

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

GABRIELA MELO VIEIRA BRAGA

**Análise de expressão de miRNAs potencialmente associados com câncer oral
e esfingosina quinase 2 em linhagem de queratinócito oral**

Ribeirão Preto
2022

GABRIELA MELO VIEIRA BRAGA

**Análise de expressão de miRNAs potencialmente associados com câncer oral
e esfingosina quinase 2 em linhagem de queratinócito oral**

Versão original

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto para a obtenção da
graduação de bacharel em Ciências
Biomédicas com ênfase em Ciências
Básicas em Saúde.

Área de Concentração: Saúde

Orientadora: Profa. Dra. Andréia Machado
Leopoldino

Co-orientador: Dr. Gabriel da Silva

Ribeirão Preto
2022

Autorizo a reprodução e divulgação total deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte. A inclusão deste trabalho na Biblioteca Digital foi aprovada pela Comissão Coordenadora do Curso em sua 63^a Sessão Ordinária, realizada em 31/10/2022.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos do Laboratório de Marcadores e Sinalização Celular no Câncer, especialmente à Profa. Dra. Andréia e ao Dr. Gabriel, verdadeiros exemplos de dedicação à pesquisa.

À minha família e amigos que apoiaram minhas escolhas e deram forças para que continuasse, mesmo em momentos caóticos.

Ao CNPq (#121665/2022-4), pelo auxílio financeiro.

E claro, agradeço a todos os professores que contribuíram com a minha formação até aqui.

RESUMO

BRAGA, G. M. V. **Análise funcional de miRNAs potencialmente associados com câncer oral e esfingosina quinase 2 em linhagem de queratinócito oral.** 2022. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

O câncer oral corresponde a 2% dos casos de câncer diagnosticados por ano mundialmente, sendo a principal neoplasia maligna de cabeça e pescoço. Resultados recentes de sequenciamento em larga escala de micro RNAs (miR) obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, revelaram que a esfingosina quinase 2 (SK2), que está alterada no câncer oral, altera os níveis dos miR-296-5p e miR-205-5p em queratinócitos orais não tumorais imortalizados (NOK). Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi verificar se o aumento de miR-205-5p ou a redução de miR-296-5p poderia reverter algumas das ações da SK2 em células NOK relacionadas ao câncer oral. A partir da análise de dados do TCGA, verificamos que os dois miRNAs selecionados estão associados com sobrevida de pacientes com câncer de cabeça e pescoço. Células NOK com superexpressão da SK2 (NOK/SK2) foram transfectadas com miR-205-5p mimético, inibidor de miR-296-5p e controle negativo, e o aumento do miR-205-5p e redução do miR-296-5p foram confirmados por PCR em tempo real. As células NOK/SK2 com alteração nos níveis de ambos miRNAs alvos apresentaram redução na capacidade de formação de esferóides na cultura 3D em relação ao controle, o que foi acompanhado pela alteração nos níveis de proteínas envolvidas na transição epitélio-mesenquimal (TEM; tais como, N-caderina, Snail e vimentina) e no fenótipo de célula-tronco tumoral (ALDH1). A redução de vimentina e ALDH1 foi confirmada por imunofluorescência e microscopia confocal, nas células transfectadas com o inibidor de miR-296-5p. Análises de viabilidade celular por citometria de fluxo de células marcadas com anexina-V e iodeto de propídeo não mostraram diferenças entre as células NOK-SK2 com alteração nos níveis dos miRNAs alvos e controle. Com base nos resultados obtidos, propomos que ambos miR-205-5p e o miR-296-5p estão envolvidos com ações da SK2. Entretanto, destacamos que o miR-296-5p tem maior impacto em diferentes vias associadas a SK2 e ao câncer oral, como TEM e fenótipo de célula-tronco tumoral. Outros estudos devem ser realizados em linhagens

tumorais de câncer oral para avaliar se os miRNAs selecionados podem ser potenciais alvos terapêuticos.

Palavras-chave: miRNA. Câncer oral. Esfingolipídios. Esfingosina quinase 2. Célula-tronco tumoral.

ABSTRACT

BRAGA, G. M. V. **Expression analysis of miRNAs potentially associated with oral cancer and sphingosine kinase 2 in oral keratinocyte lineage**. 2022. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Oral cancer accounts to 2% of cancer cases diagnosed per year worldwide, being the main head and neck malignant neoplasm. Recent results from our research group identified a potential relationship between sphingosine kinase 2 (SK2), which is altered in oral cancer, as miR-296-5p and miR-205-5p, in immortalized normal oral keratinocytes (NOK). Thus, the aim of the present study was to evaluate miR-205-5p and miR-296-5p role in SK2 functions related to oral cancer. From the analysis of TCGA data, we found that the two selected miRNAs are associated with survival of patients with head and neck cancer. NOK cells with SK2 overexpression (NOK/SK2) transfected with mimetic miR-205-5p or miR-296-5p inhibitor or control were used in order to increase the action of miR-205-5p and reducing miR-296-5p, thus reversing some of the SK2-induced functional changes in NOK. After confirming the target miRNAs levels by real-time PCR, NOK/SK2 cells showed a lower spheroids formation ability in 3D culture compared to the control, which was accompanied by a change in proteins levels associated with epithelium-mesenchymal transition (such as N-cadherin, Snail and vimentin) and tumor stem cell phenotype (ALDH1). Vimentin and ALDH1 reduction was also confirmed by immunofluorescence and confocal microscopy, in cells transfected with the miR-296-5p inhibitor. Through annexin-V and propidium iodide labeling assay and analysis by flow cytometry, no difference was identified between cells with alteration in the two target miRNAs. Based on these results obtained, we propose that both miR-205-5p and miR-296-5p are involved in SK2 actions, but miR-296-5p acts more significantly in different pathways associated with oral cancer, such as EMT and tumor stem cell. Further studies should be performed in oral cancer tumor cell lines to evaluate the two miRNAs as potential therapeutic targets.

Keywords: miRNA. Oral cancer. Sphingolipids. Sphingosine kinase 2. Tumor stem cell.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1. Câncer oral e epidemiologia.....	10
1.2. Patologia do câncer oral.....	11
1.3. Esfingosina quinase 2 (SK2).....	12
1.4. MicroRNAs.....	13
2. HIPÓTESE.....	15
3. OBJETIVOS.....	15
3.1. Objetivo geral.....	15
3.2. Objetivos específicos.....	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4.1. Análise de dados do TCGA.....	16
4.2. Linhagens celulares.....	16
4.3. Transfecção das células.....	17
4.4. Ensaio com composto ABC294640.....	17
4.5. Extração de RNA.....	17
4.6. Síntese de cDNA a partir de miRNA e quantificação por PCR em tempo real.....	18
4.7. Ensaio de apoptose por citometria de fluxo.....	19
4.8. Ensaio de formação de esferóides (cultura 3D).....	19
4.9. Ensaio clonogênico.....	19
4.10. Quantificação de proteínas.....	20
4.11. SDS-Page.....	20
4.12. Western blot.....	21
4.13. Imunofluorescência e microscopia.....	21
4.14. Análises estatísticas.....	22
5. RESULTADOS.....	22
5.1. Análise de dados do TCGA.....	22
5.2. Análise dos miRNAs por PCR em tempo real quantitativo.....	23
5.3. Ensaio de apoptose por citometria de fluxo.....	24
5.4. Ensaio de formação de esferóides (cultura 3D).....	25
5.5. Ensaio clonogênico.....	26
5.6. Avaliação dos níveis de proteínas por Western blot.....	27
5.7. Imunofluorescência.....	30

6. DISCUSSÃO.....	31
7. CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS.....	36

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer oral e epidemiologia

O câncer oral é a neoplasia maligna que pode acometer a cavidade oral e os lábios, sendo o carcinoma epidermóide oral (CEO) a forma mais comum, que corresponde a 90% do total de casos (IRFAN; DELGADO; FRIAS-LOPEZ, 2020, CHEN, 1999). De acordo com dados de 2020 do *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN), são estimados mais de 370 mil novos casos por ano, além de quase 200 mil mortes causadas pelo câncer bucal anualmente, sendo assim o câncer de cabeça e pescoço mais frequente em todo o mundo (IRFAN; DELGADO; FRIAS-LOPEZ, 2020). Ainda de acordo com o GLOBOCAN, a incidência de câncer de cabeça e pescoço continua aumentando e deverá aumentar mais de 1 milhão de novos casos anualmente até 2030. Apenas no Brasil, 73.563 pessoas morreram de câncer oral, entre 1996 e 2018 (DA CUNHA et al., 2021).

Na maioria dos casos, o câncer oral é causado pelo consumo de álcool, tabagismo, infecção por HPV e radiação ultravioleta (SUNG et al., 2021). Mas, uma dieta pobre em fibras, falta de higienização adequada, infecções, fatores genéticos e idade também são fatores de risco associados ao desenvolvimento de câncer bucal (AGHIORGHIESEI et al., 2022). Além disso, aspectos culturais também são determinantes para o desenvolvimento de câncer oral, uma vez que regiões do Sul da Ásia Central e Melanésia apresentam as maiores taxas de câncer oral (SUNG et al., 2021) devido ao costume de mastigar folhas de *Piper betle* e nóz de areca, classificadas como carcinogênicas pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2004).

Vale ressaltar que apesar do aumento de informações disponíveis acerca das causas e fatores de risco associados ao CEO, as taxas de sobrevida para câncer bucal não melhoraram substancialmente nas últimas décadas, e por isso, novas formas de diagnóstico precoce e tratamento são necessárias (IRFAN; DELGADO; FRIAS-LOPEZ, 2020). Embora a prevalência do câncer bucal não seja tão elevada se comparada com outros tipos de câncer, o câncer oral representa mortalidade e morbidade significativas, especialmente em casos de diagnóstico tardio (DHANUTHAI et al., 2017). Apesar do fácil acesso à mucosa oral para exame visual, muitas vezes o câncer bucal é detectado em estágios avançados devido à ausência de sintomas

clínicos evidentes, o que leva a redução severa da sobrevida do paciente (MIN et al., 2015).

1.2 Patologia do câncer oral

Uma série de alterações histopatológicas levam a formação de um tumor invasivo de cabeça e pescoço, sendo necessário um conjunto de mutações para que ocorra a evolução de um carcinoma *in situ* para um carcinoma invasivo a partir de células epiteliais (CALIFANO et al., 1996). Principalmente em estágios iniciais, ao reduzir a exposição a agentes carcinogênicos ou alterar hábitos prejudiciais, é possível reverter ou retardar a progressão tumoral. Já no estágio intermediário de displasia epitelial, é determinado o potencial de lesões pré-malignas no desenvolvimento do câncer bucal (KUMARI; DEBTA; DIXIT, 2022).

Durante o desenvolvimento e progressão tumoral, há significativa instabilidade genômica, frequentemente associada a perda ou ganho de regiões cromossômicas (“Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas”, 2015). Além das alterações genéticas, alterações epigenéticas também têm uma participação importante na oncogênese de cânceres de cabeça e pescoço, que geralmente são caracterizados por hipometilação na maioria dos genes, mas também ocorre hipermetilação (FOY et al., 2015). Ao contrário da maioria dos cânceres em que as mutações oncogênicas normalmente induzem a tumorigênese, a formação do CEO geralmente envolve a inativação de genes supressores tumorais (JOHNSON et al., 2020).

Essas alterações na mucosa oral podem afetar não apenas áreas com lesões aparentes, mas grandes regiões ou “campos” que podem não ser identificadas clinicamente ou mesmo no exame histopatológico, uma vez que as células do local possuem mutações, mas ainda não são malignas. Um “campo” de epitélio pré-condicionado pela exposição a agentes carcinogênicos pode desencadear múltiplos tumores (SLAUGHTER; SOUTHWICK; SMEJKAL, 1953). Esse processo chamado de “cancerização de campo” é determinante para a recorrência e persistência do câncer bucal após a terapia (SLAUGHTER; SOUTHWICK; SMEJKAL, 1953). Desta forma, em cerca de 40% dos casos avançados há recidiva após o tratamento, e mais de 50% desses pacientes desenvolvem recorrência locorregional dentro de dois anos (COCA-PELAZ et al., 2019, DENARO; MERLANO; RUSSI, 2016).

