

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

Ricardo Cesar Cintra

***Stratifin* em Tumores de Cabeça e Pescoço: Um alvo
molecular identificado por *Phage Display*.**

Versão da Tese Defendida

São Paulo, 25 de novembro de 2021

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.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

C574s Cintra, Ricardo Cesar
 Stratifin em Tumores de Cabeça e Pescoço: Um novo
 alvo molecular identificado por Phage Display /
 Ricardo Cesar Cintra. - São Paulo, 2021.
 97 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da
Universidade de São Paulo. Departamento de
Bioquímica.
Orientador: Villa, Luisa Lina

1. Biologia molecular. 2. Oncologia. 3.
Papilomavirus Humano. 4. Câncer de cabeça e pescoco.
5. CRISPR/Cas9. I. T. II. Villa, Luisa Lina,
orientador.

Ricardo Cesar Cintra

Stratifin em Tumores de Cabeça e Pescoço: Um alvo molecular identificado por *Phage Display*.

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do Título de
Doutor em Ciências (Bioquímica)*

Área de Concentração: Bioquímica

Orientador: Dr^a. Luisa Lina Villa

São Paulo

2021

Ricardo Cesar Cintra

***Stratifin* em Tumores de Cabeça e Pescoço: Um alvo molecular identificado por Phage Display.**

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos sinceros às pessoas que me ampararam durante as diferentes fases da execução desse projeto em especial a Prof^ª Luisa que me deu a oportunidade de compor sua equipe. Além disso, e de suma importância, me deu a liberdade para transitar em diferentes lugares e buscar diferentes maneiras para chegarmos às nossas conclusões. Gostaria de agradecer o suporte permanente da Raquel Ressel que me ajudou/ajuda demais em todo o meu processo. Agradeço demais à Lenice e Iza por todos esses anos de amizade, trabalho e confraternizações (que venham mais!!!). Agradeço também ao pessoal do laboratório de Inovação em Câncer: Daniel Bastos, Mirian Morale, Mayara Sallas, Giana Mota, Lara Termini, Gabriela Ávila, Rafaella Nunes e Mércia. Também agradeço o suporte dos alunos do laboratório de biologia molecular do CTO Valéria, Amanda, Aline, Milena e Matthew. Além do meu departamento, devo agradecer à Mara, Bianca, Prof^º Fábio e à equipe do LIM 43. Meus sinceros agradecimentos também ao pessoal do LIM 15, Prof^ª Suely Marie, Dr^ª Sueli Oba, Talita e Camila pelas colaborações. Ao laboratório do Prof^º Carlos Menck e seus alunos e supervisionados Mateus e Clarissa pelo suporte logo que eu comecei com as estratégias de CRISPR. Agradeço ao laboratório de Bioquímica Combinatorial do Prof^º Ricardo Giordano, Fenny Tang e sua aluna (e minha amiga) Heloise Luchiari pelo suporte com reagentes e criatividade durante a elaboração dos experimentos. Ao Prof^º Enrique Boccardo e o laboratório de Oncovirologia em nome da Suellen, Vanesca, Bruna e Andressa. Agradeço ao laboratório CENTD em nome do Carlos de Ocesano pelo suporte durante todos esses anos. Agradeço ao grupo da Prof^ª Olga do Instituto butanta em nome da Andrea Borrego pelas colaborações em CRISPR/Cas9 e permanente suporte (inclusive emocional nesse processo). Agradeço ao Nucl em nome da Prof^ª Mari Cleyde Sogayar e Ana Cláudia Carreira. Agradeço também aos meus orientados de Iniciação Científica Kenzo, Lygia e Lucca pela oportunidade de compartilhar um pouco do que aprendi e contribuir para a formação de vocês.

Gostaria de agradecer em especial (e em ordem alfabética porque não teve um que foi mais importante): Andgelina Giarretta, Carlos Romano, Cleber Santana, Diogo Lins, Fernanda Cintra (irmã), Felipe Fehr (cunhado), Filipe Rosa Gomes, Guilherme Luigi, Lucas Fitzz, Marina Trombetta, Sônia Cintra (a mãe), Vanessinha (Promega) e Vera Cintra (a tia). O carinho das minhas três sobrinhas lindas Sarah, Marina e Catharina.

Um agradecimento especial à minha avó Sarah que foi tão importante em todas as etapas da minha vida.

À VOCÊS, MUITO OBRIGADO!

"Study hard what interest you the most in the most undisciplined, irreverent and original manner possible ."

Richard Feynman

RESUMO

Cintra, R.C. *Stratifin em tumores de cabeça e pescoço: um alvo molecular identificado por Phage Display*. 2021. 97 p. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Nos últimos anos, houve um aumento na frequência dos casos de tumores de cabeça e pescoço apesar da diminuição do consumo do tabaco e álcool, e isso tem sido atribuído, em parte, à infecção pelo Papilomavírus Humano – HPV. Por apresentar baixa sobrevida em 5 anos e ter alta morbidade, tem se buscado novos alvos moleculares para terapias combinadas. Nesse contexto nosso grupo identificou, através da tecnologia de *Phage Display*, uma sequência peptídica com interação preferencial por células tumorais com relação à células não transformadas, e ensaios adicionais identificaram seu alvo como sendo a proteína *Stratifin*. *Stratifin* tem sido reportado como um oncogene em diversos modelos tumorais, entretanto seu papel em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP) permanece desconhecido e poucos trabalhos na literatura reportam sua atividade em CCECP e/ou outros tumores relacionados ao HPV. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi explorar o potencial valor clínico e o papel biológico da *Stratifin* em CCECP. Dados do perfil de expressão e de metilação assim como dados clínicos foram extraídos em base de dados do *The Cancer Genome Atlas* – TCGA. Paralelamente, o perfil de expressão de *Stratifin* foi verificado através de ensaios de *RT/qPCR* e *Western Blot* em um painel de linhagens celulares de CCECP que contempla as principais características moleculares para esses tipos tumorais. A partir da observação de que todas as linhagens expressam *Stratifin*, utilizou-se a tecnologia de CRISPR/Cas9 para modular sua expressão (nocauteando ou superexpressando o gene) de modo a se observar parâmetros relacionados ao processo tumorigênico. Dessa forma, foi possível verificar os efeitos da *Stratifin* em ensaios de proliferação, viabilidade após tratamentos com quimioterápicos, irradiação, crescimento livre de ancoragem e clonogenicidade. Como resultados, observamos que expressão aumentada de *Stratifin* no tecido tumoral quando comparado ao tecido normal, foi positivamente relacionada com o grau histológico, negatividade para HPV, mutação em *TP53* e *CDKN2A*. Biologicamente, o nocaute de *Stratifin* foi relacionado com maior sensibilidade à quimioterápicos, menor capacidade de formação de colônias, e reduzida capacidade de crescimento livre de ancoragem. Esses resultados sugerem que *Stratifin* atue como um oncogene em CCECP, entretanto ensaios adicionais devem ser realizados para corroborar esse achados.

Palavras-chaves: Câncer de cabeça e pescoço, HPV, *Phage Display*, *Stratifin*, CRISPR/Cas9.

ABSTRACT

Cintra, R.C. **Stratifin in head and neck tumors: a molecular target identified by Phage Display**. 2021. 97 p. Doctoral Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Over recent years, there has been an increase of head and neck tumors frequency despite the decrease in tobacco and alcohol consumption, and this has been attributed, in part, to Human Papillomavirus infection. Due to its low 5-year survival and high morbidity, new molecular targets for combined therapies have been sought. In this context, our group identified, through Phage Display technology, a peptide sequence with preferential interaction by tumor cells in relation to non-transformed cells, and further assays identified its target as the Stratifin protein. Stratifin has been reported as an oncogene in several tumor models, however its role in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) remains unknown and few works in the literature report its activity in HNSCC and/or other HPV-related tumors. Therefore, the aim of this study was to explore the potential clinical value and biological role of Stratifin in HNSCC. Expression profile data as well as clinical data were extracted from The Cancer Genome Atlas - TCGA database. In parallel, the expression profile of Stratifin was verified through RT/qPCR and Western Blot assays in a panel of HNSCC cell lines that address the main molecular characteristics for these tumor types. Since all cell lines express Stratifin, CRISPR/Cas9 technology was used to modulate its expression (gene knocking out or overexpressing) in order to check parameters related to the tumorigenic process. Thus, it was possible to verify the Stratifin effects in proliferation assays, viability after chemotherapy treatments, irradiation, anchorage-free growth and clonogenicity. As a result, we observed an increased expression of Stratifin in tumor tissue when compared to normal tissue, which was positively related to histological grade, HPV negativity, mutation in *TP53* and *CDKN2A*. Biologically, knockout of Stratifin was associated with greater sensitivity to chemotherapy, less colony-forming capacity, and reduced anchorage-free growth capacity. These results suggest that Stratifin acts as an oncogene in HNSCC, however additional assays should be performed to corroborate these findings.

Keywords: Head and Neck Cancer, HPV, Phage Display, Stratifin, CRISPR/Cas9.

Lista de abreviaturas e siglas

ATP:	<i>Adenosine Triphosphate</i>
BaP:	<i>Benzopirene</i>
BER:	<i>Base excision repair</i>
CDK:	<i>Cyclin Dependent Kinase</i>
CDS:	<i>Coding Sequence</i>
CRISPR:	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
Ct:	<i>Cycle threshold</i>
DEPC:	<i>Diethyl pyrocarbonate</i>
EDTA:	<i>Ácido etilenodiamino tetra-acético</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
GLOBOCAN	<i>Global cancer observatory</i>
HPV:	<i>Human papillomavirus</i>
hTERT:	<i>human telomerase reverse transcriptase</i>
IARC:	<i>International Agency for Research in Cancer</i>
INCA	<i>Instituto Nacional do Câncer</i>
kDa:	<i>Kilodaltons</i>
LCR:	<i>Long Control Region</i>
MHC:	<i>Major histocompatibility complex</i>
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
NER	<i>Nucleotide excision repair</i>
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i>
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>
ORF	<i>Open reading frame</i>
PAC	<i>Puromycin N-acetyltransferase</i>
PAM	<i>Protospacer adjacent motif</i>
pb:	<i>Pares de bases</i>
PBS:	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PPI	<i>Protein-protein interaction</i>
PCR:	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDZ:	<i>Classe de proteínas com domínio estrutural característico</i>
RT-qPCR	<i>Reverse transcriptase- quantitative polymerase chain reaction</i>
SAM	<i>Synergistic activation mediator</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SFN	<i>Stratifin</i>
TSS	<i>Transcription start site</i>
UTR	<i>Untranslated region</i>
VLP	<i>Viral-like particle</i>

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Câncer de Cabeça e Pescoço	12
1.2. Tratamento e o papel da radioterapia em CCECP.....	15
1.3. Phage Display	16
1.4. Mecanismos moleculares no desenvolvimento do CCECP por mutágenos exógenos não virais	17
1.5. O Papel do Papilomavírus Humano (HPV).....	19
1.5.1 Biologia do HPV	20
1.5.2. Ciclo viral	21
1.5.3. Mecanismo de carcinogênese por HPV.....	24
1.6 Alterações genéticas no processo de tumorigenese em CCECP	26
1.7. <i>Stratifin</i>	28
2. OBJETIVOS.....	32
2.1. Objetivo Geral	32
2.2. Objetivos Específicos	32
3. METODOLOGIA.....	33
3.1. Cultura de Células	33
3.2. Extração de RNA e síntese de cDNA.....	33
3.2.1. Desenho dos iniciadores (<i>primers</i>) e padronização da <i>RT-qPCR</i>	34
3.2.2. Ensaio de eficiência, <i>LOQ</i> & <i>LOD</i>	35
3.2.3. Seleção dos genes normalizadores e análise da expressão gênica	36
3.3. Extração e quantificação de proteínas	36
3.3.1. Western Blot.....	37
3.4. Sistema CRISPR/Cas9 para nocaute e ativação gênica.....	37
3.4.1. Desenho do sgRNA para nocaute gênico	40
3.4.2. Desenho do sgRNA para ativação gênica (<i>SAM/Cas9</i>)	41
4.3. Clonagem dos sgRNAs nos vetores do sistema CRISPR/Cas9.....	44

3.4.4. Produção e quantificação de lentivírus para o sistema CRISPR de ativação gênica.....	45
3.4.4.1. Titulação de Lentivírus e determinação do MOI.....	46
3.4.5. Curva de morte para Puromicina, Blastidina, Higromicina e Zeocina.....	47
3.4.6. Transdução Celular para o Sistema de ativação gênica.....	47
3.4.7. Transfecção Celular para nocaute gênico e seleção clonal.....	48
3.4.8. Caracterização do nocaute e ativação gênica	49
3.4.8.1. Extração de DNA e precipitação em etanol.....	50
3.4.8.2. Amplificação, clonagem e sequenciamento de DNA.....	51
3.5. Análise <i>in silico</i>	52
3.6. Ensaio de proliferação (cinética de crescimento).....	53
3.7. Ensaio de viabilidade celular com administração de agentes genotóxicos	53
3.8. Crescimento em suspensão de agarose (livre de ancoragem).....	55
3.9. Análise de ciclo celular após irradiação	55
3.9.1. Determinação da dose de radiação	56
3.9.2. Irradiação e preparação das células para citometria de fluxo.....	56
3.10. Ensaio clonogênico.....	57
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1. A base de dados do TCGA mostra a expressão aumentada de <i>Stratifin</i> em CCECP com relação ao tecido normal.....	58
4.2. <i>Stratifin</i> está expressa nas diferentes linhagens celulares para o estudo de CCECP.....	63
4.3. Caracterização dos nocautes para <i>Stratifin</i>	67
4.4. Ativação de <i>Stratifin</i> pelo sistema CRISPR/Cas9 (SAM/Cas9).....	70
4.5. A <i>Stratifin</i> parece conter a proliferação celular em duas linhagens de CCECP.....	71
4.6. <i>Stratifin</i> promove resistência à agentes genotóxicos em linhagens com alterações em <i>TP53</i> seja por mutação ou degradação promovida por HR-HPV	74
4.7. O nocaute de <i>Stratifin</i> sensibilizou mais a linhagem com p53 mutado.....	77
4.8. Na ausência <i>Stratifin</i> a eficiência de plaqueamento em substrato sólido é prejudicada ..	81

4.9. Apenas a linhagem com <i>TP53^{mut}</i> mostrou a habilidade de proliferação livre de ancoragem	84
5. Conclusões.....	87
Bibliografia.....	89

