfingolípídios com autofagia (LIMA; TAKABE; NEWTON; SAURABH *et al.*, 2018); decidimos investigar se a alteração nos níveis de LC3 poderia estar relacionada ao processo de mitofagia nestas células.

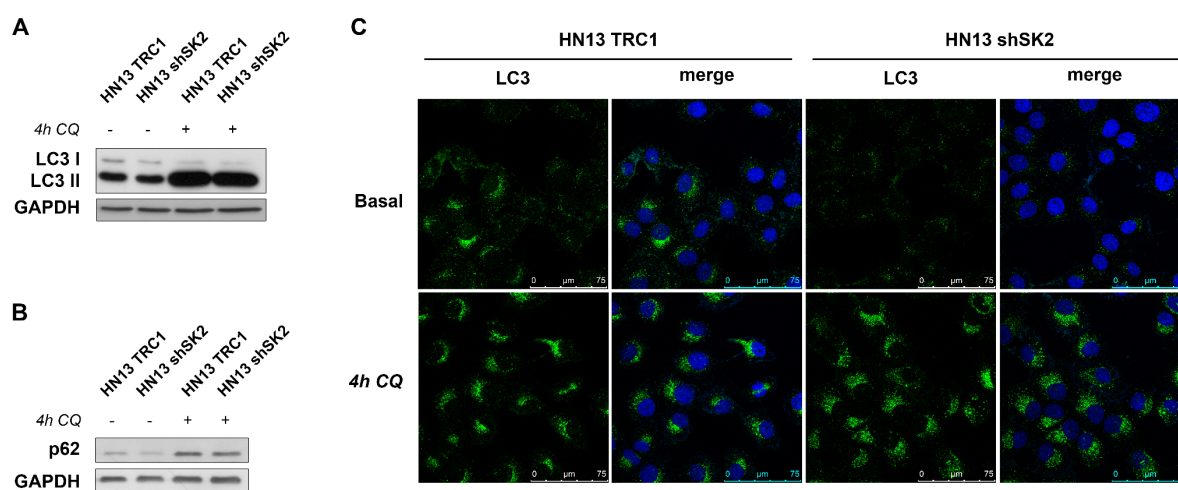


Figura 12. Knockdown da SK2 nas células HN13 reduz nível de LC3 e aumenta fluxo autofágico. Análise por WB dos níveis de LC3 I, LC3 II (A) e p62 (B) nas células HN13 TCR1 e HN13 shSK2 incubadas ou não com 20 μ M cloroquina por 4 horas. GAPDH foi usada como controle de carregamento no gel. (C) Análise por IF da proteína LC3 (verde) nas células incubadas ou não com 20 μ M cloroquina por 4 horas. Núcleos corados por DAPI (azul).

Analisamos os níveis de uma proteína relacionada à fissão mitocondrial. Uma das principais proteínas que participa desse processo é a DRP1 (YOULE; VAN DER BLIEK, 2012), por isso analisamos por western blot os níveis de sua forma ativa, p-DRP1. No resultado do fracionamento subcelular vimos que os níveis de p-DRP1 reduziram na linhagem HN13 shSK2 na fração citosólica e apenas um pouco na fração mitocondrial (Figura 13A).

Outra proteína que analisamos nessas células, foi a SET/12PP2A, um inibidor da PP2A. Já é descrito que FTY720, um análogo sintético de esfingosina e antagonista da via de S1P, é fosforilado pela SK2 e ativa PP2A via S1PR1 (OAKS; OGRET MEN, 2014). Na análise por IF identificamos que o knockdown da SK2 aumentou os níveis de SET no núcleo das células HN13 shSK2 quando comparado às células controle HN13 TCR1 (Figura 13B). Reforçando a existência de um potencial cross-talking entre SK2/SET/PP2A com impacto em suas ações na mitocôndria, autofagia e núcleo (OUCHIDA; UYEMURA; QUEIROZ; BRAUER et al., 2019).

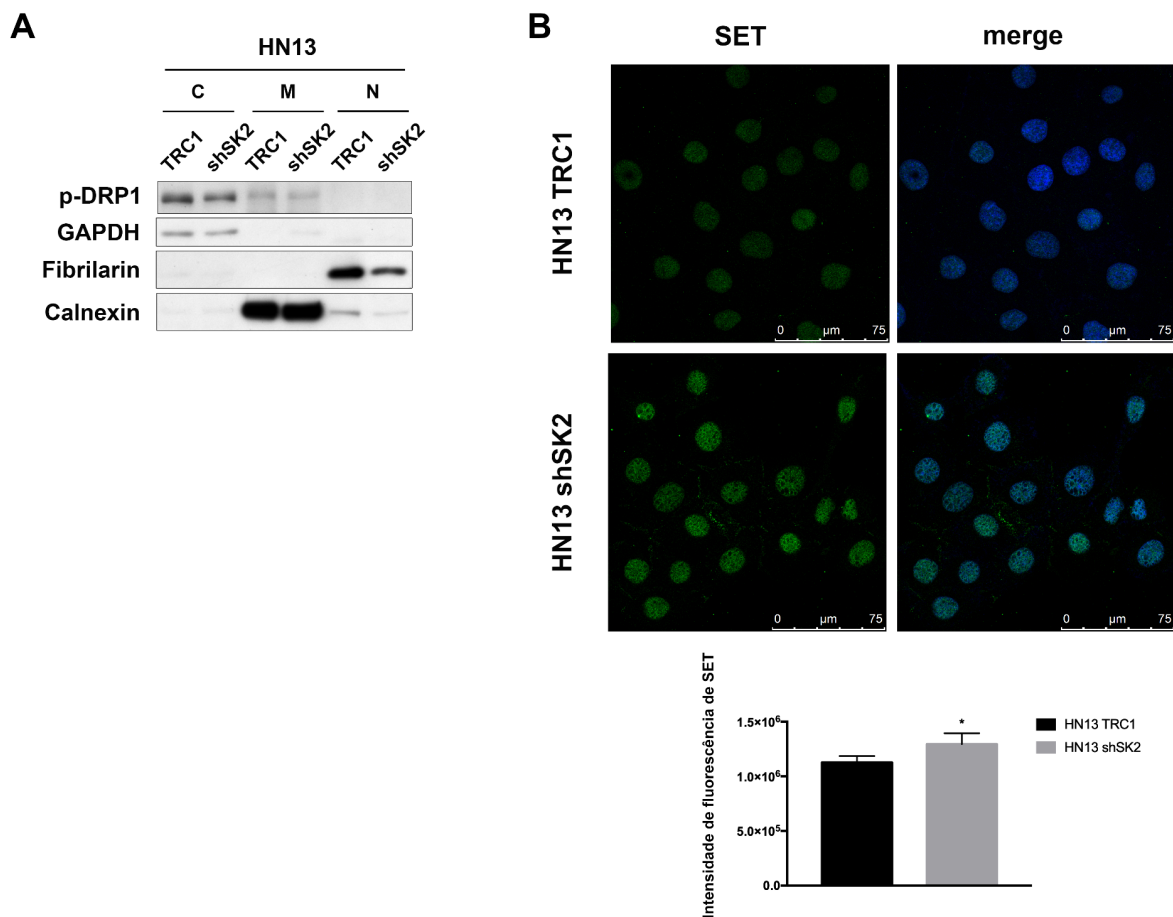


Figura 13. Knockdown da SK2 reduz p-DRP1 e aumenta nível de SET em células HN13. (A) Análise por WB dos níveis de SET e p-DRP1 em cada fração subcelular das células HN13 TRC1 e HN13 shSK2. Calnexina, Fibrilarina e GAPDH foram usados como controle de subfracionamento celular e carregamento de proteínas no gel. (B) Análise por IF de SET (verde). Os núcleos foram corados com DAPI (azul). A quantificação da intensidade de fluorescência da SET foi realizada no ImageJ. Os valores mostrados no gráfico são média±SD. As diferenças estatísticas são indicadas como * $p < 0,05$ (calculado usando teste t não pareado).

Por fim, para avaliar como estaria a morfologia das mitocôndrias nessas células, foi feita a microscopia eletrônica de transmissão (MET). A partir das imagens, observamos a presença de vários autofagossomos com conteúdo denso dentro (seta vermelha) nas células controle HN13 TRC1 (Figura 14A). Isso confirma nossos resultados anteriores os quais as células controle basal tinham alto nível de LC3. No entanto, nas células HN13 shSK2 quase não notamos a presença de autofagossomos densos, porém observamos mitocôndrias alteradas com rompimento membranar e cristas deformadas (setas pretas) assim como estruturas com membranas sem material denso (Figura 14B). Indicando assim que o silenciamento da SK2 acelera o processo autofágico, por isso há menor quantidade de autofagossomos densos na

HN13 shSK2, assim como a presença de mitocôndrias com alterações significativas da estrutura.

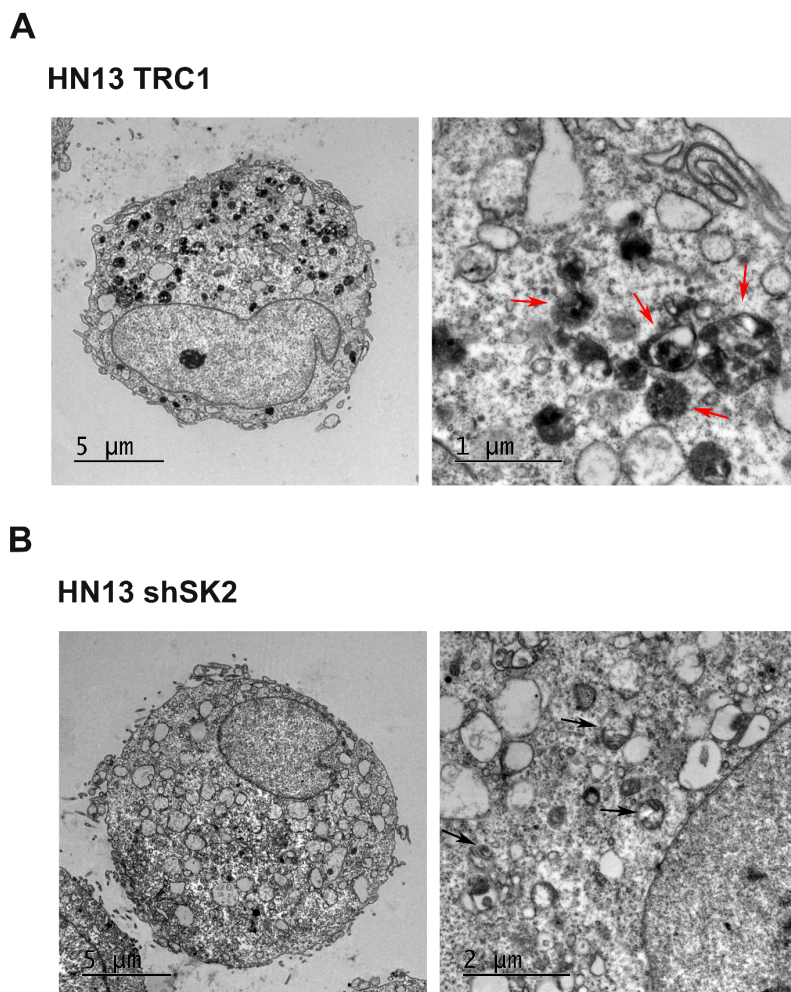


Figura 14. Knockdown da SK2 em células HN13 causa alteração em mitocôndrias. As imagens das linhagens HN13 TRC1 (A) e HN13 shSK2 (B) foram obtidas por microscopia eletrônica de transmissão. Setas vermelhas indicam autofagossomos, setas pretas indicam mitocôndrias alteradas. Imagens representativas de um experimento.

4.2 Estudo do efeito da superexpressão da SK2 na linhagem tumoral HN12

4.2.1 Obtenção e caracterização molecular de linhagem de CECP (HN12) com superexpressão de SK2

Visto que a HN12 apresentou menor nível de RNAm de SK2, utilizamos esta linhagem de CECP para a superexpressão da SK2. A superexpressão na HN12 foi

realizada de forma estável com o vetor pLenti6.3-SK2/V5 (HN12 SK2) e a célula controle negativo foi selecionada com o vetor vazio (HN12 pLenti). Confirmamos a superexpressão do RNAm por qRT-PCR e da proteína por Western blotting em todas as frações proteicas subcelulares: citosol, membrana/mit e núcleo (Figura 15A-B). Avaliamos também os níveis de RNAm de SK1 e S1PR1, aonde identificamos que SK1 aumentou nestas células, porém o S1PR1 não foi alterado, diferente do observado com o shRNA para SK2 em células HN13 (Figura 15C-D).

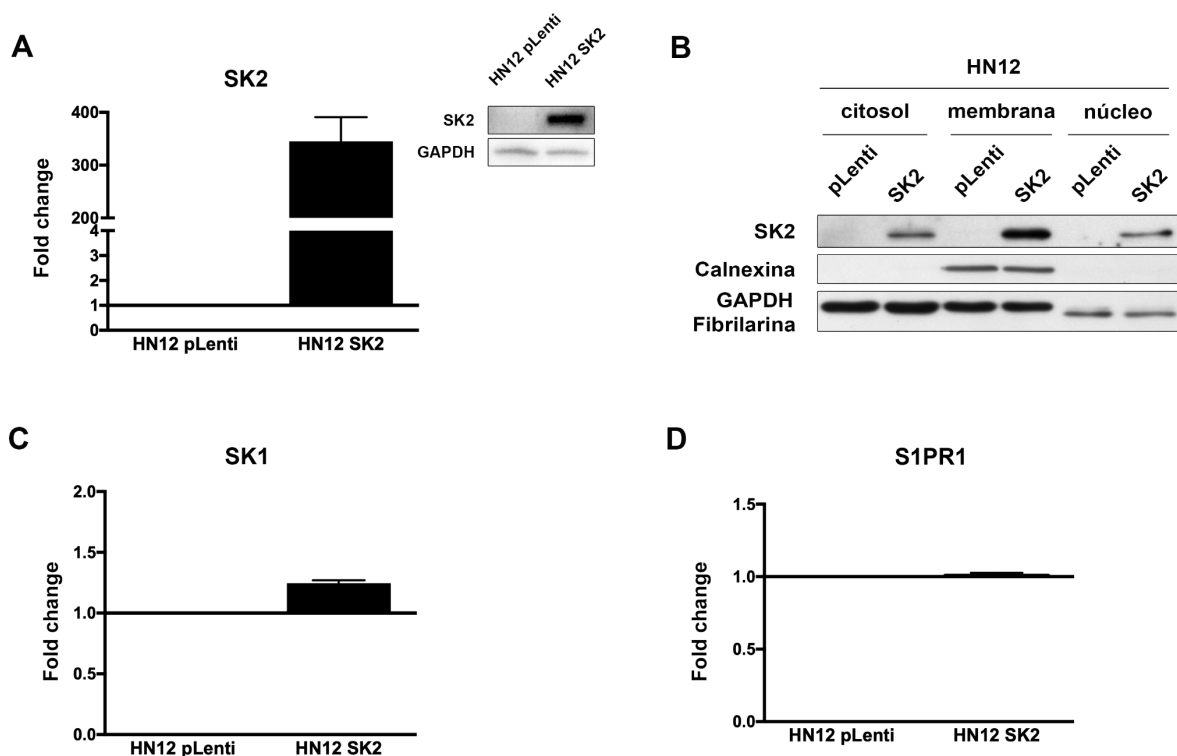


Figura 15. Confirmação da superexpressão da SK2 na linhagem HN12. As células HN12 contendo a sequência codificante da SK2 (HN12 SK2) e o vetor vazio (HN12 pLenti) foram selecionadas com blasticidina. (A) Confirmação da superexpressão de SK2 tanto a nível de RNAm por qRT-PCR quanto por WB utilizando proteína total das células GAPDH foi usado como controle de carregamento do gel. (B) Análise por WB dos níveis de SK2 nas amostras de proteínas obtidas por fracionamento subcelular das linhagens HN12 pLenti e HN12 SK2. Calnexina, Fibrilarina e GAPDH foram analisadas como marcador específico das subfrações celulares e como controle de carregamento de proteínas no gel. Expressão de SK1 e S1PR1 por qRT-PCR (C e D, respectivamente). Os dados foram apresentados como *fold change* da HN12 SK2 vs HN12 controle; os valores apresentados são média±SD.

4.2.2 Efeito da superexpressão da SK2 na proliferação e transformação celular na linhagem tumoral HN12

Como o knockdown da SK2 na HN13 alterou várias proteínas importantes na sinalização de CECP, investigamos por Western blotting os mesmos alvos nas células HN12 SK2. A superexpressão da SK2 levou ao aumento no nível de p-Akt e c-myc, e redução de p-ERK e p21 (Figura 16A-B). Quanto à regulação na acetilação de histonas, observamos que a superexpressão diminuiu a acetilação de H4^{Lys12} (Figura 16C). Estas modulações foram opostas àquelas identificadas com o knockdown da SK2 na linhagem HN13, apenas p53 não foi possível analisar pois a linhagem celular HN12 tem p53 truncado (MARTIN; ABBA; MOLINOLO; VITALE-CROSS *et al.*, 2014). Esses resultados sugerem que a superexpressão da SK2 na HN12 pode induzir ao aumento da proliferação e ativar o processo de transformação celular/TEM.

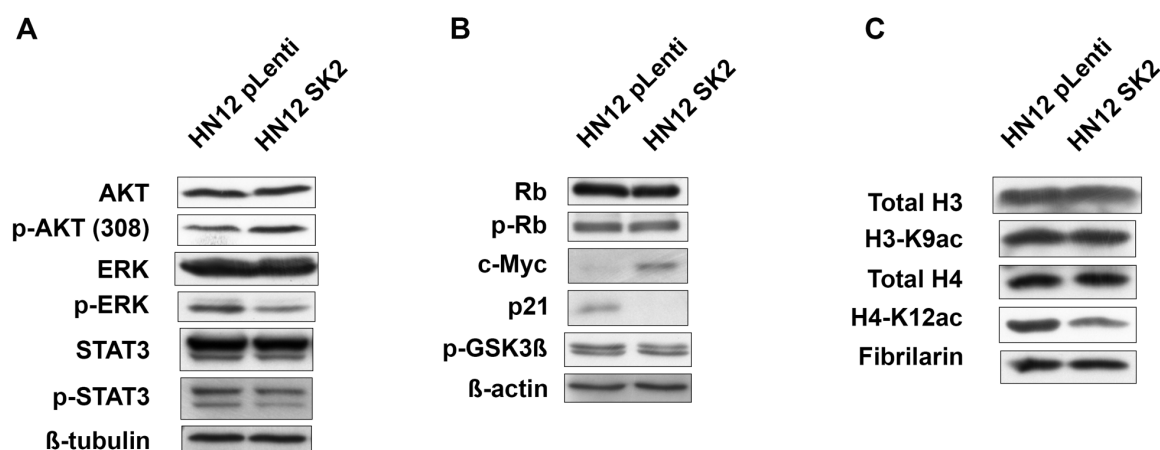


Figura 16. Superexpressão da SK2 nas células HN12 aumenta os níveis de proteínas relacionadas à proliferação celular. Análise por WB das proteínas Akt, p-Akt (Lys308), ERK, p-ERK, STAT3, p-STAT3 (A), Rb, p-Rb, c-myc, p21, p-GSK3β (B), histonas H3 e H4 totais, e histonas H3Lys9 e H4Lys12 acetiladas (C). β-tubulina, β-actina e fibrilarina foram usadas como controle de carregamento de proteínas no gel.

Assim como foi analisado nas células HN13 shSK2, foi feito também o ensaio para avaliar a migração celular usando o sistema *transwell* em placa de 24 poços. Pode-se observar que, após 24 horas, a membrana contendo as células HN12 SK2 aparentemente apresentou menos células migradas e coradas com cristal violeta comparado com a linhagem controle HN12 pLenti (Figura 17A).

Para complementar e confirmar se as células com superexpressão de SK2 estavam com menor potencial de migração, foi feito o ensaio de “*wound healing*” com as células HN12. Curiosamente, a linhagem HN12 SK2 teve menor área fechada quando comparada com a HN12 pLenti, sugerindo menor potencial de migração (Figura 17B). Outro resultado que confirmou o menor potencial de migração e invasão nas células com superexpressão de SK2 foi a zimografia, que mostrou redução nas atividades das MMP-2 e MMP-9, oposto ao observado no knockdown da SK2 na HN13 (Figura 17C).

Por outro lado, quando analisamos os níveis das proteínas e fatores de transcrição envolvidos no processo de TEM, identificamos que as células HN12 SK2 aumentaram os níveis de vimentina, e reduziram E-caderina e Sox-2 (Figura 17D). Isso indica que, apesar das células HN12 SK2 terem acentuado o perfil proteico associado ao fenótipo mesenquimal, o potencial de migração e invasão foi reduzido.

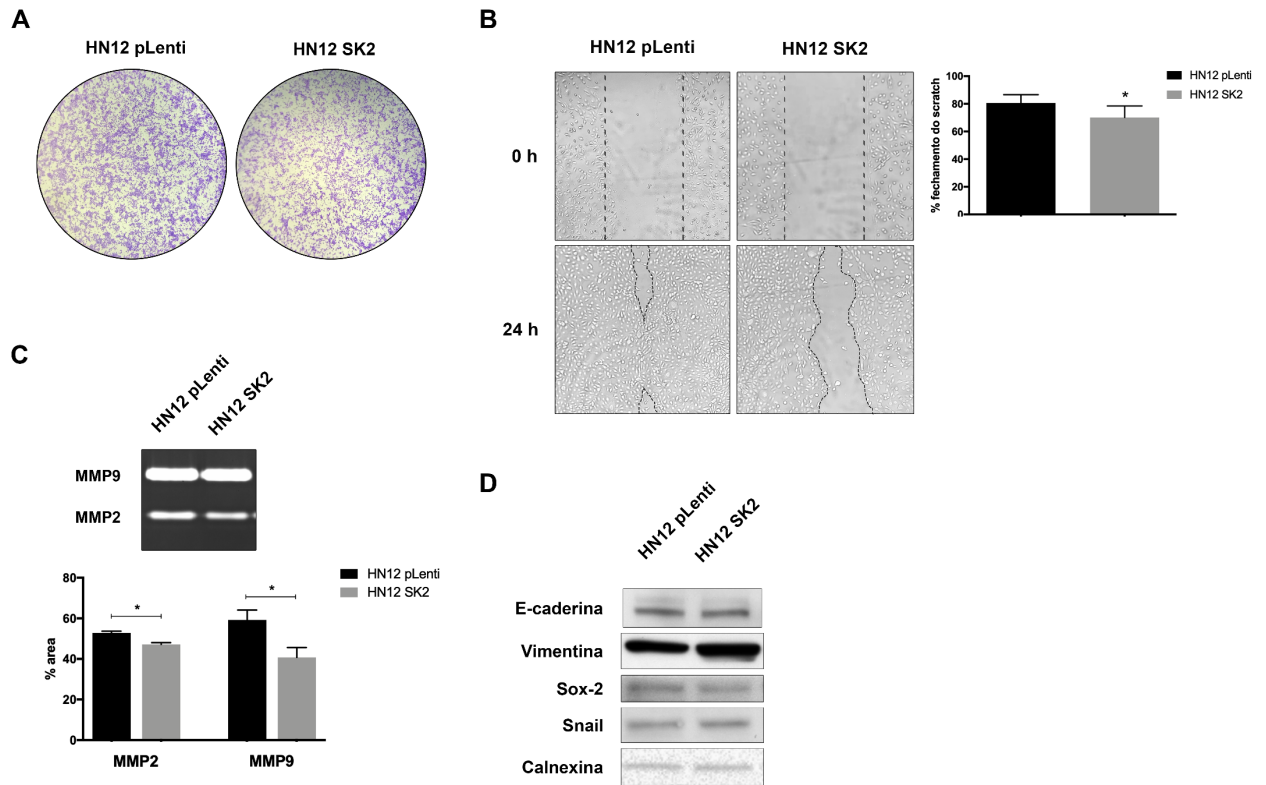


Figura 17. Superexpressão de SK2 em células HN12 reduz o potencial de migração e invasão, assim como as MMP-2 e MMP-9. (A) No ensaio de migração, as células foram plaqueadas em transwell contendo meio de cultura sem soro. Após 24h, as células foram fixadas e coradas com cristal violeta e as imagens foram obtidas em microscópio óptico no aumento de 2x. (B) No ensaio de “wound healing” estão mostradas imagens representativas do tempo zero (T0) e após 24 horas (T24) Cálculo da porcentagem de área fechada foi feito usando a ferramenta MRI Wound Healing Tool no software ImageJ. (C) Ensaio de zimografia para análise da atividade das MMP2 e MMP9 utilizando os sobrenadantes das células HN12 pLenti e HN12 SK2 coletados após 24 horas de cultura. (D). Análise por WB dos níveis de E-Caderina, vimentina, Sox-2 e Snail nas células HN12 pLenti e HN12 SK2. Calnexina como controle de carregamento. Os valores apresentados nos gráficos são média±desvio padrão. As diferenças estatísticas são indicadas como * $p < 0,05$, calculado usando teste t não pareado.

4.2.3 Efeito da superexpressão da SK2 no processo de autofagia na linhagem celular tumoral HN12

Assim como nas células HN13 com knockdown da SK2, investigamos se a superexpressão da SK2 alteraria o fluxo autofágico na HN12, incubadas ou não com cloroquina. Nos resultados por Western blot vimos que a HN12 SK2 teve maior nível de LC3-I e LC3-II do que no controle, e na presença de cloroquina houve acúmulo de LC3 semelhante à célula controle, sugerindo menor fluxo autofágico (Figura 18A). Nas análises por imunofluorescência, os resultados confirmaram àqueles obtidos por

Western blotting, ou seja, maior nível de LC3 basal na linhagem celular HN12 SK2 quando comparada à HN12 pLenti (Figura 18C).

Além do LC3, observamos que a superexpressão de SK2 aumentou os níveis de p62 comparada com as células controle (Figura 18B). Na condição com cloroquina, p62 foi acumulado nas duas linhagens igualmente. Esses resultados sugerem que o fluxo autofágico é menor na HN12 SK2, tendo a regulação contrária das mesmas proteínas (LC3 e p62) que vimos nas células HN13 shSK2, indicando que são alvos de SK2.

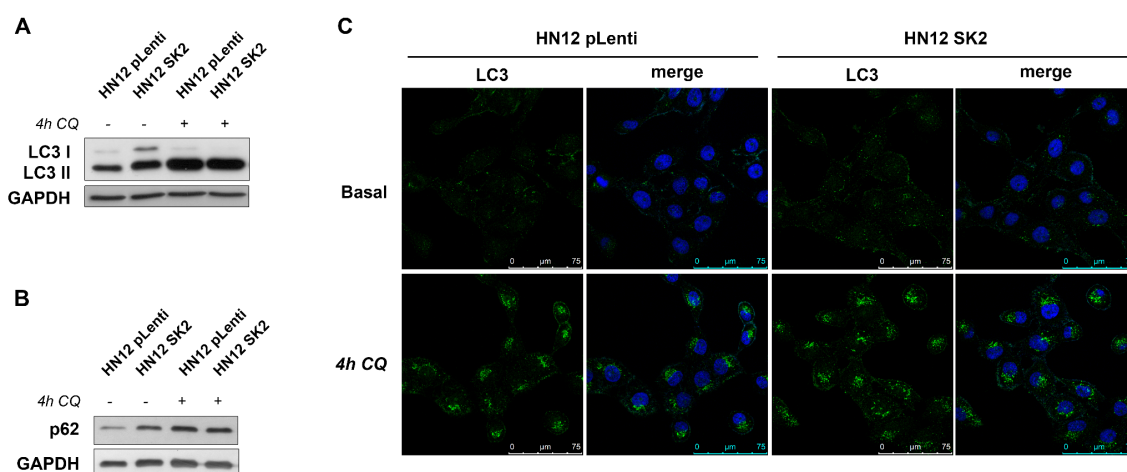


Figura 18. Superexpressão da SK2 reduz o fluxo autofágico em células HN12. Análise por WB dos níveis de LC3 I, LC3 II (A) e p62 (B) das células HN12 pLenti e HN12 SK2 tratadas e não tratadas com 20 μ M cloroquina por 4 horas. GAPDH foi usado como controle de carregamento no gel. (C) Análise por IF das células tratadas com 20 μ M cloroquina por 4 horas marcadas com LC3 (verde) e núcleo (DAPI, azul).