Apesar de variações entre os estudos, o número de pacientes com câncer de cabeça e pescoço que apresentam um segundo tumor primário é elevado, o que também contribui para as baixas taxas de sobrevida e prognóstico desfavorável observados nesses pacientes. Outro fato importante é que o risco de surgimento de um segundo tumor primário é maior em indivíduos que consomem álcool e tabaco (COCA-PELAZ et al., 2019).

1.3 Esfingosina quinase 2 (SK2)

Os esfingolipídios são lipídios que podem compor a estrutura da membrana celular ou atuar como sinalizadores que modulam uma ampla variedade de processos celulares, sendo a esfingosina e a esfingosina-1-fosfato exemplos de esfingolipídios com função sinalizadora. De forma simplificada, o metabolismo de esfingolipídios consiste na síntese *de novo* de ceramida, que é precursora de todos os esfingolipídeos complexos. A ceramida pode sofrer uma série de modificações, dentre elas, a desacetilação, que gera a esfingosina (PYNE et al., 2018), que pode ser usada como substrato para esfingosina quinases, enzimas que catalisam a fosforilação da esfingosina, produzindo a esfingosina-1-fosfato (S1P) e alterando consideravelmente sua função. Em humanos, há 2 isoformas, a esfingosina quinase 1 e 2 (DIAZ ESCARCEGA et al., 2021), sendo a segunda o foco deste trabalho.

A esfingosina quinase 2 (SPHK2; NM_001204159.3), chamada de SK2 ao longo do presente trabalho, não é responsável apenas pela fosforilação da esfingosina, mas de vários outros substratos lipídicos (DIAZ ESCARCEGA et al., 2021). A SK2 contém um sinal de localização nuclear e outro de exportação nuclear, alternando entre o núcleo e o citoplasma (DING et al., 2007). No citoplasma, pode ser encontrada no retículo endoplasmático ou na mitocôndria (MACEYKA et al., 2005, STRUB et al., 2010), porém, a localização anormal de SK2 na membrana plasmática está ligada ao câncer (NEUBAUER et al., 2016). Está envolvida com a regulação da expressão gênica, inclusive por mecanismos epigenéticos, através de S1P (HAIT et al., 2009), e interferindo em diferentes vias de sinalização associadas à proliferação, migração e apoptose (DIAZ ESCARCEGA et al., 2021). Já foi reportado o papel da SK2 no desenvolvimento de câncer de mama, pulmão, bexiga, dentre outros tipos de tumores, por estimular a proliferação, invasão e resistência a quimioterápicos (LEBLANC et al., 2020).

Estudos também têm demonstrado que a inibição da SK2 pelo ABC294640, molécula descrita por French et al., 2010 que compete com a SK2 pela ligação com a esfingosina, tem efeito antitumoral. Experimentos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o tratamento com o inibidor da SK2 reduziu o crescimento e a capacidade proliferativa de células tumorais de câncer colorretal (XUN et al., 2015), câncer de próstata (VENANT et al., 2015), câncer de pulmão (DAI et al., 2018) e de carcinoma epidermóide (ZHOU; CHEN; YU, 2018). O papel da SK2 especificamente no câncer oral ainda foi pouco explorado, mas recentemente, nosso grupo de pesquisa verificou que a superexpressão de SK2 em linhagem não-tumoral de queratinócito oral (NOK-SI) foi capaz de induzir a transformação maligna, conferindo às células a capacidade de formar tumores xenoenxerto em camundongo imunodeficiente.

1.4 MicroRNAs

MicroRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não codificantes, com cerca de 20 nucleotídeos, que inibem a expressão gênica pós-transcricionalmente por interferirem na tradução ou na estabilidade do mRNA no citoplasma, sendo estimado que regulam aproximadamente 30% do genoma humano que codifica proteínas (FILIPOWICZ; BHATTACHARYYA; SONENBERG, 2008). Para que o miRNA exerça tais funções, é necessário o pareamento entre o mRNA alvo e os nucleotídeos 2 ao 8 do miRNA, que representam a região "semente" (*seed*) da extremidade 5' UTR. Ainda é fundamental ter complementaridade entre as sequências do miRNA e mRNA na extremidade 3' UTR, em que geralmente são encontradas várias cópias do sítio de ligação do miRNA para repressão efetiva da tradução (FILIPOWICZ; BHATTACHARYYA; SONENBERG, 2008). Devido à sequência curta do miRNA, cada miRNA pode regular centenas de mRNAs alvos, com diferentes funções celulares (KREK et al., 2005, CORREIA DE SOUSA et al., 2019). Desse modo, cada miRNA desregulado em células tumorais poderá interferir numa ampla variedade de processos celulares potencialmente associados com a tumorigênese.

Diversos estudos têm demonstrado que alterações na expressão de miRNAs têm um papel fundamental no desenvolvimento tumoral (YETE; SARANATH, 2020). Além disto, sugere-se forte relação entre a desregulação de miRNAs e os principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer bucal, o que permite que sejam candidatos a biomarcadores para diagnóstico precoce, prognóstico e auxiliem na busca por novas terapias (AGHIORGHIESEI et al., 2022).

No câncer, os miRNAs podem atuar como oncogenes (oncomirs) ou supressores tumorais, estando envolvidos em uma variedade de vias desreguladas no câncer (GARZON; CALIN; CROCE, 2009), tais como invasão, angiogênese e evasão imune (HAYES; PERUZZI; LAWLER, 2014, STAHLHUT; SLACK, 2013), sendo determinantes para a sobrevivência dos pacientes e resposta ao tratamento. Ainda, há evidências que tumores de diferentes tipos e origens possuem perfis de miRNAs diferentes entre si, e que uma grande proporção de loci de miRNA conhecidos estão localizados em áreas do genoma associadas ao câncer (STAHLHUT; SLACK, 2013, CALIN et al., 2004).

Análise prévia de dados de sequenciamento em larga escala de RNAs pequenos de células NOK/SK2 (linhagem de queratinócitos orais com superexpressão de SK2), realizada por nosso grupo de pesquisa, identificou mais de 100 miRNAs diferencialmente expressos em NOK/SK2 comparada com NOK controle (artigo em preparação). Entre esses miRNAs, selecionamos o miR-296-5p e o miR-205-5p, que estavam induzido e reprimido, respectivamente, na NOK/SK2, para o presente estudo.

O miR-296-5p é descrito como superexpresso em células endoteliais de glioma e glioblastoma, sendo que níveis elevados de miR-296 promovem a angiogênese (WÜRDINGER et al., 2008). Também em linhagens celulares de câncer de pâncreas, a superexpressão de miR-296-5p é associada a maior capacidade proliferativa e invasiva, por reduzir a expressão de E-caderina, além de induzir resistência ao tratamento com 5-Fluorouracil e Gemcitabina (OKAZAKI et al., 2019). No entanto, em células de câncer de próstata, câncer cervical e colorretal, o miR-296-5p está regulado negativamente (LEE et al., 2014; CAO et al., 2021; HAN et al., 2022). Tais resultados aparentemente conflitantes são explicados por diferenças entre os genes alvos do miR em diferentes tipos celulares (LEE et al., 2014).

Já o miR-205-5p tem sido descrito como reprimido ou reduzido em diferentes tipos de tumores (MAJID et al., 2010; IORIO et al., 2009). Um estudo anterior, que avaliou 71 amostras de pacientes com CEO, demonstrou que a expressão de miR-205-5p é significativamente reduzida em amostras de tecido tumoral em relação às amostras de tecido da mucosa oral normal (NAGAI et al., 2018). Há evidências que miR-205-5p inibe a transição-epitélio mesenquimal (TEM) por regular a expressão de *Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1* (ZEB1), E-caderina e vimentina (GULEI et al., 2018). Estudos sugerem que o miR-205-5p é fundamental para a proliferação de

linhagens celulares de câncer oral (ZHANG et al., 2020), e seu aumento foi descrito em células de câncer de cabeça e pescoço (ZHOU et al., 2020).

Estudos funcionais utilizando linhagens celulares como modelos para determinar o papel de miRNAs e de vias de sinalização específicas, como SK2-S1P, são necessários para caracterização dos mecanismos moleculares envolvidos no processo de tumorigênese e de progressão do câncer oral.

2. HIPÓTESE

O miR-296-5p e miR-205-5 participam das atividades da esfingosina quinase 2 na transição epitélio-mesenquimal e fenótipo de célula tronco tumoral.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar se o miR-296-5p e o miR-205-5p estão envolvidos nas ações da esfingosina quinase 2 associadas com características de transformação maligna em queratinócitos orais.

3.2 Objetivos específicos

Para atingir o objetivo proposto, definimos os seguintes objetivos específicos:

- 1) Análise de dados do TCGA quanto a relação entre a expressão dos miRNAs e fatores associados a predição de prognóstico;
- 2) Transfectar células NOK/SK2 com miR-205-5p mimético, com inibidor de miR-296-5p e controle negativo;
- 3) Avaliar os níveis dos miR-205-5p, miR-296-5p nas células NOK/SK2 transfectadas com inibidor de miRNA e/ou miRNA mimético em comparação com respectivo controle;
- 4) Determinar viabilidade e apoptose de células NOK-SK2 após inibição de miR-296-5p e superexpressão de miR-205-5p em comparação com respectivo controle;
- 5) Avaliar o efeito da inibição da SK2 (composto ABC294640) combinada com a superexpressão de miR-205-5p ou inibição de miR-296-5p na apoptose em células NOK/SK2;

- 6) Verificar a capacidade de formação de esferóides (cultura 3D) por células NOK/SK2 após a inibição de miR-296-5p e superexpressão de miR-205-5p em comparação com respectivo controle;
- 7) Verificar a capacidade de formação de colônias (clonalidade) por células NOK/SK2 após a inibição de miR-296-5p e superexpressão de miR-205-5p em comparação com respectivo controle;
- 8) Avaliar os níveis das proteínas Snail, ALDH1, vimentina e N-caderina em células NOK/SK2 após a inibição de miR-296-5p e superexpressão de miR-205-5p.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Análise de dados do TCGA

A partir de dados de transcriptoma de amostras de pacientes com câncer de cabeça e pescoço, disponíveis no TCGA, foi analisada a curva de sobrevida dos pacientes de acordo com alta e baixa expressão de hsa-miR-205 e hsa-miR-296. Os gráficos de probabilidade de sobrevida foram gerados por meio da ferramenta de análise de informática online *Kaplan Meier Plotter: Pan-cancer miRNA* (NAGY; MUNKÁCSY; GYÖRFFY, 2021), e as curvas de sobrevida dos dois grupos de pacientes (alto e baixo nível dos miRNAs) foram comparadas, sendo considerado com significância $p < 0,05$.

4.2 Linhagens celulares

A linhagem celular utilizada no presente estudo foi nomeada NOK/SK2. Esta linhagem foi obtida a partir da superexpressão de esfingosina quinase 2 (*SPHK2* ou *SK2* ou *SK-2*; NM_021972.3) numa linhagem não tumoral de queratinócitos orais (NOK). A linhagem celular NOK/SK2 foi obtida em trabalho anterior do grupo de pesquisa por Lais Brigliadori Fugio durante seu curso de doutorado. Alíquotas das células NOK/SK2 e NOK controle (vetor de expressão vazio) foram armazenadas em nitrogênio líquido para uso futuro em outros projetos do grupo. As células foram descongeladas e 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). Durante o período de cultura, as células foram mantidas em incubadora umidificada, à 37°C e na presença de 5% CO₂. A superexpressão da proteína SPHK2 ou SK2 e de RNAm de *SPHK2/SK2* foram

confirmados nas células NOK/SK2 utilizadas no presente trabalho, por Western blot e PCR em tempo real, respectivamente.