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de Cabeça e Pescoço

As neoplasias conhecidas coletivamente como câncer de cabeça e pescoço normalmente se originam de células epiteliais que revestem a superfície mucosa da cavidade oral, faringe, laringe e menos frequentemente no epitélio da cavidade nasal. Essas neoplasias são classificadas como carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP) e compõem 90% das neoplasias dessa região anatômica (Figura 1). O remanescente é composto por neoplasias que se originam nos seios da face, glândulas salivares e células do tecido conjuntivo (músculos, nervos, vasos sanguíneos etc.) e perfazem menos de 10% em frequência. Embora esses tipos tumorais muitas vezes sejam tratados como uma entidade única, cada sítio tem suas particularidades anatômicas, funcionais e moleculares (revisado por Johnson *et al.*, 2020; revisado por Chow, 2020)

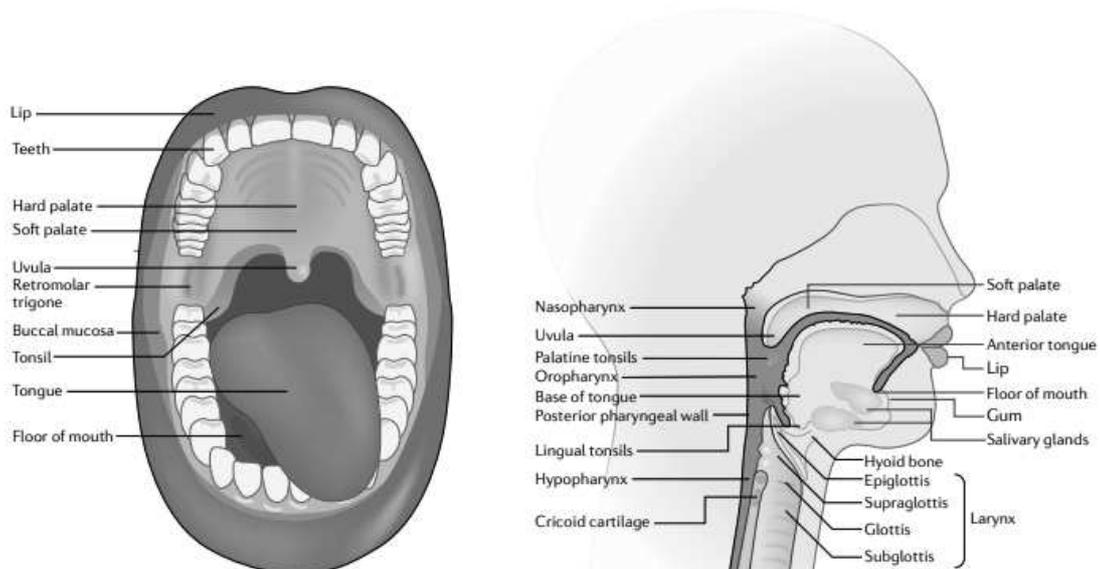


Figura 1 -Sítios anatômicos do desenvolvimento dos cânceres de células escamosas de cabeça e pescoço: **Cavidade oral:** lábios, mucosa bucal, palato duro, os dois terços anteriores da língua, assoalho da boca e o triângulo retromolar; **Nasofaringe:** cavidade nasal e seios paranasais; **Orofaringe:** tonsilas, base da língua, palato mole, úvula e parede faríngea posterior; **Hipofaringe:** parte inferior da garganta que se estende do osso hioide à cartilagem cricóide; **Laringe:** subglote, glote e supraglote (adaptado de Johnson *et al.*, 2020)

Os cânceres de cabeça e pescoço (CCECP) representam cerca de 4,8% dos cânceres e estão associados a uma porcentagem semelhante (de também ~4,8%) de mortalidade por câncer em todo o mundo. Constituem o sexto tipo mais frequente de câncer com uma incidência estimada de aproximadamente 890.000 novos casos e 450.000 mortes ao ano, que é a sétima

maior causa de morte por câncer (Globocan, 2018). No Brasil a incidência estimada em 2020 foi de aproximadamente 27.000 novos casos e 12.800 mortes ao ano, representando a quinta maior incidência e causa de morte por câncer segundo dados do Instituto Nacional do Cancer (INCA) (<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer> acessado em 29/09/2021).

Os principais fatores de risco para esses tipos tumorais incluem o consumo de tabaco, noz de areca, folha de betel, ingestão de bebidas alcoólicas e a infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) (revisado por Johnson *et al.*, 2020). A frequência e distribuição desses tumores com relação aos fatores de risco, prognóstico e sobrevida em cinco anos varia enormemente de acordo com variáveis socioeconômicas e comportamentais. Por exemplo, grande parte dos tumores da cavidade oral em países de baixa e média renda na Ásia são atribuídos ao consumo de Noz de Areca, enquanto globalmente o tabagismo associado ou não ao consumo de bebida alcoólica tem sido considerado o principal fator de risco (Lee *et al.*, 2019; revisado por Johnson *et al.*, 2020).

O consumo do tabaco tem sido considerado o fator mais importante com uma associação de aproximadamente 34% que, quando associado com o álcool, aumenta para 36%. O consumo de álcool como único fator de risco tem a menor associação com apenas 5% dos casos enquanto o remanescente de 25% tem sido atribuído à infecção pelo Papilomavírus Humano (revisado por Tumban, 2019).

Nos últimos 30 anos, porém, em muitos países de alta renda como Estados Unidos, Austrália e países da Europa Ocidental tem sido observado uma diminuição na incidência de tumores de cabeça e pescoço atribuídos ao tabaco e álcool resultante da diminuição global do tabagismo (revisado por Chow, 2020). Concomitante a isso, tem sido reportado um aumento global (embora existam variações na proporção entre países e regiões) na incidência de tumores originados em sítios específicos da orofaringe e que são causados por HPV (Gillison *et al.*, 2015, Mehanna *et al.*, 2016, revisado por Carlander *et al.*, 2021).

O aumento na frequência desses tumores tem sido atribuído principalmente a mudanças no comportamento sexual incluindo o aumento no número de parcerias sexuais, aumento na prática de sexo oral, contato com indivíduos do mesmo sexo, início precoce da vida sexual. Além disso, o aumento na incidência desses tipos tumorais reflete a latência após 10 a 30 anos da exposição, já que indivíduos que apresentaram lesões relacionadas ao HPV reportaram a prática de sexo oral com diversas parcerias quando mais jovens. (Heck *et al.*, 2010; Shewale; Gillison, 2019). Nos Estados Unidos a frequência de tumores de cabeça e pescoço atribuídos ao HPV (mais de 70% dos tumores de orofaringe) já ultrapassa os de cérvix uterina (<https://www.cdc.gov/cancer/hpv/statistics/cases.htm> visitado em 01/10/2021).

A fração dos CCECP atribuída ao HPV varia entre os estudos dependendo da região geográfica e metodologia para o diagnóstico, de modo que usando apenas ensaios baseados em DNA, essa fração é superestimada em todos os sítios anatômicos, em especial na laringe. Dessa forma, tem sido sugerida a utilização de marcadores que atribuem causalidade como por exemplo a detecção de transcritos dos oncogenes virais *E6* e *E7* (Anantharaman *et al.*, 2017; revisado por Aupérin, 2020). Essa heterogeneidade com relação ao status de HPV também se deve às tendências com que se eleva ou diminui o consumo de tabaco e álcool, diferenças culturais e normas religiosas que determinam mudanças no comportamento sexual nas diferentes regiões geográficas (Shewale; Gillison, 2019).

Os homens são significativamente mais afetados do que as mulheres com uma proporção que varia de 2:1 a 4:1 sendo que as neoplasias atribuídas ao HPV tendem a acometer principalmente homens mais jovens, quando comparados à contraparte HPV negativos, (na faixa dos 53 anos), brancos, sem histórico de consumo prévio de tabaco ou álcool e melhor status socioeconômico. Em contrapartida a média de idade do diagnóstico dos indivíduos acometidos por esses tipos tumorais por outros fatores de risco é de aproximadamente 66 anos (Haegblom *et al.*, 2017; Ferlay *et al.*, 2015; revisado por Johnson *et al.*, 2020).

O diagnóstico precoce é o fator prognóstico mais importante para esses tipos tumorais já que é observada uma sobrevida em 5 anos de 70-90% quando diagnosticados em estágios iniciais da doença. Entretanto, a maioria dos casos (60-70%) são diagnosticados em estágios mais avançados com uma sobrevida em 5 anos menor que 50%. Dessa forma, prevenção e estratégias de rastreamento devem ser as abordagens mais importantes na redução da incidência e mortalidade (Anantharaman *et al.*, 2017; Hashim *et al.*, 2019).

Diversas abordagens de rastreamento têm sido consideradas incluindo inspeção visual, testes genéticos e testes moleculares para detecção de HPV. Entretanto, a implementação em larga escala de prevenção secundária encontra três grandes barreiras: (I) Não há evidências até o momento que a prevenção secundária para CCECP seja efetiva em reduzir a mortalidade quando aplicada; (II) Falta de consenso sobre qual população deve ser submetida ao rastreamento (III) Até o momento não existe nenhum algoritmo ou protocolo de triagem sistemática baseado em risco que possa ser prontamente aplicado (Hashim *et al.*, 2019).

1.2. Tratamento e o papel da radioterapia em CCECP

A abordagem terapêutica de cada paciente é determinada de acordo com o sítio anatômico, estadiamento, considerações funcionais e acessibilidade cirúrgica. Embora tumores de origens etiológicas diferentes (tabaco x HPV) tenham características diferentes, pacientes mais idosos não suportam um tratamento tão intensivo de modo que na prática, os dois grupos são tratados com abordagens similares (revisado por Johnson et al., 2020).

O papel da radiação ionizante no tratamento de CCECP é provocar um alto nível de estresse no tecido tumoral causando danos diretos ou indiretos nas principais macromoléculas biológicas, em especial ao DNA e proteínas, que acabam resultando em parada do ciclo celular e apoptose. Em geral, células em proliferação são mais susceptíveis à radiação ionizante do que células quiescentes. Entretanto, ao mesmo tempo que células tumorais apresentam uma alta taxa de proliferação, a reduzida oxigenação do ambiente tumoral gera uma menor sensibilidade desse grupo de células (Minafra; Bravatà, 2014).

O principal mecanismo de morte celular induzido por radiação ionizante é a catástrofe mitótica que ocorre quando a divisão celular é fatalmente interrompida. Dessa forma, a sensibilidade celular se baseia na taxa de proliferação e assim, células tumorais pouco diferenciadas são mais susceptíveis à radiação ionizante por proliferarem a todo tempo (Vakifahmetoglu; Olson; Zhivotovisky, 2019). Terapias genotóxicas como radioterapia, se utiliza do princípio de que as células tumorais têm vias de reparo de DNA defectivas em contraste com as células normais. Dessa forma, as doses de radiação tendem a ser fracionadas para que as células saudáveis possam se regenerar entre uma sessão e outra, enquanto que as células tumorais acumulem danos que causam a morte desse conjunto de células. Quanto menor a dose, menor a toxicidade de modo que deve ser baixa o suficiente para permitir a regeneração do tecido saudável, mas alta o suficiente para gerar a morte das células tumorais (Maany; Maani, 2019).

CCECP normalmente é tratado com ressecção cirúrgica, acompanhado de radiação adjuvante ou quimioterapia e radiação (conhecida como quimiorradiação ou quimiorradioterapia). Entretanto, a toxicidade tardia da radioterapia, causando disfagia crônica e pneumonia por aspiração, é muito potencializada com o uso da modalidade tripla, aumentando inclusive a mortalidade não relacionada à doença em si. Dessa forma, deve ser considerada a abordagem mais eficiente que preserve o máximo possível a função do sítio anatômico (Forastiere *et al.*, 2013).

Cada vez mais tem sido demonstrado que CCECP HPV positivos têm maior radiosensibilidade *in vitro*, porém ensaios clínicos ainda não conseguiram mostrar que um tratamento mais brando nesses tumores consiga menores impactos com a mesma efetividade (Kimple *et al.*, 2013; revisado por Johnson *et al.*, 2020; Economopoulou; Kotsantis; Pyrii, 2021).

Os principais mecanismos de radioresistência estão relacionados com a parada do ciclo celular e ativação os mecanismos de reparo capazes de restabelecer as lesões ocasionadas pelos agentes genotóxicos, evitando a catástrofe mitótica. Nesse sentido, fatores antiapoptóticos se sobrepõem a fatores pró-apoptóticos levando à sobrevivência celular (Kanno *et al.*, 2021).

Agentes quimioterápicos utilizados no tratamento de CCECP incluem cisplatina, 5-fluoracil e docetaxel/paclitaxel que embora tenham diferentes ações na célula, são adjuvantes na eliminação das células tumorais. Esses fármacos são utilizados na forma de monoterapia ou terapia combinada de modo a evitar a quimioresistência. Esta, por sua vez, é uma das principais causas da falha terapêutica, sendo que os principais mecanismos para a quimioresistência também se baseiam na ativação de mecanismos de reparo e evasão a morte celular induzida pelo fármaco (revisado por Liu *et al.*, 2021).

A utilização do inibidor do epidermal growth factor receptor Cetuximab, que é um anticorpo monoclonal, foi aprovado pelo FDA como radiosensibilizante com ou sem quimioterapia em casos de metástase ou recidiva, já que se observa que a expressão desse receptor é um fator bastante importante nos mecanismos de resistência. Entretanto, seu papel contra CCECP HPV positivo é bastante inferior ao da cisplatina. Alguns pacientes com recorrência ou metástase podem ainda se beneficiar da abordagem imunoterápica, sendo que o tratamento de primeira linha é o inibidor de PD1 (pembrolizumab), caso o tumor expresse PDL1. A combinação de pembrolizumab com quimioterapia aumentou a sobrevida global quando comparado à associação com cetuximab sem alterar a toxicidade. (Rieckmann; Kriegs, 2019, revisado por Johnson *et al.*, 2020; revisado por Liu *et al.*, 2021).

1.3. Phage Display

Nos últimos anos, houve uma melhora nas tecnologias para detecção e tratamento desses tipos tumorais principalmente com o uso de terapias multimodalidades. Estudos em andamento que estratificam os pacientes de acordo com o status de HPV têm personalizado o tratamento de forma a reduzir a morbidade e melhorar a qualidade de vida desse grupo de indivíduos. Entretanto, apesar de todos os avanços nessa área, se observa uma baixa sobrevida geral em

indivíduos acometidos por CCECP (independente do status de HPV), e uma maior ênfase tem sido dada na identificação de novos alvos moleculares para terapias combinadas (Ang *et al.*, 2010).

Nesse contexto nosso grupo utilizou a tecnologia de *Phage Display* em busca de novas moléculas com potencial diagnóstico e terapêutico para tumores de cabeça e pescoço em linhagens celulares e tecidos tumorais. Precocemente nesse processo, cogitou-se que peptídeos ligantes seriam capazes de distinguir entre a presença e ausência de HPV já que tumores causados por diferentes fatores etiológicos apresentam características moleculares bastante distintas.