Para avaliar se os níveis de LC3 poderiam estar relacionados ao processo de mitofagia nestas células, avaliamos por imunofluorescência a marcação da proteína mitocondrial estrutural TOM20 e LC3. Foi possível observar maior quantidade de células com colocalização entre essas duas proteínas em HN12 SK2 na presença de cloroquina, em comparação com as células controle HN12 pLenti (Figura 19). Isso sugere que a superexpressão da SK2 aumenta o processo de macroautofagia/mitofagia nestas células.

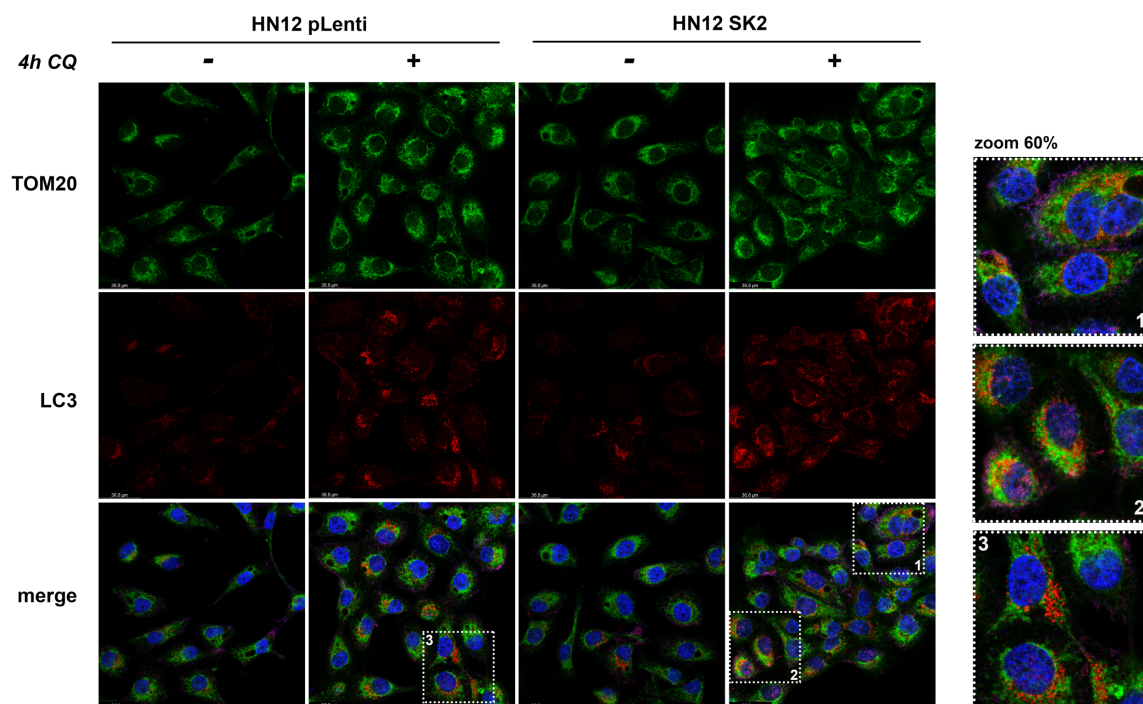


Figura 19. Superexpressão da SK2 na HN12 induz mitofagia. Análise realizada por microscopia confocal das proteínas imunomarcadas TOM20 (verde) e LC3 (vermelho) nas células HN12 SK2 e HN12 pLenti com e sem incubação com 20 μ M cloroquina por 4 horas. Os núcleos foram corados com DAPI (azul).

Visto que o knockdown da SK2 na HN13 modificou níveis de proteínas da dinâmica mitocondrial, bem como a morfologia das organelas, decidimos investigar por Western blot os níveis de proteínas que participam da dinâmica mitocondrial, principalmente mitofagia, nas frações celulares após incubação ou não das células com cloroquina. A linhagem HN12 SK2 apresentou aumento da proteína PINK1 na fração mitocondrial e redução de p-DRP1 comparado com a controle HN12 pLenti (Figura 20A).

Na análise por IF e microscopia confocal, confirmamos que nas células HN12 SK2 há redução dos níveis de p-DRP1 e, além disso, notamos que as células HN12 pLenti apresentam colocação de p-DRP1 e TOM20, o que não observamos nas células com superexpressão de SK2 (Figura 20B). Esses resultados mostram que a superexpressão de SK2 aumenta PINK1 na mitocôndria, mas não de p-DRP1, o que pode ter implicações em fissão mitocondrial e mitofagia.

Quando analisamos os níveis da proteína SET por WB, notamos que as células HN12 SK2 possuem aumento dos níveis da SET no citosol (Figura 20A), e redução no núcleo por quando analisado por IF e microscopia confocal (Figura 20C).

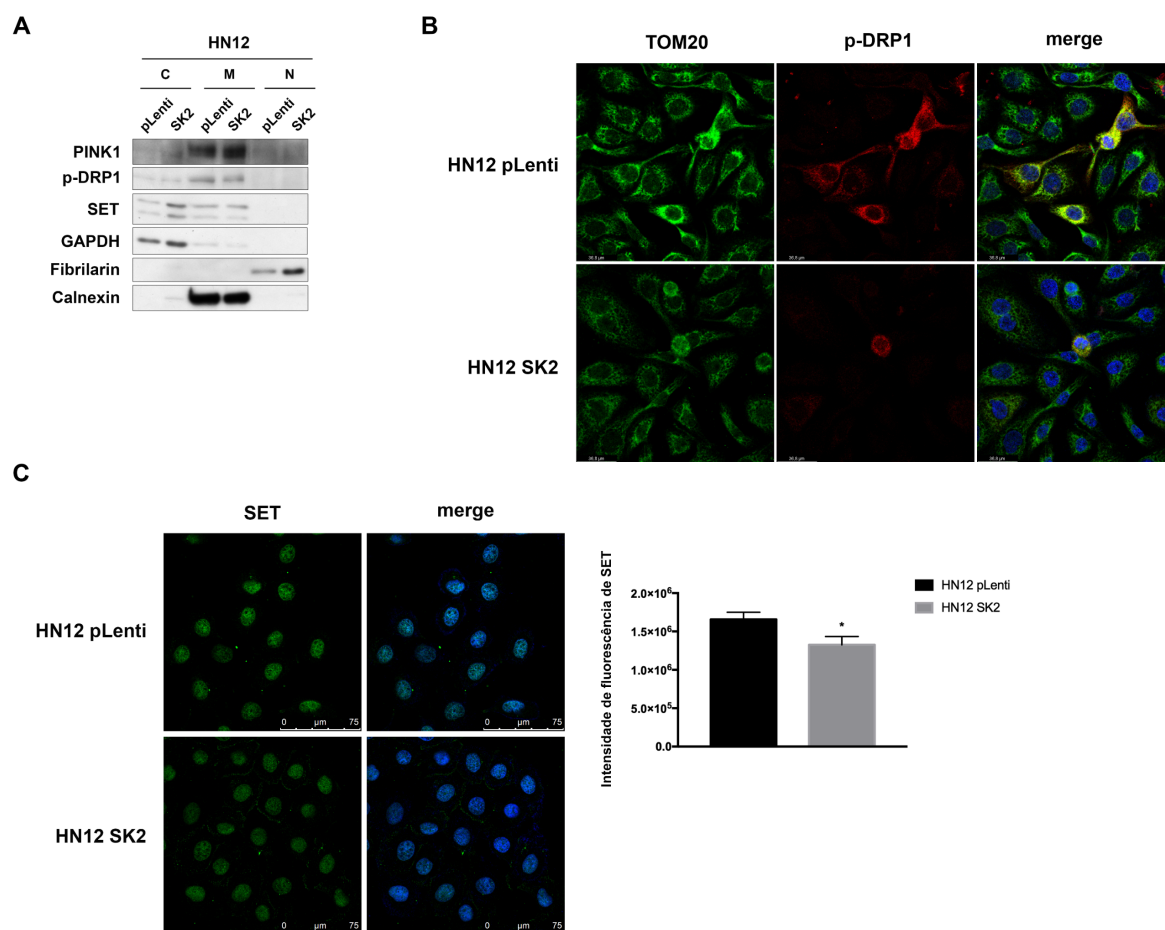


Figura 20. Superexpressão da SK2 em células HN12 aumenta os níveis de PINK1 em mitocôndrias. (A) Análise por WB dos níveis de PINK1, SET e p-DRP1 em cada fração subcelular das células HN12 pLenti e HN12 SK2. Calnexina, Fibrilarina e GAPDH foram usados como controle de subfracionamento celular e carregamento de proteínas no gel. (B) Análise por IF de p-DRP1 (verde). (C) Análise por IF de SET (verde). Os núcleos foram corados com DAPI (azul). A quantificação da intensidade de fluorescência da SET foi realizada no ImageJ. Os valores mostrados no gráfico são média ± SD. As diferenças estatísticas são indicadas como * $p < 0,05$ (calculado usando teste t não pareado).

Como a ubiquitinação participa da regulação de feedback positivo para a indução da autofagia (CHEN; CHEN; HUANG, 2019), avaliamos por Western blot como estaria o nível de ubiquitinação total nas células tumorais HN12 com superexpressão da SK2. Os resultados não mostraram diferença entre a HN12 pLenti e a HN12 SK2 na condição basal, porém ao tratarmos as células com cloroquina para inibir a degradação de proteínas ubiquitinadas pela autofagia, vimos o acúmulo destas nas células HN12 SK2, mas não nas células controle (Figura 21A). Esses resultados indicam que na HN12 SK2 as proteínas ubiquitinadas dependem do processo autofágico para degradação.

Com base neste resultado, decidimos investigar se estas proteínas Ub também estariam sendo degradadas via proteassoma. Para isso, as células foram incubadas com o inibidor proteassomal MG132. O resultado do Western blot mostrou que quando tratadas com MG132, há acúmulo de proteínas ubiquitinadas na HN12 SK2, porém em menor nível do que nas células controle HN12 pLenti (Figura 21B). Além disso, notamos que, a inibição de proteassoma leva ao aumento de SK2 nas células tratadas com MG132 (Figura 21B). Esses resultados sugerem que as proteínas ubiquitinadas na HN12 SK2 são também degradadas via proteassoma, mas em menor intensidade do que na HN12 pLenti, e que a proteína SK2 também é degradada nas células tumorais via proteassoma. Analisando em conjunto, os resultados sugerem que nas células HN12 SK2 a principal via de degradação de proteínas ubiquitinadas é a autofagia, mas a via proteassomal também está ativa.

Visto que os resultados sugeriram que a superexpressão de SK2 na HN12 induz autofagia/mitofagia, nós analisamos por imunofluorescência a distribuição das proteínas Beclina-1 e Bcl-2 nas células HN12, uma vez que já foi descrito que a SK2 se liga à Bcl-2 por meio do seu domínio BH3, liberando Beclina-1, a qual ativa o processo de autofagia (SONG; ZHANG; CHEN; XIA *et al.*, 2017). No resultado notamos a colocalização entre Beclina-1 e Bcl-2 nas células controle HN12 pLenti, enquanto na HN12 SK2 não observamos (Figura 21C). Sugerindo que a ativação da autofagia nessas células SK2 pode ser devido à liberação da Beclina-1.

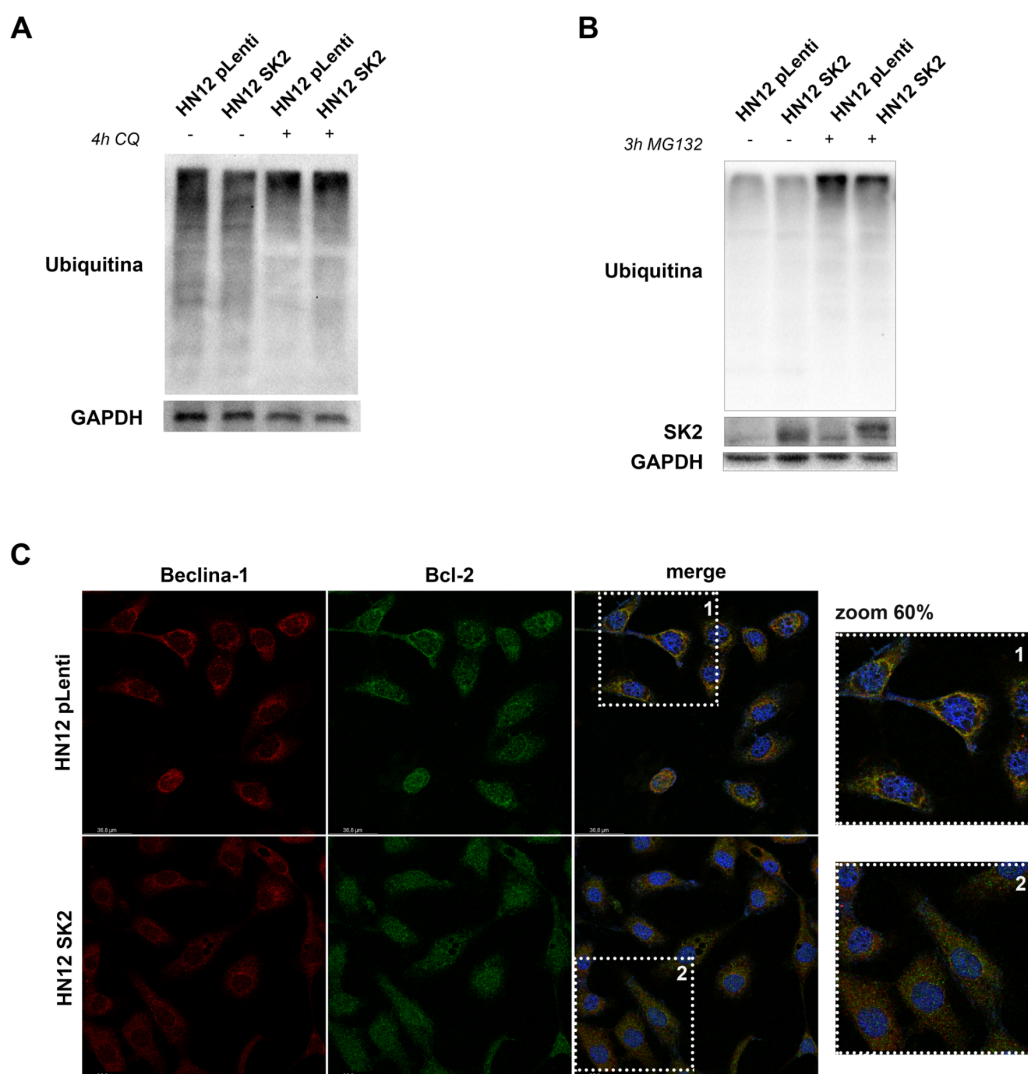


Figura 21. Superexpressão da SK2 na HN12 reduz a interação da Beclina-1 com Bcl-2. Análise por WB do nível de proteínas ubiquitinadas nas células tratadas com 20 μ M de cloroquina por 4 horas (A) e com 5 μ M de MG132 por 3 horas (B). GAPDH foi usado como controle de carregamento. (C) Análise por IF e microscopia confocal da colocalização entre Beclina-1 (vermelhor) e Bcl-2 (verde) nas células HN12 pLenti e HN12 SK2. O núcleo foi corado com DAPI (azul).

Por fim, para avaliar morfologia das mitocôndrias nas células HN12, foram obtidas imagens por MET. A partir delas, foi possível notar a presença de mitocôndria com morfologia mais alongada (seta preta), e poucos autofagossomos (seta vermelha) nas células controle HN12 pLenti (Figura 22A). Enquanto nas células HN12 SK2, notamos a presença de espaços no citoplasma com aparente rompimento de estruturas membranosas (asterisco preto), mitocôndria com aspecto bem alterado, edemaciadas e menor número de cristas (asterisco azul) (Figura 22B). Além disso, notamos maior número de autofagossomos (setas vermelhas) (Figura 22B). Dessa

forma, podemos sugerir que a superexpressão da SK2 induz o processo de autofagia e altera a estrutura das mitocôndrias das células HN12.

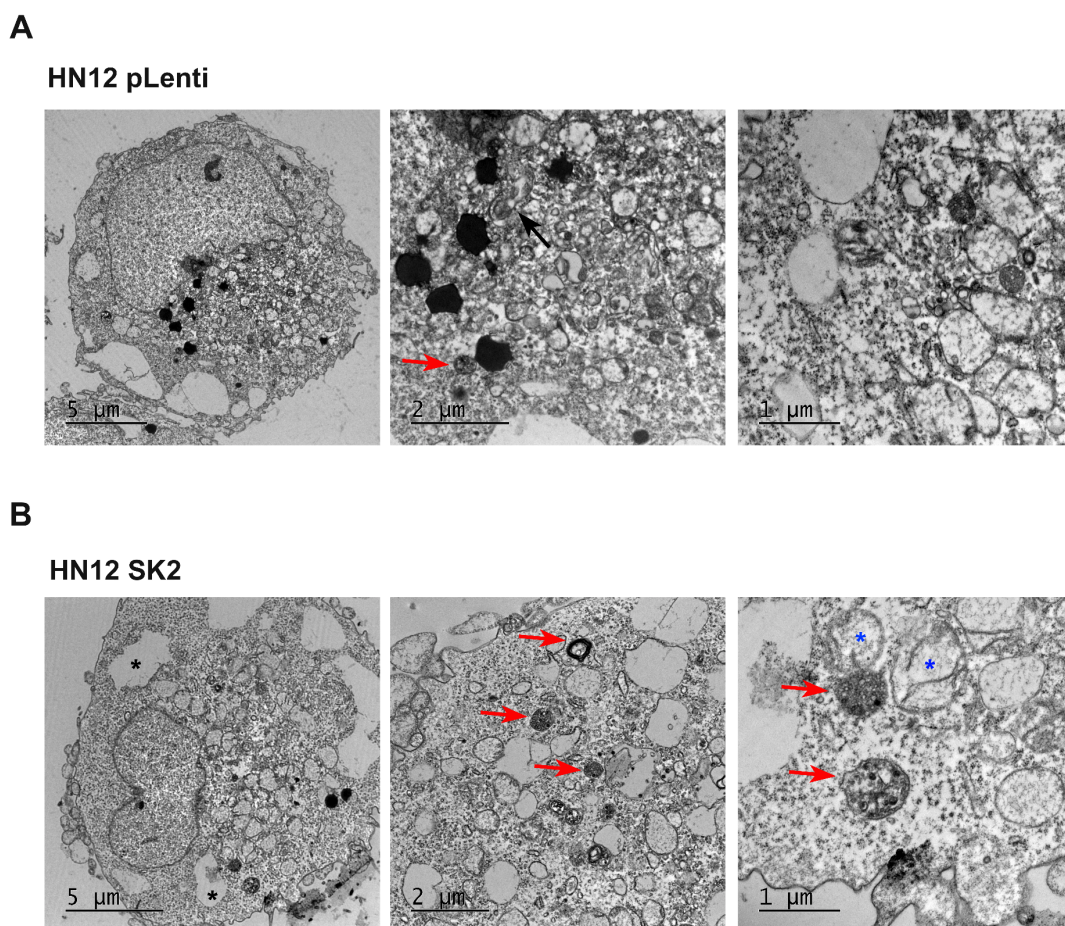


Figura 22. Microscopia eletrônica de transmissão das células HN12 com superexpressão da SK2. As imagens das linhagens HN12 pLenti (A) e HN12 SK2 (B) foram obtidas por microscopia eletrônica de transmissão. Setas vermelhas indicam autofagossomos, setas pretas indicam mitocôndrias alongadas, asteriscos azuis indicam mitocôndrias alteradas e asteriscos pretos indicam rompimento de membrana. Imagens representativas de várias células analisadas

4.2.4 Efeito da superexpressão da SK2 no metabolismo mitocondrial da linhagem celular tumoral HN12

Visto que os níveis da proteína SK2 em linhagens de CECP alterou a morfologia e níveis de proteínas mitocondriais, decidimos analisar o metabolismo bioenergético destas células. Primeiro, avaliamos o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) utilizando 5 μ M da sonda fluorescente JC-1 (Thermo Fisher) e

valinomicina como controle negativo, por induzir o desacoplamento mitocondrial. As células HN12 SK2 tem menor potencial de membrana mitocondrial do que as células HN12 pLenti (Figura 23A). A perda do potencial de membrana mitocondrial é um indicativo do comprometimento da função mitocondrial, sugerindo que as células estão sofrendo algum tipo de estresse. Sendo assim, o próximo passo foi avaliar o nível de espécies reativas de oxigênio (EROs) nestas células. As células HN12 com superexpressão da SK2 apresentaram um aumento de EROs quando comparadas às células HN12 pLenti (Figura 23B). Estes resultados indicam que a superexpressão da SK2 aumenta a produção de EROS nas células HN12, em associação ao menor potencial mitocondrial, ou seja, induz alteração na função mitocondrial de transporte de elétrons.

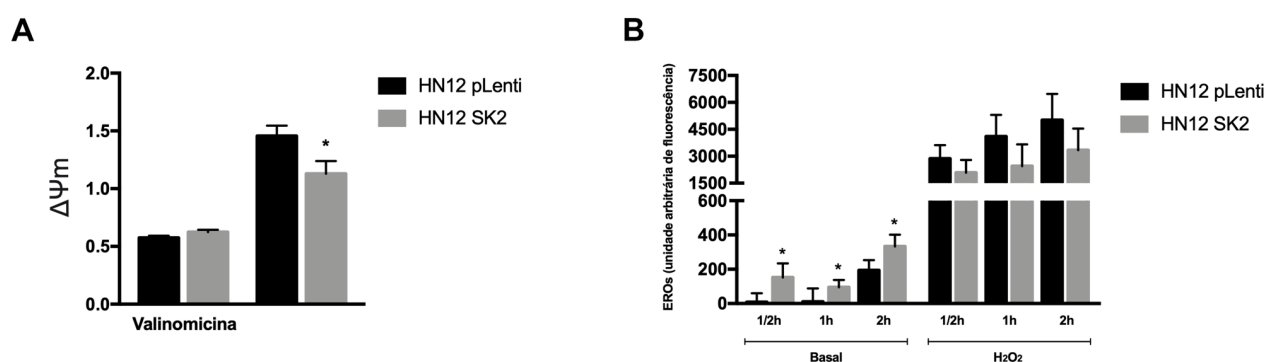


Figura 23. Superexpressão da SK2 aumenta EROs e reduz o potencial de membrana mitocondrial. (A) O potencial de membrana mitocondrial das células foi obtido utilizando o corante JC-1 e a leitura da absorvância foi feita por fluorimetria. A valinomicina (1 μ M) foi usada como desacoplador e controle do experimento. (B) Os níveis de EROs após 30 minutos, 1 hora e 2 horas da adição da sonda CM-H2DCFDA foram obtidos por fluorimetria. As células foram incubadas com H₂O₂ (1 mM) como controle do experimento. Os valores apresentados nos gráficos são média \pm desvio padrão. As diferenças estatísticas são indicadas como * p < 0,05 (calculado usando teste t não pareado).

Devido a esses resultados, nós analisamos os níveis dos complexos mitocondriais (I-IV) por western blotting, usando anticorpo anti-OXPHOS nas frações subcelulares enriquecidas de mitocôndria. Houve aumento aparente somente dos níveis do complexo I nas células HN12 SK2 (Figura 24A).

Com base nesses resultados, analisamos a atividade de citrato sintase (CS) nessas células, uma vez que a CS catalisa a primeira reação do ciclo de Krebs, sendo usada como um marcador bioquímico para o enriquecimento mitocondrial. A superexpressão da SK2 reduziu a atividade da citrato sintase nas células HN12

(Figura 24B), sugerindo uma mudança metabólica da bioenergética nessas células, de fosforilação oxidativa mitocondrial para a glicólise.

Por fim, determinamos os níveis de ATP (intracelular) e lactato (meio extracelular) nessas linhagens celulares em condição de cultura basal, ou seja, meio de cultura completo (contendo glicose). O resultado mostrou que as células HN12 SK2 apresentaram maiores níveis de ATP, mas não vimos diferença na quantidade de lactato liberado comparado com as células HN12 pLenti (Figura 24C-D). Esses resultados indicam que, apesar das modificações na estrutura mitocondrial e na atividade da CS, as células HN12 SK2 possuem maior nível de ATP, comparado com a HN12 pLenti.

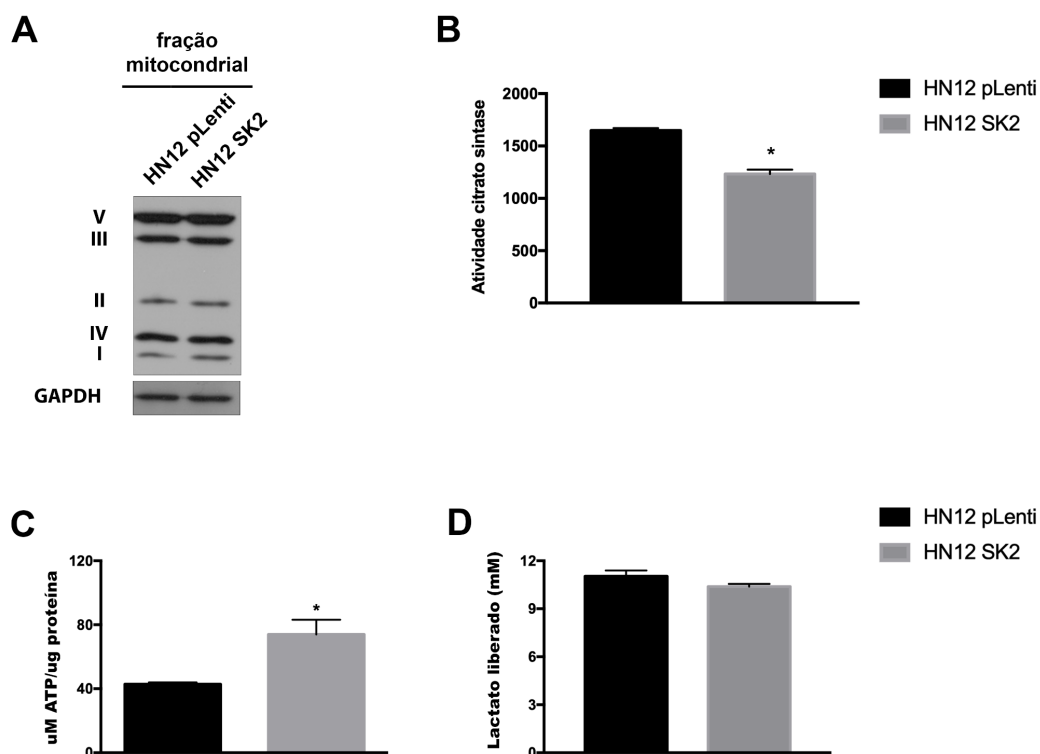


Figura 24. Superexpressão da SK2 aumenta produção de ATP nas células HN12. (A) Análise por WB dos níveis dos complexos mitocondriais da OXPHOS nas frações enriquecidas com mitocôndria das células HN12 pLenti e HN12 SK2. GAPDH foi usado como controle do carregamento. (B) Análise da atividade de citrato sintase nas células HN12 pLenti e HN12 SK2 usando 8 µg de proteína total. A dosagem de ATP (C) foi feita utilizando o ensaio de bioluminescência (Sigma Aldrich) e a liberação de lactato (D) para o meio celular foi lida no comprimento de onda de 340nm. Os valores apresentados nos gráficos são média ± desvio padrão da % da área ocupada pelas colônias. As diferenças estatísticas são indicadas como * $p < 0,05$ (calculado usando teste t não pareado).