4.3 Transfecção das células

Células NOK/SK2 foram cultivadas até 80% de confluência em placa de 10 cm e, no dia da transfecção, o meio foi substituído por meio novo. Para a transfecção, foram utilizados o inibidor do hsa-miR-296-5p (P/N: 4464084, ID: MH10609, *Life Technologies*) e o mimético hsa-miR-205-5p (P/N: 4464066, ID: MC11015, *Life Technologies*) ressuspendidos em água livre de nucleases, conforme recomendação do fabricante. Em tubos de 1,5 mL, foi realizada a mistura do meio sem soro e sem antibiótico (Opti-MEM™) com controle negativo (CN; mock miRNA) ou miRNA mimético ou inibidor, mais reagente de transfecção *HiPerFect* (*Qiagen*), seguindo o protocolo do fabricante. Para a formação dos complexos de transfecção (miRNA ou inibidor ou CN + *HiPerFect*), após vortexar, os tubos foram incubados por 10 minutos a temperatura ambiente. A solução de complexos foi adicionada gota a gota sobre as células, resultando em uma concentração final de mock miRNA, miRNA mimético ou inibidor de 50 nM. As células foram mantidas em cultura por 24-72 horas a 37°C. Em seguida, as células transfectadas foram recuperadas da placa de cultura, sendo uma parte destas utilizada para extração de RNA e análise dos miRNAs e genes alvos por PCR em tempo real, e o restante das células utilizado nos demais ensaios propostos.

4.4 Ensaio com o composto ABC294640

Antes de realizar o ensaio de apoptose (item 3.7), as células foram mantidas em cultura por 24 horas com o composto ABC294640 (10 µM), que inibe a SK2 por competir pela ligação com a esfingosina (FRENCH et al. 2010).

4.5 Extração de RNA

As células NOK/SK2 transfectadas foram coletadas em 1 mL de TRIzol (Invitrogen; reagente ácido que contém isotiocianato de guanidina e fenol), após incubação por 5 minutos a temperatura ambiente para lise celular, foram adicionados 200 µL de clorofórmio para cada 1 mL de Trizol, seguindo protocolo do fabricante. Os tubos foram agitados em vórtex e incubados por 5 minutos a temperatura ambiente. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos, a 4°C e 12000 g para separação das fases. A fase aquosa contendo o RNA foi coletada, e isopropanol (500 µL por mL de

amostra) foi utilizado para precipitação do RNA. As amostras foram vortexadas por 5 segundos e em seguida incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos, a 4°C e 12000 g para formar o pellet, o meio aquoso foi descartado. Cada amostra foi lavada com 1 mL de etanol 75%, vortexada e centrifugada por 5 minutos, a 4°C e 12000 g, em seguida, o etanol foi descartado. Foi feita uma segunda lavagem com 500 µL de etanol 75%, novamente vortexando e centrifugando as amostras por 5 minutos, a 4°C e 12000 g, descartando novamente todo o etanol. Para ressuspender o RNA precipitado, foram adicionados 40 µL de água livre de RNases, previamente aquecida a 55°C. Por fim, as amostras foram aquecidas a 55°C por 10 min para a completa ressuspensão do RNA. O RNA foi quantificado em Nanodrop, onde foi aplicado 1 µL de água como branco e 1 µL de cada amostra. A qualidade do RNA extraído foi determinada com base na razão 260/280 nm, sendo que a razão de 1.8-2.0 indica RNA com alto grau de pureza.

4.6 Síntese de cDNA a partir de miRNA e quantificação por PCR em tempo real

Após a extração do RNA descrita no item 3.5, foi feita a síntese do cDNA utilizando o *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)*. Para cada reação de 15 µL (7 µL de master mix, 3 µL de primers, e 5 µL de RNA), foram utilizados 0,15 µL de 100 mM dNTPs (com dTTP), 1 µL de *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* (50 U/µL), 1,5 µL de 10X *Reverse Transcription Buffer*, 0,19 µL de inibidor de RNases (20U/µL) e 4,16 µL de água livre de nucleases. Para a transcrição reversa, o termociclador foi configurado para 16°C por 30 minutos, 42°C por 30 minutos, 85°C por 5 minutos e 4°C até a retirada da placa de PCR do aparelho.

Para a reação de qPCR, foi utilizado o *TaqMan Universal Master Mix II (Applied Biosystems)*, conforme protocolo do fabricante. Para cada reação (20 µL), foram usados 10 µL do *TaqMan Universal Master Mix II (2X)*, 1 µL do *TaqMan miRNA Expression Assay (20X)* (TM000509 para hsa-miR-205-5p e TM000527 para hsa-miR-296), e 9 µL de cDNA diluído em água. O termociclador foi configurado para 1 ciclo de 10 minutos a 95°C (ativação da DNA polimerase) e 40 ciclos de 15 segundos a 95°C (desnaturação) e 1 minuto a 60°C (anelamento e extensão). O RNU6B (TM001093) foi utilizado como controle endógeno para quantificação relativa do miRNA.

4.7 Ensaio de apoptose por citometria de fluxo

Para avaliar a viabilidade e a quantidade de células em apoptose, foi feita a marcação com anexina V e iodeto de propídeo (PI). A anexina V interage com a fosfatidilserina, um fosfolípido que é exposto na membrana durante a apoptose, enquanto o PI é um intercalante de DNA, ou seja, marca apenas células com membrana danificada (ENGELAND et al., 1998). As células foram semeadas em placa de 6 poços (2×10^5 células/poço), após o cultivo por 24 horas, as células foram coletadas e marcadas com anexina e PI utilizando-se o *Annexin V Apoptosis Detection Kit* (BD Pharmingen), e então analisadas por citometria de fluxo na Facility da FCFRP.

Para cada teste, foram utilizados 5 µl de Anexina V- FITC, 5 µL de Iodeto de propídeo (PI) e *Annexin V Binding Buffer 1x* (solução concentrada 10 x: Hepes/NaOH 0,1 M, pH 7,4; NaCl 1,4 M e CaCl_2 25 mM). As células foram lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas no tampão a uma concentração de 10^6 células/mL. Foram transferidas 10^5 células para um tubo de citometria e adicionada a solução de Anexina V-FITC e PI, incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente e no escuro. Após adição de 400 µL de 1X *Annexin V Binding Buffer* a cada tubo, foi feita a análise das amostras por citometria de fluxo.

4.8 Ensaio de formação de esferóides (cultura 3D)

As células foram semeadas em placa de 24 poços de *ultra low adhesion* (10^3 células por poço) e mantidas em incubadora umidificada a 37°C e 5% CO_2 por 7 dias. As esferas ou esferóides foram visualizados, analisados e fotografados em microscópio invertido no modo contraste de fase (Zeiss Axiovert 40). Ainda, após a contagem dos esferóides, os mesmos foram coletados para análise por imunofluorescência ou lisados para análise de proteínas por Western blot.

4.9 Ensaio clonogênico

Em placas de 6 poços, contendo 200 células por poço, as células foram cultivadas por 7 dias após a transfecção com o controle negativo, miRNA mimético e inibidor de miRNA. O meio das placas foi descartado e, em seguida, foi adicionado 1 mL de metanol por poço e deixado durante 20 minutos para fixação das células. Após descartar o metanol, foi adicionado 1 mL por poço de cristal violeta, que foi retirado após 20 minutos. Os poços foram lavados com PBS (1 mL por poço) até que o excesso de cristal violeta fosse removido. Após a secagem da placa, os poços foram

fotografados e analisados por meio do ImageJ (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012).

4.10 Quantificação de proteínas

Para avaliar os níveis de proteínas por Western blot, as células foram semeadas em placa de 6 poços (2×10^5 células/poço), e após o cultivo por 24 horas, as células foram coletadas em tampão *CellLytic* (*Sigma*) suplementado com 10 µL/mL de inibidores de proteases e deacetilases, lisadas em 3 ciclos de 10 segundos no ultrasonicador *150E Digital Sonic Dismembrator* (*Fisher Scientific*).

Foi utilizado o método de Bradford para a quantificação de proteínas. Para isso, foi preparada uma curva de concentrações conhecidas (padrão: 50, 100, 250 e 500 µg/mL) de albumina sérica bovina (*Bovine Serum Albumin Standard*; solução estoque: 2 mg/mL, #23210, *Thermo Scientific*). Em uma placa de 96 poços, foram aplicados em triplicata 10 µL de amostra por poço, incluindo a água (branco), as diluições de albumina e as amostras de interesse. Para cada poço, foram utilizados 200 µL de reagente de Bradford, diluído em água milliQ (1:5). No espectrofotômetro *Model 680 Microplate Reader* (*Bio-Rad*), a leitura da absorbância foi feita em 595 nm.

4.11 SDS-Page

Para avaliar os níveis das proteínas PARP, vimentina, N-caderina, ALDH1, snail, e GAPDH, inicialmente foi feita uma eletroforese vertical em gel de poli(acrilamida) (PAGE) com dodecilsulfato de sódio (SDS), com base no protocolo de Harlow e Lane (1998). Foram preparados 10 mL de gel de corrida 12% utilizando 3,3 mL de água, 4 mL de mix de acrilamida 30%, 2,5 mL de Tris 1,5 M (pH 8,8), 100 µL de SDS 10%, 100 µL de persulfato de amônio 10% e 5 µL de TEMED. Após aplicar o gel na cuba *Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell* (*Bio-Rad*), foi adicionado isopropanol, e após aguardar aproximadamente 20 minutos para polimerização do gel, o isopropanol foi descartado. Para preparação de 4 mL do gel de empilhamento 5%, foram usados 2,2 mL de água, 670 µL de mix de acrilamida 30%, 1 mL de Tris 0,5 M (pH 6,8), 40 µL de SDS 10%, 40 µL de persulfato de amônio 10% e 5 µL de TEMED. Em seguida, o gel foi adicionado na cuba, solidificando após cerca de 20 minutos. As amostras contendo 20 µg ou 50 µg de proteínas, foram diluídas em tampão Laemmli e aquecidas a 95°C por 5 minutos e centrifugadas antes de serem aplicadas no gel. Como marcador, foi utilizado o *PageRuler Prestained Protein Ladder*, de 10 a 250 kDa.

(*Thermo Scientific*). Após depositar o padrão e as amostras nos poços, foi aplicada uma tensão de 90 volts, por cerca de 90 minutos.

4.12 Western blot

As proteínas foram transferidas do gel de poliacrilamida para membranas de PVDF, por meio do *Power Blotter XL System (Invitrogen)*, após a ativação da membrana com metanol por aproximadamente 1 minuto. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com a solução de bloqueio preparada com 0,25 g de *Blotting-Grade Blocker (Bio-Rad)* e 50 mL de TBS-T (TBS com 1% de Tween 20), durante 1 hora sob agitação e a temperatura ambiente. As membranas foram incubadas overnight com os anticorpos primários a 4°C e sob agitação contínua. Para retirar os anticorpos primários que não se ligaram a proteínas, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS-T, cada lavagem tendo 5 minutos mantendo as membranas sob agitação. As membranas então foram deixadas por 1 hora com o anticorpo secundário, que é conjugado a peroxidase, sob agitação contínua a temperatura ambiente. Foram utilizados os anticorpos secundários para ALDH1 (1:1000), Snail (1:1000), Vimentina (1:1000), PARP (1:1000), N-caderina (1:1000) e GAPDH (1:1000) diluídos em solução de bloqueio. As membranas foram novamente lavadas com TBS-T, 4 lavagens de 5 minutos cada, sob agitação contínua. Por fim, foi utilizado 1 mL dos reagentes do Kit *SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific)* sobre as membranas, durante 5 minutos, e o resultado foi visualizado no *ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad)*.