Para o *screening*, foi utilizada uma biblioteca de octapeptídeos circulares (isto é, flanqueado por cisteínas) previamente clarificadas com a linhagem de queratinócitos orais não transformados (OKF-hTERT). A clarificação é a exposição da biblioteca peptídica a células normais com o objetivo de eliminar possíveis interações inespecíficas com as células tumorais. Para o *screening* foram utilizadas as linhagens derivadas carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço HPV negativa (UPCI:SCC78) e HPV positiva (UPCI:SCC154). Após o *screening* com os peptídeos ligantes, foram obtidos alguns peptídeos com motivos SGA conservados que embora tenham sido enriquecidos ao longo da seleção, não demonstraram afinidade específica satisfatória para as linhagens tumorais. Dessa forma um único clone, aqui chamado de 78.E01, teve maior reprodutividade experimental e mostrou uma interação preferencial pelas células tumorais independentemente da presença do HPV.

Ensaio complementares foram realizados para a identificação do alvo celular de 78.E01 através de cromatografia de afinidade e gel bidimensional. Os *spots* resultantes dos géis foram enviados para espectrometria de massas resultando na *Stratifin*. Por fim, um ensaio de ligação foi realizado e confirmou a afinidade do peptídeo pela proteína revelada pela espectrometria. Essa fase do trabalho foi realizada no laboratório de Inovação em Câncer sob supervisão da Prof^a Luísa Lina Villa, colaboração do Dr. Ricardo Giordano e executados pelos Drs Antero Macedo e Fenny Tang (dados não publicados).

1.4. Mecanismos moleculares no desenvolvimento do CCECP por mutágenos exógenos não virais

O mais conhecido fator de risco para o desenvolvimento de cânceres de cabeça e pescoço é o uso de tabaco com seus efeitos ligados às mutações em p53, além de outros genes.

Esse efeito tem sido atribuído principalmente a danos oxidativos ou formação de adutos de DNA por carcinógenos contidos no tabaco, em especial o Benzo[α]pireno diol epóxido (BaP). Este é um carcinógeno ambiental formado principalmente através da combustão incompleta de matéria orgânica. A fumaça de cigarro e a queima de combustível fóssil são as principais fontes desse composto podendo também ser encontrado em algumas atmosferas ocupacionais e em alimentos. Sua bioativação, entretanto, é mediada pelo receptor aril hidrocarboneto (fator de transcrição) que ao ser ativado pelo BaP é translocado para o núcleo onde induz a expressão de P450s, CYP1A1, epóxido hidrolases, desidrogenases, algumas peroxidases entre outros. Por sua vez, esses produtos gênicos permitem a biotransformação do Benzo[α]pireno à formação de vários subprodutos com uma maior atenção para o 7,8-diidroxi-9,10-epóxi-7,8,9,10-tetraidrobenzo(a)pireno (BPDE) o qual é capaz de formar ligações covalentes estáveis com proteínas e na posição N² da deoxiguanosina (BPDE- N²-dG) que, quando não reparadas, podem levar a mutações que alteram a atividade de oncogenes e/ou genes supressores tumorais (Jarvis *et al.*, 2014; Madureira *et al.*, 2014).

Mutações geradas por BPDE são transversões do tipo G→A ou G→T e parecem depender da sequência gênica acometida pela modificação já que um aduto pode formar diferentes conformações dependendo da sequência de DNA adjacente (Shukla *et al.*, 1997). A maioria desses danos, porém, podem ser revertidos através dos sistemas de reparo por excisão de nucleotídeos (NER) ou reparo por excisão de bases (BER) que são complexos multienzimáticos capazes de identificar e remover alterações estruturais no DNA. Por outro lado, polimorfismos individuais dos genes que compõem esses sistemas de reparo podem influenciar no risco de estabelecimento de mutações e contribuir na susceptibilidade para o desenvolvimento de CCECP (Cheng *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2007).

O processo tumorigênico que evolui do acúmulo de alterações mutagênicas por exposição a esses carcinógenos é bastante característico nesses tipos tumorais, sendo que alterações na expressão de supressores tumorais e proto-oncogenes específicos são bem estabelecidos (Leemans; Snijders; Brakenhoff, 2018; Kang *et al.*, 2015; Saada-Bouzaid *et al.*, 2019)

O consumo de álcool tem efeito sinérgico nesse processo, causando um aumento da permeabilidade tecidual e da absorção dos carcinógenos do tabaco (Stadler *et al.*, 2008; Feng; Wang, 2013; Philip *et al.*, 2016).

1.5. O Papel do Papilomavírus Humano (HPV)

Em 1983, um grupo de pesquisadores publicaram os primeiros dados sugerindo que HPV poderia estar associado a um subgrupo de carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço. Desde então o número de trabalhos foi crescendo até que em 2009 a Agência Internacional para Pesquisa em Cancer (IARC) declarou que “há uma forte evidência epidemiológica para o papel causal do HPV16 na etiologia dos cânceres de orofaringe e tonsilas” (Syrjänen *et al.*, 1983; Bouvard *et al.*, 2009). Dessa forma, a infecção pelo HPV também foi estabelecida como um fator de risco individual para o desenvolvimento de cânceres de cabeça e pescoço com uma maior tendência em ocorrer em sítios histológicos específicos da orofaringe que compreendem as tonsilas e base da língua. Essas regiões anatômicas são constituídas por uma mucosa com invaginações na forma de criptas, alinhadas com um epitélio reticulado, no qual a lâmina basal é descontínua e os limites histológicos entre o epitélio reticulado e o estroma linfoide adjacente são indistinguíveis (Haegglom *et al.*, 2017; revisado por Syrjänen e Syrjänen, 2019).

Esses tumores são causados por tipos oncogênicos do HPV, em especial pelos tipos 16 e 18 (~85% dos tumores HPV-positivos) que são transmitidos principalmente através de sexo oral e autoinoculação. Embora as taxas de infecção sejam bastante altas, a eliminação do vírus por pessoas saudáveis é de aproximadamente 80% entre 6 e 20 meses da infecção sendo que as infecções pelo tipo 16 são as mais duradouras (até 20 meses) (revisado por Tumban, 2019).

Esses tumores apresentam características clínicas, epidemiológicas e moleculares bastante distintas sendo evidenciado um melhor prognóstico. Isso impactou inclusive na sobrevida global em cinco anos, já que uma maior proporção de tumores com melhor prognóstico representa uma maior sobrevida dos indivíduos acometidos por essas neoplasias (Chaturvedi *et.al*, 2011; revisado por Johnson *et al.*, 2020).

A melhora da sobrevida dos indivíduos acometidos por CCECP HPV positivos é atribuída a um conjunto de características clínicas às quais se destacam uma melhor resposta à quimioterapia e radioterapia. Além disso, trata-se de indivíduos mais jovens e com menos comorbidades do que indivíduos comprometidos fisiologicamente pelo uso crônico de tabaco e álcool como observado nos acometidos por CCECP HPV negativos (Chaturvedi *et al*, 2011, revisado por Chow, 2020). Dessa forma, têm sido sugeridas abordagens terapêuticas mais brandas no grupo CCECP HPV positivo (Adelstein *et al.*, 2009; O’Rorke *et al.*, 2012; Ward *et al.*, 2015). No entanto, abordagens alternativas de de-escalonamento ainda não foram aprovadas

pelo *American Joint Comitee on Cancer (AJCC)*, que aguarda a validação dos ensaios clínicos (Economopoulou; Kotsantis; Psyrris, 2021).

A prevalência e persistência das infecções por HPV nesses sítios anatômicos são maiores em homens do que em mulheres. Tem sido sugerido que uma maior resposta imune após a infecção em mulheres com relação aos homens contribui para uma predominância dessas infecções orais nos indivíduos do sexo masculino (Giuliano *et al.*, 2015; D'Souza *et al.*, 2016). Uma explicação alternativa para menor incidência em mulheres tem sido atribuída, em parte, pela exposição às fontes endógenas e exógenas de estrógeno (Hashim *et al.*, 2017). Embora já seja bem estabelecido que o HPV é um fator de risco individual para o desenvolvimento desses tumores, o tabagismo tem sido considerado um fator aditivo na persistência dessas infecções (Kero *et al.*, 2014; revisado por Tumban, 2019). Adicionalmente, um estudo de Reniqua *et al.*, 2018 sugere que a regulação negativa do miRNA-133a-3p observada por consumo de tabaco por pacientes CCECP HPV positivo aumenta a expressão de EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico) e HuR (RBP Hur antigen R) o que resulta na redução na resposta ao tratamento.

1.5.1 Biologia do HPV

Os HPVs compreendem uma família de pequenos vírus de DNA não envelopados e simetria icosaédrica de aproximadamente 50-60 nm de diâmetro. Até hoje foram descritos mais de 220 tipos de HPV, dos quais aproximadamente 40 deles infectam preferencialmente as regiões anogenital e oral. Esses vírus epiteliotrópicos são classificados de acordo com seu potencial oncogênico, de modo que os tipos encontrados em lesões epiteliais de alto grau e câncer são classificados como HPV de alto risco oncogênico. Essa associação foi feita com base em grandes estudos epidemiológicos e, portanto, esses agentes infecciosos foram classificados como carcinógenos humanos do tipo I pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer – IARC (Bouvard *et al.*, 2009; revisado por Gheit, 2019).

Aos tipos de alto risco oncogênico são atribuídos aproximadamente 100% dos cânceres de cérvix uterina, 90% dos cânceres de ânus, 80% dos cânceres de vagina, 50% dos cânceres de vulva e pênis e uma crescente frequência de cânceres na região de cabeça e pescoço que varia de 25% a 75% dependendo da região geográfica conforme mencionado anteriormente. Os tipos de HPV mais estudados são os tipos de alto risco para carcinogênese, em especial o tipo 16, que é principal tipo relacionado ao processo tumorigênico em CCECP (Serrano *et al.*, 2018).

O genoma viral, de aproximadamente 8kb, é altamente sincronizado com o programa de diferenciação do epitélio infectado e, dessa forma, a porção codificante é dividida fisicamente em uma região precoce *-early-* (mais ativa nas camadas inferiores e médias do epitélio, incluindo a camada basal) e uma região tardia *-late-* (ativa apenas nos estratos mais diferenciados do epitélio). Além disso, 10% do seu genoma é composto por uma região não codificante reguladora denominada de “*long control region*” (*LCR*). Do ponto de vista regulatório, o genoma consta de dois promotores de transcrição: um promotor precoce (p97) e um promotor tardio (p670) além de dois sítios de poliadenilação: um sítio de poliadenilação precoce (pAE) e um sítio de poliadenilação tardio (pAT). Os dois sítios de poliadenilação são precedidos por um região não codificante denominada de 5’-*UTR* (*untranslated region*) que confere ao transcrito elementos que determinam a eficiência de poliadenilação, tradução e meia vida do mRNA. A *LCR* viral compõe 10% do genoma e nessa região são encontrados a origem de replicação e diversos sítios para ligação de fatores de transcrição celulares e virais que controlam a expressão dos genes precoces (revisado por Doorbar *et al.*, 2015; revisado por Gheit, 2019).

A regulação da transcrição dos genes virais é complexa e altamente dependente do programa de diferenciação do epitélio infectado de modo que os fatores de *splicing* ricos em serina e arginina (SRSFs) e ribonucleoproteínas heterogêneas nucleares (hnRNPs) aumentam o potencial de codificação do genoma viral. Diferentes proteínas desses dois complexos são expressas em diferentes etapas do processo de diferenciação e são capazes de reconhecer motivos específicos de silenciamento ou potenciadores nos transcritos virais (Graham, 2017; revisado por Cerasuolo *et al.*, 2020).

A região precoce compõe 50% do genoma dos HPVs e consta de 6 genes não estruturais relacionados com a replicação, expressão gênica e sobrevivência (*E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* e *E7*) ao passo que a região tardia consta dos dois genes estruturais (*L1* e *L2*) que são as proteínas principais e secundárias do capsídeo viral (figura 2 b.) (revisado por Doorbar, 2015). Pelo fato da proteína *L1* ser altamente imunogênica e com capacidade de formar partículas vazias (*virus-like particles* – VLPs ou partículas semelhantes à vírus), tem sido utilizada na produção das vacinas profiláticas tipo específicas (Villa *et al.*, 2005).⁴

1.5.2. Ciclo viral

Diferentemente de como ocorre no epitélio das regiões anogenitais, onde o HPV alcança a camada basal através de micro abrasões que ocorrem durante o ato sexual, na orofaringe as

infecções ocorrem na ausência dessas abrasões. Isso porque o epitélio reticulado característico das tonsilas e base da língua contém uma lâmina basal descontínua, formando criptas, que permite o livre acesso a esses patógenos (figura 2 a.) (Faraji *et al.*, 2017). Uma outra característica bastante interessante é a expressão aumentada de PD-L1 nessas regiões anatômicas que permite ao HPV o estabelecimento de infecções produtivas com a mínima resistência do sistema imune (Lyford-Pike *et al.*, 2013). Dessa forma, as partículas virais alcançam a camada basal do epitélio e uma vez dentro da célula, o vírus é transportado por um endossomo até o núcleo onde encontra a maquinaria replicativa (revisado por Gheit, 2019).