4.3 Estudo do efeito da superexpressão e knockdown da SK2 em queratinócitos orais não tumorais

4.3.1 Obtenção da linhagem de queratinócito oral não-tumoral com superexpressão e knockdown de SK2

Para estudar o efeito do aumento e da redução nos níveis de SK2 em queratinócito não-tumoral (NOK-SI) foi feita a superexpressão e o knockdown da proteína SK2 na linhagem NOK-SI (queratinócito oral não tumoral imortalizado espontaneamente). A transdução foi feita utilizando o mesmo vetor pLenti6.3-SK2/V5 (NOK SK2) utilizado na linhagem HN12, e as células NOK-SI 'controle negativo' contem o mesmo vetor vazio (NOK pLenti) usado na HN12. Para o silenciamento de RNA, utilizamos a mesma sequência shRNA *sh1* para SK2 (nomeada como NOK shSK2) já avaliada e utilizada na linhagem HN13, e as células NOK-SI 'controle negativo' contem o vetor TRC1 (NOK TRC1). Inicialmente, a superexpressão do RNAm SK2 foi confirmada por qRT-PCR e o aumento nos níveis da proteína SK2 foi validada por Western blotting usando o lisado celular total (Figura 25A). Como a SK2 pode ser encontrada no citoplasma, mitocôndria e núcleo, a distribuição da proteína na célula foi avaliada por western blot usando a estratégia de extração de proteínas por fracionamento subcelular. O resultado do WB revelou que na superexpressão da SK2 há aumento nos níveis da proteína em todas as frações, quando comparado com as células controle (Figura 25B). A confirmação do knockdown de SK2 na NOK shSK2 foi realizado somente por qRT-PCR, uma vez que os níveis endógenos da proteína SK2 eram detectados em baixo nível por WB (Figura 25A).

Analisamos também os níveis de RNAm de *SK1* e *S1PR1* nas células NOK SK2, NOK shSK2 e respectivos controles negativos. Os níveis do S1PR1 aumentaram nas células com superexpressão de SK2 e reduziu nas células shSK2 enquanto a alteração em SK1 não foi significativa (Figura 25C-D). Estes dados sugerem que há uma relação positiva entre SK2 e expressão de S1PR1.

Além disso, durante o processo de seleção das células, observamos mudança fenotípica da linhagem NOK SK2 em cultura, passando de uma morfologia arredondada (típica de queratinócito) para uma forma mais alongada (Figura 25E).

Essa observação sugeriu que o aumento da SK2, mas não a redução, já que as células NOK shSK2 não alteraram de morfologia, pode levar à transformação epitelial-mesenquimal da linhagem de queratinócito oral não-tumoral.

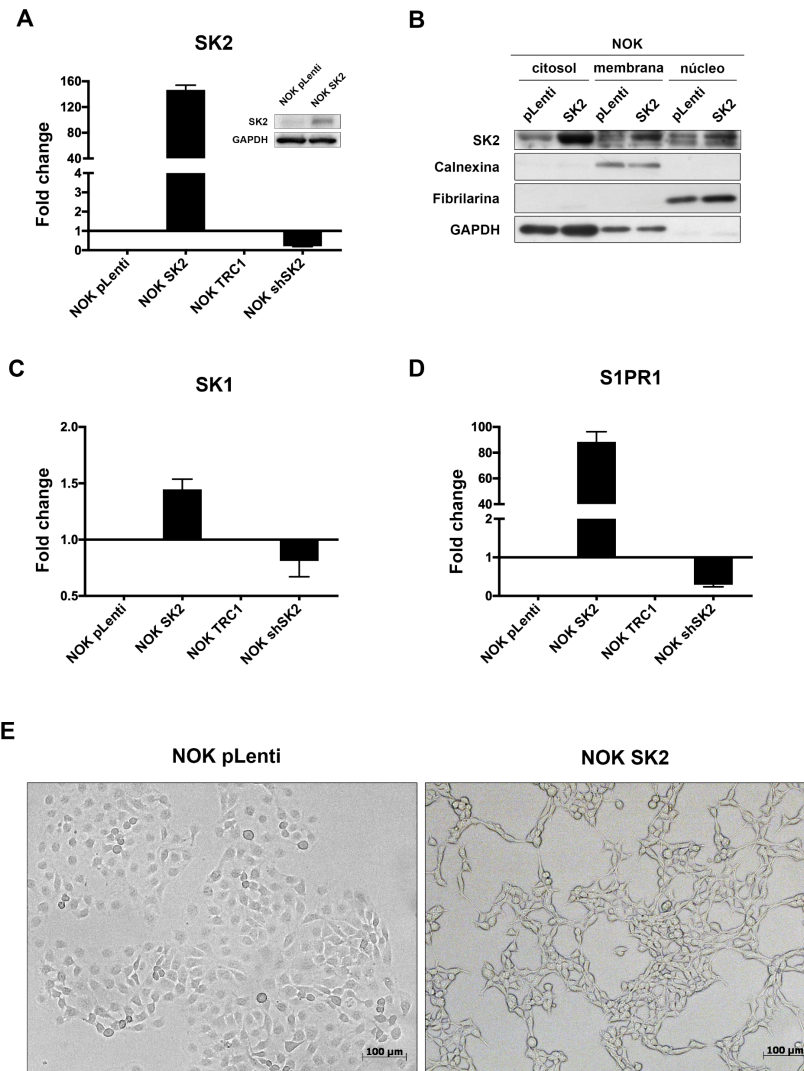


Figura 25. Confirmação da superexpressão e knockdown da SK2 na linhagem NOK-SI. Na superexpressão, as células NOK-SI contendo cDNA com a sequência da SK2 (NOK SK2) e com o vetor vazio (NOK pLenti) foram selecionadas com blasticidina. No knockdown, a linhagem NOK contendo as sequências de shRNA para SK2 (*sh1*; NOK shSK2) e com shRNA controle negativo (TRC1) foram selecionadas com puomicina. (A) A confirmação da superexpressão e do silenciamento de RNA de SK2 foi realizada por qRT-PCR nas células NOK SK2, NOK shSK2 e respectivos controles negativos e a superexpressão da proteína SK2 foi validada por WB usando proteína total extraída das células NOK-SK2 e NOK pLenti. β -tubulina usada como controle do carregamento de proteínas no gel. (B) Análise por WB dos níveis da proteína SK2 nas frações subcelulares das linhagens HN12 pLenti e HN12 SK2. Calnexina, Fibrilarina e GAPDH foram usadas como controle de subfracionamento celular e carregamento de proteínas no gel. Os níveis de RNAm de SK1 (C) e S1PR1 (D) foram quantificados por qRT-PCR. Os respectivos controles (pLenti e TCR1) foram usados como referência no cálculo de expressão relativa de RNAm. Os dados foram apresentados como *fold change* da NOK SK2 ou NOK shSK2 vs. respectivo controle negativo. Imagem obtida por microscopia de campo claro em contraste de fase (E). As barras de escala indicam 100 μ m.

4.3.2 Efeito da superexpressão e knockdown da SK2 na proliferação e transformação na linhagem celular de queratinócito não-tumoral NOK

Analisamos por WB proteínas que foram alteradas nas linhagens de CECP com superexpressão e knockdown da SK2. Nos resultados da NOK SK2 foi obtido um perfil similar de proteínas alteradas na HN12 SK2. Houve aumento de p-Akt, p-GSK3 β e ERK total, e redução de p-ERK, p-STAT3 e p21 (Figura 26A). No entanto, o knockdown da SK2 na NOK não promoveu alteração nos níveis dessas proteínas de maneira oposta (Figura 26A). Além disso, a superexpressão de SK2 na NOK, aumentou os níveis de p53 total e do oncogene c-Myc nessas células (Figura 26B); e reduziu a acetilação da lisina 12 (K12) da histona H4 (Figura 26C). Esses resultados revelam que o aumento da SK2 tem proteínas alvo comuns em ambas as linhagens tumoral (HN12) e não-tumoral (NOK), e reforçam as evidências de que estas proteínas e vias sejam de fato reguladas pela SK2.

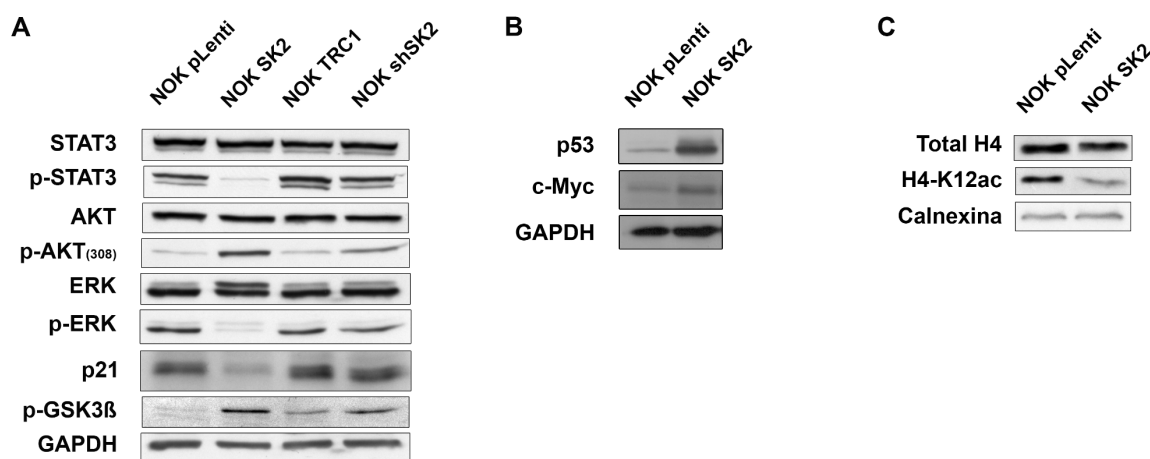


Figura 26. Superexpressão da SK2 aumenta sinalização de proteínas relacionadas à proliferação e reduz acetilação de histone H4 nas células NOK-SI. Análise por WB dos níveis de as Akt, p-Akt (Lys308), ERK, p- ERK, STAT3, p-STAT3, p21, p-GSK3 β (A), p53, c-Myc (B), histona H4 total e acetilada em K12 (C). GAPDH e calnexina foram usados como controle de carregamento.

Devido ao aumento de p-Akt e redução de p21, avaliamos a distribuição das células NOK pLenti e NOK SK2 nas fases do ciclo celular após 4 h, 12 h e 24 h por análise de citometria usando marcação por iodeto de propídeo (PI). O nocodazol, inibidor da formação de microtúbulos, foi utilizado para sincronizar as células em G2/M (BLAJESKI; PHAN; KOTTKE; KAUFMANN, 2002). No entanto, as células NOK SK2

sincronizaram em G1, indicando que estas células estão com alteração no checkpoint da formação de microtubulos de G2/M. Após 4 h de estímulo para entrada início do ciclo e retirada de nocodazol, aproximadamente 55% das células NOK pLenti passaram de G2/M para G1 (Figura 27A), enquanto aproximadamente 65% das células NOK SK2, avançaram de G1 para G2/M (Figura 27B). Após 12 h, houve aumento das células NOK SK2 em S e G2/M, indicando que estas células já estavam ciclando novamente (Figura 27B), enquanto as células NOK pLenti ainda estavam em G0/G1 e S, sugerindo que a NOK SK2 tem uma ciclagem muito mais rápida do que a NOK pLENTI (>24 h) (Figura 27A). Esses resultados indicam que a superexpressão da SK2 nas células não-tumorais NOK-SI aumenta de forma significativa a proliferação e as células perderam a checagem da fase G2/M.

Outro experimento que fizemos para confirmar que células estão proliferando mais, foi a marcação da proteína Ki67, um marcador de proliferação, por imunocitoquímica. Hove marcação intensa de Ki67 em todas células com superexpressão de SK2, enquanto as células controle possuem marcação mais fraca ou são negativas para Ki67 (Figura 27C). Estes resultados reforças o aumento de proliferação nas células NOK SK2 em relação as células controle.

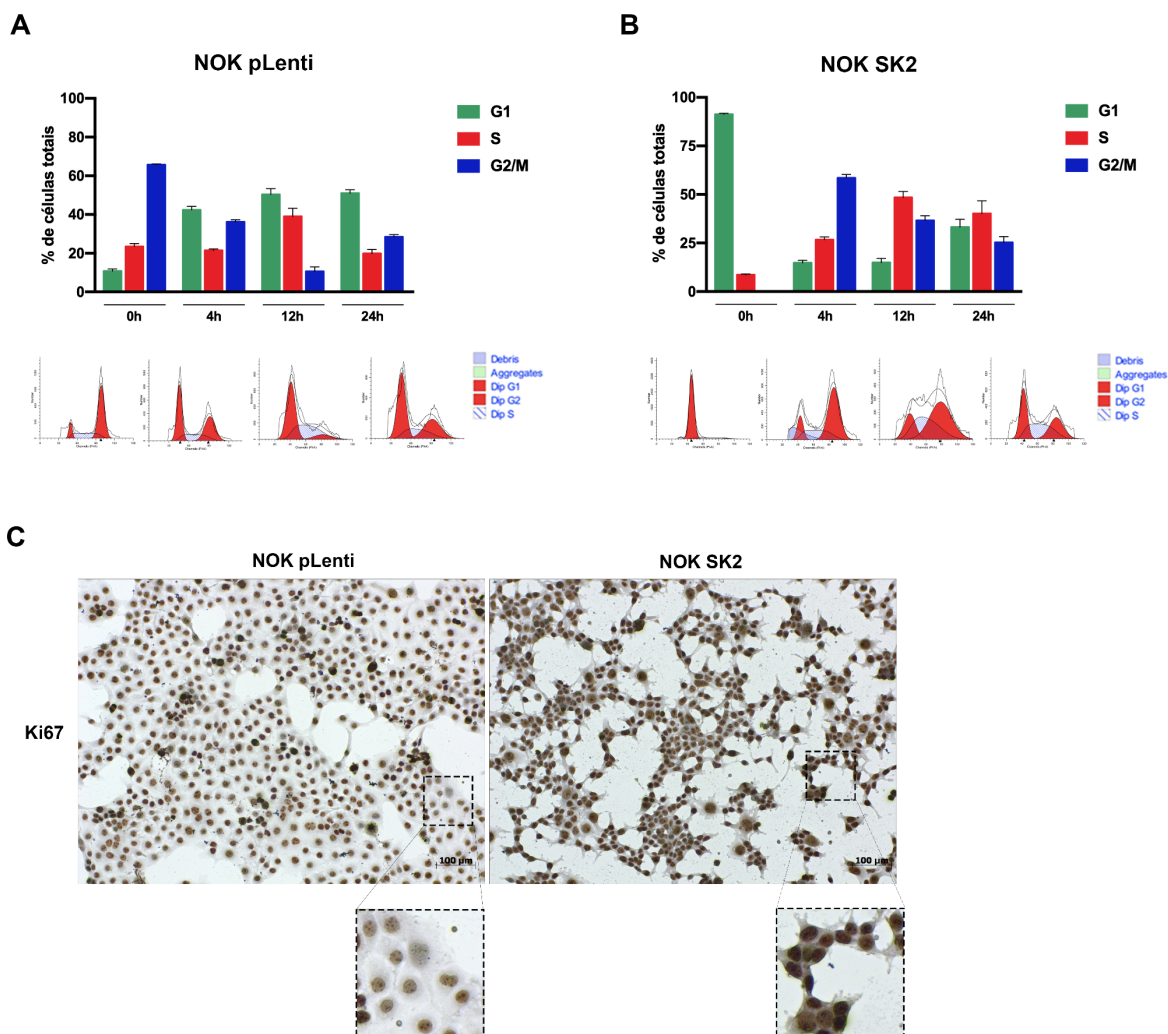


Figura 27. Superexpressão da SK2 nas células NOK leva a perda de checagem na fase G2/M do ciclo e aumenta a proliferação. Análise das subpopulações de células NOK pLenti e NOK SK2 nas diferentes fases do ciclo celular por citometria de fluxo após 4, 12 e 24 horas de estímulo. As células foram incubadas com nocodazol por 24 horas para sincronização e depois estimuladas com meio completo para ciclagem. As células NOK pLenti (A) e NOK SK2 (B) foram coradas com PI e analisadas por citometria de fluxo. (C) Análise por imunocitoquímica dos níveis da proteína Ki67 nas células NOK SK2 e NOK pLenti. Zoom em aumento de 25X do tamanho original da imagem. Os valores mostrados são média±SD.

Além disso, como observamos a mudança fenotípica das células NOK SK2 em cultura, analisamos os níveis de proteínas relacionadas com a transição epitélio-mesenquima (TEM). Por Western blotting identificamos que as células NOK SK2 tiveram redução no nível de E-caderina e aumento de vimentina e Snail, o que confirma a TEM e está de acordo com o fenótipo e morfologia observado em cultura (Figura 28A). O aumento de vimentina e redução de E-caderina nas células NOK SK2 foi confirmado por imunofluorescência e microscopia confocal (Figura 28B).

Nas células NOK shSK2 verificamos aumento de E-caderina, mas não foi possível avaliar vimentina, já que a NOK-SI não expressa a proteína vimentina (Figura 28A).

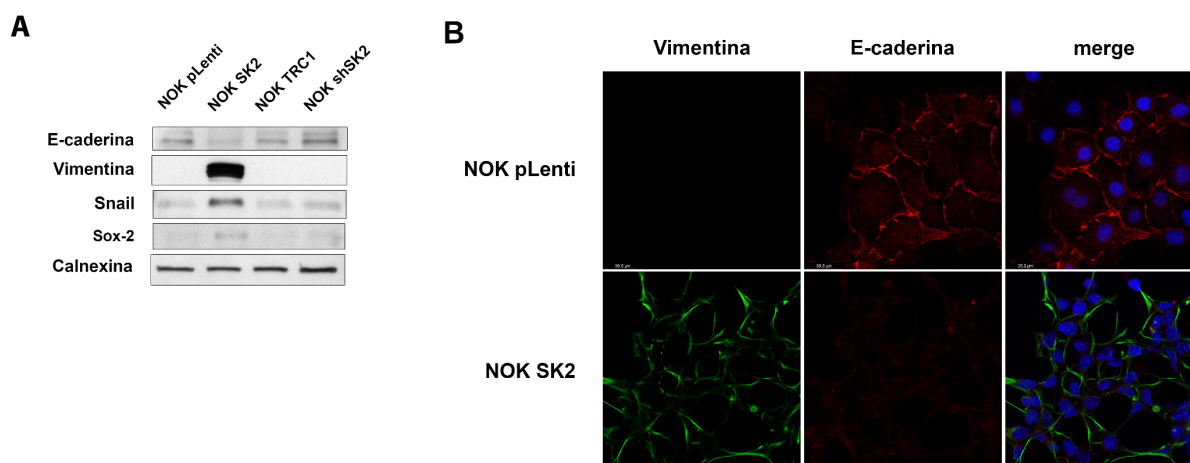


Figura 28. Superexpressão da SK2 na linhagem NOK-SI induz a transição epitélio-mesenquimal. (A) Análise por WB dos níveis de E-caderina, vimentina, Sox-2 e Snail. Calnexina foi usada como controle de carregamento. (B) Análise por IF e microscopia confocal dos níveis de vimentina (verde) e E-caderina (vermelho). Núcleo foi marcado com DAPI (azul).

Visto que a superexpressão de SK2 levou ao aumento dos níveis de vimentina e redução de E-caderina, avaliamos o potencial migratório destas linhagens utilizando o sistema *transwell* em placa de 24 poços. Apesar do fenótipo mesenquimal e aumento de vimentina nas células NOK SK2, as células não tiveram aumento no potencial de migração quando comparadas as células NOK pLenti, pelo contrário migraram menos (Figura 29A). Já a linhagem NOK shSK2 apresentou menor potencial de migração comparado com a linhagem controle NOK TRC1 (Figura 29A), coerente com o aumento de E-caderina.

Para investigar melhor o comportamento das células NOK SK2 quanto a migração e invasão, avaliamos a atividade das metaloproteinases 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9) usando a técnica de zimografia. Pelo zimograma vimos que a atividade das MMPs foi reduzida na célula NOK SK2 comparada à controle, o que consequentemente, reduz o potencial de migração e invasão (Figura 29B). Por RNA-Seq nós confirmamos que, além da redução da atividade, os níveis de RNAm de MMP-2 e MMP-9 estavam reduzidos nas células NOK SK2 em comparação a NOK pLenti (Figura 29C).

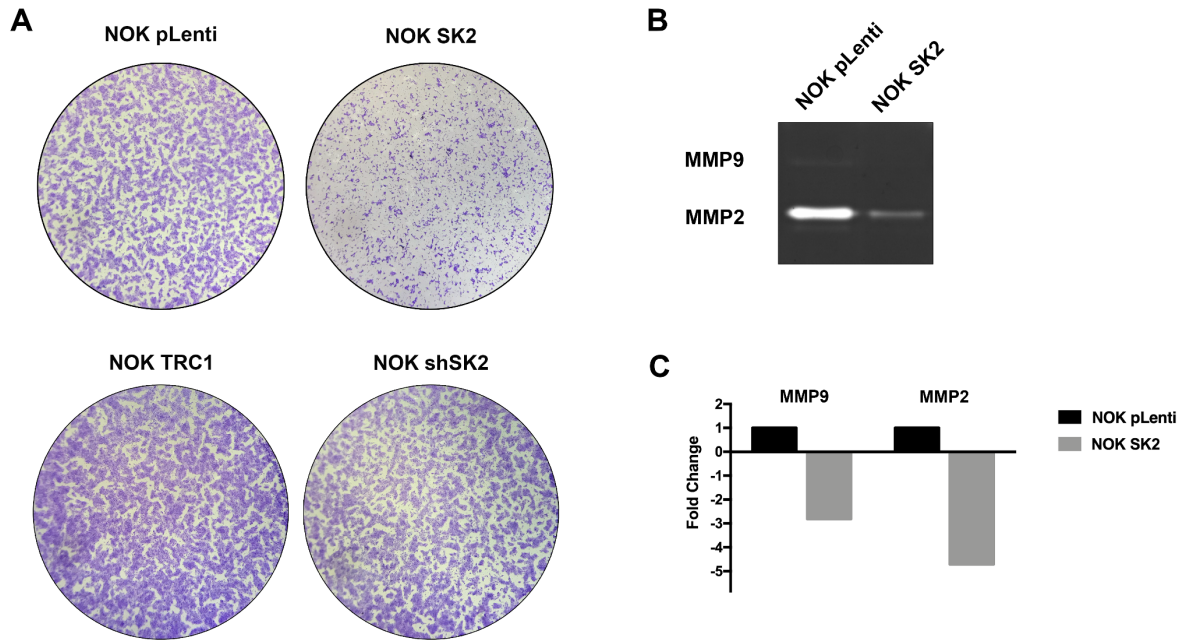


Figura 29. Superexpressão de SK2 reduz potencial migratório em linhagem de queratinócito não-tumoral NOK-SI. (A) No ensaio de migração, as células foram plaqueadas em transwell contendo meio de cultura sem soro e na parte inferior, foi adicionado meio com sorofetal bovino (10%). Após 24h, as células que migraram foram fixadas e coradas com cristal violeta e as imagens foram obtidas em microscópio óptico no aumento de 2x. (B) Ensaio de zimografia para análise da atividade das MMP2 e MMP9 utilizando os sobrenadantes das células NOK pLenti e NOK SK2 coletados após 24 horas de cultura. (C) Análise por RNA-seq da expressão de RNAm de *MMP2* e *MMP9* nas células NOK pLenti e NOK SK2.

Visto que as células NOK SK2 tinham morfologia mesenquimal, mas não comportamento invasivo, analisamos marcadores de células tronco tumorais em câncer oral, ALDH1 e CD44, por citometria de fluxo. A linhagem de queratinócito NOK-SI já tem alta expressão de CD44 (SOBRAL; COLETTA; ALBERICI; CURTI *et al.*, 2017), por isso 21,43% de células controle NOK pLenti são CD44 positivas, 70,83% são CD44+/ALDH+, porém quase não há células ALDH+ (0,67%) (Figura 30A). A superexpressão de SK2 na NOK reduziu a porcentagem de células CD44 positivas para aproximadamente 2,35% e duplo positivas (CD44+/ALDH+) para 53,74%, porém aumentou para 26,82% as células NOK SK2 ALDH+ (Figura 30B).

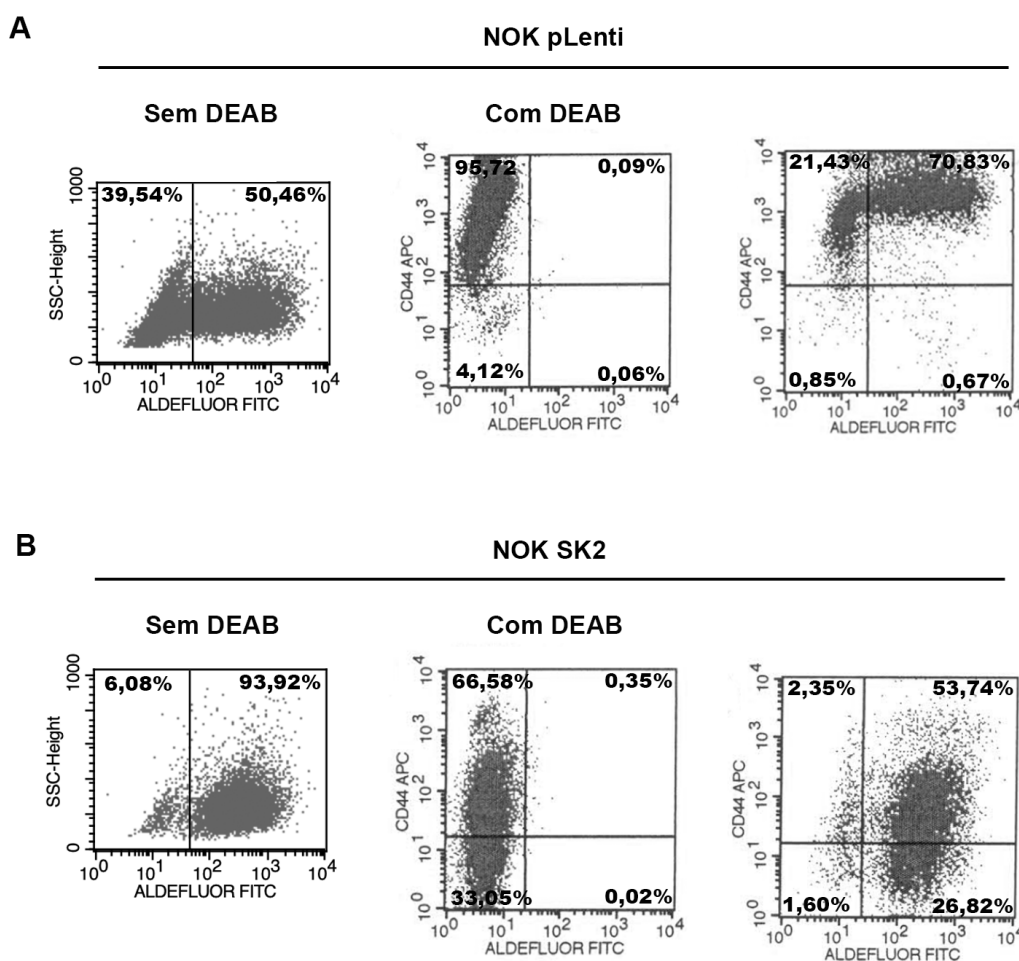


Figura 30. Superexpressão da SK2 nas células NOK-SI reduz a subpopulação de células CD44+ e CD44+/ALDH1^{hi} e aumenta a subpopulação com atividade de ALDH1^{hi}. Análise por citometria de fluxo das células NOK pLenti (A) e NOK SK2 (B) marcadas para CD44 e com atividade de ALDH1. Um controle negativo do ensaio de atividade de ALDH1 foi utilizado, DEAB.