4.13 Imunofluorescência e microscopia

O meio de cultura das placas de *ultra low adhesion* foi removido suavemente, para não remover as esferas. Para fixação, foram adicionados 100 µL de metanol gelado. As placas foram lavadas 2 vezes com 200 µL de PBS em temperatura ambiente por 5 minutos, em seguida, foram adicionados 100 µL de PBS contendo 3% BSA e 0,1% Triton X-100, e deixadas por 30 minutos em temperatura ambiente. Os poços foram lavados 3 vezes com 200 µL de 0,1% Triton X-100/PBS, depois incubados por 5 minutos a temperatura ambiente. Foram adicionados anticorpos primários (1:100 em PBS contendo 1% BSA e 0,1% Triton X-100) e deixados por 90 minutos em temperatura ambiente. Novamente foram lavados por 5 minutos, 3 vezes com 200 µL de 0,1% Triton X-100/PBS em temperatura ambiente e então foram

adicionados anticorpos secundários conjugado com AlexaFluor®488 ou AlexaFluor®647 (1:500 em PBS contendo 1% BSA e 0,1% TritonX-100), e deixados por 60 minutos em temperatura ambiente. Novamente foi feita uma lavagem por 5 minutos, 3 vezes com 200 µL de 0,1% Triton X-100/PBS em temperatura ambiente. Foram adicionados 100 µL de DAPI (1 µg/mL em PBS) e incubados por 15 minutos em temperatura ambiente. Após 3 lavagens com 200 µL de PBS, os esferóides foram analisados por microscopia de fluorescência.

4.14 Análises estatísticas

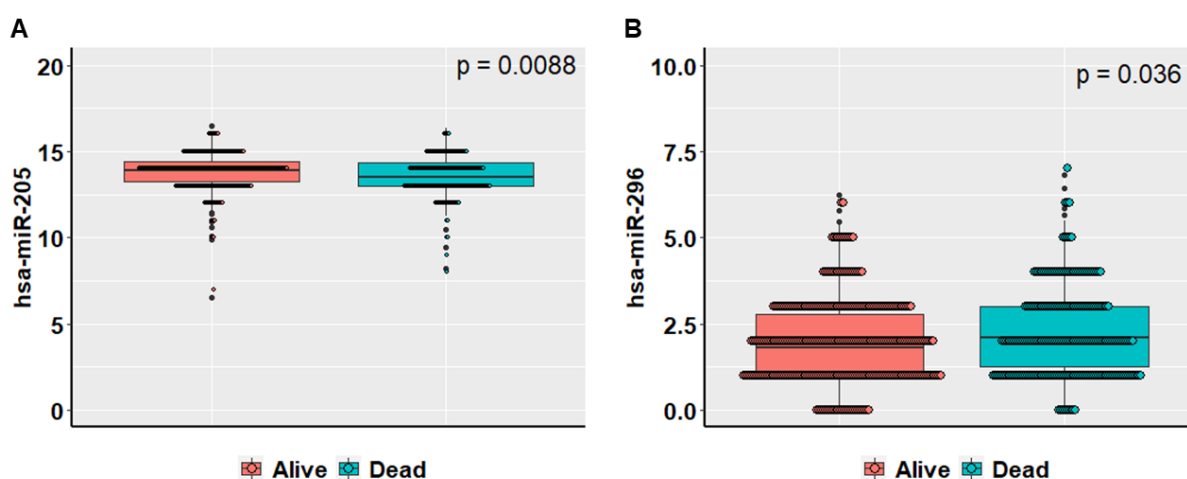
As comparações entre os dois grupos foram realizadas pelo teste t de Student. As comparações entre três ou mais grupos foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis. Em todas as análises estatísticas, um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS

5.1 Análise de dados do TCGA

De acordo com dados disponíveis no TCGA, há diferença significativa na expressão dos dois miRNAs selecionados, miR-205 e miR-296, entre pacientes que sobreviveram ou faleceram (figura 1).

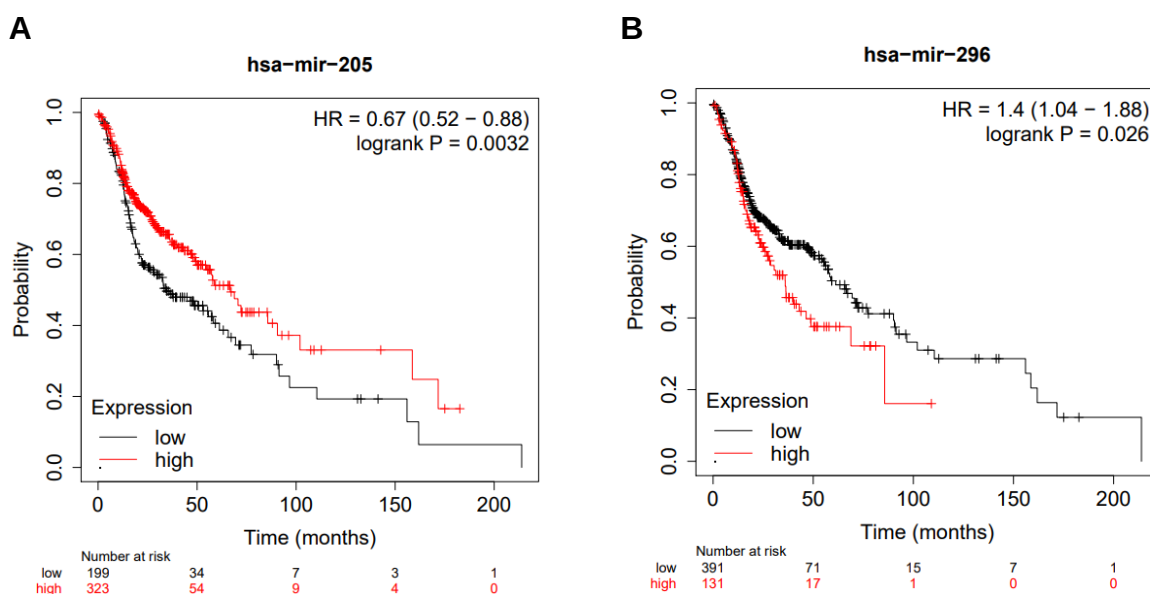
Figura 1 – Expressão relativa dos miR-205 e miR-296 em amostras de pacientes com CCP do TCGA que sobreviveram ou óbitos.



(A) Menor expressão de miR-205 e (B) maior expressão de miR-296 em amostras de pacientes com câncer de cabeça e pescoço que faleceram em relação a pacientes que sobreviveram (acompanhamento até 200 meses). Valores apresentados em $\log_2$.

Sobretudo, a expressão dos miRNAs analisados pode ser correlacionada a sobrevida de pacientes com câncer de cabeça e pescoço. Pacientes que apresentam baixa expressão de miR-205 possuem menor probabilidade de sobrevida em relação àqueles que possuem expressão elevada (figura 2-A). Já a análise do miR-296 indica que a expressão elevada desse miRNA é relacionada a uma menor probabilidade de sobrevida se comparado àqueles que possuem baixa expressão (figura 2-B).

Figura 2 – Pacientes com câncer de cabeça e pescoço com expressão baixa de miR-205 ou elevada expressão de miR-296 apresentam menor probabilidade de sobrevida

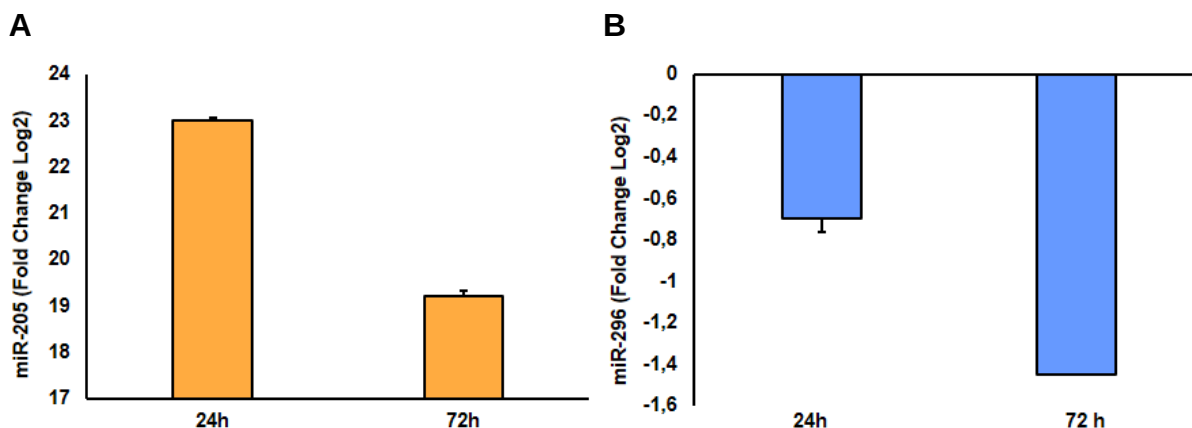


(A) Curvas de sobrevida de pacientes com alta e baixa expressão de miR-205. (B) Curvas de sobrevida de pacientes com alta e baixa expressão do miR-296. Gráfico gerado pelo *Kaplan Meier Plotter* (NAGY; MUNKÁCSY; GYÖRFFY, 2021), selecionando os dados de pacientes com câncer de cabeça e pescoço disponíveis no TCGA.

5.2 Análise dos miRNAs por PCR em tempo real quantitativo

Por meio da PCR em tempo real quantitativa (qPCR), feita 24 e 72h após a transfecção dos miRNA mimético e inibidor, foi confirmada a superexpressão do miR-205-5p e a inibição do miR-296-5p. Como mostrado na figura 3, 72 h após a transfecção, obteve-se uma modulação significativa tanto do miR-205-5p quanto do miR-296-5p. Por isso, os ensaios foram realizados 72 horas após a transfecção.

Figura 3 – Alteração nos níveis do miR-205 e miR-296 em células NOK/SK2 após transfecção com miRNA mimético e inibidor, respectivamente.