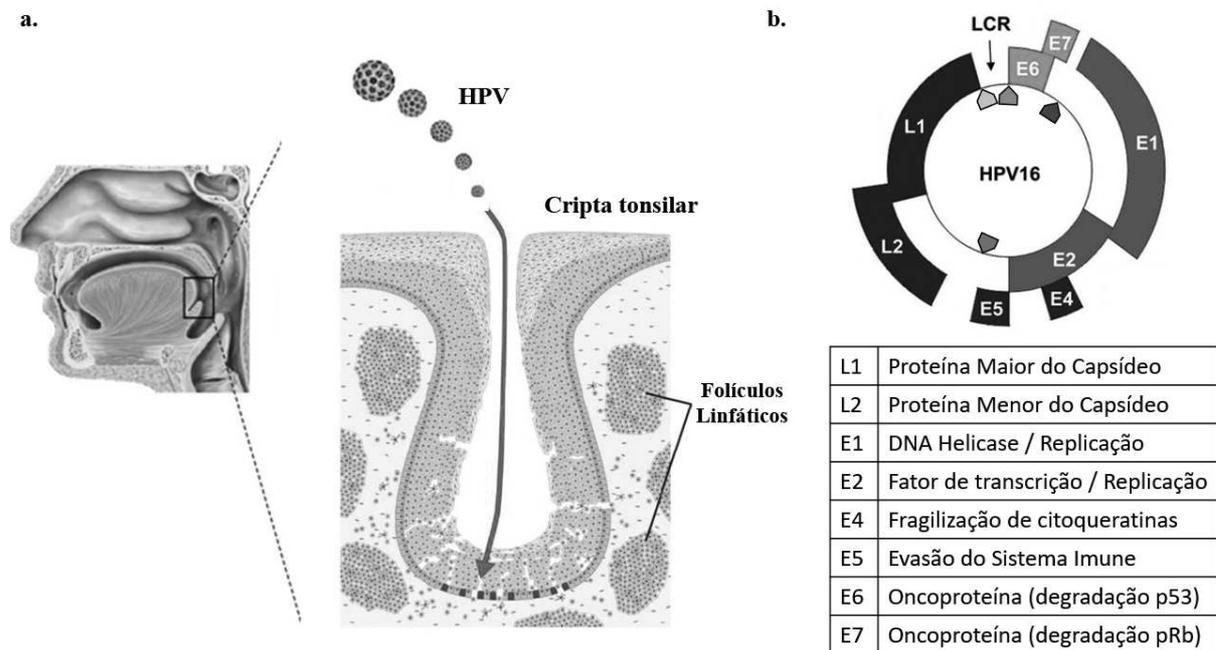


Figura 2 – Infecção pelo Papilomavírus Humano em CCECP e seu genoma viral: a. Sítio anatômico preferencial da infecção pelo HPV destacado no corte sagital à esquerda, representando a região que contempla a base da língua e tonsilas. À direita, a representação e organização histológica das criptas acessadas pelo HPV com a seta vermelha indicando a camada basal do epitélio, onde a infecção é estabelecida. b. Organização do genoma viral em suas regiões precoce, representado pelos genes *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* e *E7*, tardia, representado por *L1* e *L2* e a *LCR*. Os pentágonos internos indicam: verde: promotor precoce, azul: promotor tardio, vermelho: sítio de poliadenilação precoce e amarelo: sítio de poliadenilação tardio (adaptado de D’Abramo; Archambault, 2011; Egawa *et al.*, 2015; Faraji *et al.*, 2017).

No compartimento basal, a expressão de *E1* e *E2* promove a replicação do genoma viral que é mantido em um número baixo de 50-100 cópias do episossomo por célula. Ao mesmo tempo que a expressão das proteínas *E6* e *E7* promove a proliferação de células das camadas basais e parabasais do epitélio infectado. Nesse processo a proteína *E2* atua direcionando *E1* para o sítio de início da replicação na *LCR*, promovendo/regulando a transcrição dos genes precoces além de ter um papel fundamental na segregação correta dos genomas virais durante a divisão celular (revisado por Doorbar *et al.*, 2015; revisado por Gheit, 2019). A manutenção dos episossomos na

camada basal do epitélio é crucial para a infecção persistente, portanto a baixa expressão de proteínas virais assim como da replicação são importantes estratégias para o escape imune (Zhou; Tuong; Frazer, 2019).

Assim que as células infectadas deixam o compartimento basal e são direcionadas no curso da diferenciação, elas perdem a capacidade replicativa. Dessa forma, para o vírus completar o ciclo viral, ocorre um aumento da expressão das oncoproteínas *E6* e *E7* que cooperam para manter a atividade replicativa viral (Johansson; Schwartz, 2013, revisado por Doorbar *et al.*, 2015). Nesse processo, a proteína *E7* é capaz de interagir com a forma hipofosforilada das proteínas da família do retinoblastoma (pRb) – p105, p107 e p130 – levando-as à degradação. As proteínas p105 e p107 controlam a entrada no ciclo celular nas células do compartimento basal, enquanto a p130 controla a reentrada no ciclo celular nos estratos superiores e mais diferenciados do epitélio. Isso resulta na liberação das proteínas da família E2F para atuarem como fatores de transcrição que dirigem a expressão de genes da fase S (enzimas de replicação do DNA). Ao mesmo tempo, o estresse replicativo causado pela entrada constante no ciclo celular levaria à indução de p53, que ocasionaria a parada do ciclo celular seguido de apoptose. Entretanto, para contornar esse desfecho, a proteína *E6* se liga à p53 através da ligase de ubiquitina E6AP, levando p53 à degradação proteossômica (Moody; Laimins, 2010, revisado por Doorbar *et al.*, 2015).

Durante essa fase do ciclo viral, a cooperação da proteína *E5* é fundamental na evasão do sistema imune, já que inibe o complexo MHC/HLA classe I, e dessa forma evita o reconhecimento de células infectadas por linfócitos. Adicionalmente, *E5* atua como uma oncoproteína, estabilizando o receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*), que resulta em um sinal mitogênico contínuo (Campo *et al.*, 2010; Müller *et al.*, 2015). Dessa forma, essas três oncoproteínas cooperam na manutenção de um ambiente favorável para a replicação do genoma viral mesmo em estratos superiores do epitélio. Entretanto, com a ativação do promotor tardio, ocorre um aumento acentuado da expressão dos genes *E1* e *E2*, que resulta na abundância replicativa do genoma viral, ao mesmo tempo em que os altos níveis de *E2* reprimem o promotor precoce. Isso culmina na regulação negativa dos oncogenes *E6* e *E7*, permitindo à célula infectada se diferenciar em resposta aos sinais celulares. Embora o promotor tardio tenha sido ativado pelo processo de diferenciação, o sítio de poliadenilação utilizado nesse estágio do ciclo viral continua sendo o precoce de forma que não há expressão das proteínas tardias *L1* e *L2* (Doorbar, 2006; McBride, 2008; Thierry, 2009).

A montagem e maturação da partícula viral, porém, depende da diferenciação terminal que regula negativamente o sítio de poliadenilação precoce e resulta na expressão das proteínas

tardias do capsídeo. Dessa forma, os genomas virais recrutam a proteína tardia *L2* (através de *E2*) antes do empacotamento pela proteína *L1* que se automonta em capsômeros pentaméricos que forma o capsídeo. Esse processo só é possível quando o queratinócito perde a atividade de fosforilação oxidativa mitocondrial e o ambiente passa de redutor a oxidante, com a progressiva formação de pontes dissulfeto entre as proteínas *L1*. Nessa fase também se observa o acúmulo da proteína *E4* que promove um colapso da rede de filamentos intermediários e facilita a movimentação das partículas virais. E assim, os vírus são liberados junto às células em descamação em um ciclo não lítico, com as proteínas mais imunogênicas sendo expressas em estratos mais afastados da camada basal. O ciclo biológico do HPV leva em média 2 a 3 semanas, o tempo necessário para uma célula migrar do compartimento basal até o estrato mais diferenciado do epitélio (Stanley, 2010; revisado por Doorbar *et al.*, 2015).

1.5.3. Mecanismo de carcinogênese por HPV

Antes de descrever a ação das oncoproteínas virais e alguns dos seus alvos celulares, deve se ter em mente que a persistência viral é um dos fatores mais importantes para o risco de carcinogênese relacionada ao HPV. Por serem bem adaptados ao seu hospedeiro, os HPVs causam, na maioria das vezes, infecções assintomáticas por períodos inferiores a 1 ano que são longas o suficiente para transmissão para outros hospedeiros, mas não tão longas para causar doenças como neoplasias. O desenvolvimento de neoplasias geralmente ocorre em indivíduos que são incapazes de eliminar ou manter o vírus em estágio de latência, sustentando a expressão dos oncogenes por anos ou décadas. Visto isso, pode-se destacar a imunovigilância como um fator bastante importante, já que também é observada uma maior frequência dessas neoplasias em indivíduos imunocomprometidos (Wang e Palefsky, 2015; revisado por Zhou;Tuong; Frazer, 2019).

Os mecanismos moleculares de ação do HPV de alto risco oncogênico, especialmente o tipo 16, associados ao CCECP são a manipulação das vias celulares para ativar o ciclo celular e suprimir apoptose. A transformação dessas células é principalmente atribuída à atividade das oncoproteínas virais *E6* e *E7* que rompe a regulação do ciclo celular e as vias de reparo do DNA, que dirige mudanças genéticas e epigenéticas e conduzem à progressão neoplásica. Dessa forma, a expressão constitutiva de *E6* e *E7* são essenciais para a manutenção do tumor (Leemans *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2015).

Muitos estudos sobre a história natural dessas infecções em outros sítios anatômicos sugerem que apenas a infecção pelo HPV não é suficiente para o desenvolvimento tumoral, e

sim uma interação entre a atividade viral e fatores relacionados ao hospedeiro. Um evento que aumenta o risco de desenvolvimento tumoral bastante observado em CCEPC e outros cânceres relacionados ao HPV é a integração do DNA viral no genoma da célula do hospedeiro (identificado em ~70% de CCECP) (*Cancer Genome Atlas Network*, 2015; Gillison *et al.*, 2019). Esse processo parece não ser aleatório, de modo que se observa a ruptura do DNA viral na região que codifica o gene *E2*, cujo produto de expressão regula negativamente os genes *E6* e *E7*. Na ausência da proteína *E2*, as oncoproteínas virais *E6* e *E7* são expressas de modo constitutivo aumentando as atividades de transformação e imortalização do HPV. Além da expressão constitutiva desses genes, tem sido largamente sugerido que o processo de integração não ocorre em locais aleatórios do genoma e que os *hotspots* de integração acabam por favorecer a expansão clonal por ativar ou inativar genes específicos (Bodelon *et al.*, 2016; revisado por Pinatti *et al.*, 2018).

O principal alvo descrito para *E6* é a degradação de p53 que resulta na ruptura da sinalização da apoptose, instabilidade genômica por permanente reentrada no ciclo celular mesmo após dano no DNA e abolição da senescência em resposta a fatores estressores (Pol e Klingelutz *et al.*, 2013). Além da degradação de p53, *E6* inibe a atividade de complexos proteicos que promovem estabilidade de p53 como as acetiltransferases p300/CBP e ADA3. Esses mecanismos em conjunto inibem a sinalização apoptótica que em um contexto de persistência permite o acúmulo de mutações que contribuem para a progressão neoplásica. Adicionalmente como mecanismo antiapoptótico, *E6* é capaz de se ligar e levar à degradação as proteínas BAK, caspase-8, receptor FADD e ainda, se ligar diretamente ao receptor de TNF1 anulando sua sinalização (revisado por Scarth *et al.*, 2021). Além disso, *E6* ainda é capaz de levar à degradação proteossômica NFX1-91, um repressor constitutivo de *hTERT* que, em última instância, contribui para a imortalização do queratinócito infectado (revisado por Gheit, 2019).

E7 é o responsável pela reentrada não programada no ciclo celular de modo a garantir a replicação viral. Nesse processo, além da degradação de pRb, *E7* pode interagir e reprimir os efeitos inibitórios de p21 e p27, favorecendo a proliferação (revisado por Gheit, 2019).

A redução da atividade de pRb por sua vez, induz um aumento na expressão de p16^{INK4A}, que vem sendo utilizado como marcador preditivo da presença de HPV, já que em tumores HPV negativos de orofaringe o gene que o transcreve está silenciado em aproximadamente 58% deles (Lewis *et al.*, 2012; Saada-Bouزيد *et al.*, 2019). Entretanto, a atividade de p16 está *upstream* à pRb, proteína alvo de *E7*, de modo que a expressão aumentada de p16 não atua como supressor tumoral no bloqueio da transição G1/S. Adicionalmente, foi mostrado que uma

das importantes atividades de *E7* no processo tumorigênico reside na promoção de resistência à *anoikis* e crescimento livre de ancoragem. Esse fenômeno é induzido pela associação com p60/UBR4 que culminam na desestabilização de PTPN14 resultando em um atraso na diferenciação, que permite às células proliferarem em suspensão (revisado por Basukala; Banks, 2021).

A atividade dessas oncoproteínas é fundamental para o início do desenvolvimento tumoral, entretanto, as consequências da expressão constitutiva dessas proteínas à longo prazo levam a um perfil genético e epigenético bastante característico em CCECP HPV positivo. Nesse contexto, mutações em tumores HPV positivos (menos frequentes que mutações em HPV negativos) são o resultado da diminuição da estringência com relação à apoptose, pela ausência da atividade de p53, somado a superexpressão de enzimas modificadoras do DNA como APOBECs. APOBECs pertencem a uma família de citidinas deaminases capazes de promoverem a troca de citosinas em uracil em RNA e em ssDNA, e que fazem parte da resposta imune inata contra infecções virais. Entretanto, em casos em que a infecção não é eliminada, a ação permanente dessas enzimas acabam por causar mutações no DNA. Adicionalmente, tem sido sugerido que algumas APOBECs, que não inibem a infectividade do HPV (APOBEC A3B), podem ser induzidas por HPV de alto risco oncogênico. Um alvo bastante característico de mutações por ação de APOBECs é o gene *PIK3CA* presente em 56% dos tumores HPV positivos (revisado por Riva *et al.*, 2021).

1.6 Alterações genéticas no processo de tumorigenese em CCECP

Câncer surge de um acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas em genes relacionados com uma variedade de vias de sinalização que resultam em ativação ou inativação de genes chaves em processos de proliferação, sobrevivência, reparo do DNA e apoptose. Entretanto, em CCECP, uma característica que se destaca, é que há uma predominância em alterações genéticas e moleculares em genes supressores tumorais com relação à oncogenes, indicando que estes apresentam um papel crítico nesses tipos tumorais (Leemans; Snijders; Brakenhoff, 2018; Johnson *et al.*, 2020).

O processo inicial é marcado por mutações em *TP53* (cromossomo 17p) e perdas na região cromossômica 9p (onde se localiza o gene *CDKN2A*, que codifica p16 e p14 – ARF). O papel de p16 é inibir a progressão do ciclo celular em G1/S se ligando ao complexo ciclina D-CDK4/6 inativando-o enquanto p14 inibe a degradação de p53 sob elevado estímulo mitogênico (revisado por Leemans; Snijders; Brakenhoff, 2018; revisado por Johnson *et al.*, 2020).

Mutações em *TP53* ocorre na maioria das vezes por mutações do tipo *missense* (substituição de um aminoácido) combinada com perda alélica (perda de um alelo quando o outro já está inativo) e estão presentes em 84% de CCECP HPV negativo. Embora as funções celulares de p53 sejam múltiplas, deve-se destacar a indução de p21 (outra proteína inibidora dos complexos ciclina-CDK) que bloqueia o ciclo celular e a síntese de DNA. Combinado a isso observa-se uma amplificação do gene *CCND1* na região 13 do braço longo do cromossomo 11 que codifica a ciclina D1 e resulta na replicação não programada do DNA (ultrapassando o ponto de checagem G1>S) (revisado por Zhou; Liu; Myers, 2016; Gillison *et al.*, 2019).