Visto que as células NOK SK2 mudaram de perfil epitelial para mesenquimal e a presença de subpopulações com características de célula tronco tumoral, avaliamos a capacidade delas formarem esferas em cultura usando placas de ultrabaixa adesão. Após uma semana em cultura, as células NOK com superexpressão de SK2 foram capazes de formar maior número de esferas e de tamanhos maiores, do tipo holoesferas, do que a NOK pLenti (Figura 31A), confirmando assim que as células NOK SK2 têm uma maior subpopulação de células com características de célula tronco tumoral. Curiosamente, quando transferimos as esferas formadas para placa de cultura de células aderentes, após quatro dias, a NOK SK2 foi capaz de reverter o processo de perda de adesão e adquiriu novamente habilidade de aderir e proliferar enquanto a NOK pLenti não aderiu nem sobreviveu na condição de adesão (Figura

31B). Estes dados mostram pela primeira vez que a superexpressão da SK2 na NOK não só transforma o queratinócito oral não tumoral, mas tem um papel significativo de plasticidade e sobrevivência característicos de células tumorais com alta agressividade.

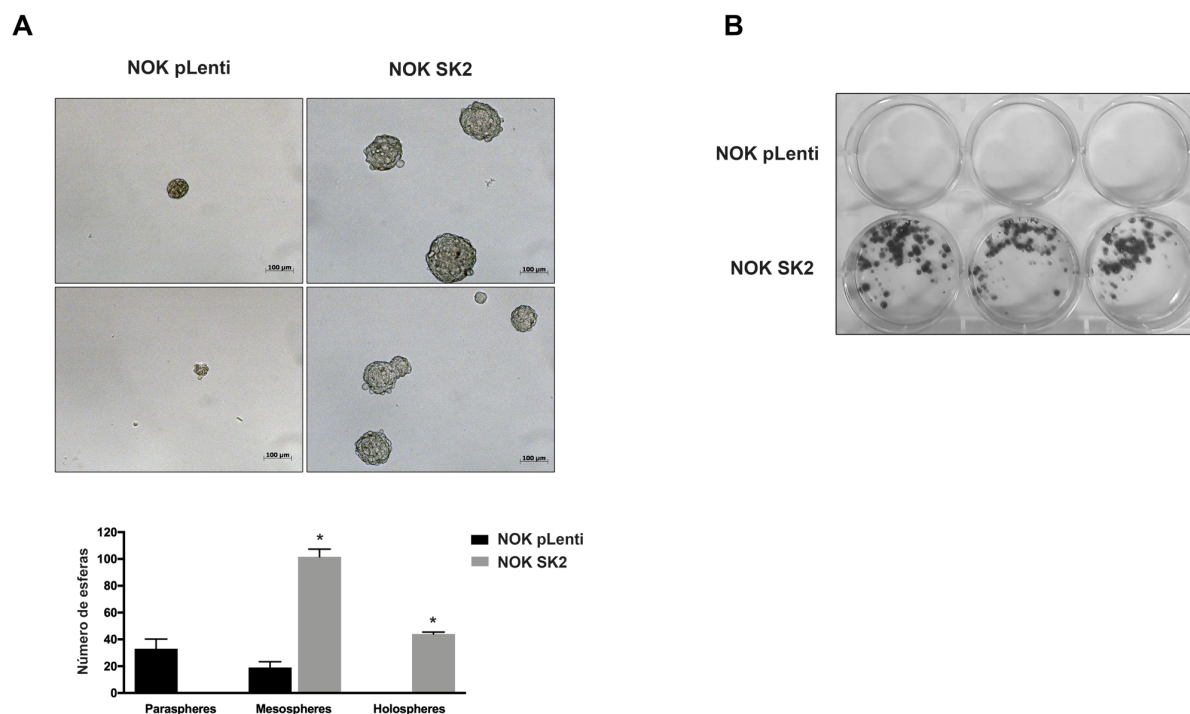


Figura 31. Superexpressão da SK2 nas células NOK-SI aumenta a capacidade de formação de esferas. (A) As células NOK SK2 e NOK pLenti foram plaqueadas em placa de 6 poços de ultra-baixa adesão e mantidas em meio de cultura completo durante 7 dias. As esferas foram analisadas em microscópio de campo claro e contadas de acordo com a classificação em holo-esferas, meso-esferas e para-esferas. (B) As esferas de NOK SK2 e NOK pLENTI foram transferidas para placa aderente e mantidas em cultura por 4 dias. A seguir, as esferas/células aderidas e viáveis foram coradas com cristal violeta e as imagens adquiridas em fotodocumentador. Conforme mostrado, as esferas de NOK SK2 tinham células/esferas aderidas e viáveis enquanto para as NOK pLENTI não foi observado qualquer célula aderida na placa. Os valores apresentados nos gráficos são média±SD do número de esferas segundo o tipo observado. As diferenças estatísticas são indicadas como * $p < 0,05$ (calculado usando teste t não pareado).

Sabe-se que a perda da função do fator de transcrição p53 está associado ao desenvolvimento e progressão do câncer (WILLIAMS; SCHUMACHER, 2016). Como nossos resultados mostraram que as células NOK SK2 tiveram aumento dos níveis proteicos de p53, decidimos analisar como estaria a atividade de P53 nas linhagens NOK. O ensaio funcional de atividade de transcrição de p53 mostrou que apesar da NOK SK2 ter maior nível proteico de p53, a atividade transcricional deste está

reduzida nestas células quando comparamos com a NOK pLenti (Figura 32A). Curiosamente, quando analisamos as células HN13 com knockdown de SK2, que teve redução dos níveis de p53 por Western blotting, houve aumento da atividade transcricional de p53 (Figura 32A). Estes resultados sugerem que a SK2 regula, não só os níveis de p53, mas a atividade transcricional da proteína p53.

Visto que houve redução da atividade transcricional de p53 e redução nos níveis proteicos de p21 nas células NOK SK2, o próximo passo foi analisar se a proteína p53 estaria ligando ou não ao promotor de p21 usando a técnica de imunoprecipitação da cromatina (ChIP-PCR). Interessantemente, as células com superexpressão de SK2 apresentaram maior ligação de p53 ao promotor de p21, comparado com as células NOK pLenti (Figura 32B). Por fim, para definir se a regulação ocorria em termos de expressão gênica, buscamos nos dados de RNA-seq os níveis de p21 e confirmamos que as células NOK SK2 têm redução de RNA de p21/CDKN1A (Figura 32C).

Como p53 pode atuar na resposta a danos no DNA, investigamos os níveis de gama-H2AX, um marcador de danos do DNA/reparo, nas células NOK SK2 e NOK pLenti por imunofluorescência (BRYANT; SCHULTZ; THOMAS; PARKER *et al.*, 2005). A análise por microscopia confocal mostrou maior intensidade de marcação nuclear para γ -H2AX nas células NOK pLenti do que na NOK SK2 (Figura 32D).

P53 pode ter outras ações nas células, tais como regulação da autofagia, como mostrado em trabalho prévio sobre a S1P e P53 (LIMA; TAKABE; LEOPOLDINO; NEWTON *et al.*, 2017), e na senescência (RUFINI; TUCCI; CELARDO; MELINO, 2013), assim como tem sido proposto para os esfingolipídios (TRAYSSAC; HANNUN; OBEID, 2018). Desta forma, decidimos avaliar o perfil de senescência nas células NOK SK2 utilizando o ensaio de β -galactosidase associada a senescência ou *lysosomal hydrolase β -galactosidase*. O resultado mostrou uma quantidade maior de células senescentes na linhagem NOK SK2 comparada com as células NOK pLenti (Figura 32E). Isto sugere que o aumento de senescência nas células com superexpressão de SK2, pode estar associado ao aumento de p53 que foi acompanhado de estresse mitocondrial e TEM.

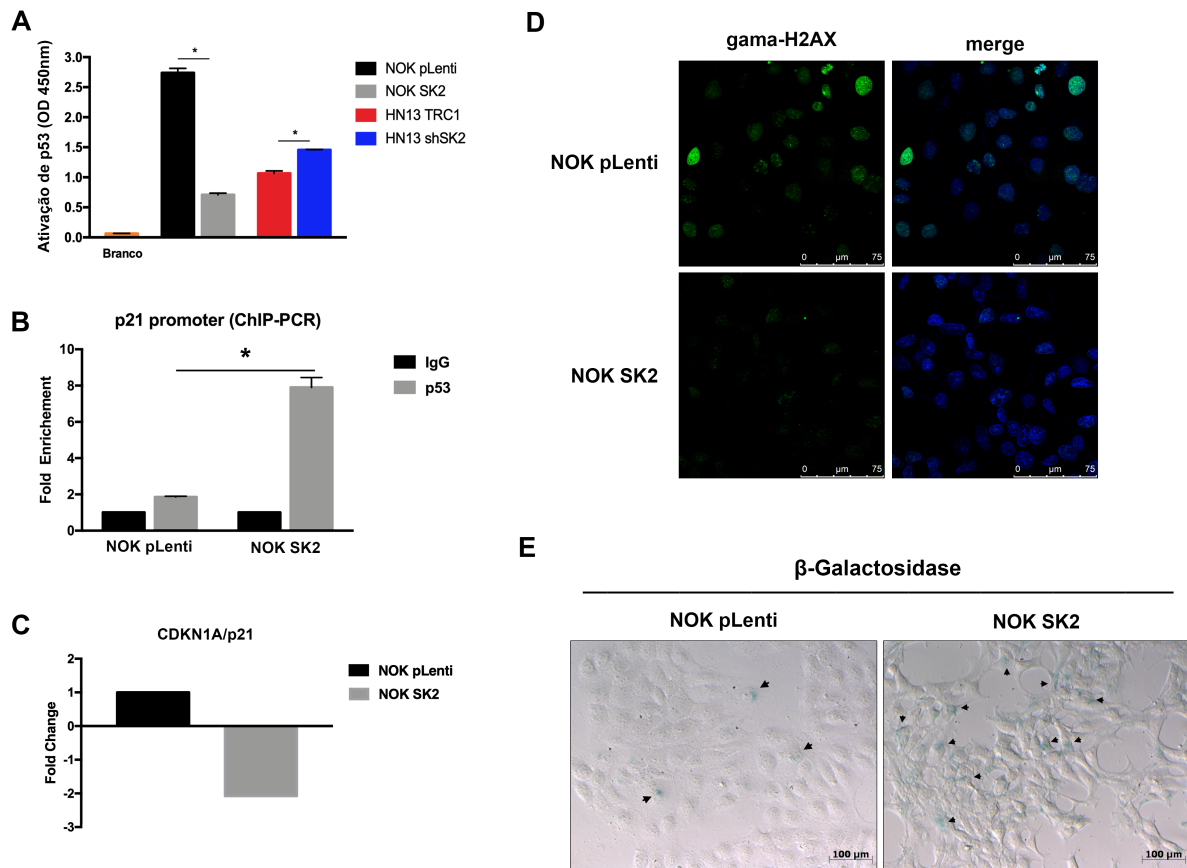


Figura 32. Superexpressão da SK2 reduz atividade de transcrricional de p53 e induz senescência celular em linhagem NOK-SI. (A) Análise da atividade transcrricional de p53 usando 10 μ g de proteína extraída da fração nuclear das linhagens NOK pLenti, NOK SK2, HN13 TRC1 e HN13 shSK2. (B) Análise da interação de p53 com promotor de *P21* por ensaio de ChIP utilizando anti-p53 e qPCR para a região do promotor de *P21*. (C) Nível de expressão de RNAm de p21 obtido por RNA-Seq nas células NOK SK2 e NOK pLenti. Os valores são mostrados como fold change. (D) Análise por imunofluorescência dos níveis de γ -H2AX nas células NOK SK2 e controle (verde). O núcleo foi marcado com DAPI (azul). As imagens foram obtidas por microscopia confocal e as barras de escala indicam 75 μ m. (E) Ensaio de senescência foi realizado utilizando o *Senescence β -Galactosidase Staining Kit*. As setas pretas indicam as células senescentes com marcação azul. Os valores são mostrados como média \pm SD. As diferenças estatísticas são indicadas como * p < 0,05 (calculado usando teste t não-pareado).

Por fim, assim como analisamos nas outras linhagens celulares, avaliamos a distribuição da proteína SET nas frações subcelulares por WB. A superexpressão da SK2 reduziu os níveis de SET na fração mitocondrial das células NOK e aumentou os níveis da isoforma menor da proteína SET no citosol (Figura 33A). Na análise por IF e microscopia confocal, confirmamos que houve a redução da SET no núcleo das células NOK SK2 (Figura 33B). Isso indica que a SK2 regula a localização da proteína SET e induz aumento da isoforma menor.

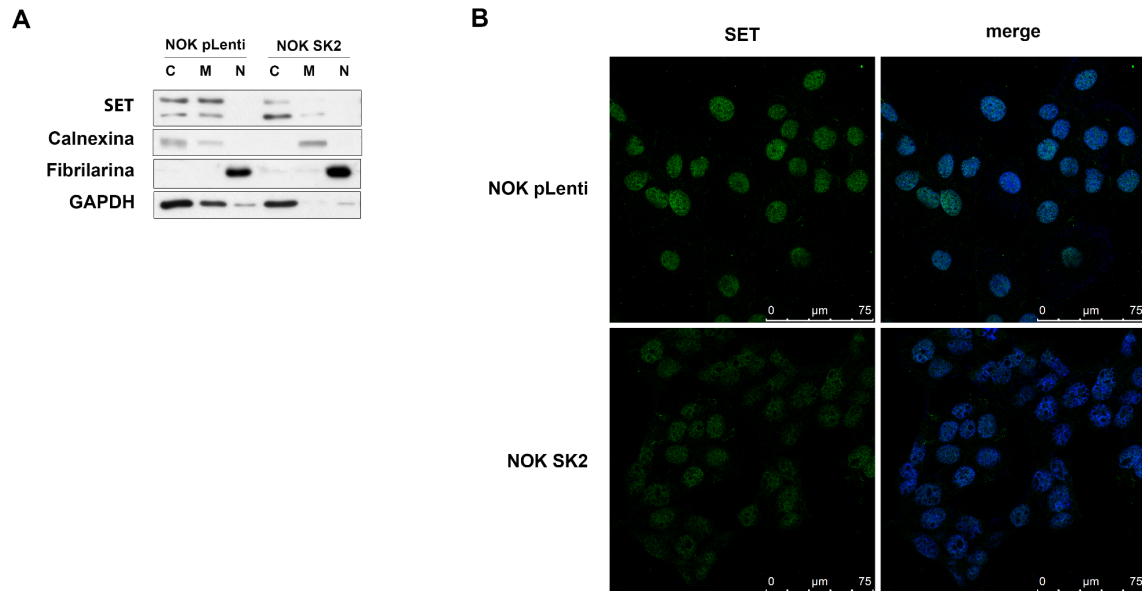


Figura 33. Superexpressão da SK2 em células NOK-SI reduz a proteína SET no núcleo e mitocôndria e aumenta a isoforma 2 da SET no citosol. (A) Análise por WB dos níveis da SET por fracionamento subcelular das células NOK pLenti e NOK SK2. Calnexina, Fibrilarina e GAPDH foram usadas como controle de fracionamento subcelular e de carregamento de proteínas no gel. (B) Análise dos níveis da SET por IF e microscopia confocal (verde). O núcleo foi marcado com DAPI (azul). As barras de escala indicam 75 μm (B).

4.3.3 Investigação do efeito do knockdown e da superexpressão da SK2 no processo de autofagia na linhagem celular de queratinócito não-tumoral NOK-SI

Assim como feito nas outras linhagens, investigamos também o fluxo autofágico nas células não tumorais NOK pLenti e NOK SK2, na presença e ausência de cloroquina durante 4 horas. A NOK SK2 apresentou menores níveis de LC3 basal do que a NOK controle, que acumulou significativamente quando as células foram incubadas com cloroquina, indicando que o fluxo autofágico na NOK SK2 é maior que na célula NOK pLenti (Figura 34A). No knockdown da SK2 na NOK houve um aparente aumento nos níveis de LC3 basal em comparação com a NOK shCT, e o acúmulo na presença da cloroquina foi semelhante ao observado nas células NOK TRC1, sugerindo redução no fluxo autofágico nas células NOK shSK2, o oposto que foi identificado nas células NOK SK2 (Figura 34A). Por imunofluorescência, confirmamos os resultados obtidos por Western blotting, maior fluxo autofágico nas células NOK SK2, e menor nas células NOK shSK2 comparadas com os respectivos controles (Figura 34B-C).

Uma das vias de ativação da autofagia quando há estresse celular é AMPK/ULK1 (KIM; KUNDU; VIOLLET; GUAN, 2011). Nas células NOK SK2 houve aumento de p-AMPK e p-ULK1, as formas ativas das duas proteínas (Figura 34 D).

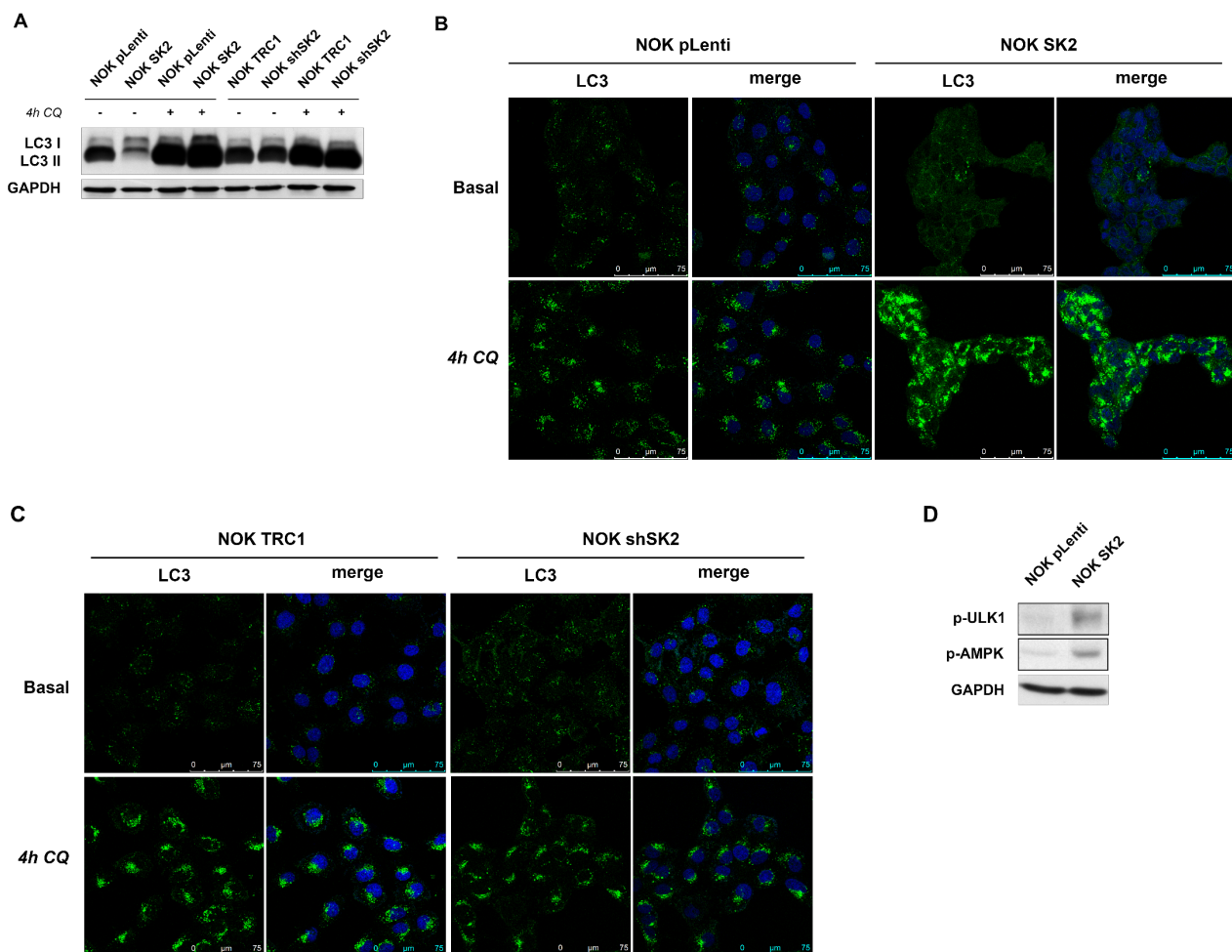


Figura 34. Superexpressão da SK2 nas células NOK-SI aumenta o fluxo autofágico. (A) Análise do fluxo autofágico por WB dos níveis de LC3 I e LC3 II das células tratadas e não tratadas com 20 μ M cloroquina por 4 horas. Análise por IF e microscopia confocal das células NOK pLenti e NOK SK2 (B), NOK TRC1 e NOK shSK2 (C) tratadas com 20 μ M cloroquina por 4 horas marcadas com anti-LC3 (verde). O núcleo foi marcado com DAPI (azul). (D) Análise por WB dos níveis de p-ULK1 e p-AMPK. GAPDH foi usado como controle de carregamento de proteínas no gel.

Em seguida, analisamos por imunofluorescência a massa mitocondrial nessas células usando o probe fluorescente MitoTracker. Nesta análise, vimos aumento de MitoTracker nas células NOK SK2 e redução na NOK shSK2, comparado às células controle (Figura 35A-B).

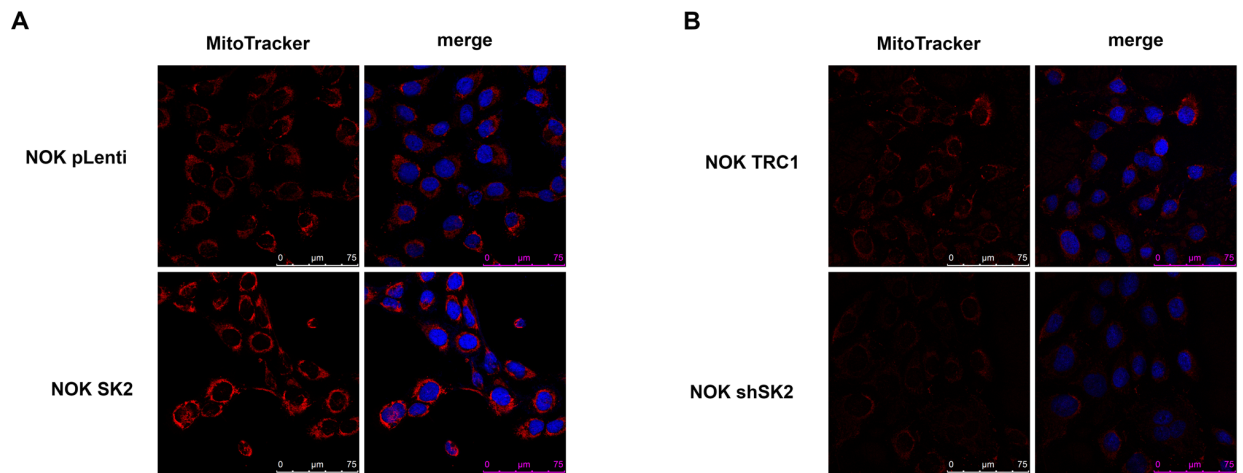


Figura 35. Diferentes níveis de SK2 alteram massa mitocondrial nas células NOK-SI. Análise de imunofluorescência por microscopia confocal das células NOK pLenti e NOK SK2 (A), NOK TRC1 e NOK shSK2 (B) marcadas com Mitotracker (vermelho) e núcleo (DAPI, azul).

Uma vez que a superexpressão da SK2 aumentou a massa mitocondrial das células NOK, investigamos os níveis de p-DRP1 que participa da fissão mitocondrial por IF nas linhagens com superexpressão e knockdown de SK2. Houve aumento dos níveis de p-DRP1 nas células NOK SK2 e redução na NOK shSK2 comparadas com os controles (Figura 36A-B), sugerindo que a SK2 induz o processo de fissão mitocondrial.

Em seguida, avaliamos se haveria colocalização por IF da proteína estrutural mitocondrial (TOM20) e p-DRP1. O resultado confirmou que as células com superexpressão da SK2, além de ter maior intensidade de p-DRP1, apresentam maior colocalização entre TOM20 e p-DRP1 (Figura 36C) do que as controle. Isso indica que há aumento na fissão mitocondrial nas células NOK SK2. O aumento de fissão pode estar refletindo estresse mitocondrial e alteração na respiração celular provocado talvez por aumento de S1P na mitocôndria.

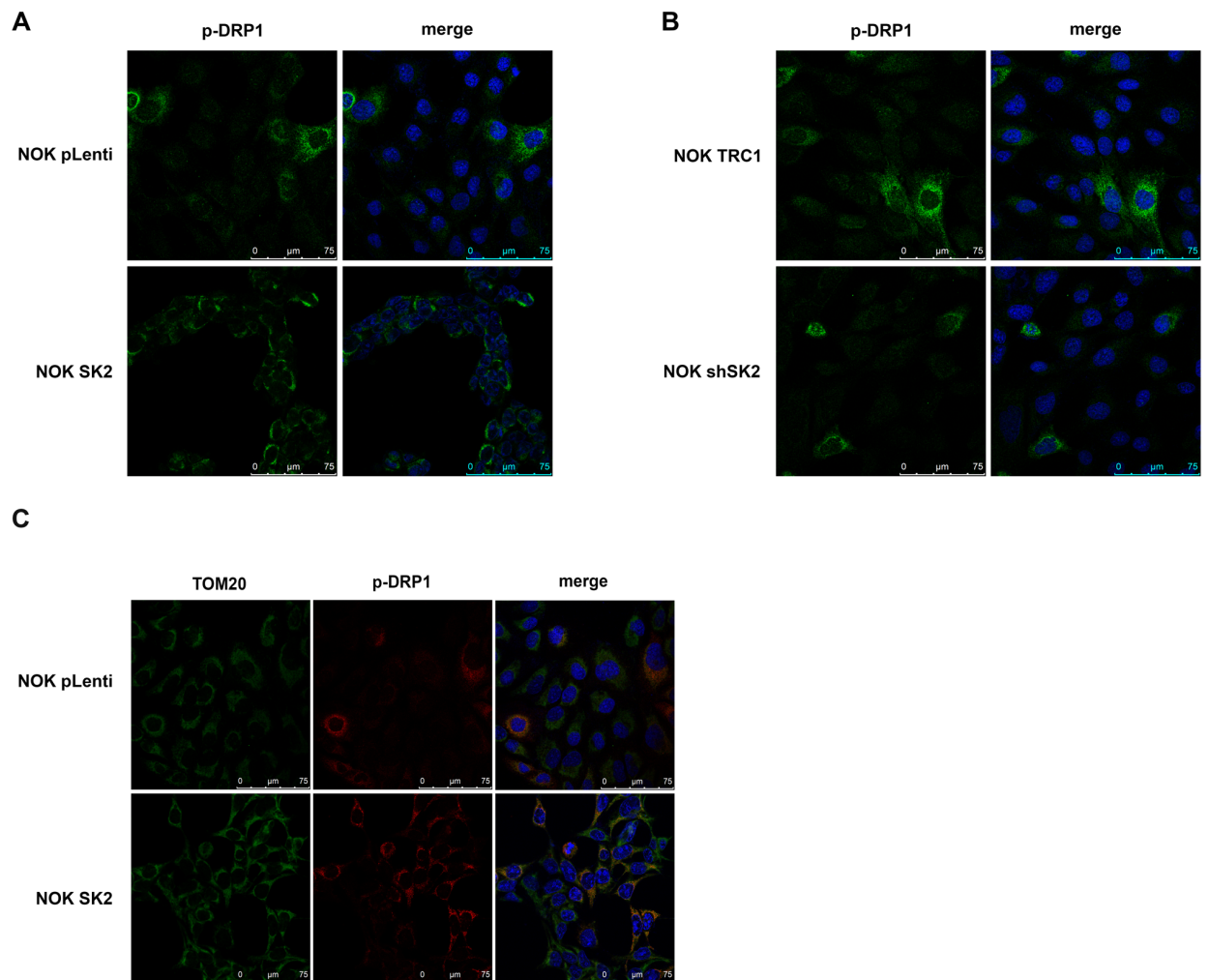
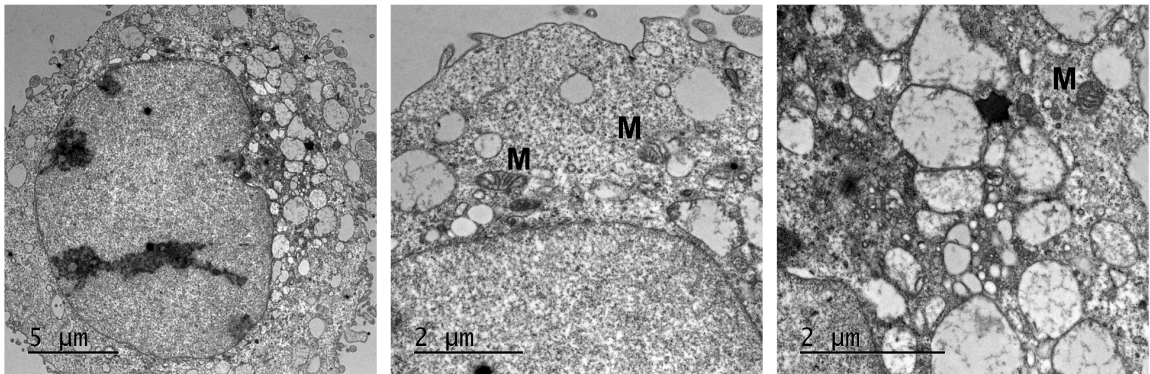


Figura 36. Superexpressão da SK2 induz fissão mitocondrial em células NOK-SI. Análise por IF e microscopia confocal dos níveis de p-DRP1 (verde) nas células NOK pLenti e NOK SK2 (A), NOK TRC1 e NOK shSK2 (B). (C) Análise por IF da colocalização entre TOM20 (verde) e p-DRP1 (vermelho) nas células NOK-SI com superexpressão de SK2. O núcleo foi marcado com DAPI (azul).