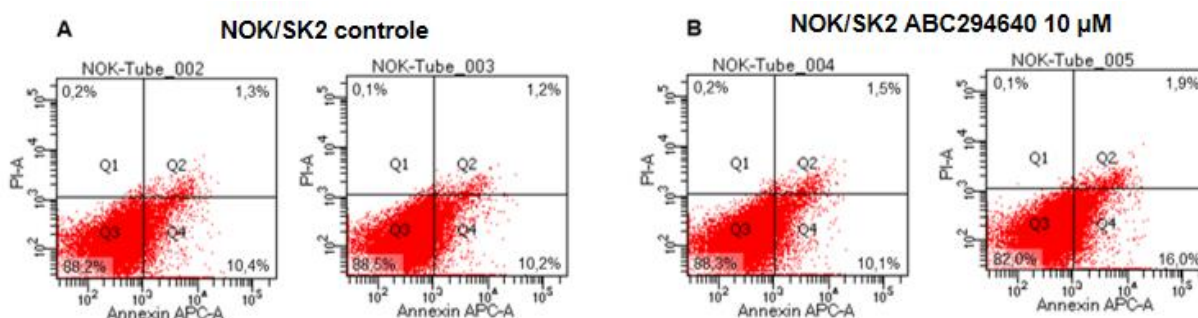


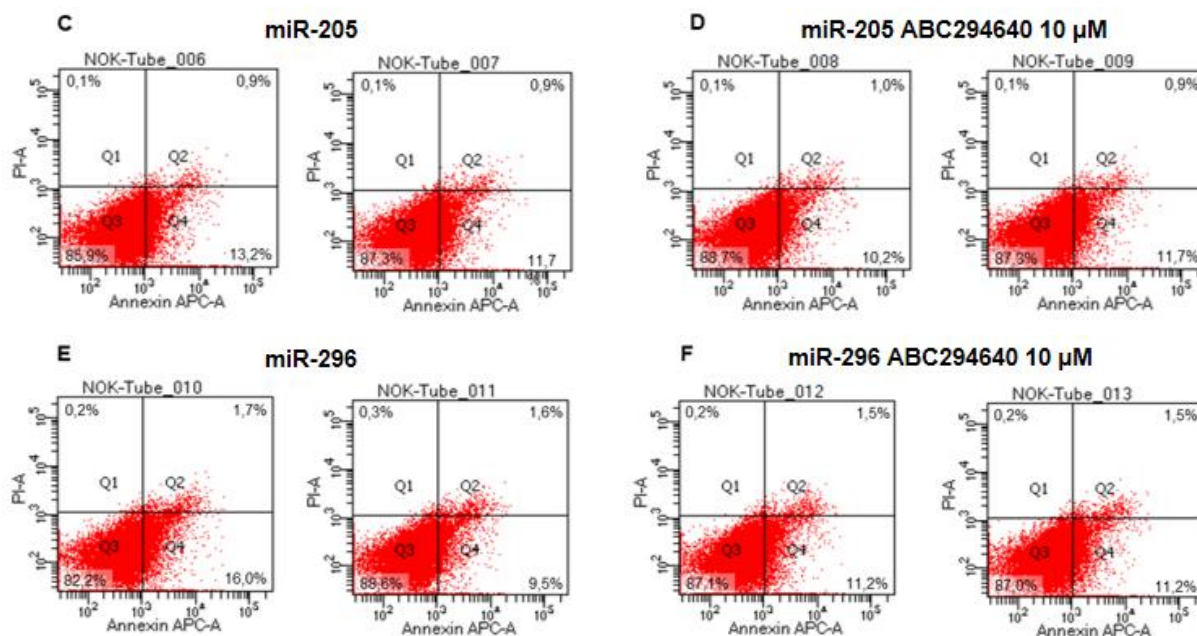
(A) Níveis do miR-205 após transfecção (24 e 72 h) das células com o miR-205-5p mimético e (B) do miR-296-5p após transfecção com o inibidor do miR-296 determinado por PCR em tempo real. Os valores relativos de expressão são mostrados como *fold change* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) e o controle endógeno usado foi o RNU6B. Ensaios realizados em triplicata técnica e as barras indicam o desvio padrão.

5.3 Ensaio de apoptose por citometria de fluxo

O ensaio de apoptose indicou que o tratamento com o inibidor da SK2, a superexpressão do miR-205-5p e inibição do miR-296-5p não promoveram alteração do potencial apoptótico. Ao comparar células tratadas com ABC294640 (10 μ M) ao seu respectivo controle, bem como células transfectadas com inibidor de miRNA ou miRNA mimético ao controle negativo, não houve alteração significativa da quantidade de células viáveis (não marcadas), marcadas somente com PI ou anexina V-FITC ou duplamente marcadas com anexina V-FITC e PI (figura 4).

Figura 4 – A inibição da SK2 e alteração da expressão dos miRNAs não alterou o número de células em apoptose





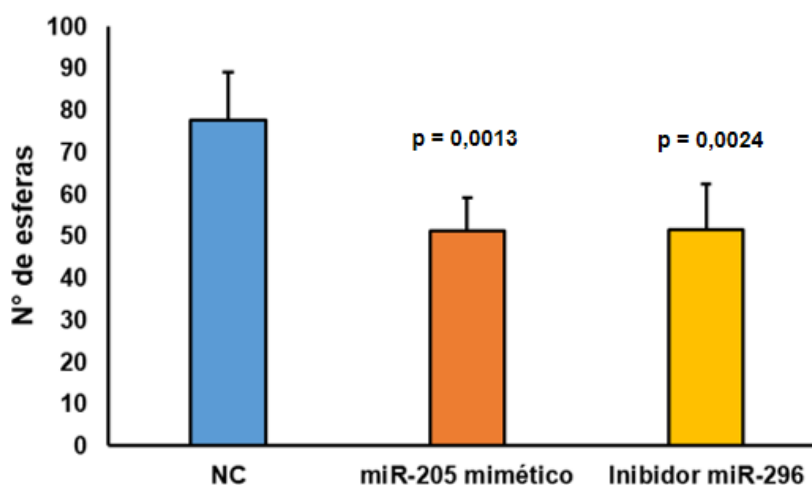
Resultado do ensaio de apoptose com por citometria de fluxo. (A) Células NOK/SK2 controle e (B) tratadas com ABC294640, (C) células que superexpressam o miR-205-5p controle e (D) tratadas com ABC294640, (E) células com a inibição do miR-296-5p controle e (F) tratadas com ABC294640. A superexpressão do miR-205-5p e inibição do miR-296-5p, assim como o tratamento com ABC294640, não resultaram em alteração do número de células em apoptose. Q1: indica o número de células marcadas apenas com PI, Q2: células marcadas com PI e Anexina V-FITC (apoptose tardia ou mortas), Q3: células não marcadas (viáveis) e Q4: células marcadas apenas com Anexina V-FITC (em apoptose inicial). Ensaios realizados em duplicata biológica.

5.4 Ensaio de formação de esferóides (cultura 3D)

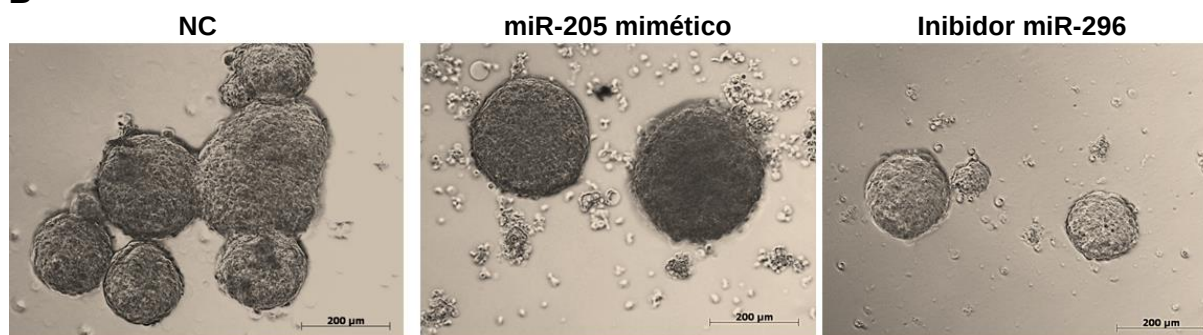
A superexpressão do miR-205-5p e a inibição do miR-296-5p promoveram uma redução da capacidade de formação de esferóides, o que é evidenciado pela diminuição do número de esferóides formados após a transfecção com miRNA mimético e inibidor (figura 5).

Figura 5 – Redução da formação de esferóides após a superexpressão do miR-205 e inibição do miR-296.

A



B



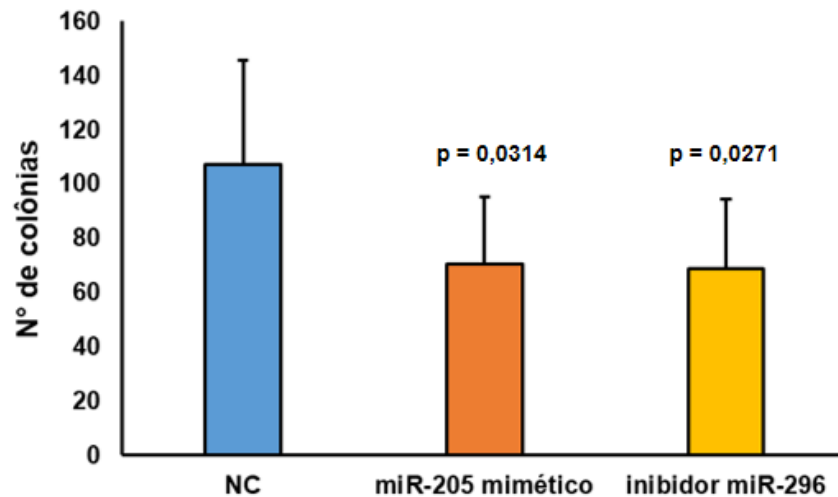
(A) Redução no número de esferóides após aumento do miR-205 e redução do miR-296 nas células NOK/SK2. Média do número de esferas formadas por células NOK/SK2 transfectadas com o controle negativo (NC) em preto, miR-205-5p mimético (azul) e inibidor do miR-296-5p (vermelho). (B) Fotografias das esferas formadas por células NOK/SK2 transfectadas com o controle negativo (NC), miR-205 mimético e inibidor do miR-296. Ensaios realizados em triplicata biológica e as barras indicam o desvio padrão.

5.5 Ensaio clonogênico

A transfecção das células NOK-SK2 com os miRNAs mimético (miR-205) e inibidor (miR-296) induziu redução na formação de colônias, conforme mostrado na figura 6.

Figura 6 – Diminuição da formação de colônias após a superexpressão do miR-205 e inibição do miR-296

A



B

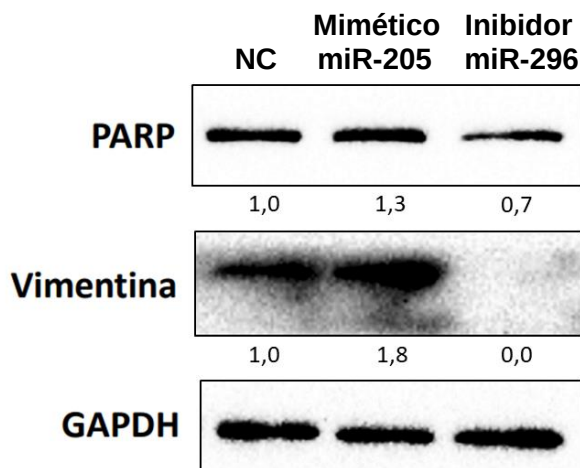


(A) Redução no número de colônias após superexpressão do miR-205 e inibição do miR-296 nas células NOK/SK2. Média do número de colônias formadas por células NOK/SK2 transfectadas com o controle negativo (NC) em azul, miR-205-5p mimético (laranja) e inibidor do miR-296-5p (amarelo). (B) Fotografias das colônias formadas por células NOK/SK2 transfectadas com o controle negativo (NC), miR-205 mimético e inibidor do miR-296. Ensaios realizados em triplicata biológica e as barras indicam o desvio padrão.

5.6 Avaliação dos níveis de proteínas por Western Blot

Por meio de Western Blot, foram avaliados os níveis de PARP e vimentina em células transfectadas com o miR-205-5p mimético e inibidor do miR-296-5p, 72 horas após a transfecção (figura 7). A inibição do miR-296-5p promoveu a redução de vimentina e PARP. Já a superexpressão do miR-205-5p, provocou um aumento dos níveis de vimentina.

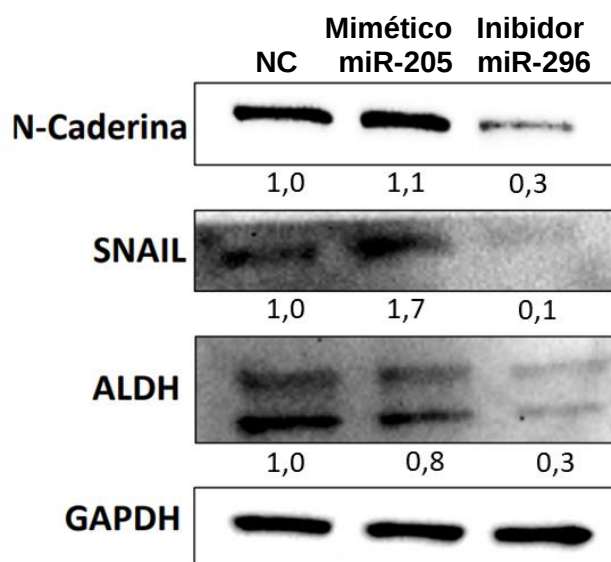
Figura 7 – Redução dos níveis de PARP e vimentina em células transfectadas com o inibidor do miR-296-5p e aumento em células transfectadas com o miR-205-5p mimético



Níveis de PARP e vimentina em células transfectadas com o controle negativo (NC), miR-205-5p mimético e inibidor do miR-296-5p verificados por western blot. GAPDH foi usada como controle de carregamento de proteínas no SDS-PAGE e do WB. Os número mostrados abaixo das bandas das proteínas referem-se a razão entre PARP ou vimentina / GAPDH, após quantificação das bandas usando o ImageJ.