O papel do HPV na contraparte viral é exatamente o mesmo e, embora sejam atribuídas funções diversas às pleiotrópicas oncoproteínas E6 e E7, destacam-se as respectivas inativações de p53 e pRb. Adicionalmente, a proteína viral E5, também considerada uma oncoproteína, participa na estabilização e estímulo permanente de EGFR (Hoppe-Seyler *et al.*, 2018.; Gillison *et al.*, 2019). Entretanto, o sistema biológico humano com suas complexidades e redundâncias exige insultos cooperativos para que a doença se estabeleça. Nesse contexto, conforme se acumulam alterações pela exposição contínua aos carcinógenos, observam-se mutações de genes que são característicos para cada fator etiológico (Leemans *et al.*, 2018).

As principais alterações em CCECP HPV negativos que se acumulam ao longo do estabelecimento tumoral incluem amplificação em regiões do cromossomo 7, que codifica EGFR (15%); amplificação 11q22 que codifica YAP1, deleção de importantes supressores tumorais como *NSD1* e *NOTCH 1* (15%), relacionados respectivamente com hipometilação do DNA e promoção da diferenciação. Combinado a isso, também se verifica a perda de função de *PTEN*, um regulador negativo da via de PI3K-AKT (Vokes; Agrawal; Seiwert, 2015; revisado por Leemans *et al.*, 2018).

Em CCECP HPV positivos, é bem evidenciada a amplificação em 20q1, que codifica E2F1 e parece ser imprescindível para a manutenção de proliferação nesses tipos tumorais. Além disso, a deleção em *TRAF3*, relacionado com a imunidade antiviral e regulação negativa da via de NF- κ B, aparece em 20% dos casos de CCECP HPV positivos. Mutações induzidas pela ação de APOBECs (C>T e C>G no contexto 5'-T*CW-3') são bastante características de CCECP HPV positivos, principalmente no oncogene *PIK3CA* que se apresenta mutado em 56% desses tumores. Entretanto, essa via parece ser bastante importante para CCECP, já que tumores HPV negativos também apresentam uma frequência de 34% em alterações desse mesmo gene (revisado por Riva *et al.*, 2021).

A disponibilidade de um modelo de progressão histológica, que relaciona características moleculares com os estágios da progressão tumoral (campo de cancerização), é de suma

importância para o entendimento das principais alterações genéticas, epigenéticas e estruturais no desenvolvimento de CCECP. No entanto, é impossível propor um único modelo de progressão neoplásica linear para a complexidade e heterogeneidade apresentados por esses tipos tumorais. Dessa forma, os diversos estudos de variações cromossômicas no processo de tumorigênese de CCECP revelam que múltiplas alterações genéticas podem ser requeridas para a completa transformação. Adicionalmente, a caracterização mais profunda nesse perfil de mutações e assinaturas moleculares de acordo com o fator etiológico está constantemente crescendo, e tem grande contribuição de bancos de dados ômicos como o TCGA.

1.7. *Stratifin*

Stratifin, também conhecida como 14-3-3 σ , é uma proteína ácida de 248 aminoácidos, peso molecular de ~28kD e membro da família de proteínas 14-3-3. Em humanos, sete diferentes genes codificam para as isoformas β , γ , ϵ , η , σ , τ e ζ sendo que a *Stratifin* é a que mais têm sido relacionada ao processo tumorigênico dentre as demais. Estas proteínas estão envolvidas em diversas vias de sinalização, regulação da progressão do ciclo celular, tráfego intracelular e apoptose através da interação direta com suas proteínas alvo (Hermeking *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2009).

São proteínas diméricas em que cada monômero é composto de 9 α -hélices antiparalelas em forma de U, sendo que as quatro α -hélices aminoterminais determinam a dimerização, formando uma plataforma, para que as cinco α -hélices carboxiterminais tenham uma orientação retangular. Esses dímeros criam um largo canal interno negativamente carregado, que é bastante conservado entre as diferentes isoformas, enquanto os resíduos variáveis estão localizados na superfície da proteína, conferindo a especificidade da interação. Dessa forma, cada dímero apresenta dois sítios principais de ligação a seus alvos (figura 3 b., c. e .d., apontados pelas setas azuis) (Aitken, 2006).

Enquanto a maioria dessas proteínas são capazes de formar heterodímeros, *Stratifin* forma apenas homodímeros devido à presença de resíduos estrategicamente posicionados, e a isso também atribuída sua especificidade (figura 3 a.) (Verdoodt *et al.*, 2006; revisado por Aljabal; Yap, 2020).

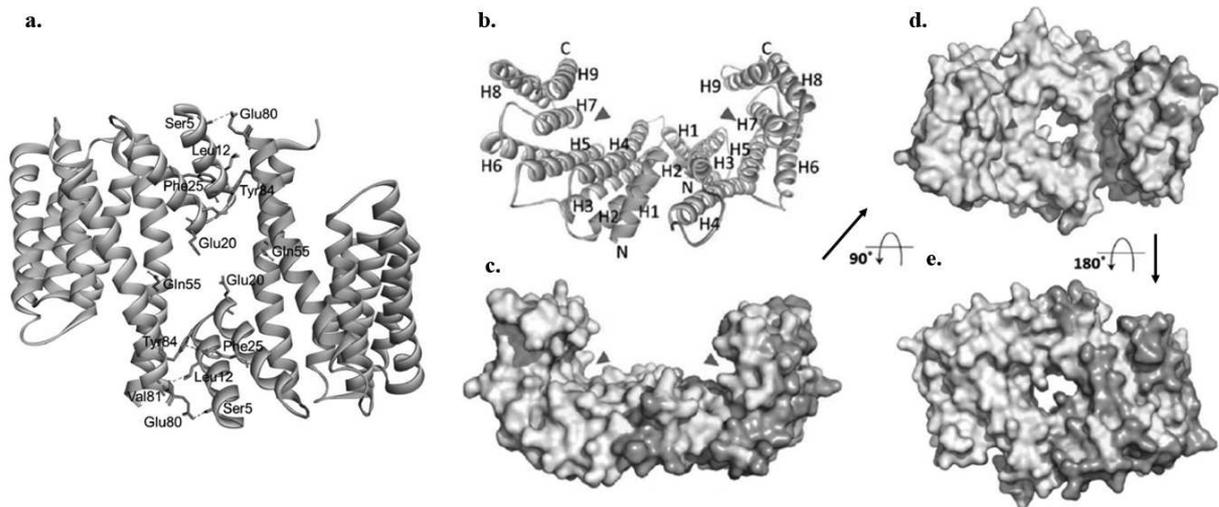


Figura 3 - Estrutura do dímero de *Stratifin* em todos os seus ângulos: a. Representação em fita das subunidades do dímero em ciano e mostarda com os respectivos resíduos de aminoácidos responsáveis pela homodimerização; b. Representação em fita das α -hélices de cada dímero (H1-H9) com suas respectivas porções N-terminal e C-terminal (C e N), com as setas triangulares azuis apontando para os sítios de interação com os ligantes entre as hélices 3 e 5. c.d.e. Representação em 3D da superfície da *Stratifin*, com os resíduos amarelos representando os aminoácidos conservados entre as diferentes isoformas da família de proteínas 14-3-3, resíduos cinza claro e escuro representando os resíduos variáveis dos respectivos monômeros (adaptado de Aljabal; Yap, 2020).

Sua atividade está na interação direta com diversas proteínas celulares, que se tornam alvo após fosforilação de resíduos de serinas/treoninas em motivos específicos. Os três motivos canônicos R(S/X)XpSXP, RXXXpSXP e pS/pT-X₁₋₂-COOH (onde pS representa a fosfoserina ou fosfotreonina e X representa qualquer aminoácido) foram identificados para interação com proteínas 14-3-3. Recentemente, foi demonstrado que a fosforilação de resíduos específicos de algumas isoformas de 14-3-3 também apresenta um fator regulatório, evitando a interação com seus alvos através dos motivos canônicos (Benzinger *et al.*, 2005; Coblitz *et al.*, 2005; Aitken *et al.*, 2006).

À essas proteínas são sugeridas três formas principais de interação com seus alvos: *Clamping*, que está relacionada a sua capacidade de estabilizar certas conformações das proteínas alvo (atribuída à sua rigidez intrínseca); *Masking*, que está relacionada à capacidade de ocultar fisicamente motivos estruturais específicos, evitando interações e interrompendo vias de sinalização; e *Scaffolding*, que está relacionada ao favorecimento de interações entre diferentes proteínas tanto por fornecer uma plataforma para o recrutamento, quanto por ancorá-las em localizações celulares específicas. Embora *Stratifin* não tenha uma atividade enzimática intrínseca, a ligação direta com enzimas alvo podem alterar a conformação das mesmas, resultando na modulação de suas atividades (Smith *et al.*, 2011).

Até hoje, mais de 100 proteínas já foram identificadas como alvos de *Stratifin*, sendo muitas delas implicadas em processos de diferenciação, organização do citoesqueleto, adesão, sinalização mitogênica, regulação do ciclo celular e apoptose (Benzinger *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2011; revisado por Aljabal; Yap, 2020). Diferentemente das outras isoformas, *Stratifin* é a única que mostrou ser induzida por p53 e BRCA1 após danos ao DNA, de modo que a ela são atribuídas propriedades anti-tumorigênicas. (Hermeking *et al.*, 1997; Aprelikova *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2009). Sua atividade como supressor tumoral tem sido atribuída principalmente por promover a parada do ciclo celular em G2/M, sequestrando o complexo CDK1/ciclina B no citoplasma e, dessa forma, prevenindo a catástrofe mitótica após dano ao DNA. (Chan *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2003; revisado por Aljabal; Yap, 2020).

Enquanto *Stratifin* é induzida por p53, observa-se um *feedback* positivo sobre o mesmo, no qual ela estabiliza fisicamente os tetrâmeros de p53, aumentando sua afinidade pelo DNA e potencializando sua atividade transcricional. Além disso, *Stratifin* promove a inativação de MDM2 que, ao contrário, facilitaria a exportação nuclear de p53 levando à sua degradação proteossômica (Lee; Lozano, 2006; Yang *et al.*, 2003).

A regulação da expressão de *Stratifin* é controlada por metilação em ilhas CpG localizadas dentro da porção 5' do seu único éxon, e esse tem sido o principal mecanismo de silenciamento reportado em alguns tipos tumorais, já que raramente foram observadas mutações nesse gene (Ferguson *et al.*, 2000; Liang *et al.*, 2008).

Em queratinócitos humanos, sua expressão é induzida durante a diferenciação e é necessária para a saída do compartimento basal, ao passo que a perda dessa expressão permite escapar da senescência e assumir um fenótipo de imortalização celular, sem a necessidade da expressão exógena de oncogenes ou oncovírus (Dellambra *et al.*, 2000; Gasco *et al.*, 2002).

Se, por um lado, *Stratifin* quando silenciada parece atuar como uma proteína supressora de tumor em alguns tipos neoplásicos, ela também tem sido reportada como um oncogene quando superexpressa. Esse papel oncogênico tem sido relacionado principalmente com a resistência às abordagens genotóxicas, como radiação ionizante e quimioterápicos indutores de danos ao DNA (Samuel *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2009). O mecanismo de resistência foi atribuído à capacidade de sequestrar, no citoplasma, fatores pró-apoptóticos como BAD, BAX e c-Abl. Os dois primeiros atuam na mitocôndria, enquanto o último no núcleo (Samuel *et al.*, 2001; Subramanian *et al.*, 2001; Iralde-Lorente *et al.*, 2020).

Stratifin também tem sido sugerida participar dos processos de invasão e metástase, já que ao ser secretada, atua como um fator estimulante de colagenase derivado de queratinócitos. Dessa forma, é capaz de induzir a expressão de metaloproteinase de matriz-1 (MMP1) a partir

de fibroblastos associados a tumores, conferindo resistência ao tratamento (Neupane; Korc, 2008; Ghaffari *et al.*, 2010; Johansson *et al.*, 2012).

Em suma, parece que a atividade de *Stratifin* como oncoproteína ou supressor tumoral depende do tipo de neoplasia examinada. Muitos estudos já fizeram a associação de *Stratifin* como supressor tumoral em câncer de mama, de cólon, esôfago e nasofaríngeo, ao passo que outros mostram exatamente o contrário, como em câncer de ovário, pulmão e pâncreas (Ferguson *et al.*, 2000; Temesgem *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2018; Hu *et al.*, 2019; Robin *et al.*, 2020) . Em CCECP, poucas publicações fazem a associação de *Stratifin* com o processo tumorigênico, de modo que explorar esse gene pode ser de grande contribuição para o entendimento do seu papel nesses tipos tumorais. Por conta dessas características, fica bastante evidente o potencial de *Stratifin* como alvo terapêutico, de modo que desde os anos 2000 vários grupos têm buscado moduladores de interações proteína-proteína (PPIs) para *Stratifin*. Moduladores positivos ou estabilizadores, para tumores em que *Stratifin* atue como uma proteínas supressora tumoral, ou moduladores inibidores, para tumores em que ela atue como uma oncoproteína (Lodygin; Hermeking, 2006; revisado por Aljabal; Yap, 2020).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Caracterizar a expressão e a atuação de *Stratifin* em linhagens celulares de câncer escamoso de cabeça e pescoço

2.2. Objetivos Específicos

Caracterizar a expressão de *Stratifin* na base de dados TCGA e correlacionar a expressão de *Stratifin* com características clínico patológicas;

Caracterizar molecularmente a expressão de *Stratifin* em um painel de linhagens celulares de CCECP através de ensaios de Western Blot e PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR);

Gerar modelos celulares com *Stratifin* nocauteada ou superexpressa através do sistema CRISPR/Cas9;

Caracterizar a atividade de *Stratifin* na proliferação celular;

Verificar a viabilidade celular após administração de quimioterápicos e caracterizar a população das células em cada etapa do ciclo celular após irradiação do modelos celulares gerados.

Verificar a capacidade de formação de colônias em substrato sólido (em subconfluência) e semissólido (*soft-ágar*).

3. METODOLOGIA

3.1. Cultura de Células

O painel para a caracterização molecular da *Stratifin* consta de três linhagens derivadas carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (UPCI:SCC78; UPCI:SCC143 e UPCI:SCC154), além de uma linhagem de queratinócitos orais imortalizados não transformados (OKF-hTERT-1), adquiridas de duas *cell core facilities* da Universidade de Pittsburgh (UPCI:SCCs) e Harvard (OKF-hTERT-1). Adicionalmente, foram utilizadas as linhagens MCF-7 (ATCC® HTB-22™), derivada de carcinoma mamário e MD-MBA 435S (ATCC® HTB-129™), derivada de melanoma metastático que foram utilizadas como controles positivo e negativos para expressão de *Stratifin*, respectivamente. Estas duas últimas foram gentilmente cedidas pela Prof^a Mari Cleyde Sogayar (Nucel-FMUSP).