Para caracterizar e analisar o perfil das mitocôndrias e autofagossomos nas células NOK, realizamos a microscopia eletrônica de transmissão (MET). As células NOK pLenti apresentaram mitocôndrias intactas (M) (Figura 37A). Já na linhagem celular NOK SK2, observamos rompimento de membrana plasmática com degeneração celular (indicada com seta preta) e a presença de mitocôndrias alteradas (indicadas com asterisco azul) (Figura 37B). Além disso, notamos, duas mitocôndrias em processo de fissão (seta amarela) e nenhuma mitocôndria com morfologia intacta. Assim, podemos sugerir que as células com superexpressão da SK2 possuem danos nas mitocôndrias que potencialmente estão causando a fissão e mitofagia, além disto há danos em membrana plasmática.

A

NOK pLenti



B

NOK SK2

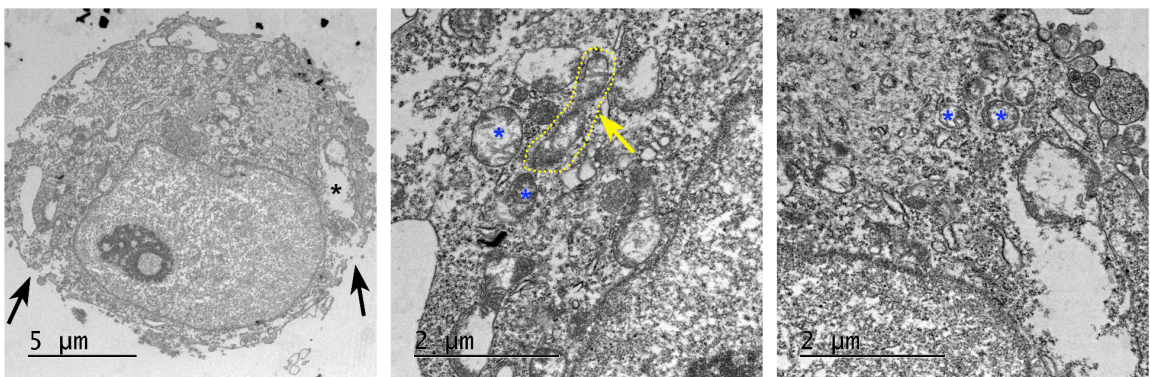


Figura 37. Células NOK-SI com superexpressão da SK2 apresentam alterações estruturais que indicam estresse celular e alterações mitocondriais. As imagens das linhagens NOK pLenti (A) e NOK SK2 (B) foram obtidas por meio de microscopia eletrônica de transmissão. A letra M indica mitocôndrias intactas; setas pretas indicam rompimento da membrana celular; asteriscos pretos indicam espaços no citosol; asteriscos azuis indicam mitocôndrias alteradas e inchadas, com cristas irregulares; seta amarela indica duas mitocôndrias em processo de fissão. Imagens representativas de várias células analisadas.

Já quando comparamos as imagens da MET das células NOK com knockdown da SK2, vimos que nas células controle NOK TRC1 a presença de um autofagossomo (indicado com seta vermelha) e mitocôndrias alteradas (asterisco preto*) (Figura 38A). Enquanto, nas células NOK shSK2, observamos mitocôndrias alongadas (seta preta), mitocôndrias alteradas (asterisco preto), porém sem a presença de autofagossomos (Figura 38B).

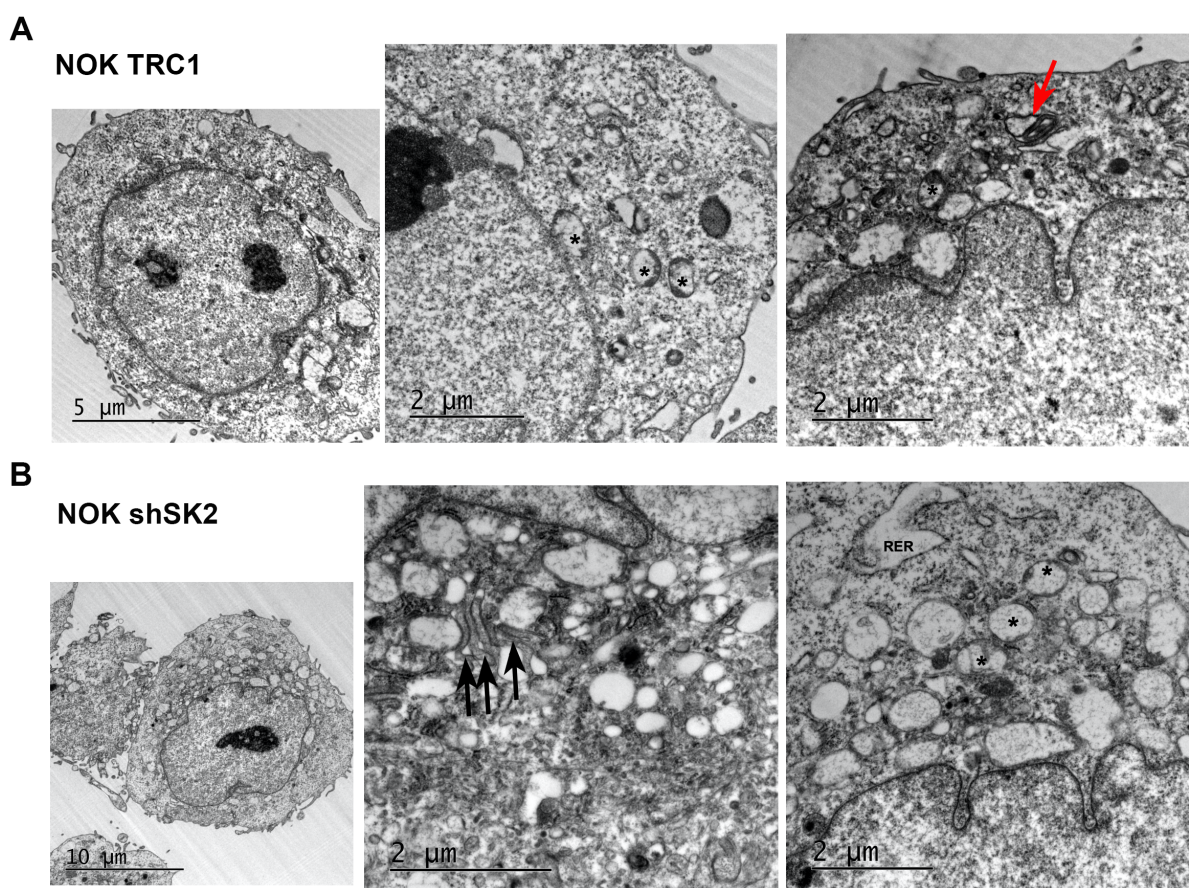


Figura 38. Células NOK-SI com Knockdown da SK2 possuem alterações estruturais como acúmulo de mitocôndrias alongadas e acúmulo de vesículas. As imagens das linhagens NOK TRC1 (A) e NOK shSK2 (B) foram obtidas por meio de Microscopia Eletrônica de Transmissão. Seta vermelha indica presença de autofagossomo; asteriscos pretos indicam mitocôndrias alteradas; setas pretas indicam mitocôndrias alongadas; RER retículo endoplasmático rugoso. Imagens representativas de várias células analisadas.

Como a ubiquitinação participa da regulação de feedback positivo para a indução da autofagia (CHEN; CHEN; HUANG, 2019), avaliamos por western blot o nível de ubiquitinação total nas células NOK SK2 (uma vez que demonstraram ter maior fluxo autofágico) e na tumoral HN12 com superexpressão da SK2. Nas células NOK SK2 a ubiquitinação é maior que nas células controle NOK pLenti, porém quando tratamos as células com cloroquina, para inibir a degradação de proteínas Ub pela autofagia, não houve acúmulo na NOK SK2 (Figura 39A). Esses resultados indicam que na NOK SK2 o mecanismo de degradação de proteínas Ub parece não ser dependente da autofagia.

Devido ao aumento de proteínas ubiquitinadas na NOK SK2, investigamos se estas proteínas marcadas estariam sendo degradadas via proteassoma. Para isso, as

células foram incubadas com o inibidor proteassomal MG132 (5 μ M) por 3h. As células NOK SK2 tratadas com MG132 acumularam mais proteínas ubiquitinadas do que as células controle NOK pLenti (Figura 39B). Além disso, quando marcamos SK2 nestas linhagens, vimos que há acúmulo da proteína SK2 tanto na NOK pLenti quanto na NOK SK2 tratadas com MG132 (Figura 39B). Estes resultados indicam que a superexpressão da SK2 aumenta a ubiquitinação de proteínas que são direcionadas, principalmente, para degradação via proteassoma e que, a própria proteína SK2 endógena quanto a superexpressa são degradadas via proteassoma.

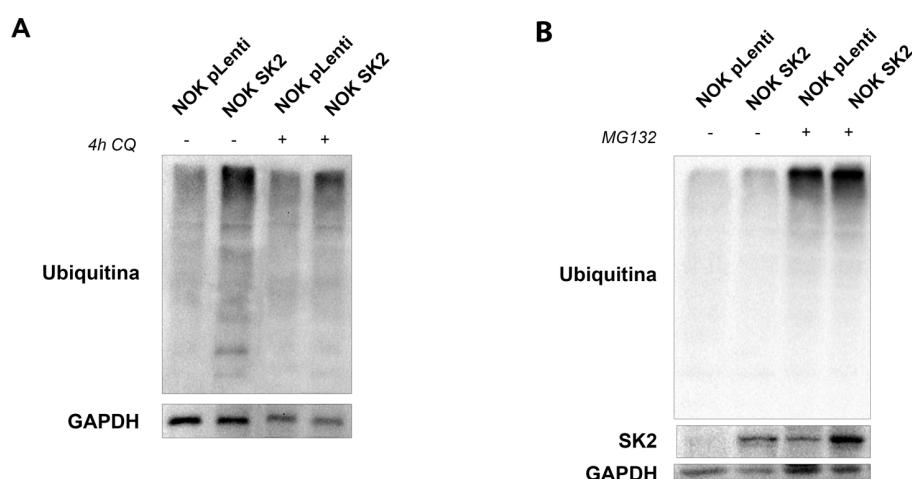


Figura 39. Superexpressão da SK2 aumenta o nível de proteínas ubiquitinadas em células NOK-SI que podem ser degradadas tanto por autofagia quanto por proteassoma. Análise por WB do nível de proteínas ubiquitinadas nas células NOK SK2 e NOK pLENTI tratadas com 20 μ M de cloroquina por 4 horas (A) e com 5 μ M de MG132 por 3 horas (B). GAPDH foi usado como controle de carregamento de proteínas no gel.

Assim como analisamos o metabolismo mitocondrial das células HN12 com superexpressão da SK2, avaliamos os mesmos parâmetros nas células NOK SK2. Nos resultados vimos que o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$ m) das células NOK com superexpressão da SK2, assim como a HN12 SK2, também apresentou redução no potencial de membrana mitocondrial (Figura 40A).

Em seguida, avaliamos a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nestas células após 30 minutos, 1 hora e 2 horas. As células NOK SK2 apresentaram um aumento de EROs em comparação com a NOK pLENTI (Figura 40B). Estes resultados sugerem que, assim como na HN12, a superexpressão da SK2 aumenta a produção de EROS na NOK, promovendo estresse oxidativo nas células.

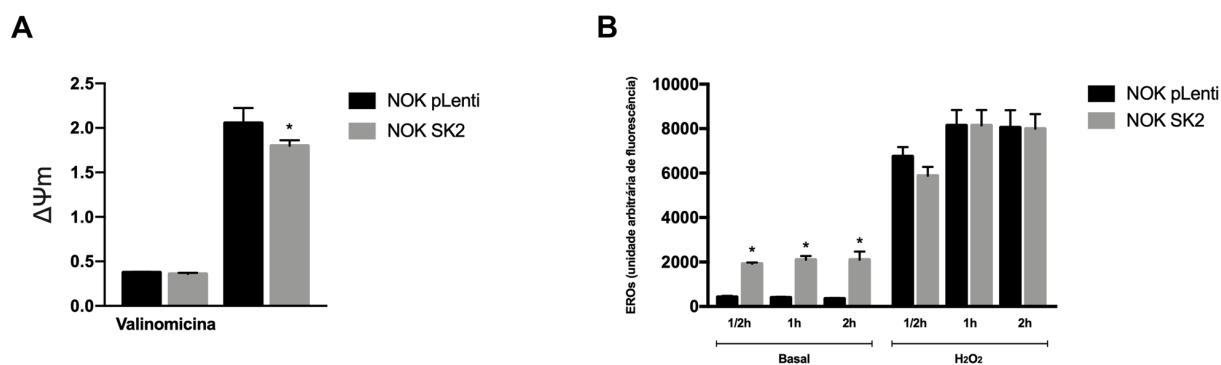


Figura 40. Superexpressão da SK2 nas células NOK-SI reduz o potencial de membrana mitocondrial e aumenta EROs. O potencial de membrana mitocondrial das células foi obtido utilizando o corante JC-1 e a leitura da absorvância foi feita por fluorimetria. A valinomicina (1 μ M) foi usada como desacoplador e controle do experimento. (B) Os níveis de EROs após 30 minutos, 1 hora e 2 horas da adição da sonda CM-H2DCFDA foram obtidos por fluorimetria. As células foram incubadas com H₂O₂ (1 mM) como controle do experimento. Os valores apresentados nos gráficos são média \pm desvio padrão. As diferenças estatísticas são indicadas como * $p < 0,05$ (calculado usando teste t não pareado).

Para caracterizar o efeito da superexpressão de SK2 no metabolismo mitocondrial na NOK, determinamos os níveis dos complexos mitocondriais (I-IV) por western blotting utilizando as frações enriquecidas de mitocôndria da NOK pLenti e NOK SK2. Houve aumento dos níveis de todos os complexos mit (I-V) nas células NOK SK2 (Figura 41A). Quando avaliamos a atividade de citrato sintase nas células NOK, vimos que a superexpressão da SK2 levou ao aumento da atividade da citrato sintase na NOK (Figura 41B). Esses resultados indicam que o aumento da SK2 aumenta o metabolismo mitocondrial na linhagem de queratinócito não-tumoral NOK-SI.

Por fim, verificamos os níveis de ATP (intracelular) e lactato (meio extracelular). O resultado mostrou que as células NOK SK2 apresentaram maiores níveis tanto de ATP quanto de lactato liberado quando comparado com as células controle NOK pLenti (Figura 41C-D).

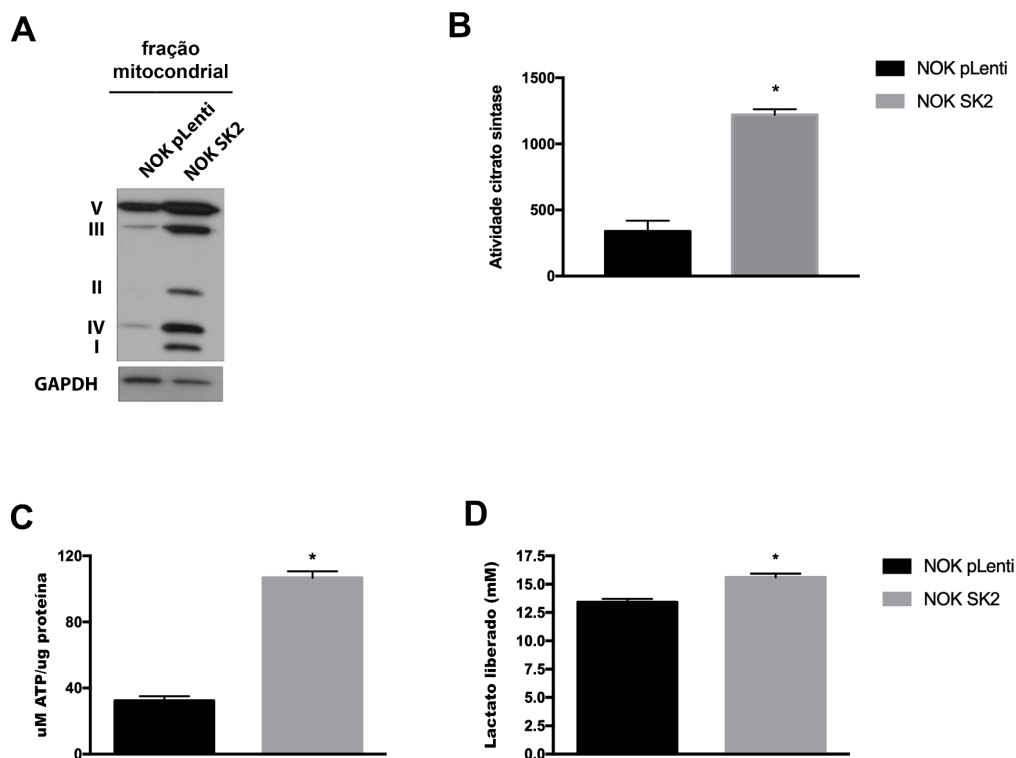


Figura 41. Superexpressão da SK2 aumenta o metabolismo mitocondrial das células NOK-SI. (A) Análise dos níveis dos complexos mitocondriais da OXPHOS nas frações enriquecidas com mitocôndria das células NOK pLenti e NOK SK2 por WB. GAPDH foi usado como controle do carregamento. (B) Análise da atividade de citrato sintase nas células NOK pLenti e NOK SK2. A dosagem de ATP (C) foi realizada por ensaio de bioluminescência e a dosagem de lactato (D) no meio de cultura. Os valores apresentados nos gráficos são média \pm desvio padrão. As diferenças estatísticas são indicadas como * $p < 0,05$ (calculado usando teste t não pareado).

4.4 Efeito da superexpressão de SK2 na tumorigênese das células NOK-SI e HN12

Visto que a HN12 é uma linhagem tumoral metastática de linfonodo (com sítio primário do tumor na língua), e que a superexpressão de SK2 aumentou os níveis de p-Akt e c-myc, nós avaliamos o efeito da SK2 na formação tumoral usando o modelo *in vivo* de tumores xenoenxerto em camundongo Balb/c nude. As células foram transplantadas subcutaneamente nos dois lados do dorso dos camundongos e após 9 dias, foi possível visualizar uma massa celular formada. Os tumores foram medidos 3 vezes por semana com o auxílio de um paquímetro digital, e após 22 dias os animais foram eutanasiados (Figura 42A). Os tumores formados por HN12 SK2 apresentaram maior volume do que no grupo controle HN12 pLenti (Figura 42B), e maior peso (Figura 42C). Cabe ressaltar que, ao coletarmos os tumores, observamos macroscopicamente que os do grupo HN12 SK2 eram mais irrigados e com acúmulo

de líquido do que os do grupo controle HN12 pLenti. Os tumores coletados foram separados metade para análise histológica e metade para molecular.

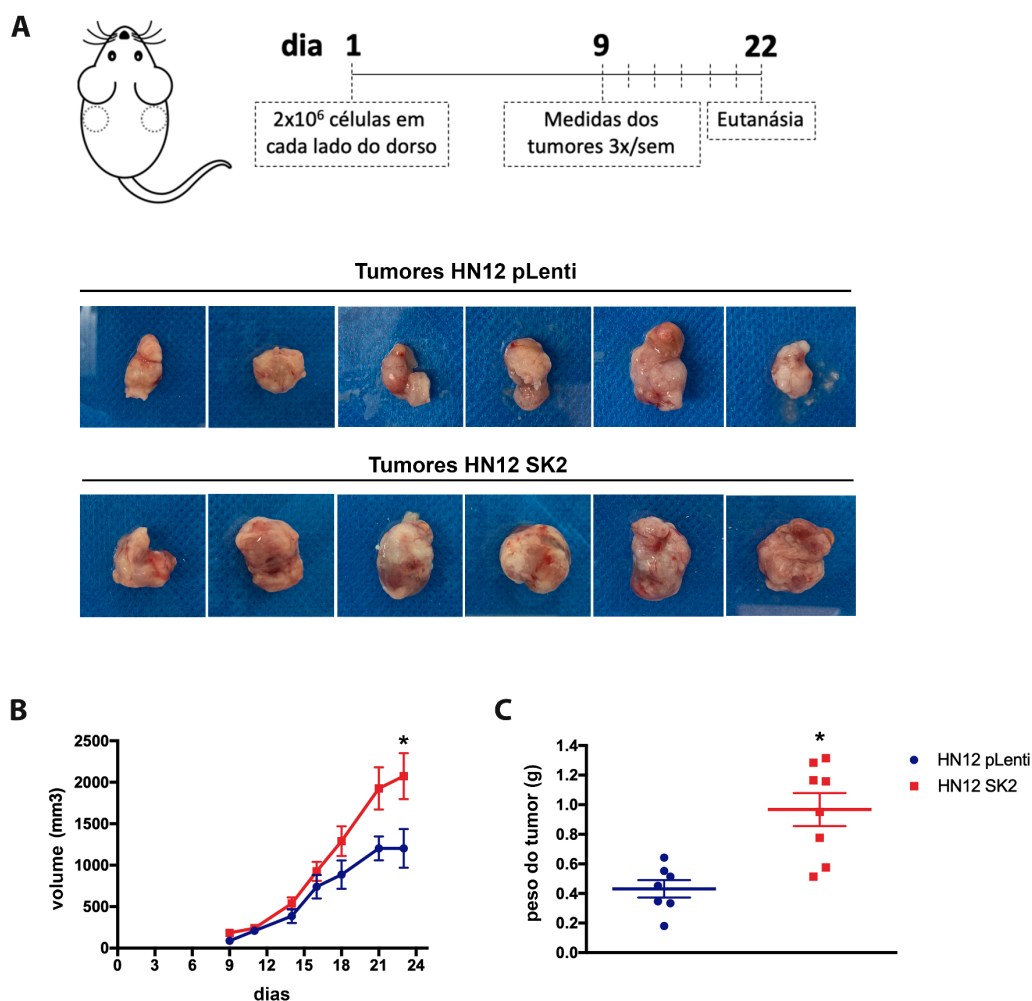


Figura 42. Superexpressão da SK2 aumenta o potencial tumorigênico das células HN12. (A) Células HN12 pLenti (n = 4) e HN12 SK2 (n = 5) foram transplantadas subcutaneamente no dorso, em ambos os lados (esquerdo e direito), em camundongos Balb/C nude de 6 a 8 semanas de idade. Após 9 dias, os tumores formados foram medidos 3x/semana com paquímetro digital. Após 22 dias do transplante das células, os camundongos foram eutanasiados. Foto dos tumores coletados dos camundongos. Gráfico do volume dos tumores (mm³) (B) e do peso (C). Os dados mostrados nos gráficos são apresentados como média ± erro padrão da média. As diferenças estatísticas são indicadas como * p < 0,05 (calculado usando teste t não pareado).

Na análise por imunohistoquímica para SK2 nos cortes histológicos, confirmamos maior nível de SK2 no grupo dos animais HN12 SK2 comparado com os animais do grupo controle HN12 pLenti, como esperado (Figura 43B). Visto que a superexpressão da SK2 levou a formação de tumores maiores, analisamos os níveis de Ki67 nos dois grupos, e o grupo HN12 SK2 apresentou intensidade maior no núcleo

das células (Figura 43C). Além disso, a análise histopatológica, confirmou que os tumores do grupo HN12 SK2 apresentaram maior número de células em mitoses atípicas em 10 campos, sendo superior ao observado no grupo controle HN12 pLenti (Figura 43D). Estes resultados indicam que a superexpressão da SK2 contribuiu ainda mais para a tumorigênese e induziu aumento na divisão celular na linhagem tumoral HN12.

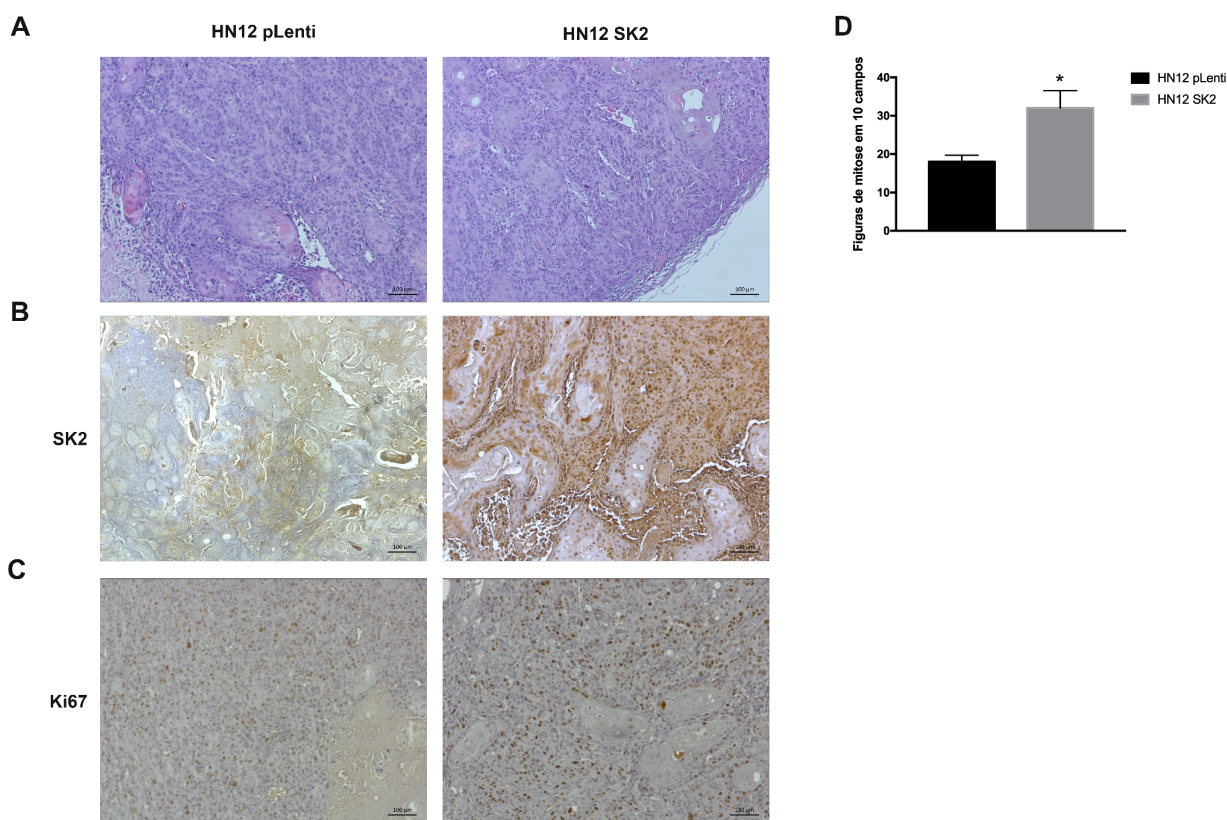


Figura 43. Tumores xenoenxerto das células HN12 SK2 tem maior taxa de proliferação e mitoses do que tumores HN12 pLenti. (A) Análise dos tumores formados nos grupos HN12 pLenti e HN12 SK2 corados com hematoxilina-eosina (HE). Análise por imunohistoquímica do nível de SK2 (B) e Ki67 (C) nos tumores xenoenxertos. Gráfico mostrando o número de figuras de mitoses atípicas contadas em 10 campos/corte histológico (n=5) (D). Os dados mostrados nos gráficos são apresentados como média ± desvio padrão. As diferenças estatísticas são indicadas como * p < 0,05 (calculado usando teste t não pareado).