Ainda foram verificados os níveis de proteínas N-caderina, Snail e ALDH1. Em células NOK/SK2 transfectadas com o inibidor de miR-296-5p, houve redução dos níveis das proteínas N-caderina, Snail e ALDH1, o que evidencia que o miR-296-5p regula os níveis de proteínas associadas com vias de sinalização envolvidas com células-tronco tumoral/CTT (ALDH1) e transição epitélio-mesenquimal/TEM (N-caderina e Snail). Já nas células NOK/SK2 transfectadas com o miR-205-5p mimético, houve uma redução apenas dos níveis de ALDH1 (figura 8).

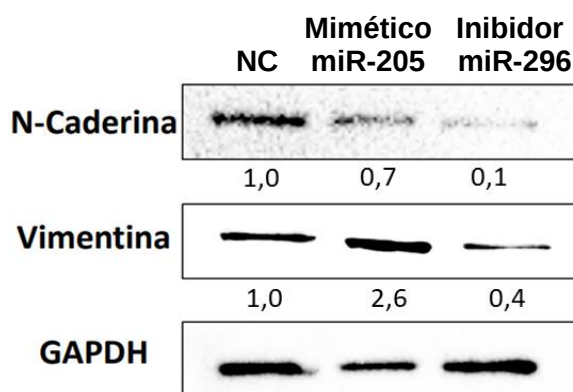
Figura 8 – Impacto dos miRNAs selecionados em marcadores associados com TEM e CTT



Análise das proteínas N-caderina, SNAIL, ALDH1 e GAPDH por Western blot em células NOK/SK2 transfectadas com o controle negativo (NC), miR-205 mimético e com o inibidor de miR-296. GAPDH foi usada como controle no carregamento de proteínas no gel. Os número mostrados abaixo das bandas das proteínas referem-se a razão entre N-caderina, Snail ou ALDH1 / GAPDH, após quantificação das bandas usando o ImageJ.

Também por Western blot, foi verificada uma diminuição dos níveis de N-caderina e vimentina em esferóides formados por células transfectadas com o inibidor do miR-296-5p. Já as esferas com superexpressão do miR-205-5p apresentaram uma redução apenas de N-caderina (figura 9).

Figura 9 – Redução dos níveis de N-caderina e vimentina em esferóides após a modulação dos miRNAs alvos em células NOK/SK2.



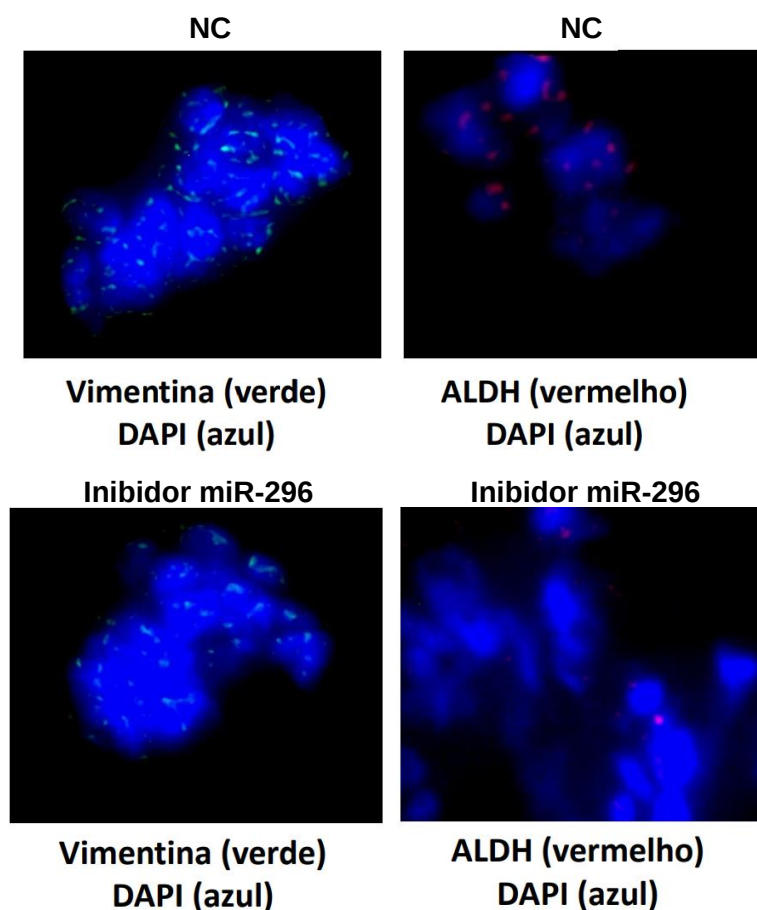
Análise das proteínas N-caderina, vimentina e GAPDH por Western blot em células NOK/SK2 transfectadas com o controle negativo (NC), miR-205 mimético e com o inibidor de miR-296 a partir da amostra de esferóides. As esferas formadas por células que superexpressam o miR-205 apresentaram menor nível de N-caderina e aumento de vimentina, enquanto células em que o miR-296 está reprimido

há uma redução dos níveis de N-caderina e vimentina. GAPDH foi usada como controle no carregamento de proteínas no gel. Os números mostrados abaixo das bandas das proteínas referem-se a razão entre N-caderina ou vimentina / GAPDH, após análise das bandas usando o programa ImageJ.

5.7 Imunofluorescência

Os resultados da análise de vimentina e ALDH1 por imunofluorescência confirmaram os resultados obtidos por Western blot. Em esferas formadas a partir de células transfectadas com o inibidor de miR-296-5p, houve uma redução de vimentina e ALDH1 (figura 10).

Figura 10 – Redução de vimentina e ALDH1 em células transfectadas com o inibidor do miR-296-5p verificada por meio de imunofluorescência



Marcação de vimentina, ALDH1 e DAPI (núcleos) em esferas formadas por células transfectadas com o controle negativo ou inibidor de miR-296.

6. DISCUSSÃO

Com base na análise de dados de transcriptoma do TCGA, pacientes com câncer de cabeça e pescoço que faleceram mostraram níveis do miR-205 significativamente menor (figura 1-A), enquanto o miR-296 era significativamente maior (figura 1-B). Esse dado está de acordo com a relação identificada entre expressão elevada de miR-296-5p e reduzida de miR-205-5p com a menor sobrevida (figura 2). Outros estudos correlacionam a alta expressão de miR-296-5p a pior sobrevida livre de recorrência para pacientes com câncer de cabeça e pescoço, uma vez que esse miRNA parece estar relacionado a resistência a determinadas drogas (MAIA et al., 2015), e dados disponíveis no TCGA suportam essas evidências.

Ao avaliar a ocorrência de apoptose, tanto o ensaio utilizando citometria de fluxo (figura 4) quanto a verificação dos níveis de *poly-ADP ribose polymerase* (PARP) (figura 7) indicaram que o miR-205 e miR-296 não interferem na indução ou inibição da apoptose em células NOK/SK2. PARP é um fator de sobrevivência que atua na vigilância e manutenção da integridade do genoma, promovendo a morte celular em resposta a danos no DNA (DE MURCIA et al., 1997; SCHREIBER et al., 2006; YU, 2002). Durante a apoptose, PARP é clivada e inativada por caspases, gerando dois fragmentos (KAUFMANN, 1993), que podem ser visualizados por Western blot. Nossos resultados indicaram que não houve aumento da clivagem de PARP em células transfectadas com o inibidor ou mimético, o que está de acordo com o ensaio de apoptose por citometria de fluxo. Apesar desses resultados, é descrito que, no câncer oral, a indução do miR-205 aumenta consideravelmente o número de células apoptóticas (KIM et al., 2013). Também há evidências que miR-205 e miR-296 regulam a apoptose em linhagens de câncer cervical e colorretal por diferentes vias (NIU et al., 2021; YAN et al., 2021).

Ademais, a inibição da SK2 por meio de ABC294640 também não alterou o número de células apoptóticas, apesar das evidências na literatura que a conversão metabólica de ceramida em esfingosina-1-fosfato (S1P), esfingomielina ou glicosilceramida tem funções antiapoptóticas e pró-sobrevivência (OGRETMEN et al., 2017). Um trabalho de VENKATA et al. (2014) demonstrou que o tratamento com ABC294640 induziu apoptose via caspase 3 em linhagens celulares de mieloma, no entanto, o mesmo não foi verificado para células NOK/SK2.

Conforme mencionado, o ensaio de formação de esferóides (cultura 3D) demonstrou uma redução da formação de esferas após a superexpressão do miR-

205-5p e inibição do miR-296-5p (figura 5). Nesse sentido, vale ressaltar que as células-tronco tumorais têm a capacidade de formar esferas tridimensionais multicelulares *in vitro* quando cultivadas sem aderência (BAHMAD et al., 2018). Ou seja, o crescimento de culturas 3D indica a proliferação de CTT. As CTT são células pluripotentes responsáveis pela angiogênese, imortalidade, auto-renovação e diferenciação em tumores. Por isso, as CTT estão entre os principais mediadores da agressividade tumoral, recorrência, metástase, e resistência a terapias (TAHMASEBI et al., 2020).

A expressão de genes marcadores de células-tronco por essa subpopulação de células tumorais é um indicador de desenvolvimento e progressão tumoral (TAHMASEBI et al., 2020). Por isso, avaliamos por meio de imunofluorescência (figura 10) e Western blot (figura 8) a expressão da aldeído desidrogenase (ALDH), um marcador de CTT (DOUVILLE; BEAULIEU; BALICKI, 2009). ALDH1 está envolvida na desintoxicação de aldeídos e síntese de ácido retinóico, mas também na tumorigênese. Além de estar relacionado a recorrência local do câncer oral, em vários outros tumores epiteliais, a expressão de ALDH1 é associada a baixa sobrevida (OTA et al., 2013). Ainda, células com altos níveis de ALDH1 possuem maior potencial tumorigênico, invasivo e metastático em comparação com células tumorais que expressam baixos níveis da enzima (SUN; WANG, 2010).

Como miR-205-5p mimético e o inibidor de miR-296-5p interferiram na formação de esferóides e nos níveis de ALDH1, esses miRNAs parecem estar relacionados ao fenótipo de células-tronco tumorais nas células NOK/SK2, mas a inibição do miR-296-5p apresentou um efeito inibitório bem mais significativo se comparado ao efeito do mimético. Aparentemente, nossos resultados indicam que miR-205-5p tem função inibitória enquanto miR-296-5p favorece o fenótipo de CTT. Um estudo de Yeh et al. (2016) relaciona miR-205 a características de células-tronco em linhagens tumorais de câncer de cabeça e pescoço, no entanto, de acordo com o resultado dos autores, miR-205 promoveria a expressão do fenótipo de CTT por estímulo do *nuclear factor-κB* (NF-κB). Ainda não há trabalhos que indiquem a função do miR-296 sobre CTT em linhagens de câncer oral, mas foi demonstrado por Shi et al. (2020) que o miR-296 exerce um efeito inibitório na potência de CTT em linhagens de carcinoma hepatocelular.