As linhagens celulares de CCECP UPCI:SCCs foram cultivadas em *Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose* (DMEM) - suplementado com 1% de Glutamax, 10% de soro fetal bovino, 100 µg/mL de estreptomicina e 100 µg/mL de penicilina. A linhagem de queratinócitos orais imortalizados OKF-hTERT-1 foi cultivada em KSFM suplementada com Cloreto de Cálcio, extrato de pituitária bovina e EGF (para 500mL foi utilizado 1,1 mL de extrato de pituitária bovina, 15 mL de ClCa₂ -10mM e 2,5µL de EGF recombinante humana) além de 100 µg/mL de estreptomicina e 100 µg/mL de penicilina. As duas linhagens controle foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 µg/mL de estreptomicina e 100 µg/mL de penicilina.

Todas as culturas celulares foram mantidas em estufas com condições padronizadas de 5% CO₂ a 37°C.

3.2. Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi isolado através da aplicação direta de 1mL de TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) por poço com 70- 80% de confluência celular (placa de 35mm), seguido de raspagem e coleta em tubos de 1,7 mL adicionados de 200µL de Clorofórmio. Os tubos foram homogeneizados por 15 segundos (vórtex), reservados por 5 minutos e centrifugados a 14000 rpm/ 15 minutos a 4°C. O sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para outro tubo, adicionado de 500µL de isopropanol, homogeneizado e acondicionado à -80°C por um período mínimo de 16 horas. Após esse período, o tubo foi centrifugado a 14000 rpm/ 15 minutos a

4°C, o sobrenadante removido e o RNA precipitado lavado três vezes com etanol gelado 75% (preparado com água tratada com DEPC) através de centrifugações a 14000 rpm/ 15 minutos e 4°C. O sobrenadante foi descartado, os tubos ficaram invertidos para eliminar o excesso de etanol e o RNA ressuspendido em 20 µL de água *RNase free*. As amostras de RNA foram quantificadas e sua pureza, com relação à proteína e compostos orgânicos, atestada pela razões 260/280nm e 260/230nm. As medidas foram realizadas no espectrofotômetro NanoDrop2000® (*Thermo Scientific*, Wilmington, DE, USA), sua integridade verificada em *TapeStation2100*® (*Agilent Technologies Inc.*, Santa Clara, CA, USA) e inferida em *RIN (RNA integrity number)*.

Dois microgramas de RNA total de cada amostra foram tratados com *RNase-free DNase Set*® (*Qiagen*, Venlo, NL) e submetido à transcrição reversa utilizando *SuperScript™ Vilo™* (*Life Technologies*, Carlsbad, USA) de acordo com as instruções dos fabricantes.

A fim de verificar possível contaminação com DNA genômico, antes da etapa de transcrição reversa, todas as amostras foram submetidas à reação de PCR com o gene da tubulina que gera um produto de 241 pb (iniciadores F 5'-TCAACACCTTCTTCAGTGAAACGR-3' e R 5'-AGTGCCAGTGCGAACTTCATC-3'). As reações foram realizadas em um volume final de 25µL contendo uma concentração final de 1x *TaqGold PCR Buffer*® (*Applied Biosystems*, Texas, USA), 200µM de cada dNTP, 2mM de MgCl₂, 1U de *AmpliTaqGold DNA* polimerase (*Applied Biosystems*, Texas, USA) e 100 nM de cada iniciador no termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (*Applied Biosystems*, Texas, USA). Cada ciclo incluiu 1 minuto de desnaturação a 95°C, 30 segundos de anelamento a 60°C e 30 segundos para o alongamento a 72°C. O primeiro ciclo foi precedido por 5 minutos de desnaturação e ativação da enzima a 95°C e o último ciclo estendido por 7 minutos de alongamento a 72°C. Foram incluídos dois controles positivos contendo uma massa de 20 ng e 0,75 ng de DNA genômico e um controle negativo.

3.2.1. Desenho dos iniciadores (*primers*) e padronização da *RT-qPCR*

O par de *primers* para *Stratifin* foi desenhado utilizando o NCBI *primer blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e analisado com a ferramenta *online OligoAnalyzer -IDT* (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). Os *primers* foram desenhados dentro da região codificadora do único exon do gene baseado em sua sequência de referência no NCBI (RefSeq) NM_006142.3 *Homo sapiens stratifin* (SFN), mRNA.

<i>Primer Forward – Stratifin</i>	5'- AAGACCACTTTCGACGAGGC -3'
<i>Primer Reverse – Stratifin</i>	5'- CTCTTCCCCGGCGTTGT -3'

A padronização dos ensaios de qPCR foi realizada com diferentes concentrações de *primers* sendo que a menor concentração a atingir o menor *Ct* foi selecionada. A especificidade da reação foi aferida através da curva de *melting* e da verificação do tamanho dos fragmentos amplificados através de eletroforese em gel de agarose.

As reações de qPCR foram realizadas com a utilização do reagente SYBR Green® (*Applied Biosystems*, Foster City, California, USA) em uma plataforma que contém um termociclador acoplado a um sistema ótico para excitação e captação da fluorescência - *7500 Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*, Foster City, California, USA). Todas as reações foram realizadas em triplicata utilizando 2µL do cDNA diluído 1:200 em um volume total de 12µL de reação. Cada reação consta de 1x SYBR Green® (6µL), 300 nM -concentração final- de cada *primer*, 2µL do cDNA e H₂O qsp 12µL. O protocolo para amplificação foi realizado por um ciclo inicial de 95°C para ativação da polimerase por 2 minutos seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e então 60°C por 60 segundos.

3.2.2. Ensaios de eficiência, *LOQ* & *LOD*

Para verificar a eficiência da reação, foi realizada uma curva padrão elaborada com DNA genômico (oriundo da linhagem OKF-hTERT-1) em diluições seriadas que abrangem 3 logs de magnitude do gene alvo. O número de cópias do gene alvo pode ser diretamente calculado utilizando DNA genômico humano assumindo que cada célula diplóide (dois genomas por célula) apresenta duas cópias do gene em questão e que um genoma completo tem massa aproximada de 3,3 pg. Dessa forma, 1µg de DNA genômico contém aproximadamente $3,03 \times 10^5$ cópias do gene alvo.

Todas as amostras foram testadas em triplicata e os resultados são as médias de dois ensaios repetidos de uma única réplica biológica. Além de verificar a eficiência da reação, esse ensaio permite determinar os limites de detecção (*LOD – Limit Of Detection*) e quantificação (*LOQ – Limit Of Quantification*).

3.2.3. Seleção dos genes normalizadores e análise da expressão gênica

Para a normalização dos ensaios de qRT-PCR foram selecionados genes cuja expressão foi a mais estável, entre as diferentes linhagens celulares, utilizando o mesmo *input* de cDNA. O nível de expressão de 8 genes (*GAPDH*, *ACTB*, *HMBS*, *TUBA*, *RPLO*, *RPL27*, *TBP* e *HPRT1*) foi avaliado nas 6 linhagens celulares, selecionados os que não variaram mais do que 1,5 *Ct* entre as amostras e que tiveram eficiências dentro de uma amplitude média não maior do que 5%.

A quantificação relativa da expressão de *Stratifin* foi feita utilizando o método de comparação de *Ct* ou $\Delta\Delta Ct$. Esse método se baseia na redução dos valores de *Ct*s da amostra controle em relação as amostras de interesse. Os valores de todas as amostras foram normalizados por um gene endógeno de referência conforme mencionado acima.

3.3. Extração e quantificação de proteínas

A extração de proteínas, a partir dos extratos celulares, foi realizada com o uso de um tampão de extração contendo 150mM de NaCl, 50mM de Tris-HCl pH 7,5, 0,1mM de EDTA e 0,5% de NP40. Esse tampão foi adicionado de inibidores de protease e fosfatase no momento da extração. Foi utilizado 0,5 mL do preparado (tampão + inibidores) por placa de 100mm com 85-90% de confluência e após raspagem completa o material foi acondicionado em tubos de 1,7 mL, mantidos no gelo por 20 minutos. Após esse período, os espécimes foram centrifugados a 12000 rpm/ 20 minutos a 4°C, o sobrenadante transferido para um novo tubo que foi armazenado a -80°C.

A quantificação foi realizada através do método de Bradford baseado na ligação do corante Coomassie às moléculas de proteína em condições ácidas seguida da leitura da absorção a 595nm. Para isso, foi preparada uma solução de 20% de *Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate*® (*Bio-Rad Laboratories Inc*, California, USA) em água MilliQ, que foi distribuída em uma placa de fundo reto e 96 poços com um volume final de 200 μ L por poço. Uma curva padrão contendo 7 diferentes concentrações de proteínas (de 0,5 μ g/ μ L, 1,0 μ g/ μ L, 2,0 μ g/ μ L, 3,0 μ g/ μ L, 4 μ g/ μ L, 5 μ g/ μ L e 6,0 μ g/ μ L) foi elaborada utilizando albumina de soro bovina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA. cat n°9048-46-8) . 2 μ L de cada padrão e das amostras foram aplicados em triplicata e a leitura de absorbância realizada no leitor de placa iMark™ (*Bio-Rad Laboratories Inc*, California, USA). Os valores médios das absorbâncias das triplicatas da curva foram utilizados para estabelecer uma equação de reta possibilitando a

interpolação dos valores médios obtidos a partir das amostras e dessa forma inferimos suas respectivas concentrações.

3.3.1. Western Blot

Para a determinação das proteínas de interesse, 50 µg dos extratos proteicos foram fracionados por eletroforese em condições desnaturantes em gel de poliacrilamida a 15% com SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) seguido de transferência para membrana de PVDF. Após a transferência, foi realizado um bloqueio da membrana com PBS-T 0,05% pH 7,4 (2mM de KH_2PO_4 , 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10mM de Na_2HPO_4 e 0,05% de Tween-20) contendo 5% de leite em pó desnatado por uma hora. Em seguida, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários diluídos em solução de PBS-T (descrita acima) e 1% de leite em pó desnatado a 4°C por um período de 16 horas em constante agitação. Os anticorpos primários utilizados foram: anti-*Stratifin* (Abcam, cat n°ab14123) diluído 1:1000, anti-*GAPDH* (Sigma-Aldrich, cat n° G9545) diluído 1:5000.

Após incubação com os anticorpos primários, seguiu-se com 3 lavagens consecutivas de 15 minutos utilizando PBS-T 0,05%. A incubação com o anticorpo secundário anti-mouse (*GE Healthcare*, Buckinghamshire, UK) foi realizada na diluição de 1:5000 em solução de PBS-T e 1% de leite em pó desnatado por um período de 1 hora em temperatura ambiente e constante agitação.

As membranas foram analisadas por quimioluminescência no aparelho *ImageQuant LAS®* (*GE Healthcare*, Buckinghamshire, UK), utilizando os reagentes de detecção *Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent* (*GE Healthcare*, Buckinghamshire, UK). A expressão da *Stratifin* e do gene normalizador *GAPDH* nos diferentes extratos celulares foram quantificados por densitometria utilizando o programa *ImageJ* (Rasband, W.S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) e plotados no *GraphPad Prism 5* para Windows (*GraphPad software, La Jolla, California, USA*).

3.4. Sistema CRISPR/Cas9 para nocaute e ativação gênica

O sistema *CRISPR/Cas9* é uma ferramenta de edição gênica baseado no “sistema imune adaptativo” bacteriano, que possibilita a modificação de uma região genômica de maneira bastante precisa. Entretanto, a abordagem escolhida deve levar em considerações variáveis individuais, dentre elas, o modelo celular. Desde do início da aplicação em modelos animais, o

número de publicações cresceu vertiginosamente de modo que são oferecidas inúmeras abordagens e estratégias. Porém, quando se transfere a um modelo celular e todas suas peculiaridades, as possibilidades são restritas ao que esse modelo permite. Algumas linhagens são bastante refratárias à sistemas de transfecção e transdução como foi observado nesse projeto. A estratégia para nocaute que foi utilizada nesse trabalho tem como objetivo promover uma quebra de dupla fita dentro da região codificadora do gene, de modo a promover um *indel*. O *indel*, caracterizado por inserções ou deleções na sequência do DNA é resultado da junção de extremidades não homólogas (*non-homologous end joining - NHEJ*), o sistema de reparo de quebra de dupla fita de DNA que ocorre mais frequentemente na célula. Por conta desse sistema não ser guiado por homologia, ele é sujeito a erros na forma de *indels*, e estes são os eventos chaves para o funcionamento do sistema CRISPR (Ran *et al.*, 2013).

Do ponto de vista informacional, o *indel* altera o quadro de leitura aberto (*ORF*) transformando a sequência de DNA modificada em uma sequência aleatória. Dessa forma, uma sequência aleatória acaba por gerar um produto truncado (sem atividade biológica) ou, mais frequentemente, um códon de terminação precoce (*premature termination codon – PTC*). Isso possibilita ainda a degradação prematura do transcrito mediada por uma mutação sem sentido (*Nonsense-mediated mRNA decay – NMD*) que é favorecido por um sistema celular de vigilância capaz de reconhecer *PTCs* (Supek *et al.*, 2020).

O sistema CRISPR adaptado para células eucarióticas consta de um único vetor com uma região para clonagem do oligonucleotídeo (com a sequência alvo), que precede a região invariável e que compõe o sgRNA. Essa região é regulada por uma sequência promotora U6 que utiliza a RNA polimerase III (geralmente utilizada pela célula para transcrever genes de RNAs transportadores, fração 5S ribossomal e outros RNAs pequenos) para a produção desse pequeno transcrito. Adicionalmente, esse vetor apresenta uma região que codifica a Cas9 (endonuclease efetora) e o gene que confere resistência à Puromicina, ambos com a expressão controlada por um promotor sintético forte, precedido por um elemento intensificador precoce do citomegalovírus (figura 4 a.). Após transfecção, o vetor é dirigido ao núcleo onde é submetido à transcrição pelas RNAs polimerases celulares.

O produto transcrito a partir do promotor U6 permanece no núcleo, ao passo que o transcrito único que codifica a Cas9 e o gene de seleção é transportado para o citoplasma. No citoplasma o transcrito único é traduzido no ribossomo e sofre autoclivagem por conta do elemento T2A, separando-se da região que codifica a Puromicina N-acetiltransferase - PAC (enzima que gera resistência à puromicina).

molde, além de um repertório de proteínas que são expressas apenas em fases específicas do ciclo celular (Mjelle *et al.*, 2015).