A análise de potencial tumorigênico nas células NOK-SI com superexpressão e knockdown da SK2 foi realizada utilizando o modelo de formação de tumores de xenoenxerto em camundongos Balb/c nude. As células foram transplantadas subcutaneamente nos dois lados do dorso dos camundongos e após 24 dias da injeção, foi possível visualizar a formação de tumores apenas com as células NOK

SK2. As massas celulares foram medidas 3 vezes por semana com o auxílio de um paquímetro digital. Após 32 dias do transplante, os camundongos foram eutanasiados. No grupo dos animais NOK SK2 observamos a formação de tumores grandes, enquanto no grupo controle NOK pLenti não teve formação de tumor, como esperado, pois as células NOK não são tumorigênicas (SOBRAL; COLETTA; ALBERICI; CURTI *et al.*, 2017) (Figura 44A). Ainda assim, medimos os tumores formados pelas células NOK SK2 e comparamos com a massa residual do local de transplante das células NOK pLenti aplicada juntamente com matrigel nos camundongos (Figura 44B).

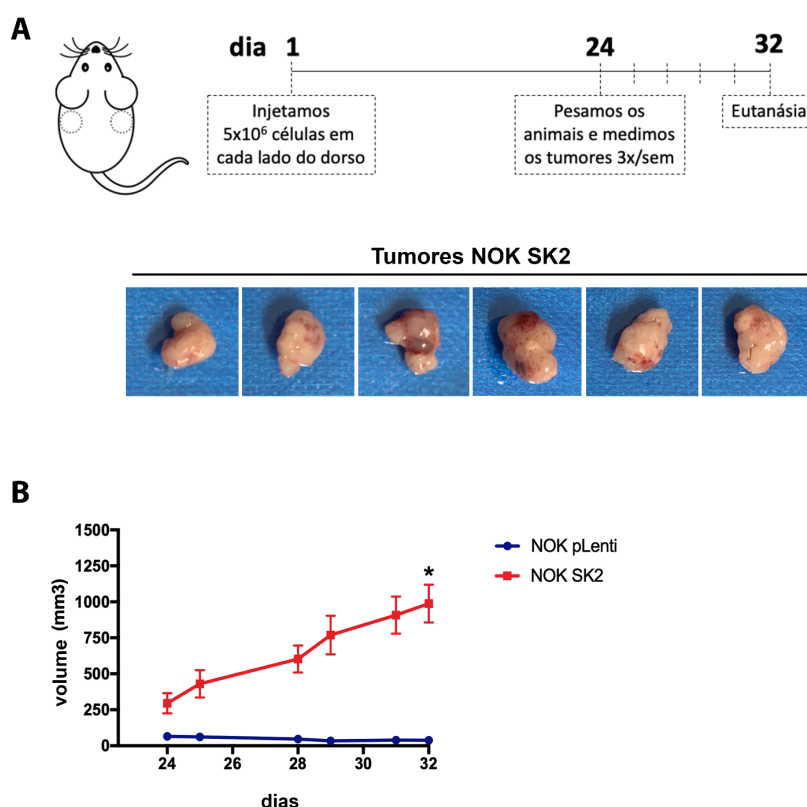


Figura 44. Superexpressão da SK2 transforma a linhagem celular não-tumoral NOK e induz formação de tumor. (A) Células NOK pLenti (n = 5) e NOK SK2 (n = 6) foram transplantadas de forma subcutânea no dorso esquerdo e direito, em camundongos Balb/C nude de 6 a 8 semanas de idade. Após 24 dias, os tumores formados começaram a ser medidos 3x/semana com paquímetro. Após 31 dias da injeção, os camundongos foram eutanasiados. Foto dos tumores xenoinxerto obtidos com a NOK SK2. (B) Gráfico do volume dos tumores (mm³) dos camundongos. Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média do valor de todos os tumores do grupo. As diferenças estatísticas são indicadas como * p < 0,05 (calculado usando teste t não pareado).

As análises por imunohistoquímica para SK2 e Ki67 mostraram intensa marcação para ambas as proteínas nos tumores xenoinxerto formados pela NOK SK2 (Figura 45A-B). Além disso, na análise histopatológica constatamos que os tumores

do grupo NOK SK2 apresentaram em média 64 mitoses por campo, analisados 10 campos de cada tumor (n=6). Cabe ressaltar que as intensidades de Ki67 e o número de mitoses dos tumores da NOK SK2 foram ainda maiores que os obtidos nos tumores xenoinxerto da HN12 SK2.

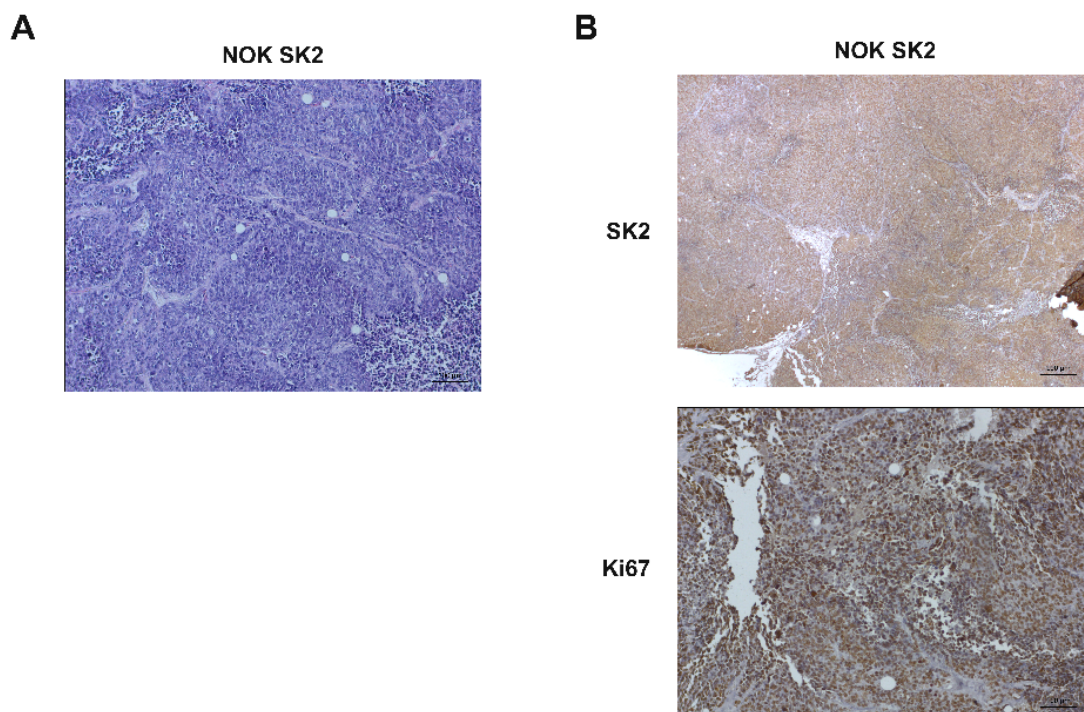


Figura 45. Tumores xenoinxerto formados pelas células NOK-SI com superexpressão da SK2 tem alta taxa proliferativa. (A) Análise dos tumores formados no grupo NOK SK2 corados com hematoxilina-eosina (HE). Análise por imunohistoquímica do nível de SK2 (B) e Ki67 (C) nos tumores formados.

Para validar os resultados *in vitro* obtidos com o knockdown da SK2 em células NOK, realizamos o transplante das células controle e NOK shSK2 em camundongos nude. Após 42 dias da injeção, não observamos a formação de massa tumoral nem pela NOK controle (como esperado) e nem pela NOK shSK2 (Figura 46). Estes resultados indicam que a superexpressão da SK2 causa a transformação neoplásica da linhagem celular de queratinócito oral não-tumoral (NOK-SI) tornando-a tumorigênica, e com evidente aumento na capacidade proliferativa das células, potencialmente associado ao descontrole no ciclo celular e aumento de estímulo de vias de proliferação celular.

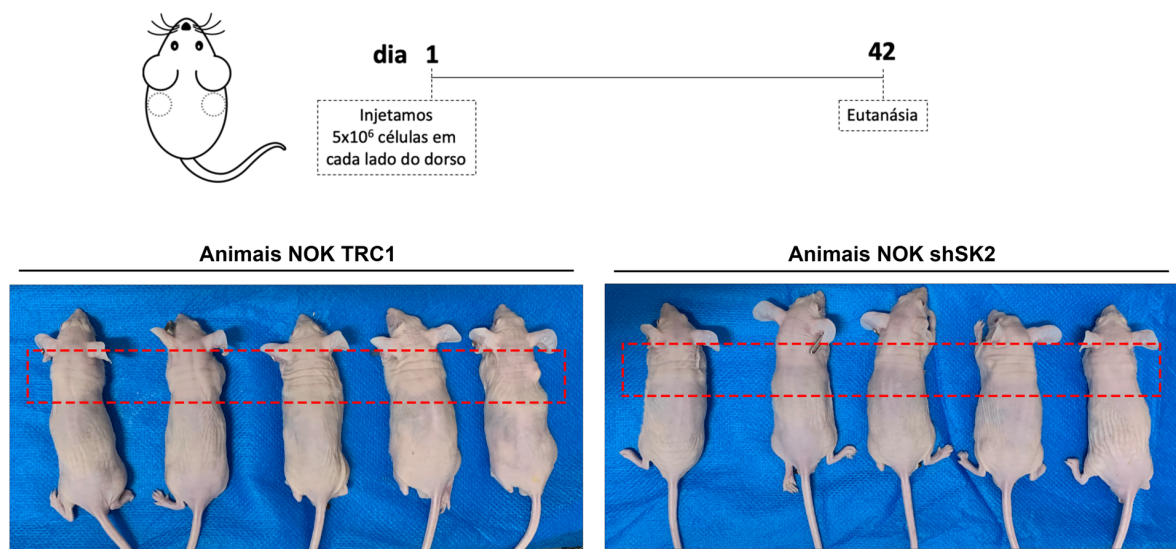


Figura 46. Knockdown da SK2 em células NOK-SI não induz formação de tumor xenoinxerto em camundongo nude. Células NOK TRC1 (n = 5) e NOK shSK2 (n = 5) foram transplantadas de forma subcutânea no dorso esquerdo e direito, em camundongos Balb/C nude de 6 a 8 semanas de idade. Após 42 dias do transplante das células, não foi observada formação de tumor e os camundongos foram eutanasiados.

Por fim, utilizando o kit de ELISA, analisamos a concentração de esfingosina-1-fosfato (S1P) nos tumores dos grupos HN12 pLenti, HN12 SK2 e NOK SK2, uma vez que S1P é o produto da fosforilação de esfingosina, catalisada pelas SKs (SK1 e SK2) e o principal esfingolípido ativo relacionado à proliferação e tumorigênese (PYNE; PYNE, 2010). Como esperado, o resultado do ELISA para S1P confirmou que os tumores formados no grupo HN12 SK2 apresentaram maior concentração de S1P que os tumores do grupo controle HN12 pLenti (Figura 47). Os níveis de S1P nos tumores dos animais NOK SK2 também tinham alta concentração de S1P, até mais que nos tumores do grupo HN12 SK2 (Figura 47). Nossos resultados sugerem que, a ativação de vias de proliferação e transformação podem estar também associadas ao aumento de S1P nas células HN12 SK2 e NOK SK2.

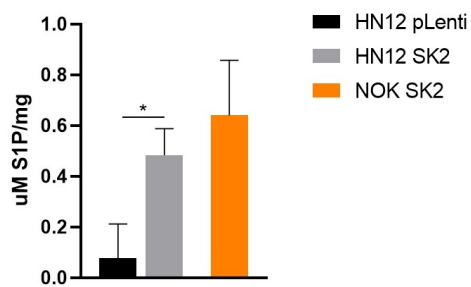


Figura 47. Superexpressão da SK2 aumenta os níveis de S1P nos tumores xenoenxerto. Concentração de S1P presente em 1500 µg de proteína total nos tumores dos grupos HN12 pLenti, HN12 SK2 e NOK SK2 (3 tumores de cada grupo). Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. As diferenças estatísticas são indicadas como * $p < 0,05$ (calculado usando teste t não pareado).

Discussão

5. Discussão

Nas últimas décadas, a sinalização da esfingosina-1-fosfato (S1P) tem sido amplamente explorada como um alvo terapêutico no câncer (PYNE; PYNE, 2020). A esfingosina quinase 2 (SK2), uma das isoformas que fosforila esfingosina, tem mecanismo de ação dependente do tipo celular e localização em que se encontra, podendo induzir parada do ciclo celular, apoptose, proliferação e sobrevivência (NEUBAUER; PITSON, 2013). Diferentemente da SK1, que é amplamente estudada em diferentes tipos de câncer (NEMA; VISHWAKARMA; AGARWAL; PANDAY *et al.*, 2016; PYNE; PYNE, 2010; TAMASHIRO; FURUYA; SHIMIZU; KAWAMORI, 2014), o papel da SK2 no desenvolvimento e progressão de CECP ainda é desconhecido. Desta forma, neste estudo investigamos o potencial envolvimento da SK2 em diferentes processos relacionados com tumorigênese e progressão tumoral, utilizando tanto linhagens celulares de CECP (HN12 e HN13) quanto linhagem de queratinócito oral não-tumoral (NOK-SI). Os modelos experimentais selecionados foram superexpressão de SK2 nas células NOK-SI e HN12, e RNA de interferência para SK2 na NOK-SI e HN13. A seleção das linhagens foi realizada com o objetivo de avaliar se o papel da SK2 seria pró ou antitumoral em células não tumorais (NOK-SI) e se teria papel na progressão da doença em células malignas.

5.1 SK2 regula a fissão mitocondrial e autofagia/mitofagia em células de queratinócito oral não-tumoral e de CECP

Há poucos estudos mostrando o envolvimento da esfingosina quinase 2 no processo de autofagia (FUGIO; COELI-LACCHINI; LEOPOLDINO, 2020; OGRETMEN; HANNUN, 2004; TANIGUCHI; KITATANI; KONDO; HASHIMOTO-NISHIMURA *et al.*, 2012; YOUNG; KESTER; WANG, 2013), sendo que nenhum deles é em linhagem celular de CECP. Nossos resultados de WB e IF mostram que a superexpressão de SK2 nas células HN12 SK2, apesar de aumentar os níveis de LC3, reduziu o fluxo autofágico devido ao menor acúmulo de LC3 e p62 comparado com as células controle HN12 pLenti. Além disto, o aumento de LC3 na HN12 SK2 estava relacionado ao processo de mitofagia, uma vez que observamos maior colocalização da proteína mitocondrial TOM20 e LC3 por IF e aumento da proteína mitocondrial

PINK1 no subfracionamento por WB. Sabe-se que o acúmulo de PINK1 na membrana externa de mitocôndrias despolarizadas, recruta parkina e leva à poliubiquitinação de proteínas da membrana mitocondrial externa. Um dos receptores de conteúdo autofágico que reconhece e captura as proteínas ubiquinadas para degradação na autofagia seletiva, é o p62 (KAUR; DEBNATH, 2015). Nos resultados de WB, vimos acúmulo das proteínas ubiquitinadas no tratamento com cloroquina nas células HN12 SK2. Dessa forma, o aumento dos níveis de p62 nestas células é devido à indução do processo de mitofagia. Além disso, a análise de microscopia eletrônica de transmissão, pudemos observar quantidade maior de autofagossomos nas células HN12 SK2 do que nas células HN12 pLenti. Ambas as linhagens apresentaram mitocôndrias com morfologia alterada, na HN12 pLenti foi possível observar algumas inchadas (termo usado no inglês “*swollen mitochondria*”) sem cristas definidas, outras mais alongadas e menores mais condensadas. No entanto, na HN12 SK2 todas as mitocôndrias estavam inchadas, com cristas não definidas e algumas com as membranas rompidas. Apesar da HN12 ser uma linhagem celular tumoral, com metabolismo alterado, foi possível observar diferença entre as células com e sem superexpressão de SK2.

A ativação direta da autofagia pela SK2 foi descrita em células neuronais, onde a SK2 se liga a Bcl-2, por meio do seu domínio putativo BH3, liberando beclina-1 para ativar autofagia protetora contra isquemia cerebral (SONG; ZHANG; CHEN; XIA *et al.*, 2017). Por IF, houve colocalização das proteínas Bcl-2 e beclina-1 nas células HN12 pLenti, mas na HN12 SK2 não observamos. Apesar da mitofagia poder ser antecedida pela fissão mitocondria (FU; LIU; YIN, 2019), nos nossos resultados vimos que isso não estava acontecendo, já que tivemos redução dos níveis de p-DRP1 por WB e IF nas células HN12 SK2. Dessa forma, nosso estudo mostrou um novo mecanismo de ação da SK2 na mitocôndria, onde a superexpressão de SK2 induz mitofagia na linhagem celular HN12 de CECP.

Já nas células NOK SK2, o acúmulo de LC3 na condição sem e com cloroquina indica aumento do fluxo autofágico, mas aparentemente não relacionado ao processo de mitofagia. Além de não observarmos alteração em PINK1 ou colocalização de TOM20 e LC3 (resultados não mostrados), não observamos colocalização de Bcl-2 e beclina-1 nas células NOK pLenti, indicando que o mecanismo de ativação da autofagia é diferente daquele da linhagem HN12. AMPK é considerada um sensor da homeostase celular, que em condições de estresse promove autofagia ativando

diretamente ULK1, o qual é recrutado para a formação do autofagossomo (KAUR; DEBNATH, 2015; KIM; KUNDU; VIOLLET; GUAN, 2011). Nos nossos resultados, o aumento dos níveis de p-AMPK e p-ULK1 nas células NOK-SI com superexpressão de SK2, podendo ser uma das vias de ativação da autofagia nas células NOK SK2 há ativação de ULK1, que ativa autofagia, via AMPK.

Apesar do aumento nos níveis de proteínas ubiquinadas nas células NOK SK2, o acúmulo foi maior no tratamento com o inibidor proteassomal MG132, indicando que o aumento de ubiquinação nessas células está relacionado não somente a autofagia, mas também com degradação proteassomal. Inclusive a proteína SK2 é degradada via proteassoma tanto a endógena quanto a ectópica.

O aumento da massa mitocondrial observado pela marcação com MitoTracker nas células NOK SK2 por IF poderia ser decorrente de fissão mitocondrial. Sabe-se que a proteína DRP1 contém três resíduos que podem ser fosforilados e cada modificação tem um efeito na atividade, por exemplo, a fosforilação em Ser616 ativa a fissão mitocondrial, enquanto na Ser637 suprime (LEE; YOON, 2016). Nossos resultados, mostraram que as células NOK SK2 tiveram aumento dos níveis de p-DRP1 no resíduo Ser616 e, ainda, houve a colocalização da proteína mitocondrial TOM20 e p-DRP1 por imunofluorescência. Confirmando que a superexpressão de SK2, além de autofagia, também induz a fissão mitocondrial na linhagem de queratinócito oral não-tumoral NOK-SI. O aumento desses dois processos celulares indica que as células estão passando por algum estresse e ocorre a ativação de mecanismo de sobrevivência. No resultado da microscopia eletrônica de transmissão, observamos mitocôndrias com morfologia intacta, com as cristas e membrana definidas nas células controle NOK pLenti. Entretanto, as mitocôndrias das células NOK SK2 estavam inchadas, sem cristas definidas e com rompimento de membranas. Isso confirma que há alteração mitocondrial e provavelmente no metabolismo dessas células.

Ao contrário dos resultados da superexpressão, o knockdown da SK2 na NOK-SI aumentou os níveis de LC3 e acumulou menos no tratamento com cloroquina, indicando redução do fluxo autofágico comparado com as células controle NOK TRC1. Além disso, a NOK shSK2 mostrou redução tanto da massa mitocondrial visto na marcação com MitoTracker, quanto nos níveis de p-DRP1 por IF. O resultado da microscopia eletrônica de transmissão revelou a presença de autofagossomo nas células NOK TRC1, mas não na NOK shSK2. Além disso, vimos mitocôndrias

alongadas nas células NOK shSK2. Dessa forma, nossos resultados indicam que a SK2 regula a autofagia e a fissão mitocondrial em células de queratinócito oral não tumoral, alterando os níveis de LC3 e p-DRP1 com envolvimento de AMPK e ULK1.

O knockdown da SK2 nas células HN13 aumentou o fluxo autofágico, visto que observamos por WB e IF menores níveis de LC3 e p62, e o acúmulo de ambos no tratamento com cloroquina. No caso da linhagem celular HN13, ficou evidente que esta já apresenta autofagia basal alta, devido aos níveis de LC3 e à presença de autofagossomos observada na microscopia eletrônica de transmissão nas células controle HN13 TRC1. A diminuição de autofagossomos nas células HN13 shSK2 por MET condiz com o resultado do WB e IF, pois seria necessário incubar com a cloroquina para observar o acúmulo de autofagossomos. Além disso, a redução dos níveis de p-DRP1 nas células HN13 shSK2 indica que a fissão mitocondrial está reduzida nessas células.

Dessa forma, nossos resultados mostraram que diferentes níveis de SK2 alteram o processo de autofagia, mitofagia e fissão mitocondrial, dependendo do tipo celular. Em células orais não tumorais, a regulação foi linear, onde o aumento de SK2 induziu a autofagia e a fissão mitocondrial, enquanto o knockdown reduziu os mesmos processos por meio dos mesmos alvos analisados, LC3 e p-DRP1. Devido às alterações já existentes nas vias de sinalização das células de CECP, HN12 e HN13, a regulação foi diferente para cada uma, como era esperado (citar o artigo da Amanda Ouchida). Até o momento, não há trabalhos publicados que mostram o envolvimento da SK2 na regulação da autofagia/mitofagia e/ou fissão mitocondrial.

5.2 Superexpressão da SK2 induz OXPHOS nas células de queratinócito oral não-tumoral e de CECP

O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) gerado pelas bombas de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana (complexos I, III e IV) é essencial para o armazenamento de energia durante a fosforilação oxidativa (OXPHOS) (ZOROVA; POPKOV; PLOTNIKOV; SILACHEV *et al.*, 2018). A redução do potencial de membrana mitocondrial pode implicar que há falha no sistema de controle de qualidade mitocondrial, ou que o processo de dano/estresse mitocondrial excede a capacidade de eliminar as mitocôndrias danificadas, ou que há um defeito no

mecanismo de degradação das mitocôndrias (ZOROVA; POPKOV; PLOTNIKOV; SILACHEV *et al.*, 2018). Nossos resultados mostraram que a superexpressão da SK2 levou à perda do $\Delta\Psi_m$ nas linhagens celulares NOK e HN12. Visto que nas imagens da microscopia eletrônica de transmissão as mitocôndrias apresentaram alterações, algumas até com as membranas rompidas, estes resultados condizem com o esperado. O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre a produção de EROs e a ação antioxidante da célula (LIOU; STORZ, 2010). Nossos resultados mostraram acúmulo de EROs nas linhagens celulares NOK SK2 e HN12 SK2, após 30 minutos, 1 hora e 2 horas. Sendo assim, a superexpressão da SK2 induz o estresse oxidativo nas células prejudicando a integridade mitocondrial.

O ciclo do ácido cítrico (TCA) regula a geração de energia na respiração mitocondrial, além de suprir a célula com intermediários do ciclo. A citrate sintase (CS) cataliza a primeira reação do TCA e é a enzima limitadora da taxa do ciclo (MUKHERJEE, A.; SRERE, P. A.; FRENKEL, E. P., 1976). Nas células NOK com superexpressão da SK2 houve aumento da atividade da CS indicando um efeito direto na bioenergética mitocondrial. Já foi descrito que a S1P produzida na mitocôndria pela SK2 se liga à proibitina 2 (PHB2), proteína predominantemente localizada na membrana mitocondrial interna e que regula funções mitocondriais; esta interação é importante para a formação e função do complexo IV (citocromo-c oxidase, COX) na cadeia transportadora de elétrons (STRUB; PAILLARD; LIANG; GOMEZ *et al.*, 2011). Nossos resultados mostraram que, apesar da redução do potencial de membrana mitocondrial, os níveis proteicos de todos os complexos (I, II, III, IV e V), que participam da cadeia respiratória, aumentaram na NOK SK2. O complexo IV é a etapa final da atividade da cadeia respiratória, considerada reguladora da OXPHOS para produção de ATP (KADENBACH, 2021), e nossos resultados confirmaram que as células NOK SK2 produziram muito mais ATP do que as células controle NOK pLenti. No geral, as células tumorais (e altamente metastáticas) preferem realizar a glicólise aeróbica, Efeito Warburg, (KOPPENOL; BOUNDS; DANG, 2011; LIBERTI; LOCASALE, 2016) à respiração mitocondrial para produzir energia mesmo na presença de oxigênio. O produto desse metabolismo é a produção de lactato. Nas células NOK SK2, além do aumento na produção de ATP, houve aumento de lactato. Esses resultados mostram que a superexpressão de SK2 nas células de queratinócito não tumoral aumenta o metabolismo mitocondrial e também a glicólise aeróbica para

suprir a demanda energética, apresentando um perfil metabólico característico ao de células tumorais.

A superexpressão da SK2 nas células HN12 reduziu a atividade da CS. No entanto, vimos aumento da produção de ATP e dos níveis do complexo I da cadeia respiratória. A mitocôndria é a principal produtora de ânion superóxido e outras EROs (BAE; OH; RHEE; YOO, 2011), sendo o complexo I a principal fonte de produção (BRAND, 2016). Portanto, o aumento de EROs nas células HN12 SK2 pode estar relacionado ao aumento da atividade do complexo I. O aumento de ATP e a não alteração dos níveis de lactato sugerem que estas células estão com o metabolismo ativo, realizando ainda mais a fosforilação oxidativa e mantendo a glicólise.

5.3 SK2 regula proteínas do ciclo celular, fatores de transcrição e acetilação de histonas de células de queratinócito oral não-tumoral e de CECP

Alguns estudos descreveram que o acúmulo de SK2 leva à apoptose e parada do crescimento celular, sendo um dos mecanismos propostos, o aumento da transcrição de p21 induzido pela S1P no núcleo (IGARASHI; OKADA; HAYASHI; FUJITA *et al.*, 2003; LIU; TOMAN; GOPARAJU; MACEYKA *et al.*, 2003; MACEYKA; SANKALA; HAIT; LE STUNFF *et al.*, 2005; HAIT; ALLEGOOD; MACEYKA; STRUB *et al.*, 2009). Entretanto, nossos dados mostram que a superexpressão da SK2 em queratinócito oral não-tumoral ativa vias de proliferação e induz a progressão do ciclo celular. A superexpressão da SK2 na NOK-SI levou ao aumento do nível de Akt na sua forma ativa, p-Akt, e redução significativa de p21. Akt é uma serina/treonina quinase da via de PI3K/Akt que desempenha importante papel em diversos processos celulares, como proliferação, sobrevivência e migração celular (CHANG; LEE; NAVOLANIC; STEELMAN *et al.*, 2003) e no CECP (JOHNSON, D. E.; BURTNES, B.; LEEMANS, C. R.; LUI, V. W. Y. *et al.*, 2020) P21 é um inibidor de quinase dependente de ciclina (CDK) que regula o ciclo celular e pode impedir a progressão do ciclo nas fases G1/S e G2/M inibindo CDK4,6/ciclina-D e CDK2/ciclina-E, respectivamente (KARIMIAN; AHMADI; YOUSEFI, 2016). Com a análise do ciclo celular confirmamos que as células NOK SK2 estavam proliferando mais do que as células NOK pLenti. Apesar das células NOK SK2 não terem respondido ao tratamento do nocodazol como sincronizador na fase G2/M, foi possível observar a

diferença da progressão do ciclo celular das duas linhagens celulares. A superexpressão da SK2 acelerou a progressão do ciclo, principalmente da fase G1 para S. Após 4 horas do início do ciclo, aproximadamente 70% das células NOK SK2 passaram de G1, para S (15%) e G2/M (55%), e após 12 horas, as células já estavam ciclando novamente, visto que houve redução da porcentagem de células em G2/M e aumento em S. No entanto, as células NOK pLenti tiveram progressão mais lenta pelo ciclo, sendo que, após 24 horas as células não tinham terminado o primeiro ciclo, como o esperado. Além disso, a indução da parada do ciclo celular por p21 na transição entre G1/S é um processo dependente de p53, mas na NOK SK2 houve redução de p21 (HOLLAND; ELDER; MCCLOUD; HALL *et al.*, 2001).