O ensaio clonogênico evidenciou uma redução da formação de colônias após a transfecção com miR-205 mimético ou inibidor do miR-296 (figura 6), o que sugere

a participação desses miRNAs em vias associadas a manutenção da viabilidade e proliferação. Um estudo que avaliou a formação de colônias em células de câncer oral demonstrou que a superexpressão de miR-296-5p elevou o número colônias, no entanto, miR-296 estava inicialmente reprimido nas células usadas no estudo (ZHANG, 2021), o que contraria os resultados obtidos inicialmente por nosso grupo de pesquisa em relação a expressão do miRNA, mas confirma o resultado do ensaio clonogênico, que indica que miR-296 promoveria a formação de colônias. Há divergências sobre a função do miR-205 ao considerar diferentes linhagens de câncer de esôfago, tendo evidências que miR-205 atua como um supressor tumoral em adenocarcinoma, mas como oncogene no carcinoma epidermóide (HEZOVA et al., 2015). Em linhagens de câncer de estômago, a regulação positiva do miR-205-5p diminuiu a capacidade de formação de colônias (CHEN et al., 2022), conforme observado em nossos resultados.

Resultados do Western blot e imunofluorescência indicaram uma alteração dos níveis de vimentina em células transfectadas (figura 7) e em esferóides (figuras 9 e 10). A vimentina é uma proteína do citoesqueleto não expressa em células epiteliais normais, sendo um marcador de TEM (CHENG et al., 2018). Além da vimentina, outros marcadores de TEM alterados foram detectados por Western blot, N-caderina e Snail (ZIDAR et al., 2017). A N-caderina é uma das caderinas expressas em células mesenquimais, e o aumento da expressão de N-caderina em células epiteliais induz a migração celular, invasão e metástase (WHEELLOCK et al. 2008; HAZAN et al., 2000). Já Snail é um fator de transcrição que reprime a expressão de genes normalmente expressos em células epiteliais, como a E-caderina, favorecendo a TEM (BATLLE et al., 2000). Mudanças na expressão dessas proteínas permitem que as células se separem, percam a polaridade apicobasal e aumentem a capacidade migratória, o que é fundamental para o processo de tumorigênese (ZIDAR et al., 2017).

Vale ressaltar que, ao comparar os resultados da análise de células e esferóides houve diferença nos níveis de N-caderina e vimentina observados. Em células NOK/SK2 transfectadas com o inibidor de miR-296, houve redução dos níveis das proteínas N-caderina e Snail (figura 8), o que evidencia que o miR-296 regula vias de sinalização envolvidas com a transição epitélio-mesenquimal, além de regular o fenótipo de células-tronco tumoral como discutido anteriormente. Nas células transfectadas com o miR-205 mimético, não houve diminuição dos níveis dessas

proteínas. Já em esferóides formados pelas células transfectadas com o inibidor ou mimético, houve uma redução de N-caderina, que foi mais significativa com a inibição do miR-296. Esferóides com o inibidor ainda apresentaram uma pequena redução de vimentina, mas o mesmo não ocorreu nas esferas com superexpressão do miR-205 (figura 9). Ou seja, ambos miRNAs parecem atuar no fenótipo de CTT e na TEM, mas com base nos resultados obtidos, miR-296-5p parece ter um papel mais significativo em tais processos.

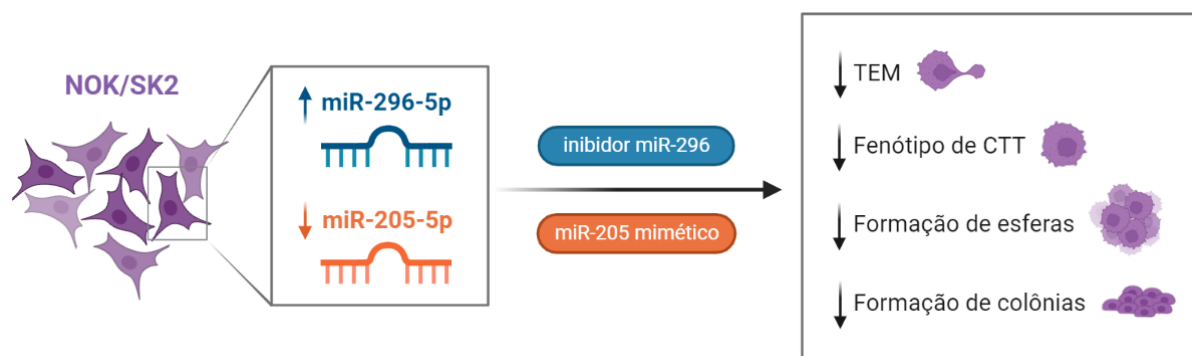
É descrito que miR-205 regula a TEM no carcinoma de cabeça e pescoço, por meio da via de PI3K/AKT (ZHANG et al., 2019). No trabalho de Zhang e colaboradores (2019), a transfecção do miR-205 mimético induziu um aumento dos níveis de Snail, vimentina e N-caderina em linhagens celulares de carcinoma nasofaríngeo HNE1, o que condiz apenas parcialmente com os resultados obtidos na NOK/SK2. Ademais, em linhagens de câncer oral, miR-296 é associado a inibição da TEM por Zhang et al. (2020). É sugerido que a infecção por *F. nucleatum*, responsável pela indução de TEM em células epiteliais orais através da repressão do miR-296, eleva os níveis de N-caderina, vimentina e Snail, o que está de acordo com nossos resultados. Ainda foi demonstrado que o miR-296-5p não se liga diretamente a 3'UTR de Snail, ou seja, a ação do miRNA seria apenas indireta (ZHANG et al., 2020).

Também utilizando linhagens de carcinoma nasofaríngeo, uma publicação de Chen et al. (2020) evidencia que o silenciamento de miR-296-5p regula positivamente N-caderina e Snail via TGF- β , e o contrário ocorre após a superexpressão do miR-296, indicando que miR-296 reprime a metástase relacionada a TEM nas linhagens analisadas, o que não é compatível com os resultados obtidos com a NOK/SK2. Mas, enquanto na NOK/SK2 o miR-296-5p está *upregulated*, nas linhagens de carcinoma nasofaríngeo está *downregulated*, e ainda há uma variação relativamente alta na expressão desse miRNA dentre as linhagens consideradas nesse estudo (CHEN et al., 2020), o que demonstra como inviável a comparação de resultados obtidos entre diferentes linhagens. Em cada linhagem, os miRNAs teriam um nível de expressão e diferentes genes alvo, e consequentemente, efeitos diferentes.

Desse modo, é visto que miR-296-5p e miR-205-5p regulam a TEM, o fenótipo de CTT, a capacidade de formação de esferas e colônias, conforme representado na figura 11. Vale ressaltar que miR-296-5p parece ter uma função mais relevante nesses processos, uma vez que promoveu uma redução mais significativa de ALDH,

vimentina, N-caderina e Snail. Tais resultados aparentemente divergem de dados disponíveis devido a utilização de linhagens celulares diferentes entre os estudos.

Figura 11 – Efeitos da inibição do miR-296 e superexpressão do miR-205 em células NOK/SK2



Células NOK/SK2, que apresentam uma superexpressão do miR-296-5p e inibição do miR-205-5p, foram transfectadas com o inibidor e mimético dos miRNAs selecionados, respectivamente. A inibição do miR-296-5p e superexpressão do miR-205-5p provocou a redução do fenótipo de CTT e da capacidade de formação de esferas e colônias, no entanto, não alterou o potencial apoptótico. O papel do miR-205-5p sobre TEM foi inconclusivo, mas a inibição do miR-296-5p provocou a redução da TEM. Figura criada com *BioRender.com*; autoria própria.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, é sugerido que miR-205-5p e miR-296-5p estariam envolvidos em etapas fundamentais da tumorigênese promovida pela esfingosina quinase 2 nas células NOK/SK2.

Em células NOK/SK2, miR-205-5p teria função antitumoral, enquanto miR-296-5p, pró-tumoral. No entanto, miR-296-5p parece ter influência mais significativa sobre a TEM e CTT, características da transformação maligna e progressão tumoral. Tais dados são relevantes no contexto de desenvolvimento de técnicas de diagnóstico precoce do câncer oral, predição de prognóstico e até mesmo novos tratamentos.

Outros estudos serão necessários para caracterizar a função desses miRNAs em linhagens de CEO, assim como explorar a relação dos dois miRNAs com SPHK2.

REFERÊNCIAS

- AGHIORGHIESEI, O. et al. Dysregulation of miR-21-5p, miR-93-5p, miR-200c-3p and miR-205-5p in Oral Squamous Cell Carcinoma: A Potential Biomarkers Panel? **Current Issues in Molecular Biology**, v. 44, n. 4, p. 1754–1767, 16 abr. 2022.
- AGHIORGHIESEI, O. et al. The World of Oral Cancer and Its Risk Factors Viewed from the Aspect of MicroRNA Expression Patterns. **Genes**, v. 13, n. 4, p. 594, 26 mar. 2022.
- BAHMAD, H. F. et al. Sphere-Formation Assay: Three-Dimensional in vitro Culturing of Prostate Cancer Stem/Progenitor Sphere-Forming Cells. **Frontiers in Oncology**, v. 8, 28 ago. 2018.
- BATLLE, E. et al. The transcription factor Snail is a repressor of *E-cadherin* gene expression in epithelial tumour cells. **Nature Cell Biology** 2, 84–89, 13 jan. 2000.
- BEHM-ANSMANT, I.; REHWINKEL, J.; IZAURRALDE, E. MicroRNAs Silence Gene Expression by Repressing Protein Expression and/or by Promoting mRNA Decay. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 71, n. 0, p. 523–530, 1 jan. 2006.
- CALIFANO, J. et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. **Cancer research**, v. 56, n. 11, 1996.
- CALIN, G. A. et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 9, p. 2999–3004, 18 fev. 2004.
- CAO, X. et al. Circ-E2F3 promotes cervical cancer progression by inhibiting microRNA-296-5p and increasing STAT3 nuclear translocation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1507, n. 1, p. 84–98, set. 2021.
- CHEN, M. et al. MicroRNA-296-5p inhibits cell metastasis and invasion in nasopharyngeal carcinoma by reversing transforming growth factor- β -induced epithelial-mesenchymal transition. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 25, n. 1, p. 49, 3 nov. 2020.
- CHEN, X. et al. MiR-205-5p Functions as a Tumor Suppressor in Gastric Cancer Cells through Downregulating FAM84B. **Journal of Oncology**, v. 2022, p. 1–10, 27 maio 2022.
- CHEN, Y. Primary oral squamous cell carcinoma: an analysis of 703 cases in southern Taiwan. **Oral Oncology**, v. 35, n. 2, p. 173–179, mar. 1999.
- COCA-PELAZ, A. et al. The risk of second primary tumors in head and neck cancer: A systematic review. **Head & Neck**, v. 42, n. 3, p. 456–466, 21 nov. 2019.
- Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. **Nature**, v. 517, n. 7536, p. 576–582, 28 jan. 2015.

CORREIA DE SOUSA, M. et al. Deciphering miRNAs' Action through miRNA Editing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 24, p. 6249, 11 dez. 2019.

DA CUNHA, A. R. et al. The impact of inequalities and health expenditure on mortality due to oral and oropharyngeal cancer in Brazil. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 18 jun. 2021.

DAI, L. et al. The sphingosine kinase 2 inhibitor ABC294640 displays anti-non-small cell lung cancer activities *in vitro* and *in vivo*. **International Journal of Cancer**, v. 142, n. 10, p. 2153–2162, 4 jan. 2018.

DE MURCIA, J. M. et al. Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 14, p. 7303–7307, 8 jul. 1997.

DE WEVER, O. et al. Molecular and pathological signatures of epithelial–mesenchymal transitions at the cancer invasion front. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 130, n. 3, 22 jul. 2008.

DENARO, N.; MERLANO, M. C.; RUSSI, E. G. Follow-up in Head and Neck Cancer: Do More Does It Mean Do Better? A Systematic Review and Our Proposal Based on Our Experience. **Clinical and Experimental Otorhinolaryngology**, v. 9, n. 4, p. 287–297, 1 dez. 2016.

DHANUTHAI, K. et al. Oral cancer: A multicenter study. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, 2017.