3.4.1. Desenho do sgRNA para nocaute gênico

O primeiro passo para o nocaute gênico baseado em CRISPR é o estudo da região genômica. Entretanto, o gene *SFN* possui um único éxon sem nenhuma anotação codificadora anti-senso ou mesmo sobreposição a algum elemento de regulação conhecido. Dessa forma foram desenhados dois *guides* no início da *CDS* (*coding sequence*) do gene, com o objetivo de promover um *indel* (*insertion* ou *deletion*) o mais próximo possível do início da tradução. O objetivo dessa estratégia de nocaute é a geração de uma proteína truncada não funcional ou, preferencialmente, um *stop códon* precoce. Esses *guides* são utilizados individualmente e estão na mesma região, porém um na orientação senso e o outro na orientação anti-senso. Para o *design* foi utilizada uma ferramenta *online* <http://crispor.tefor.net>, capaz de gerar *guides* baseado em um algoritmo que prevê possíveis *offtargets*. Os *guides* selecionados apresentavam ≥ 4 *mismatches*, com pelo menos dois sendo dentro da sequência “*seed*” (1-12 nucleotídeos *upstream* à sequência *PAM*), o que reduz consideravelmente a clivagem dos possíveis *offtargets* pela Cas9 conforme Zheng *et al.*, 2017. Para a correta clonagem nos vetores, nucleotídeos acessórios (em vermelho no quadro abaixo) são adicionados nas extremidades 5’ e 3’ dos respectivos oligonucleotídeos (figura 4 b.).

<i>sgRNA Stratifin I - TOP</i>	5’- CACCC <u>G</u> AGAGCAGGCCGAACGCTATG -3’
<i>sgRNA Stratifin I - BOTTOM</i>	5’- AAACCATAGCGTTTCGGCCTGCTCTC <u>C</u> -3’

<i>sgRNA Stratifin II - TOP</i>	5’- CACCCAGCAGGTTTCGCTCTTCGC -3’
<i>sgRNA Stratifin II - BOTTOM</i>	5’- AAACGCGAAGAGCGAAACCTGCTC -3’

Stratifin, cuja localização cromossômica é 1p36, consta de um único éxon de 1308 pb, dos quais 747 pb codificam a proteína de 248 aminoácidos. O gene consta de regiões 5’UTR e 3’UTR, que contém elementos responsáveis pela estabilidade do transcrito. De acordo com essas características, se buscou o desenho dos *guides* para nocaute o mais próximo possível do início da *coding sequence* (*CDS*)(figura 5).

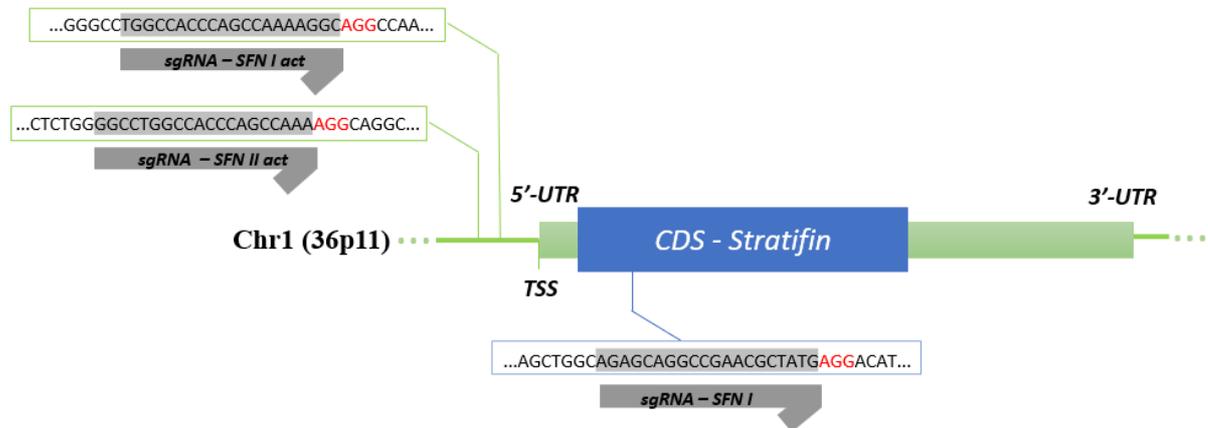


Figura 5- Posição genômica do gene *Stratifin* e as posições dos *sgRNAs*: Representação espacial da *Stratifin* dentro do locus 1p36 com os dois *sgRNAs* para a ativação gênica à esquerda da TSS, representados como setas cinzas (*sgRNA -SFN I & SFN II act*). Acima das setas, são observadas as sequências alvo precedidas pela sequência PAM em vermelho. Ao lado direito da TSS, pode se observar o gene representado pelo retângulo verde claro com as respectivas regiões 5' e 3' UTR e a região codificante da proteína em azul. Na parte inferior da imagem, observa-se o *sgRNA* efetivo para o nocaute representado pela seta cinza. Dentro da caixa, encontra-se a sequência alvo do *sgRNA* precedida pela sequência PAM (em vermelho). Espera-se que a quebra de dupla fita ocorra 3 nucleotídeos *upstream* da sequência PAM.

3.4.2. Desenho do *sgRNA* para ativação gênica (SAM/Cas9)

Para a ativação gênica, os *sgRNAs* foram posicionados entre as posições -20 e -100 relativas ao sítio de início da transcrição (*Transcription Start Site - TSS*) que se mostrou mais eficiente na promoção da transcrição segundo Konermann *et al.*, 2015 (figura 5). De forma bastante simplificada, o sistema de ativação gênica baseado em CRISPR também conhecido como Mediador de Ativação Sinérgica (SAM – *Synergistic Activation Mediator*) é uma ferramenta que utiliza uma Cas9 modificada, a qual tem sua atividade nucleásica inativada, enquanto mantém sua capacidade de ser dirigida para uma sequência de DNA guiada pelo *sgRNA*. Dessa forma, a Cas9 defectiva (dCas9) se torna uma proteína ligadora de DNA guiada por um RNA. A partir dessa dCa9 foram fusionadas outras estruturas que atuam como fatores de transcrição sintéticos “engenheirados”, e tem como objetivo recrutar a maquinaria de transcrição gênica para um determinado locus e modular a expressão do gene desejado (figura 6) (Konermann *et al.*, 2015).

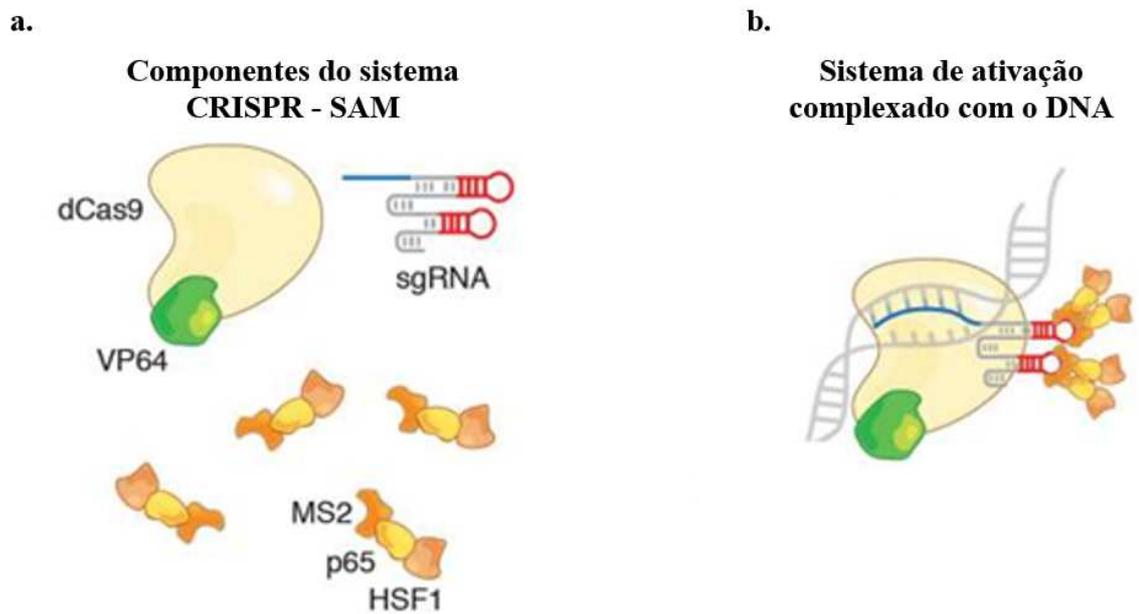


Figura 6 - Sistema de ativação SAM-Cas9: a. *dCas9* fusionada à proteína VP64; *sgRNA* com "scaffold" modificado com um *stem-loop2* e um *tetraloop* (aptameros de RNA) e as proteínas fusionadas MS2, p65 e HSF1 que atuam como complexos capazes de recrutar a maquinaria de transcrição celular. b. O complexo *dCas9_VP64-sgRNA-MS2_p65_HSF1* ligadas ao DNA alvo através da hibridização do RNA guia – porção em azul (Konnerman *et al.*, 2015).

O sistema consta de 3 vetores lentivirais, os quais devem ser introduzidos em cada linhagem celular e selecionadas por 3 diferentes antibióticos. O primeiro vetor traz a *dCas9* fusionada à uma molécula de VP64 (um ativador transcricional composto por 4 cópias em *tandem* da proteína VP16, oriunda do vírus herpes simplex) e tem como fator de seleção o gene de resistência à Blastomicina (figura 7 a.). O segundo vetor traz a molécula MS2 (proteína de revestimento de um bacteriófago de RNA), fusionada à subunidade p65 do complexo transcricional NF- κ B e ainda o HSF1 (domínio de ativação do fator 1 da proteína do choque térmico humana) e tem como fator de seleção o gene de resistência à Higromicina (figura 7 b.). O terceiro vetor traz o *sgRNA* que é onde inserimos a sequência que irá determinar o *locus* da ativação gênica e tem como fator de seleção o gene de resistência à Zeocina (figura 7 c.). Para o *design* foi utilizada a mesma ferramenta online <https://crispor.tefor.net> e semelhante estratégia para evitar *offtargets*.

<i>sgRNA – Stratifin I act - TOP</i>	5' - CACCG TGGCCACCCAGCCAAAAGGC -3'
<i>sgRNA – Stratifin I act - BOTTOM</i>	5' - AAACGC TTTTGGCTGGGTGGCCAC -3'

<i>sgRNA – Stratifin II act - TOP</i>	5'- CACCGGCCTGGCCACCCAGCCAAA -3'
<i>sgRNA – Stratifin II act - BOTTOM</i>	5'- AAACTTTGGCTGGGTGGCCAGGCC -3'

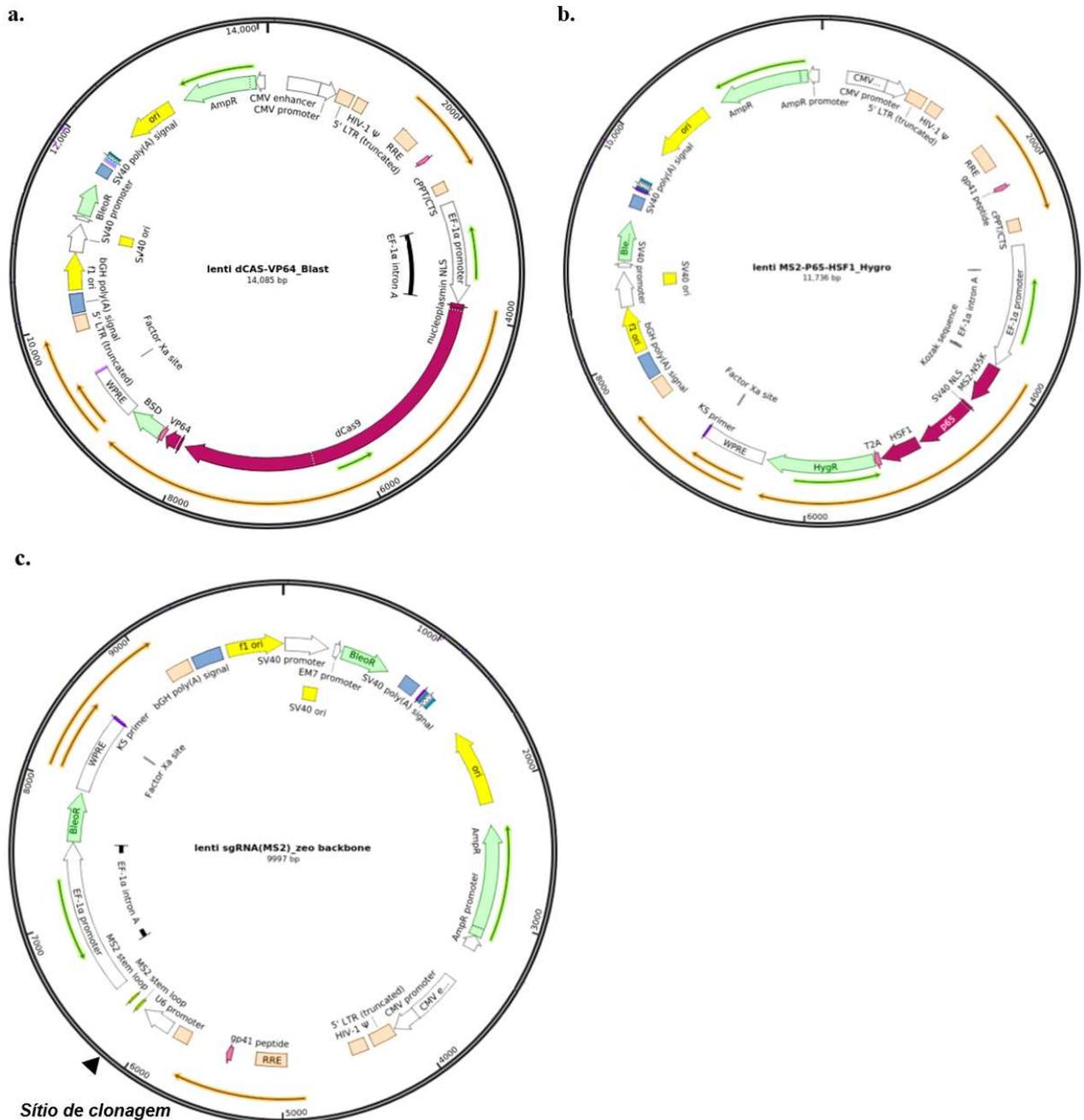


Figura 7 - Vetores para o sistema de ativação gênica baseadas em CRISPR: a. Vetor que codifica a dCas9+VP64 (representado pela seta circular roxa seguida do gene de resistência para blasticidina); b. Vetor que codifica os fatores do sistema sinérgico de ativação gênica MS2, p65 e HSF1 (representado pelas três setas roxas em tandem, seguido pelo gene de resistência à higromicina); c. Vetor que codifica o *sgRNA* com as modificações *stem loop* e *tetraloop* com o sítio de clonagem do *guide* destacado pelo triângulo preto (fonte das imagens através dos links addgene em 3.4.3).