P53 é um fator de transcrição que controla a expressão de genes e miRNAs que regulam muitos processos celulares importantes, incluindo proliferação, reparo de DNA, apoptose, autofagia e migração celular (LEVINE; OREN, 2009; VOUSDEN; PRIVES, 2009). P53 é reconhecido como o principal regulador transcricional de p21. Estresse oxidativo, dano no DNA, e outros estresses celulares induzem a atividade de p53 que, subsequentemente, resulta na expressão de p21 (JUNG; QIAN; CHEN, 2010). Na superexpressão da SK2 na NOK, apesar de aumentar o nível proteico de p53, houve redução na sua atividade transcricional. Além disso, os nossos dados de RNA-Seq mostraram que a transcrição de p21 também está reduzida nas células NOK SK2. Portanto, propomos que o aumento da proliferação, a perda de checagem do ciclo e a rápida progressão do ciclo celular nas células NOK SK2, é devido à redução de p21 (proteína e mRNA) causado pela diminuição da atividade transcricional de p53.

Visto que a SK2 regula fortemente os níveis de p53 total, nós avaliamos se haveria danos no DNA das células NOK SK2, devido à sua função no reparo de DNA. Por IF fizemos a marcação para gamma-H2AX, marcador de quebras de fita dupla (“*double stranded breaks*”, DSBs) (WILLIAMS, A. B.; SCHUMACHER, B., 2016). Porém, houve marcação mais intensa no núcleo das células NOK pLenti, o que sugere que nas células NOK SK2 ou há menos danos no DNA ou a resposta está ineficiente.

Por fim, outra ação relacionada à regulação de p53 é a senescência, no entanto uma das vias é dependente da transcrição de p21 (MIJIT; CARACCILO; MELILLO; AMICARELLI *et al.*, 2020; KARIMIAN; AHMADI; YOUSEFI, 2016), o que já confirmamos não estar acontecendo nas células NOK SK2. Durante a senescência, as células em condições de estresse podem ser capazes de reparar e/ou eliminar a causa dos danos e, assim, escapar da parada do ciclo celular (MIJIT; CARACCILO;

MELILLO; AMICARELLI *et al.*, 2020). Nos resultados vimos maior quantidade de células em estado senescente na NOK SK2 do que nas células controle NOK pLenti. Este mecanismo ativado pela superexpressão da SK2 pode ser uma defesa das células regulado por uma via independente de p53/p21. Existem trabalhos que sugerem a senescência aguda como um mecanismo de resistência a condições de estresse, o que estaria de acordo com as alterações observadas nas células com aumento de SK2 e desregulação no balanço de ceramida/esfingosina (TRAYSSAC; HANNUN; OBEID, 2018).

Curiosamente, a superexpressão da SK2 na linhagem tumoral HN12 modulou as mesmas proteínas, levando ao aumento de p-Akt e redução de p21. No entanto, já é descrito que a linhagem tumoral HN12 tem p53 truncado e inativo (MARTIN; ABBA; MOLINOLO; VITALE-CROSS *et al.*, 2014; SHARMA; VU; COOK; NASERI *et al.*, 2018). Dessa forma, a regulação de p21 nessas células é diferente. C-myc é um proto-oncogene e fator de transcrição com vários genes alvo que regulam proliferação, metabolismo glicolítico e biogênese mitocondrial, e que já foi descrito estar superexpresso em vários tipos de cancer (MILLER; THOMAS; ISLAM; MUENCH *et al.*, 2012). Uma das ações da família de proteínas c-myc é reprimir a expressão de p21 em nível transcricional. A ligação de c-myc ao fator de transcrição MIZ-1, resulta na repressão da transcrição de p21 (KARIMIAN; AHMADI; YOUSEFI, 2016). Como a linhagem celular HN12 não tem p53, a redução de p21 nas células HN12 SK2 pode ser devido ao aumento dos níveis de c-Myc.

Apesar desse perfil proteico, no resultado de “*wound healing*” identificamos que as células HN12 SK2 não apresentaram aumento significativo na proliferação e migração/interação célula-célula, pois após 24 horas, o risco não foi fechado.

O knockdown da SK2 nas células NOK não alterou os níveis das proteínas analisadas, porém na HN13 shSK2 houve alterações opostas às da superexpressão nas outras linhagens celulares, tais como redução de p-Akt e aumento dos níveis de p21 por WB, além da redução de Rb e p-Rb. Rb é um supressor tumoral, que atua como controle negativo do ciclo celular e progressão tumoral. Rb é considerado regulador do ciclo celular e tem papel central no controle de iniciação da replicação do DNA e divisão. Eliminação da funcionalidade de Rb leva à progressão desregulada do ciclo celular e crescimento do tumor (GIACINTI; GIORDANO, 2006). Houve redução dos níveis de Rb nas células HN13 shSK2 acompanhada de aumento de p21, o que reforça a ação de SK2 no controle do ciclo celular. No entanto, no ensaio

funcional de formação de colônias, vimos que em condições de menor confluência, as células HN13 shSK2 formaram colônias menores e em menor número; enquanto, com maior quantidade de células, mais colônias foram formadas nas células com knockdown da SK2.

Curiosamente, vimos redução dos níveis de p53 por WB, mas aumento da atividade transcricional nas células HN13 shSK2 comparado à HN13 TRC1. Estes resultados indicam que o knockdown de SK2 induz danos e/ou estresse celular que leva ao aumento de p21 e da atividade de p53.

SET/I2PP2A é uma inibidora endógena de PP2A descrita como oncoproteína (LI; GUO; DAMUNI, 1995). A ativação de PP2A promove a morte celular por apoptose (SILVERSTEIN; BARROW; DAVIS; MUMBY, 2002). Além disso, a proteína SET participa da regulação de reparo de danos de DNA, regulação epigenética e morte celular (ALMEIDA; GOTO; PESTANA; UYEMURA *et al.*, 2012; KIM; KIM; SON; CHAE *et al.*, 2012). Já é descrito que FTY720 (análogo sintético de esfingosina usado no tratamento para esclerose múltipla), ativa PP2A. Quando FTY720 é internalizado nas células, este é fosforilado (FTY720-P), principalmente, pela SK2 e ativa a supressão imunológica via o S1PR1 (OAKS; OGRETMEN, 2014). Nos nossos resultados, vimos que SK2 regula os níveis de SET, principalmente no núcleo. A superexpressão de SK2 na NOK e na HN12 reduziu os níveis de SET nuclear nas células, enquanto o knockdown de SK2 na HN13 aumentou a proteína no núcleo. Dessa forma, sugerimos que a SK2 é capaz de regular os níveis e a distribuição da SET nas células, portanto a SET participa de alguma forma das alterações e/ou respostas induzidas pela SK2. Outros estudos estão em andamento no nosso grupo para melhor compreender este cross-talking entre as proteínas.

Já foi descrito que a S1P produzida no núcleo pela SK2, inibe HDAC1/2, levando ao aumento da acetilação de histonas H3Lys9, H4Lys5 e H2BLys12 (HAIT; ALLEGOOD; MACEYKA; STRUB *et al.*, 2009), e conseqüentemente, aumenta a expressão de p21, o que explicaria um efeito anti-proliferativo da SK2. Porém, as células HN13 shSK2 tiveram aumento de p21 e aumento da acetilação de histonas H3Lys9 e H4Lys12 (resíduo não descrito ainda como regulado pela SK2), enquanto a superexpressão da SK2 tanto na HN12 quanto na NOK levou à redução na acetilação de H4Lys12. Estes resultados sugerem que nas linhagens estudadas os mecanismos de regulação epigenética sob controle de SK2 são diferentes, portanto, tem ações específicas em CECP.

5.4 SK2 regula atividade das MMPs e induz a TEM

A superexpressão da SK2 na linhagem de queratinócito oral não-tumoral NOK-SI, alterou a morfologia das células para um perfil mesenquimal, com o aumento de vimentina e redução de E-caderina. Durante a transição epitélio-mesenquima (TEM) as células epiteliais perdem as junções célula-célula e marcadores epiteliais e adquirem formato e marcadores mesenquimais (LAI; LI; WU; LIN *et al.*, 2020). Nos resultados, identificamos aumento de Snail, repressor da transcrição do gene de E-caderina (CANO; PÉREZ-MORENO; RODRIGO; LOCASCIO *et al.*, 2000). Além disso, a redução da atividade de p53 na NOK SK2 também pode estar associada ao aumento do fenótipo mesenquimal das células, pois ele também desempenha um papel determinante como regulador negativo na diferenciação celular (WANG; KUA; HU; GUO *et al.*, 2006; YANG; WANG; ZHAO; ZHANG *et al.*, 2018).

A transição TEM é regulada por vários fatores como: sinalização celular, controle transcricional, modificação epigenética e modificações pós-traducionais (LAI; LI; WU; LIN *et al.*, 2020). Essa programação confere às células epiteliais propriedades para invasão e disseminação metastática, com o aumento da motilidade e capacidade de degradar componentes da matriz extracelular (NIETO; HUANG; JACKSON; THIERY, 2016). No entanto, nos nossos resultados vimos que o potencial invasivo estava reduzido nas células NOK SK2. Sabe-se que, alterações no repertório de integrina durante TEM está correlacionado com o aumento da expressão de proteases, como as metaloproteinases da matriz MMP2 e MMP9, melhorando assim a degradação de proteína da matriz extracelular e possibilitando a invasão⁵¹. Pela análise de zimografia, vimos que a superexpressão da SK2 na NOK reduz a atividade das metaloproteinases (MMP2 e MMP9) e reduz também a transcrição das MMPs. Um dos fatores de transcrição que regula a expressão das MMPs é o p-STAT3(Tyr705) (JIA; JIA; GUO; CHEN *et al.*, 2017; XIE; WEI; LIU; GAO *et al.*, 2004). Nos resultados de WB e RNA-Seq vimos redução da proteína e na transcrição de STAT3 nas células NOK SK2, indicando que esta regulação possa estar acontecendo nessas células.

Por fim, nos resultados do knockdown de SK2 na linhagem tumoral HN13 tivemos resposta contrária aos da superexpressão. As células HN13 shSK2 tiveram

aumento da atividade da MMP2 e MMP9, indicando maior potencial migratório. Além disso, por WB tivemos aumento dos níveis de p-STAT3(Tyr705) nas células HN13 shSK2 comparado com as células HN13 TRC1. Apesar da linhagem celular HN13 não expressar vimentina, vimos que o knockdown da SK2 levou ao aumento de E-caderina, também visto nas células NOK shSK2, sugerindo ser uma proteína alvo de SK2.

Dessa forma, esses resultados indicam que STAT3 e as MMP2 e MMP9 são alvos da SK2 nas duas linhagens celulares, queratinócito oral não-tumoral e de CECP.

Nosso grupo de pesquisa já fez a caracterização fenotípica da linhagem celular NOK-SI por citometria de fluxo usando anticorpos para marcadores mesenquimais (SOBRAL; COLETTA; ALBERICI; CURTI *et al.*, 2017). As células NOK-SI apresentam alta porcentagem de células CD44+, mas quase nula de ALDH. Nos nossos resultados de citometria de fluxo vimos que a superexpressão da SK2 aumentou a porcentagem de células ALDH+ e duplamente positiva CD44+/ALDH+, indicando que as células NOK SK2 adquiriram perfil de células tronco tumorais, CTTs. O aumento dos níveis de Sox-2 na NOK SK2 pode estar associado à regulação do perfil de célula tronco, pois é descrito ser um fator de transcrição que regula genes relacionados à pluripotência e repressão de genes específicos (RIZZINO; WUEBBEN, 2016; SARLAK; VINCENT, 2016).

As células-tronco são funcionalmente definidas como células com a capacidade de se auto-renovar e se diferenciar (LAI; LI; WU; LIN *et al.*, 2020). Nesse contexto, foi descrito que o fator de transcrição p53, regulador de resposta ao dano ao DNA e morte celular, desempenha um papel determinante como regulador negativo da osteogênese e da diferenciação dos osteoblastos (WANG, X.; KUA, H. Y.; HU, Y. *et al.*, 2006). Embora p53 seja um regulador poderoso da morte celular, com papel crucial no desenvolvimento do câncer, ele pode participar da regulação das células tronco mesenquimais (MSCs) (WILLIAMS, A. B.; SCHUMACHER, B., 2016; WANG, X.; KUA, H. Y.; HU, Y. *et al.*, 2006). Nos nossos resultados mostramos que as células NOK SK2 apresentaram características de células tronco tumorais pelo ensaio de formação de esferas, e que, apesar do aumento dos níveis de p53 na NOK SK2, a atividade transcricional de p53 foi reduzida comparada à da célula NOK pLenti. Isso indica que as características mesenquimais e CTT adquiridas pela NOK SK2 podem estar relacionadas à redução da atividade de p53.

Curiosamente, nós vimos que as células NOK SK2 foram capazes de reverter o processo TEM para TME (transição mesenquimal-epitelial). A TEM e seu processo reverso de transição apresentam princípios fundamentais em diferentes processos fisiológicos e patológicos (LAI; LI; WU; LIN *et al.*, 2020). A reprogramação metabólica é uma das marcas da progressão tumoral. Células malignas alteram o metabolismo celular de diversas maneiras para ganhar energia e atender aos requisitos de proliferação e sobrevivência. O metabolismo da glicose é a alteração metabólica com maior destaque nas CTTs (LAI; LI; WU; LIN *et al.*, 2020). Há relatos mostrando que as CTTs são mais glicolíticas do que outras células diferenciadas, porém outros relatos sugerem que elas preferem a fosforilação oxidativa mitocondrial OXPHOS (THANKAMONY; SAXENA; MURALI; JOLLY *et al.*, 2020). CTTs de câncer de mama, cólon e pulmão mostraram maior atividade glicolítica do que as outras células (CIAVARDELLI; ROSSI; BARCAROLI; VOLPE *et al.*, 2014), porém CTTs de câncer de leucemia e pâncreas dependem de OXPHOS para produção de energia (SKRTIĆ; SRISKANTHADEVAN; JHAS; GEBBIA *et al.*, 2011). Alguns estudos mostraram também que, além de alternar entre o fenótipo glicolítico e OXPHOS, as CTTs também podem associar as duas vias e existir em um estado metabólico híbrido (YU; LU; JIA; MA *et al.*, 2017), e este é o perfil das células NOK SK2.

5.5 SK2 induz transformação celular da NOK-SI e contribui com a tumorigênese da HN12

Alguns trabalhos demonstraram que a SK2 contribui com o desenvolvimento tumoral e que o uso de inibidores seletivos da quinase, atenuam o crescimento de tumores em modelo *in vivo* (FRENCH; ZHUANG; MAINES; GAO *et al.*, 2010). No entanto, em CECF ainda não foi descrito seu papel. Nossos resultados mostraram que o aumento de SK2, além de alterar fenotipicamente a NOK com o aumento de vimentina e redução de E-caderina, transformou a linhagem celular de queratinócito oral não-tumoral numa célula maligna, com alta taxa proliferativa e tumorigênica. O número de figuras de mitoses em 10 campos fotografados e os níveis de Ki67 obtidos por imunocitoquímica, indicaram que o aumento de SK2 na NOK acelerou significativamente a proliferação destas células.

Várias alterações causadas nas células NOK SK2 explicam a capacidade tumoral dessas células: o aumento dos níveis do proto-oncogene c-Myc, p-AKT, as alterações no metabolismo celular e o aumento exacerbado da autofagia está relacionado como a promoção da tumorigênese, como já foi descrito em outros tipos de câncer (PERERA; STOYKOVA; NICOLAY; ROSS *et al.*, 2015).

A superexpressão da SK2 na linhagem tumoral HN12 de CECP, contribuiu ainda mais com o crescimento do tumor xenoenxerto nos camundongos nude. A marcação de Ki67 por imunocitoquímica e o número de figuras de mitose em 10 campos fotografados, indicaram que a SK2 induz ainda mais a proliferação nas células de CECP. Por fim, confirmamos que os tumores formados com células SK2 apresentaram também altos níveis de S1P, o que sugere o envolvimento do desbalanço de esfingolipídios em CECP, mas ressalta a relevância da SK2 no processo.

Conclusão

6. Conclusão

O nosso trabalho mostrou o efeito da superexpressão e do silenciamento da proteína SK2 em linhagens celulares de CECP (HN12 e HN13) e em queratinócito oral não-tumoral (NOK-SI). Nos resultados mostramos que a SK2 participa da regulação de diversas proteínas e genes envolvidos em ciclo celular, proliferação, sobrevivência, autofagia, fissão e metabolismo mitocondrial, TEM e fenótipo de célula tronco tumoral, todos estes são aspectos relacionados ao câncer.

Os principais alvos regulados nas linhagens epidermóides orais pela alteração nos níveis de SK2 foram p-AKT, p-ERK, p21, c-myc, p53, LC3, p62, p-AMPK, p-ULK1, H4 acetilada, MMP-2, MMP-9, gama-H2AX, ALDH1, CD44, p-DRP1, S1RP1 e S1P.

Nas células de CECP mostramos que o knockdown da SK2 na linhagem celular HN13 acelerou o processo autofágico, enquanto que a superexpressão de SK2 na HN12 aumentou o processo de macroautofagia/mitofagia. Apesar da alteração na morfologia mitocondrial, as células HN12 SK2 produziram mais ATP, indicando estarem com metabolismo ativo. No ensaio de formação de tumores xenoinxerto, mostramos que o aumento de SK2 na célula HN12, tumorigênica e metastática, formou tumores ainda maiores que os do grupo controle HN12 pLenti.

Na linhagem de queratinócito oral não-tumoral NOK-SI, mostramos que a superexpressão da SK2 aumentou o fluxo autofágico e induziu a fissão mitocondrial. As células NOK SK2 adquiriram características mesenquimais e de CTT, com um perfil metabólico característico ao de células tumorais. No ensaio de formação de tumores xenoinxerto, mostramos pela primeira vez que somente o aumento da proteína SK2 foi capaz de transformar queratinócito oral não-tumoral em uma célula tumorigênica com alta taxa proliferativa.

Sendo assim, propomos que em CECP, a SK2 contribui não só com o desenvolvimento, mas também com a progressão da doença para um fenótipo mais agressivo e/ou resistente à terapia.

Referências Bibliográficas

7. Referências Bibliográficas

ALMEIDA, L. O.; GOTO, R. N.; PESTANA, C. R.; UYEMURA, S. A. *et al.* SET overexpression decreases cell detoxification efficiency: ALDH2 and GSTP1 are downregulated, DDR is impaired and DNA damage accumulates. **FEBS J**, 279, n. 24, p. 4615-4628, Dec 2012.

ALMEIDA, L. O.; GUIMARÃES, D. M.; MARTINS, M. D.; MARTINS, M. A. T. *et al.* Unlocking the chromatin of adenoid cystic carcinomas using HDAC inhibitors sensitize cancer stem cells to cisplatin and induces tumor senescence. *Stem Cell Res*, 21, p. 94-105, 05 2017.

ANDING, A. L.; BAEHRECKE, E. H. Cleaning House: Selective Autophagy of Organelles. **Dev Cell**, 41, n. 1, p. 10-22, 04 10 2017.

ANTOON, J. W.; WHITE, M. D.; DRIVER, J. L.; BUROW, M. E. *et al.* Sphingosine kinase isoforms as a therapeutic target in endocrine therapy resistant luminal and basal-A breast cancer. **Exp Biol Med (Maywood)**, 237, n. 7, p. 832-844, Jul 2012.

BAE, Y. S.; OH, H.; RHEE, S. G.; YOO, Y. D. Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. **Mol Cells**, 32, n. 6, p. 491-509, Dec 2011.

BELJANSKI, V.; KNAAK, C.; ZHUANG, Y.; SMITH, C. D. Combined anticancer effects of sphingosine kinase inhibitors and sorafenib. **Invest New Drugs**, 29, n. 6, p. 1132-1142, Dec 2011.

BELJANSKI, V.; LEWIS, C. S.; SMITH, C. D. Antitumor activity of sphingosine kinase 2 inhibitor ABC294640 and sorafenib in hepatocellular carcinoma xenografts. **Cancer Biol Ther**, 11, n. 5, p. 524-534, Mar 2011.

BLAJESKI, A. L.; PHAN, V. A.; KOTTKE, T. J.; KAUFMANN, S. H. G(1) and G(2) cell-cycle arrest following microtubule depolymerization in human breast cancer cells. **J Clin Invest**, 110, n. 1, p. 91-99, Jul 2002.

BLOT, W. J.; MCLAUGHLIN, J. K.; WINN, D. M.; AUSTIN, D. F. *et al.* Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. **Cancer Res**, 48, n. 11, p. 3282-3287, Jun 01 1988.

BRAND, C. S.; TAN, V. P.; BROWN, J. H.; MIYAMOTO, S. RhoA regulates Drp1 mediated mitochondrial fission through ROCK to protect cardiomyocytes. **Cell Signal**, 50, p. 48-57, Oct 2018.

BRAND, M. D. Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. **Free Radic Biol Med**, 100, p. 14-31, 11 2016.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**, 68, n. 6, p. 394-424, 11 2018.

BRYANT, H. E.; SCHULTZ, N.; THOMAS, H. D.; PARKER, K. M. *et al.* Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. **Nature**, 434, n. 7035, p. 913-917, Apr 14 2005.

CANO, A.; PÉREZ-MORENO, M. A.; RODRIGO, I.; LOCASCIO, A. *et al.* The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. **Nat Cell Biol**, 2, n. 2, p. 76-83, Feb 2000.

CARDINALI, M.; PIETRASZKIEWICZ, H.; ENSLEY, J. F.; ROBBINS, K. C. Tyrosine phosphorylation as a marker for aberrantly regulated growth-promoting pathways in cell lines derived from head and neck malignancies. **Int J Cancer**, 61, n. 1, p. 98-103, Mar 29 1995.

CASTILHO, R. M.; SQUARIZE, C. H.; LEELAHAVANICHKUL, K.; ZHENG, Y. *et al.* Rac1 is required for epithelial stem cell function during dermal and oral mucosal wound healing but not for tissue homeostasis in mice. **PLoS One**, 5, n. 5, p. e10503, May 06 2010.

CHANG, F.; LEE, J. T.; NAVOLANIC, P. M.; STEELMAN, L. S. *et al.* Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. **Leukemia**, 17, n. 3, p. 590-603, Mar 2003.

CHEN, R. H.; CHEN, Y. H.; HUANG, T. Y. Ubiquitin-mediated regulation of autophagy. **J Biomed Sci**, 26, n. 1, p. 80, Oct 2019.

CHIOU, S. H.; YU, C. C.; HUANG, C. Y.; LIN, S. C. *et al.* Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma. **Clin Cancer Res**, 14, n. 13, p. 4085-4095, Jul 01 2008.

CHU, J. H.; GAO, Z. H.; QU, X. J. Down-regulation of sphingosine kinase 2 (SphK2) increases the effects of all-trans-retinoic acid (ATRA) on colon cancer cells. **Biomed Pharmacother**, 68, n. 8, p. 1089-1097, Oct 2014.

CHUMANEVICH, A. A.; POUDYAL, D.; CUI, X.; DAVIS, T. *et al.* Suppression of colitis-driven colon cancer in mice by a novel small molecule inhibitor of sphingosine kinase. **Carcinogenesis**, 31, n. 10, p. 1787-1793, Oct 2010.

CIAVARDELLI, D.; ROSSI, C.; BARCAROLI, D.; VOLPE, S. *et al.* Breast cancer stem cells rely on fermentative glycolysis and are sensitive to 2-deoxyglucose treatment. **Cell Death Dis**, 5, p. e1336, Jul 17 2014.

CUERVO, A. M.; WONG, E. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. **Cell Res**, 24, n. 1, p. 92-104, Jan 2014.

CUVILLIER, O. [Sphingosine 1-phosphate receptors: from biology to physiopathology]. **Med Sci (Paris)**, 28, n. 11, p. 951-957, Nov 2012.

CUVILLIER, O.; PIRIANOV, G.; KLEUSER, B.; VANEK, P. G. *et al.* Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. **Nature**, 381, n. 6585, p. 800-803, Jun 1996.

DESTRO RODRIGUES, M. F.; SEDASSARI, B. T.; ESTEVES, C. M.; DE ANDRADE, N. P. *et al.* Embryonic stem cells markers Oct4 and Nanog correlate with perineural invasion in human salivary gland mucoepidermoid carcinoma. **J Oral Pathol Med**, 46, n. 2, p. 112-120, Feb 2017.

DING, G.; SONODA, H.; YU, H.; KAJIMOTO, T. *et al.* Protein kinase D-mediated phosphorylation and nuclear export of sphingosine kinase 2. **J Biol Chem**, 282, n. 37, p. 27493-27502, Sep 14 2007.

DRESSLER, K. A.; MATHIAS, S.; KOLESNICK, R. N. Tumor necrosis factor-alpha activates the sphingomyelin signal transduction pathway in a cell-free system. **Science**, 255, n. 5052, p. 1715-1718, Mar 1992.

EBENEZER, D. L.; BERDYSHEV, E. V.; BRONOVA, I. A.; LIU, Y. *et al.* stimulates nuclear sphingosine-1-phosphate generation and epigenetic regulation of lung inflammatory injury. **Thorax**, 74, n. 6, p. 579-591, 06 2019.

EGAN, D. F.; SHACKELFORD, D. B.; MIHAYLOVA, M. M.; GELINO, S. *et al.* Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. **Science**, 331, n. 6016, p. 456-461, Jan 28 2011.

FABER, A.; BARTH, C.; HÖRMANN, K.; KASSNER, S. *et al.* CD44 as a stem cell marker in head and neck squamous cell carcinoma. **Oncol Rep**, 26, n. 2, p. 321-326, Aug 2011.

FANTUS, D.; ROGERS, N. M.; GRAHAMMER, F.; HUBER, T. B. *et al.* Roles of mTOR complexes in the kidney: implications for renal disease and transplantation. **Nat Rev Nephrol**, 12, n. 10, p. 587-609, 10 2016.

FERLAY, J.; COLOMBET, M.; SOERJOMATARAM, I.; MATHERS, C. *et al.* Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **Int J Cancer**, 144, n. 8, p. 1941-1953, 04 15 2019.

FRENCH, K. J.; ZHUANG, Y.; MAINES, L. W.; GAO, P. *et al.* Pharmacology and antitumor activity of ABC294640, a selective inhibitor of sphingosine kinase-2. **J Pharmacol Exp Ther**, 333, n. 1, p. 129-139, Apr 2010.

FU, W.; LIU, Y.; YIN, H. Mitochondrial Dynamics: Biogenesis, Fission, Fusion, and Mitophagy in the Regulation of Stem Cell Behaviors. **Stem Cells Int**, 2019, p. 9757201, 2019.

FUGIO, L. B.; COELI-LACCHINI, F. B.; LEOPOLDINO, A. M. Sphingolipids and Mitochondrial Dynamic. **Cells**, 9, n. 3, Mar 2020.

GALLUZZI, L.; PIETROCOLA, F.; BRAVO-SAN PEDRO, J. M.; AMARAVADI, R. K. *et al.* Autophagy in malignant transformation and cancer progression. **EMBO J**, 34, n. 7, p. 856-880, Apr 01 2015.