DIAZ ESCARCEGA, R.; MCCULLOUGH, L. D.; TSVETKOV, A. S. The Functional Role of Sphingosine Kinase 2. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 8, 14 maio 2021.

DING, G. et al. Protein Kinase D-mediated Phosphorylation and Nuclear Export of Sphingosine Kinase 2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 37, p. 27493–27502, set. 2007.

DOUVILLE, J.; BEAULIEU, R.; BALICKI, D. ALDH1 as a Functional Marker of Cancer Stem and Progenitor Cells. **Stem Cells and Development**, v. 18, n. 1, p. 17–26, jan. 2009.

FILIPOWICZ, W.; BHATTACHARYYA, S. N.; SONENBERG, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 2, p. 102–114, fev. 2008.

FOY, J.-P. et al. New DNA Methylation Markers and Global DNA Hypomethylation Are Associated with Oral Cancer Development. **Cancer Prevention Research**, v. 8, n. 11, p. 1027–1035, 4 set. 2015.

FRENCH, K. J. et al. Pharmacology and Antitumor Activity of ABC294640, a Selective Inhibitor of Sphingosine Kinase-2. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 333, n. 1, p. 129–139, 8 jan. 2010.

GARZON, R.; CALIN, G. A.; CROCE, C. M. MicroRNAs in Cancer. **Annual Review of Medicine**, v. 60, n. 1, p. 167–179, 1 fev. 2009.

GULEI, D. et al. The silent healer: miR-205-5p up-regulation inhibits epithelial to mesenchymal transition in colon cancer cells by indirectly up-regulating E-cadherin expression. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 2, 19 jan. 2018.

HAIT, N. C. et al. Regulation of Histone Acetylation in the Nucleus by Sphingosine-1-Phosphate. **Science**, v. 325, n. 5945, p. 1254–1257, 4 set. 2009.

HAN, W. et al. Aloperine inhibits colorectal cancer cell proliferation and metastasis progress via regulating miR-296-5p/STAT3 axis. **Tissue and Cell**, v. 74, p. 101706, fev. 2022.

HAYES, J.; PERUZZI, P. P.; LAWLER, S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. **Trends in Molecular Medicine**, v. 20, n. 8, p. 460–469, ago. 2014.

HAZAN, R. B. et al. Exogenous Expression of N-Cadherin in Breast Cancer Cells Induces Cell Migration, Invasion, and Metastasis. **Journal of Cell Biology**, v. 148, n. 4, p. 779–790, 21 fev. 2000.

HEZOVA, R. et al. MiR-205 functions as a tumor suppressor in adenocarcinoma and an oncogene in squamous cell carcinoma of esophagus. **Tumor Biology**, v. 37, n. 6, p. 8007–8018, 28 dez. 2015.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Betel-quid and areca-nut chewing and some areca-nut derived nitrosamines. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, No. 85. **International Agency for Research on Cancer**, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK316567/>>. Acesso em: 2 de janeiro de 2022.

IORIO, M. V. et al. microRNA-205 Regulates HER3 in Human Breast Cancer. **Cancer Research**, v. 69, n. 6, p. 2195–2200, 10 mar. 2009.

IRFAN, M.; DELGADO, R. Z. R.; FRIAS-LOPEZ, J. The Oral Microbiome and Cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 23 out. 2020.

JOHNSON, D. E. et al. Head and neck squamous cell carcinoma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 6, n. 1, 26 nov. 2020.

KAUFMANN. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. **Cancer research**, v. 53, n. 17, 2022.

KIM, J.-S. et al. MicroRNA-205 suppresses the oral carcinoma oncogenic activity via down-regulation of Axin-2 in KB human oral cancer cell. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 387, n. 1-2, p. 71–79, 29 out. 2013.

KREK, A. et al. Combinatorial microRNA target predictions. **Nature Genetics**, v. 37, n. 5, p. 495–500, 3 abr. 2005.

KUMARI, P.; DEBTA, P.; DIXIT, A. Oral Potentially Malignant Disorders: Etiology, Pathogenesis, and Transformation Into Oral Cancer. **Frontiers in pharmacology**, v. 13, p. 825266, 2022.

LEBLANC, F. R. et al. Sphingosine kinase-2 is overexpressed in large granular lymphocyte leukaemia and promotes survival through Mcl-1. **British Journal of Haematology**, v. 190, n. 3, p. 405–417, 2 mar. 2020.

LEE, K.-H. et al. MicroRNA-296-5p (miR-296-5p) functions as a tumor suppressor in prostate cancer by directly targeting Pin1. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 9, p. 2055–2066, set. 2014.

MACEYKA, M. et al. SphK1 and SphK2, Sphingosine Kinase Isoenzymes with Opposing Functions in Sphingolipid Metabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 44, p. 37118–37129, nov. 2005.

MAIA, D. et al. Expression of miR-296-5p as predictive marker for radiotherapy resistance in early-stage laryngeal carcinoma. **Journal of Translational Medicine**, v. 13, p. 262, 12 ago. 2015.

MAJID, S. et al. MicroRNA-205-directed transcriptional activation of tumor suppressor genes in prostate cancer. **Cancer**, v. 116, n. 24, p. 5637–5649, 24 ago. 2010.

MIN, A. et al. MicroRNAs as Important Players and Biomarkers in Oral Carcinogenesis. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–10, 2015.

NAGAI, H. et al. MicroRNA-205-5p suppresses the invasiveness of oral squamous cell carcinoma by inhibiting TIMP-2 expression. **International Journal of Oncology**, 31 jan. 2018.

NAGY, Á.; MUNKÁCSY, G.; GYÖRFFY, B. Pancancer survival analysis of cancer hallmark genes. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 15 mar. 2021.

NEUBAUER, H. A. et al. An oncogenic role for sphingosine kinase 2. **Oncotarget**, v. 7, n. 40, p. 64886–64899, 30 ago. 2016.

NIU, Z. et al. HNRNPU-AS1 Regulates Cell Proliferation and Apoptosis via the MicroRNA 205-5p/AXIN2 Axis and Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in Cervical Cancer. **Molecular and Cellular Biology**, v. 41, n. 10, 24 set. 2021.

OGRETMEN, B. Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 18, n. 1, p. 33–50, 17 nov. 2017.

OKAZAKI, J. et al. MicroRNA-296-5p Promotes Cell Invasion and Drug Resistance by Targeting Bcl2-Related Ovarian Killer, Leading to a Poor Prognosis in Pancreatic Cancer. **Digestion**, v. 101, n. 6, p. 794–806, 27 set. 2019.

OTA, N. et al. In vitro and in vivo expression of aldehyde dehydrogenase 1 in oral squamous cell carcinoma. **International Journal of Oncology**, v. 44, n. 2, p. 435–442, 27 nov. 2013.

PYNE, N. J. et al. Sphingosine 1-phosphate and cancer. **Advances in Biological Regulation**, v. 68, p. 97–106, maio 2018.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, 28 jun. 2012.

SCHREIBER, V. et al. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 7, p. 517–528, jul. 2006.

SHI, D.-M. et al. miR-296-5p suppresses stem cell potency of hepatocellular carcinoma cells via regulating Brg1/Sall4 axis. **Cellular Signalling**, v. 72, p. 109650, 1 ago. 2020.

SLAUGHTER, D. P.; SOUTHWICK, H. W.; SMEJKAL, W. “Field cancerization” in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin. **Cancer**, v. 6, n. 5, p. 963–968, set. 1953.

STAHLHUT, C.; SLACK, F. J. MicroRNAs and the cancer phenotype: profiling, signatures and clinical implications. **Genome Medicine**, v. 5, n. 12, p. 111, 2013.

STRUB, G. M. et al. Sphingosine-1-phosphate produced by sphingosine kinase 2 in mitochondria interacts with prohibitin 2 to regulate complex IV assembly and respiration. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 2, p. 600–612, 19 out. 2010.

SUN, S.; WANG, Z. ALDHhigh adenoid cystic carcinoma cells display cancer stem cell properties and are responsible for mediating metastasis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 396, n. 4, p. 843–848, jun. 2010.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 4 fev. 2021.

TAHMASEBI, E. et al. The current markers of cancer stem cell in oral cancers. **Life Sciences**, v. 249, p. 117483, maio 2020.

VENANT, H. et al. The Sphingosine Kinase 2 Inhibitor ABC294640 Reduces the Growth of Prostate Cancer Cells and Results in Accumulation of Dihydroceramides *In Vitro* and *In Vivo*. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 14, n. 12, p. 2744–2752, 1 dez. 2015.

VENKATA, J. K. et al. Inhibition of sphingosine kinase 2 downregulates the expression of c-Myc and Mcl-1 and induces apoptosis in multiple myeloma. **Blood**, v. 124, n. 12, p. 1915–1925, 18 set. 2014.

WHEELOCK, M. J. et al. Cadherin switching. **Journal of Cell Science**, v. 121, n. 6, p. 727–735, 26 fev. 2008.

WÜRDINGER, T. et al. miR-296 Regulates Growth Factor Receptor Overexpression in Angiogenic Endothelial Cells. **Cancer Cell**, v. 14, n. 5, p. 382–393, nov. 2008.

XUN, C. et al. Targeting sphingosine kinase 2 (SphK2) by ABC294640 inhibits colorectal cancer cell growth in vitro and in vivo. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 34, n. 1, 4 set. 2015.

YAN, G. et al. MicroRNA-296-5p inhibits cell proliferation by targeting HMGA1 in colorectal cancer. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 22, n. 2, 24 maio 2021.

YEH, D. W. et al. Downregulation of COMMD1 by miR-205 promotes a positive feedback loop for amplifying inflammatory- and stemness-associated properties of cancer cells. **Cell death and differentiation**, 23(5), 841–852, maio de 2016.

YETE, S.; SARANATH, D. MicroRNAs in oral cancer: Biomarkers with clinical potential. **Oral Oncology**, v. 110, p. 105002, nov. 2020.

YU, S. S.; CIRILLO, N. The molecular markers of cancer stem cells in head and neck tumors. **Journal of Cellular Physiology**, v. 235, n. 1, p. 65–73, 17 jun. 2019.

YU, S.-W. Mediation of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1-Dependent Cell Death by Apoptosis-Inducing Factor. **Science**, v. 297, n. 5579, p. 259–263, 12 jul. 2002.

ZHANG, L. M. et al. Epigenetic regulation of VENTXP1 suppresses tumor proliferation via miR-205-5p/ANKRD2/NF- κ B signaling in head and neck squamous cell carcinoma. **Cell Death & Disease**, v. 11, n. 10, out. 2020.

ZHANG, P. et al. miR-205-5p regulates epithelial-mesenchymal transition by targeting PTEN via PI3K/AKT signaling pathway in cisplatin-resistant nasopharyngeal carcinoma cells. **Gene**, v. 710, p. 103–113, ago. 2019.

ZHANG, S. et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes epithelial-mesenchymal transition through regulation of the lncRNA MIR4435-2HG/miR-296-5p/Akt2/SNAI1 signaling pathway. **The FEBS Journal**, v. 287, n. 18, p. 4032–4047, 1 set. 2020.

ZHANG. [Effect and mechanism of circular RNA BICD2 on the biological behavior of oral squamous cell carcinoma cells]. **Zhonghua kou qiang yi xue za zhi = Chinese journal of stomatology**, v. 56, n. 11, 2021.

ZHOU, J.; CHEN, J.; YU, H. Targeting sphingosine kinase 2 by ABC294640 inhibits human skin squamous cell carcinoma cell growth. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 497, n. 2, p. 535–542, mar. 2018.

ZHOU, Z. et al. Expression and Possible Molecular Mechanisms of microRNA-205-5p in Patients With Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Technology in Cancer Research & Treatment**, v. 19, p. 153303382098011, 1 jan. 2020.

Zidar, N. et al. The role of epithelial- mesenchymal transition in squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Virchows Archiv**, v. 472, n. 2, p. 237–245, 12 jul. 2017.