GARVALOV, B. K.; ACKER, T. Cancer stem cells: a new framework for the design of tumor therapies. **J Mol Med (Berl)**, 89, n. 2, p. 95-107, Feb 2011.

GIACINTI, C.; GIORDANO, A. RB and cell cycle progression. **Oncogene**, 25, n. 38, p. 5220-5227, Aug 28 2006.

GLICK, D.; BARTH, S.; MACLEOD, K. F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. **J Pathol**, 221, n. 1, p. 3-12, May 2010.

GOTO, R. N.; SOBRAL, L. M.; STRINGHETTA-PADOVANI, K.; GARCIA, C. B. *et al.* Synergic effect of OP449 and FTY720 on oral squamous cell carcinoma. **Eur J Pharmacol**, 882, p. 173268, Sep 05 2020.

GUAN, Y.; WANG, Y.; LI, B.; SHEN, K. *et al.* Mitophagy in carcinogenesis, drug resistance and anticancer therapeutics. **Cancer Cell Int**, 21, n. 1, p. 350, Jul 05 2021.

HAIT, N. C.; ALLEGOOD, J.; MACEYKA, M.; STRUB, G. M. *et al.* Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate. **Science**, 325, n. 5945, p. 1254-1257, Sep 2009.

HAIT, N. C.; BELLAMY, A.; MILSTIEN, S.; KORDULA, T. *et al.* Sphingosine kinase type 2 activation by ERK-mediated phosphorylation. **J Biol Chem**, 282, n. 16, p. 12058-12065, Apr 2007.

HAIT, N. C.; SARKAR, S.; LE STUNFF, H.; MIKAMI, A. *et al.* Role of sphingosine kinase 2 in cell migration toward epidermal growth factor. **J Biol Chem**, 280, n. 33, p. 29462-29469, Aug 2005.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, 144, n. 5, p. 646-674, Mar 04 2011.

HANNUN, Y. A.; BELL, R. M. Lysosphingolipids inhibit protein kinase C: implications for the sphingolipidoses. **Science**, 235, n. 4789, p. 670-674, Feb 1987.

HANNUN, Y. A.; OBEID, L. M. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 9, n. 2, p. 139-150, Feb 2008.

HASANIFARD, L.; SHEERVALILOU, R.; MAJIDINIA, M.; YOUSEFI, B. New insights into the roles and regulation of SphK2 as a therapeutic target in cancer chemoresistance. **J Cell Physiol**, 234, n. 6, p. 8162-8181, 06 2019.

HERNÁNDEZ-CORBACHO, M. J.; SALAMA, M. F.; CANALS, D.; SENKAL, C. E. *et al.* Sphingolipids in mitochondria. **Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids**, 1862, n. 1, p. 56-68, Jan 2017.

HLA, T.; BRINKMANN, V. Sphingosine 1-phosphate (S1P): Physiology and the effects of S1P receptor modulation. **Neurology**, 76, n. 8 Suppl 3, p. S3-8, Feb 2011.

HOLLAND, T. A.; ELDER, J.; MCCLOUD, J. M.; HALL, C. *et al.* Subcellular localisation of cyclin D1 protein in colorectal tumours is associated with p21(WAF1/CIP1)

expression and correlates with patient survival. **Int J Cancer**, 95, n. 5, p. 302-306, Sep 20 2001.

IGARASHI, N.; OKADA, T.; HAYASHI, S.; FUJITA, T. *et al.* Sphingosine kinase 2 is a nuclear protein and inhibits DNA synthesis. **J Biol Chem**, 278, n. 47, p. 46832-46839, Nov 2003.

ISHIMARU, K.; YOSHIOKA, K.; KANO, K.; KURANO, M. *et al.* Sphingosine kinase-2 prevents macrophage cholesterol accumulation and atherosclerosis by stimulating autophagic lipid degradation. **Sci Rep**, 9, n. 1, p. 18329, 12 04 2019.

JIA, D.; LU, M.; JUNG, K. H.; PARK, J. H. *et al.* Elucidating cancer metabolic plasticity by coupling gene regulation with metabolic pathways. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 116, n. 9, p. 3909-3918, 02 26 2019.

JIA, Z. H.; JIA, Y.; GUO, F. J.; CHEN, J. *et al.* Phosphorylation of STAT3 at Tyr705 regulates MMP-9 production in epithelial ovarian cancer. **PLoS One**, 12, n. 8, p. e0183622, 2017.

JIN, S. M.; LAZAROU, M.; WANG, C.; KANE, L. A. *et al.* Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. **J Cell Biol**, 191, n. 5, p. 933-942, Nov 29 2010.

JOHNSON, D. E.; BURTNES, B.; LEEMANS, C. R.; LUI, V. W. Y. *et al.* Head and neck squamous cell carcinoma. **Nat Rev Dis Primers**, 6, n. 1, p. 92, 11 26 2020.

JOHNSON, K. R.; BECKER, K. P.; FACCHINETTI, M. M.; HANNUN, Y. A. *et al.* PKC-dependent activation of sphingosine kinase 1 and translocation to the plasma membrane. Extracellular release of sphingosine-1-phosphate induced by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). **J Biol Chem**, 277, n. 38, p. 35257-35262, Sep 2002.

JUNG, Y. S.; QIAN, Y.; CHEN, X. Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity. **Cell Signal**, 22, n. 7, p. 1003-1012, Jul 2010.

KADENBACH, B. Complex IV - The regulatory center of mitochondrial oxidative phosphorylation. **Mitochondrion**, 58, p. 296-302, 05 2021.

KARIMIAN, A.; AHMADI, Y.; YOUSEFI, B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. **DNA Repair (Amst)**, 42, p. 63-71, 06 2016.

KAUR, J.; DEBNATH, J. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 16, n. 8, p. 461-472, Aug 2015.

KIM, J.; KUNDU, M.; VIOLLET, B.; GUAN, K. L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. **Nat Cell Biol**, 13, n. 2, p. 132-141, Feb 2011.

KIM, J. Y.; KIM, K. B.; SON, H. J.; CHAE, Y. C. *et al.* H3K27 methylation and H3S28 phosphorylation-dependent transcriptional regulation by INHAT subunit SET/TAF- β . **FEBS Lett**, 586, n. 19, p. 3159-3165, Sep 21 2012.

KLIONSKY, D. J.; ABDELMOHSEN, K.; ABE, A.; ABEDIN, M. J. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). **Autophagy**, 12, n. 1, p. 1-222, 2016.

KOPPENOL, W. H.; BOUNDS, P. L.; DANG, C. V. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. **Nat Rev Cancer**, 11, n. 5, p. 325-337, May 2011.

KRISHNAMURTHY, S.; DONG, Z.; VODOPYANOV, D.; IMAI, A. *et al.* Endothelial cell-initiated signaling promotes the survival and self-renewal of cancer stem cells. **Cancer Res**, 70, n. 23, p. 9969-9978, Dec 01 2010.

LAI, X.; LI, Q.; WU, F.; LIN, J. *et al.* Epithelial-Mesenchymal Transition and Metabolic Switching in Cancer: Lessons From Somatic Cell Reprogramming. **Front Cell Dev Biol**, 8, p. 760, 2020.

LAMB, C. A.; YOSHIMORI, T.; TOOZE, S. A. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 14, n. 12, p. 759-774, Dec 2013.

LAVIEU, G.; SCARLATTI, F.; SALA, G.; CARPENTIER, S. *et al.* Regulation of autophagy by sphingosine kinase 1 and its role in cell survival during nutrient starvation. **J Biol Chem**, 281, n. 13, p. 8518-8527, Mar 31 2006.

LECLERCQ, T. M.; PITSON, S. M. Cellular signalling by sphingosine kinase and sphingosine 1-phosphate. **IUBMB Life**, 58, n. 8, p. 467-472, Aug 2006.

LEE, H.; YOON, Y. Mitochondrial fission and fusion. **Biochem Soc Trans**, 44, n. 6, p. 1725-1735, 12 2016.

LEE, M. J.; VAN BROCKLYN, J. R.; THANGADA, S.; LIU, C. H. *et al.* Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1. **Science**, 279, n. 5356, p. 1552-1555, Mar 1998.

LEVINE, A. J.; OREN, M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. **Nat Rev Cancer**, 9, n. 10, p. 749-758, 10 2009.

LEVY, J. M. M.; TOWERS, C. G.; THORBURN, A. Targeting autophagy in cancer. **Nat Rev Cancer**, 17, n. 9, p. 528-542, 09 2017.

LI, M.; GUO, H.; DAMUNI, Z. Purification and characterization of two potent heat-stable protein inhibitors of protein phosphatase 2A from bovine kidney. **Biochemistry**, 34, n. 6, p. 1988-1996, Feb 14 1995.

LIBERTI, M. V.; LOCASALE, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? **Trends Biochem Sci**, 41, n. 3, p. 211-218, Mar 2016.

LIMA, S.; TAKABE, K.; LEOPOLDINO, A. M.; NEWTON, J. *et al.* Sphingosine kinase 1 inhibition modulates crosstalk between p53 and autophagic cell death. **Faseb Journal**, 31, APR 2017 2017.

LIMA, S.; TAKABE, K.; NEWTON, J.; SAURABH, K. *et al.* TP53 is required for BECN1- and ATG5-dependent cell death induced by sphingosine kinase 1 inhibition. **Autophagy**, p. 1-16, Mar 2018.

LIU, G. Y.; STORZ, P. Reactive oxygen species in cancer. **Free Radic Res**, 44, n. 5, p. 479-496, May 2010.

LIU, H.; TOMAN, R. E.; GOPARAJU, S. K.; MACEYKA, M. *et al.* Sphingosine kinase type 2 is a putative BH3-only protein that induces apoptosis. **J Biol Chem**, 278, n. 41, p. 40330-40336, Oct 2003.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biol**, 15, n. 12, p. 550, 2014.

MA, I.; ALLAN, A. L. The role of human aldehyde dehydrogenase in normal and cancer stem cells. **Stem Cell Rev Rep**, 7, n. 2, p. 292-306, Jun 2011.

MACEYKA, M.; HARIKUMAR, K. B.; MILSTIEN, S.; SPIEGEL, S. Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. **Trends Cell Biol**, 22, n. 1, p. 50-60, Jan 2012.

MACEYKA, M.; SANKALA, H.; HAIT, N. C.; LE STUNFF, H. *et al.* SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. **J Biol Chem**, 280, n. 44, p. 37118-37129, Nov 2005.

MARTIN, D.; ABBA, M. C.; MOLINOLO, A. A.; VITALE-CROSS, L. *et al.* The head and neck cancer cell oncogenome: a platform for the development of precision molecular therapies. **Oncotarget**, 5, n. 19, p. 8906-8923, Oct 15 2014.

MELSER, S.; LAVIE, J.; BÉNARD, G. Mitochondrial degradation and energy metabolism. **Biochim Biophys Acta**, 1853, n. 10 Pt B, p. 2812-2821, Oct 2015.

MENDELSON, K.; ZYGMUNT, T.; TORRES-VÁZQUEZ, J.; EVANS, T. *et al.* Sphingosine 1-phosphate receptor signaling regulates proper embryonic vascular patterning. **J Biol Chem**, 288, n. 4, p. 2143-2156, Jan 25 2013.

MIJIT, M.; CARACCILOLO, V.; MELILLO, A.; AMICARELLI, F. *et al.* Role of p53 in the Regulation of Cellular Senescence. **Biomolecules**, 10, n. 3, 03 08 2020.

MILLER, A. V.; ALVAREZ, S. E.; SPIEGEL, S.; LEBMAN, D. A. Sphingosine kinases and sphingosine-1-phosphate are critical for transforming growth factor beta-induced extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 activation and promotion of migration and invasion of esophageal cancer cells. **Mol Cell Biol**, 28, n. 12, p. 4142-4151, Jun 2008.

MILLER, D. M.; THOMAS, S. D.; ISLAM, A.; MUENCH, D. *et al.* c-Myc and cancer metabolism. **Clin Cancer Res**, 18, n. 20, p. 5546-5553, Oct 15 2012.

MUKHERJEE, A.; SRERE, P. A.; FRENKEL, E. P. Studies of the mechanism by which hepatic citrate synthase activity increases in vitamin B12 deprivation. **J Biol Chem**, v.

251, n. 7, p. 2155-60, Apr 1976.

MURDOCH, D. Standard, and novel cytotoxic and molecular-targeted, therapies for HNSCC: an evidence-based review. **Curr Opin Oncol**, 19, n. 3, p. 216-221, May 2007.

NAKANO, K.; VOUSDEN, K. H. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. **Mol Cell**, 7, n. 3, p. 683-694, Mar 2001.

NEMA, R.; VISHWAKARMA, S.; AGARWAL, R.; PANDAY, R. K. *et al.* Emerging role of sphingosine-1-phosphate signaling in head and neck squamous cell carcinoma. **Onco Targets Ther**, 9, p. 3269-3280, 2016.

NETWORK, C. G. A. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. **Nature**, 517, n. 7536, p. 576-582, Jan 29 2015.

NEUBAUER, H. A.; PITSON, S. M. Roles, regulation and inhibitors of sphingosine kinase 2. **FEBS J**, 280, n. 21, p. 5317-5336, Nov 2013.

NIETO, M. A.; HUANG, R. Y.; JACKSON, R. A.; THIERY, J. P. EMT: 2016. **Cell**, 166, n. 1, p. 21-45, Jun 30 2016.

NISHI, T.; KOBAYASHI, N.; HISANO, Y.; KAWAHARA, A. *et al.* Molecular and physiological functions of sphingosine 1-phosphate transporters. **Biochim Biophys Acta**, 1841, n. 5, p. 759-765, May 2014.

OAKS, J.; OGRETMEN, B. Regulation of PP2A by Sphingolipid Metabolism and Signaling. **Front Oncol**, 4, p. 388, 2014.

OGRETMEN, B. Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy. **Nat Rev Cancer**, 18, n. 1, p. 33-50, Jan 2018.

OGRETMEN, B.; HANNUN, Y. A. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. **Nat Rev Cancer**, 4, n. 8, p. 604-616, Aug 2004.

OUCHIDA, A. T.; UYEMURA, V. T.; QUEIROZ, A. L.; BRAUER, V. S. *et al.* SET protein accumulation prevents cell death in head and neck squamous cell carcinoma through regulation of redox state and autophagy. **Biochim Biophys Acta Mol Cell Res**, 1866, n. 4, p. 623-637, 04 2019.

PAN, J.; TAO, Y. F.; ZHOU, Z.; CAO, B. R. *et al.* An novel role of sphingosine kinase-1 (SPHK1) in the invasion and metastasis of esophageal carcinoma. **J Transl Med**, 9, p. 157, Sep 22 2011.

PANIGRAHI, D. P.; PRAHARAJ, P. P.; BHOL, C. S.; MAHAPATRA, K. K. *et al.* The emerging, multifaceted role of mitophagy in cancer and cancer therapeutics. **Semin Cancer Biol**, 66, p. 45-58, 11 2020.

- PARK, J. H.; VITHAYATHIL, S.; KUMAR, S.; SUNG, P. L. *et al.* Fatty Acid Oxidation-Driven Src Links Mitochondrial Energy Reprogramming and Oncogenic Properties in Triple-Negative Breast Cancer. **Cell Rep**, 14, n. 9, p. 2154-2165, Mar 08 2016.
- PATWARDHAN, G. A.; BEVERLY, L. J.; SISKIND, L. J. Sphingolipids and mitochondrial apoptosis. **J Bioenerg Biomembr**, 48, n. 2, p. 153-168, Apr 2016.
- PERERA, R. M.; STOYKOVA, S.; NICOLAY, B. N.; ROSS, K. N. *et al.* Transcriptional control of autophagy-lysosome function drives pancreatic cancer metabolism. **Nature**, 524, n. 7565, p. 361-365, Aug 20 2015.
- PITMAN, M. R.; PITSON, S. M. Inhibitors of the sphingosine kinase pathway as potential therapeutics. **Curr Cancer Drug Targets**, 10, n. 4, p. 354-367, Jun 2010.
- PYNE, N. J.; PYNE, S. Sphingosine 1-phosphate and cancer. **Nat Rev Cancer**, 10, n. 7, p. 489-503, Jul 2010.
- PYNE, N. J.; PYNE, S. Recent advances in the role of sphingosine 1-phosphate in cancer. **FEBS Lett**, 594, n. 22, p. 3583-3601, 11 2020.
- REBECCA, V. W.; AMARAVADI, R. K. Emerging strategies to effectively target autophagy in cancer. **Oncogene**, 35, n. 1, p. 1-11, Jan 07 2016.
- RIZZINO, A.; WUEBBEN, E. L. Sox2/Oct4: A delicately balanced partnership in pluripotent stem cells and embryogenesis. **Biochim Biophys Acta**, 1859, n. 6, p. 780-791, Jun 2016.
- ROGOV, V.; DÖTSCH, V.; JOHANSEN, T.; KIRKIN, V. Interactions between autophagy receptors and ubiquitin-like proteins form the molecular basis for selective autophagy. **Mol Cell**, 53, n. 2, p. 167-178, Jan 23 2014.
- RUFINI, A.; TUCCI, P.; CELARDO, I.; MELINO, G. Senescence and aging: the critical roles of p53. **Oncogene**, 32, n. 43, p. 5129-5143, Oct 2013.
- SANDOVAL, H.; THIAGARAJAN, P.; DASGUPTA, S. K.; SCHUMACHER, A. *et al.* Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. **Nature**, 454, n. 7201, p. 232-235, Jul 10 2008.
- SARLAK, G.; VINCENT, B. The Roles of the Stem Cell-Controlling Sox2 Transcription Factor: from Neuroectoderm Development to Alzheimer's Disease? **Mol Neurobiol**, 53, n. 3, p. 1679-1698, Apr 2016.
- SEINO, S.; SHIGEISHI, H.; HASHIKATA, M.; HIGASHIKAWA, K. *et al.* CD44(high)/ALDH1(high) head and neck squamous cell carcinoma cells exhibit mesenchymal characteristics and GSK3 β -dependent cancer stem cell properties. **J Oral Pathol Med**, 45, n. 3, p. 180-188, Mar 2016.
- SENTELLE, R. D.; SENKAL, C. E.; JIANG, W.; PONNUSAMY, S. *et al.* Ceramide targets autophagosomes to mitochondria and induces lethal mitophagy. **Nat Chem Biol**, 8, n. 10, p. 831-838, Oct 2012.

SHARMA, K.; VU, T. T.; COOK, W.; NASERI, M. *et al.* p53-independent Noxa induction by cisplatin is regulated by ATF3/ATF4 in head and neck squamous cell carcinoma cells. **Mol Oncol**, 12, n. 6, p. 788-798, 06 2018.

SILVERSTEIN, A. M.; BARROW, C. A.; DAVIS, A. J.; MUMBY, M. C. Actions of PP2A on the MAP kinase pathway and apoptosis are mediated by distinct regulatory subunits. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 99, n. 7, p. 4221-4226, Apr 02 2002.

SINHA, U. K.; SCHORN, V. J.; HOCHSTIM, C.; CHINN, S. B. *et al.* Increased radiation sensitivity of head and neck squamous cell carcinoma with sphingosine kinase 1 inhibition. **Head Neck**, 33, n. 2, p. 178-188, Feb 2011.

SKRTIĆ, M.; SRISKANTHADEVAN, S.; JHAS, B.; GEBBIA, M. *et al.* Inhibition of mitochondrial translation as a therapeutic strategy for human acute myeloid leukemia. **Cancer Cell**, 20, n. 5, p. 674-688, Nov 15 2011.

SOBRAL, L. M.; COLETTA, R. D.; ALBERICI, L. C.; CURTI, C. *et al.* SET/12PP2A overexpression induces phenotypic, molecular, and metabolic alterations in an oral keratinocyte cell line. **Febs Journal**, 284, n. 17, p. 2774-2785, SEP 2017 2017.

SOBRAL, L. M.; SOUSA, L. O.; COLETTA, R. D.; CABRAL, H. *et al.* Stable SET knockdown in head and neck squamous cell carcinoma promotes cell invasion and the mesenchymal-like phenotype in vitro, as well as necrosis, cisplatin sensitivity and lymph node metastasis in xenograft tumor models. **Mol Cancer**, 13, n. 1, p. 32, 2014.

SONG, D. D.; ZHANG, T. T.; CHEN, J. L.; XIA, Y. F. *et al.* Sphingosine kinase 2 activates autophagy and protects neurons against ischemic injury through interaction with Bcl-2 via its putative BH3 domain. **Cell Death Dis**, 8, n. 7, p. e2912, 07 2017.

STOLZ, A.; ERNST, A.; DIKIC, I. Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. **Nat Cell Biol**, 16, n. 6, p. 495-501, Jun 2014.

STRUB, G. M.; PAILLARD, M.; LIANG, J.; GOMEZ, L. *et al.* Sphingosine-1-phosphate produced by sphingosine kinase 2 in mitochondria interacts with prohibitin 2 to regulate complex IV assembly and respiration. **FASEB J**, 25, n. 2, p. 600-612, Feb 2011.

SU, W. P.; LO, Y. C.; YAN, J. J.; LIAO, I. C. *et al.* Mitochondrial uncoupling protein 2 regulates the effects of paclitaxel on Stat3 activation and cellular survival in lung cancer cells. **Carcinogenesis**, 33, n. 11, p. 2065-2075, Nov 2012.

TAKABE, K.; PAUGH, S. W.; MILSTIEN, S.; SPIEGEL, S. "Inside-out" signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets. **Pharmacol Rev**, 60, n. 2, p. 181-195, Jun 2008.

TAMASHIRO, P. M.; FURUYA, H.; SHIMIZU, Y.; IINO, K. *et al.* The impact of sphingosine kinase-1 in head and neck cancer. **Biomolecules**, 3, n. 3, p. 481-513, 2013.

TAMASHIRO, P. M.; FURUYA, H.; SHIMIZU, Y.; KAWAMORI, T. Sphingosine kinase 1 mediates head & neck squamous cell carcinoma invasion through sphingosine 1-phosphate receptor 1. **Cancer Cell Int**, 14, n. 1, p. 76, 2014.

TANIGUCHI, M.; KITATANI, K.; KONDO, T.; HASHIMOTO-NISHIMURA, M. *et al.* Regulation of autophagy and its associated cell death by "sphingolipid rheostat": reciprocal role of ceramide and sphingosine 1-phosphate in the mammalian target of rapamycin pathway. **J Biol Chem**, 287, n. 47, p. 39898-39910, Nov 2012.

THANKAMONY, A. P.; SAXENA, K.; MURALI, R.; JOLLY, M. K. *et al.* Cancer Stem Cell Plasticity - A Deadly Deal. **Front Mol Biosci**, 7, p. 79, 2020.

TRAYSSAC, M.; HANNUN, Y. A.; OBEID, L. M. Role of sphingolipids in senescence: implication in aging and age-related diseases. **J Clin Invest**, 128, n. 7, p. 2702-2712, 07 2018.

URESHINO, R. P.; ROCHA, K. K.; LOPES, G. S.; BINCOLETTO, C. *et al.* Calcium signaling alterations, oxidative stress, and autophagy in aging. **Antioxid Redox Signal**, 21, n. 1, p. 123-137, Jul 01 2014.

VOUSDEN, K. H.; PRIVES, C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. **Cell**, 137, n. 3, p. 413-431, May 01 2009.

VU, T. M.; ISHIZU, A. N.; FOO, J. C.; TOH, X. R. *et al.* Mfsd2b is essential for the sphingosine-1-phosphate export in erythrocytes and platelets. **Nature**, 550, n. 7677, p. 524-528, 10 26 2017.

WACKER, B. K.; PARK, T. S.; GIDDAY, J. M. Hypoxic preconditioning-induced cerebral ischemic tolerance: role of microvascular sphingosine kinase 2. **Stroke**, 40, n. 10, p. 3342-3348, Oct 2009.

WALLINGTON-BEDDOE, C. T.; POWELL, J. A.; TONG, D.; PITSON, S. M. *et al.* Sphingosine kinase 2 promotes acute lymphoblastic leukemia by enhancing MYC expression. **Cancer Res**, 74, n. 10, p. 2803-2815, May 15 2014.

WANG, X.; KUA, H. Y.; HU, Y.; GUO, K. *et al.* p53 functions as a negative regulator of osteoblastogenesis, osteoblast-dependent osteoclastogenesis, and bone remodeling. **J Cell Biol**, 172, n. 1, p. 115-125, Jan 2006.

WANG, Z.; VALERA, J. C.; ZHAO, X.; CHEN, Q. *et al.* mTOR co-targeting strategies for head and neck cancer therapy. **Cancer Metastasis Rev**, 36, n. 3, p. 491-502, 09 2017.

WEIGERT, A.; SCHIFFMANN, S.; SEKAR, D.; LEY, S. *et al.* Sphingosine kinase 2 deficient tumor xenografts show impaired growth and fail to polarize macrophages towards an anti-inflammatory phenotype. **Int J Cancer**, 125, n. 9, p. 2114-2121, Nov 2009.

WILLIAMS, A. B.; SCHUMACHER, B. p53 in the DNA-Damage-Repair Process. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 6, n. 5, 05 02 2016.

- WONG, P. M.; FENG, Y.; WANG, J.; SHI, R. *et al.* Regulation of autophagy by coordinated action of mTORC1 and protein phosphatase 2A. **Nat Commun**, 6, p. 8048, Aug 27 2015.
- XIE, T. X.; WEI, D.; LIU, M.; GAO, A. C. *et al.* Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis. **Oncogene**, 23, n. 20, p. 3550-3560, Apr 29 2004.
- XIE, Z.; KLIONSKY, D. J. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. **Nat Cell Biol**, 9, n. 10, p. 1102-1109, Oct 2007.
- YANG, C.; HASHIMOTO, M.; LIN, Q. X. X.; TAN, D. Q. *et al.* Sphingosine-1-phosphate signaling modulates terminal erythroid differentiation through the regulation of mitophagy. **Exp Hematol**, 72, p. 47-59.e41, 04 2019.
- YANG, S.; WANG, X.; CONTINO, G.; LIESA, M. *et al.* Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. **Genes Dev**, 25, n. 7, p. 717-729, Apr 01 2011.
- YANG, Y.; WANG, C.; ZHAO, K.; ZHANG, G. *et al.* TRMP, a p53-inducible long noncoding RNA, regulates G1/S cell cycle progression by modulating IRES-dependent p27 translation. **Cell Death Dis**, 9, n. 9, p. 886, 08 2018.
- YOULE, R. J.; NARENDRA, D. P. Mechanisms of mitophagy. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 12, n. 1, p. 9-14, Jan 2011.
- YOULE, R. J.; VAN DER BLIEK, A. M. Mitochondrial fission, fusion, and stress. **Science**, 337, n. 6098, p. 1062-1065, Aug 31 2012.
- YOUNG, M. M.; KESTER, M.; WANG, H. G. Sphingolipids: regulators of crosstalk between apoptosis and autophagy. **J Lipid Res**, 54, n. 1, p. 5-19, Jan 2013.
- YOUNG, M. M.; WANG, H. G. Sphingolipids as Regulators of Autophagy and Endocytic Trafficking. **Adv Cancer Res**, 140, p. 27-60, 2018.
- YU, L.; LU, M.; JIA, D.; MA, J. *et al.* Modeling the Genetic Regulation of Cancer Metabolism: Interplay between Glycolysis and Oxidative Phosphorylation. **Cancer Res**, 77, n. 7, p. 1564-1574, 04 01 2017.
- YU, S. S.; CIRILLO, N. The molecular markers of cancer stem cells in head and neck tumors. **J Cell Physiol**, 235, n. 1, p. 65-73, 01 2020.
- ZHANG, L. W.; LI, J.; CONG, X.; HU, X. S. *et al.* Incidence and mortality trends in oral and oropharyngeal cancers in China, 2005-2013. **Cancer Epidemiol**, 57, p. 120-126, 12 2018.
- ZHI, X.; ZHONG, Q. Autophagy in cancer. **F1000Prime Rep**, 7, p. 18, 2015.
- ZOROVA, L. D.; POPKOV, V. A.; PLOTNIKOV, E. Y.; SILACHEV, D. N. *et al.* Mitochondrial membrane potential. **Anal Biochem**, 552, p. 50-59, 07 01 2018.