4.3. Clonagem dos sgRNAs nos vetores do sistema CRISPR/Cas9

Para utilização do sistema CRISPR de nocaute gênico, utilizou-se o vetor para o sistema de transfecção plasmidial pX459 gentilmente cedido por Feng Zhang (Addgene plasmid # 62988 ; <http://n2t.net/addgene:62988> ; RRID:Addgene_62988). Para o sistema de ativação gênica CRISPR SAM-Cas9, utilizou-se os plasmídeos também cedidos gentilmente por Feng Zhang: lenti dCas-VP64_Blast (Addgene plasmid # 61425 ; <http://n2t.net/addgene:61425> ; RRID:Addgene_61425), lenti MS2-P65-HSF1_Hygro Addgene plasmid # 61426 ; <http://n2t.net/addgene:61426> ; RRID:Addgene_61426) e lenti sgRNA(MS2)_Zeo backbone (Addgene plasmid # 61427 ; <http://n2t.net/addgene:61427> ; RRID:Addgene_61427) – os últimos três para o sistema lentiviral, conforme citado acima.

Os oligonucleotídeos liofilizados foram reconstituídos na concentração de 100 μ M e 1 μ L de cada par foi submetidos à reação de fosforilação (extremidades 5') utilizando 1 μ L da enzima T4 polinucleotídeo quinase (PNK) (*Promega Corporation*, Madison, Wisconsin, EUA), 1 μ L do Buffer da enzima T4 ligase em uma reação final de 10 μ L. As condições da reação de fosforilação foram de 37°C por 30 minutos, inativação da enzima à 95°C por 5 minutos, seguido de um *rampdown* para 25°C, com taxa de 5°C por minuto para o anelamento entre *TOP-BOTTOM*. Após esse processo, faz-se necessária uma diluição de 100x conforme protocolo de Ran *et al.*, 2013.

Para a inserção dos *guides* nos vetores foram utilizados 100 ng do vetor em questão (pX459 para o sistema de nocaute por transfecção e lenti sgRNA(MS2)_Zeo backbone para o sistema de ativação por transdução), 2 μ L dos respectivos oligos anelados e diluídos, 2 μ L de Tango Buffer 10X, 1 μ L de Ditiotretitol (DTT – 10mM), 1 μ L de ATP (10mM), 0,5 μ L de enzima de restrição do tipo IIS (BsmBI para o sistema lentiviral - para ativação gênica - ou BbsI para o sistema de transfecção), 0,5 μ L da enzima T4 ligase (*Promega Corporation*, Madison, Wisconsin, EUA) em uma reação final de 20 μ L. As condições para as reações foram otimizadas em 24 ciclos de 37°C por 5 minutos seguidos de 21°C por 5 minutos com um ciclo final de 37°C por 7 minutos.

Foram utilizados 5 μ L dessa reação para transformar 50 μ L de bactérias competentes por eletroporação, seguido de recuperação em 1 mL de meio SOC sob agitação a 37°C por 1 hora. Em seguida, foram plaqueados 50 μ L do produto em placas de LB ágar com 100 μ g/mL de ampicilina (Sambrook *et al.*, 1989).

Após incubação à 37°C *overnight*, 5 colônias foram selecionadas e submetidas a uma reação de PCR utilizando um *primer* da região promotora U6 do plasmídeo como *forward* (5'-

GACTATCATATGCTTACCGT-3) e o oligo complementar (*bottom*) de cada *guide*, como *primer reverse*. As reações foram realizadas em um volume final de 25µL contendo uma concentração final de 1x *TaqGold PCR Buffer*® (*Applied Biosystems*, Texas, USA), 250µM de cada dNTP, 2,5mM de MgCl₂, 1U de *AmpliTaqGold DNA* polimerase (*Applied Biosystems*, Texas, USA) e 300nM de cada iniciador no termociclador *GeneAmp*® *PCR System 9700* (*Applied Biosystems*, Texas, USA). Cada ciclo incluiu 30 segundos de desnaturação a 95°C, 30 segundos de anelamento do *primer F* a 49°C, 30 segundos de anelamento do *primer R* a 60°C e 30 segundos para o alongamento a 72°C. O primeiro ciclo foi precedido por 10 minutos para a ruptura da célula bacteriana e desnaturação a 95°C e o último ciclo estendido por 7 minutos de alongamento a 72°C. Foi incluído como controle negativo o DNA plasmídeo antes do processo de restrição e ligação. Essa reação gera um fragmento de 103 pares de bases para os plasmídeos em que o *guide* foi corretamente clonado que deve ser observado no gel de agarose 1,5% em TBE 1x por transiluminação ultravioleta (*BD Bioscience*, Oxford, UK). Uma das colônias positivas para cada um dos vetores clonados foi selecionada, inoculada em 2 mL de LB com 100µg/mL de ampicilina, incubada à 37°C com agitação por um período de 16 horas. Após esse período, uma alíquota de 500 µL foi adicionada de 500 µL de glicerol 100% e armazenada a -80°C (estoque) e o remanescente submetido à Miniprep para purificação dos plasmídios recombinantes (Sambrook *et al.*, 1989).

3.4.4. Produção e quantificação de lentivírus para o sistema CRISPR de ativação gênica

A produção de lentivírus foi realizada em células HEK293T (ATCC CLR 3216™), utilizando o reagente *Mission*™ *Lentiviral Pack Mix* (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) que consta de um conjunto de vetores acessórios para a montagem da partícula viral. As células HEK 293T foram cultivadas em *Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose* (DMEM) - suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 µg/mL de estreptomicina e 100 µg/mL de penicilina em incubadora com 5% CO₂ a 37°C. Brevemente, as células foram semeadas em placas de 6 poços na densidade de 10⁴ células por cm² um dia antes da transfecção. Para a transfecção foi utilizado 8µL do reagente *Mission*, 1µg de cada vetor, 5µL do reagente de transfecção *Fugene*®HD (*Promega Corporation*, Madison, Wisconsin, EUA) em 150 µL de *Opti-MEM*™ (*Thermo Scientific*, Wilmington, DE, USA), seguidos de homogeneização rápida em tubos de poliestireno. Passados 15 minutos o produto foi cuidadosamente gotejado em cada poço na superfície do meio para evitar que as células se desprendessem da placa. Foram feitas

coletas do sobrenadante com imediata filtração (filtros com porosidade de 45 µm) em 24, 48 e 72 horas, e os lentivirus acondicionados à -80°C.

3.4.4.1. Titulação de Lentivírus e determinação do MOI

A titulação viral foi inferida utilizando qPCR em tempo real, baseado em DNA genômico de células 3T3 (ATCC CLR-1658), transduzidas com três diluições diferentes de cada uma das alíquotas de lentivírus coletados. Cada um dos vetores utilizados na produção de lentivirus contém um gene de seleção para o qual foram desenhados primers específicos (Blasticidina, Higromicina e Zeocina). Dessa forma, baseado na massa de cada vetor foram elaboradas curvas padrão de 10 a 10⁶ cópias de modo que fosse possível, através da interpolação linear e uma equação de reta, estabelecer o número exato de cópias virais pela massa de DNA genômico. Considerou-se a massa do genoma diploide de *Mus musculus* de 5,97 pg (5,97x10⁻¹²g) que é o equivalente à 2x(~2,8 Gbp) x 1,096x10⁻²¹g (Genome Reference Consortium Mouse Build 39 - https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000001635.2/ consultado em 30/10/2021). Como gene endógeno controle para o *input* do DNA genômico e elaboração da curva padrão foi utilizado o gene *Car9*, que contém 1 cópia por genoma.

<i>Primer Forward – Car9</i>	5'- ACGAACAGTTGCTGTCCCAT -3'
<i>Primer Reverse – Car9</i>	5'- CAGAGCCAGTTCACCCTCAG -3'

<i>Primer Forward - Blasticidina</i>	5'- TCGGAAATGAGAACAGGGGC -3'
<i>Primer Reverse - Blasticidina</i>	5'- TCCCAGGATGCAGATCGAGA -3'

<i>Primer Forward - Higromicina</i>	5'- ATGCTCCGCATTGGTCTTGA -3'
<i>Primer Reverse - Higromicina</i>	5'- ATTTGTGTACGCCCGACAGT -3'

<i>Primer Forward – Zeocina</i>	5'- CAAGTTGACCAGTGCCGTTC -3'
<i>Primer Reverse – Zeocina</i>	5'- TGATGAACAGGGTCACGTCG -3'

As células NIH-3T3 foram cultivadas em RPMI - suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 µg/mL de estreptomicina e 100 µg/mL de penicilina em incubadora com 5% CO₂ a 37°C. Brevemente, as células foram semeadas em placas de 12 poços na densidade de 5x10⁴

células por poço um dia antes da transdução. No dia seguinte da semeadura, células de 3 poços foram tripsinizadas e contadas com hemocitômetro, os demais poços foram adicionados de meio fresco contendo $8\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de polibreno. As células foram transduzidas pela adição de alíquotas de $1\mu\text{L}$, $10\mu\text{L}$ e $100\mu\text{L}$ dos lentivírus estoque por poço seguidas de leve agitação circular para homogeneização. Após 24 horas, o meio foi retirado, adicionado de $200\mu\text{L}$ de meio sem soro contendo $10\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ de DNase I e incubado por 15 minutos a 37°C . Após esse período a DNase foi removida, 1mL de meio /poço foi repostado e as células incubadas por mais 48 horas. Passado esse período as células foram coletadas, o DNA foi extraído conforme 3.4.8.1. e uma massa de 100ng de cada concentração foi utilizada para os ensaios de PCR quantitativo em tempo real em triplicata (protocolo adaptado de Kutner *et al.*, 2009).

Cada reação consta de $1\times$ SYBR Green® ($6\mu\text{L}$), 300nM -concentração final- de cada *primer*, $2\mu\text{L}$ de DNA ($50\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) e H_2O qsp $12\mu\text{L}$. O protocolo para amplificação foi realizado por um ciclo inicial de 95°C para ativação da polimerase por 2 minutos seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e então 60°C por 60 segundos realizado na plataforma *7500 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, California, USA).

3.4.5. Curva de morte para Puromicina, Blastidina, Higromicina e Zeocina

Em placas de 12 poços foram plaqueados 4 poços com 1×10^5 células de cada linhagem de modo que após 24 horas tivéssemos $\sim 60\%$ de confluência para cada uma delas. Cada linhagem foi então desafiada com 4 diferentes doses de cada um dos antibióticos, de acordo com o range indicado pelo fabricante. Desse modo foi possível estabelecer as doses suficientes para selecionar as UPCI:SCCs: $2,5\mu\text{g}/\text{mL}$ de Puromicina, $2,5\mu\text{g}/\text{mL}$ de Blastidina por 4 dias, $250\mu\text{g}/\text{mL}$ de Higromicina por 4 dias e $250\mu\text{g}/\text{mL}$ de Zeocina por 5 dias.

3.4.6. Transdução Celular para o Sistema de ativação gênica

As células das diferentes linhagens foram transduzidas de maneira sequencial utilizando um MOI de 0,3 com $8\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Polibreno por 48 horas seguido de um período de seleção dos respectivos antibióticos. As transduções foram realizadas em placas de 6 poços com $2,5\times 10^5$ células/poço para SCC78 e SCC154; e 10^5 células por poço para SCC143 que foram plaqueadas 24 horas antes da incubação com os lentivírus. Embora o Konermann *et al.*, 2015, sugiram a transdução com os 3 lentivírus simultaneamente, nesse projeto as transduções foram realizadas individualmente. Para as duas primeiras transduções foram utilizados os lentivírus para os

vetores lenti dCas-VP64_Blast (#61425), lenti MS2-P65-HSF1_Hygro (#61426), que estabelecem a dCas9 e os fatores acessórios e, por último o lenti sgRNA(MS2)_Zeo backbone (#61427) com os sgRNAs para *Stratifin*, ou apenas o vetor vazio.

Passado o último processo de seleção, o *pool* de cada linhagem foi expandido para extração de RNA e proteínas, de forma a confirmar o aumento na expressão gênica em nível transcricional e proteico.

A abordagem de transdução para o nocaute gênico foi considerada e utilizada no início do projeto, entretanto resolvemos evitar essa estratégia para reduzir o risco de *offtargets* já que nesse processo ocorreria a expressão permanente e não desejável de uma endonuclease (Cas9) na célula. Adicionalmente, evitamos a mutagênese insercional, ocasionada pela integração do lentivírus no genoma celular e quaisquer possíveis consequências indesejáveis ocasionadas por esse processo (Moiani *et al.*, 2012).

3.4.7. Transfecção Celular para nocaute gênico e seleção clonal

Uma característica bastante marcante para as linhagens SCC78 e SCC154, é o quanto elas são refratárias ao processo de transfecção com relação à SCC143 (facilmente transfectável). Dessa forma, foram utilizados diferentes reagentes e protocolos incluindo métodos baseados em polibreno (Dollard *et al.*, 1992) e os reagentes convencionais Lipofectamina®3000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), Lipofectamina®LTX (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e Fugene®HD (*Promega Corporation*, Madison, Wisconsin, EUA). Dessa forma, para a linhagem celular SCC154, o único reagente que se obteve sucesso nesse processo foi a Lipofectamina®LTX, enquanto que para SCC78 e SCC143 esse mesmo reagente foi extremamente tóxico. Por outro lado, a utilização de Fugene®HD na proporção 1:3 (massa de vetor:reagente) possibilitou a transfecção de SCC78 e SCC143.

Para SCC154, $2,5 \times 10^5$ células/poço foram semeadas em placa de 6 poços e após 48 horas foram submetidas ao processo de transfecção. Uma das variáveis que afeta positivamente o processo de transfecção é sua realização na fase exponencial de crescimento celular já que a entrada do plasmídeo no núcleo ocorre preferencialmente após divisão celular. O preparo do reagente constou de 2 tubos de poliestireno cada qual com 150µL de Opti-MEM®. Em um deles foi adicionado 9µL de Lipofectamina®LTX e no outro 3,5µg do vetor + 3,5µL do reagente *PLUS*. Foi então adicionado o conteúdo de um tubo no outro, incubado por 5 minutos em temperatura ambiente e gotejado cuidadosamente em cada um dos poços já com o meio recém trocado. A seleção com Puomicina foi iniciada após 48 horas da transfecção.

Para SCC78 e SCC143 foram semeadas 2×10^5 e 10^5 células/poço respectivamente em placas de 6 poços e (também) transfectadas após o período de 48 horas. O preparo do reagente foi realizado em um único tubo de poliestireno com 150 μ L de Opti-MEM®, adicionado de 1,5 μ g do vetor + 4,5 μ L do Fugene®HD, homogeneizado e incubado por 15 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, foi adicionado mais 650 μ L de Opti-MEM®, novamente homogeneizado e aplicado diretamente sobre as células sem meio. Após 4 horas, foi adicionado mais 1,2 mL do meio de cultivo e aguardadas mais 44 horas antes da adição do agente de seleção.

Esse processo de otimização dos protocolos permitiu que uma pequena fração de cada uma das linhagens fossem selecionadas, entretanto novas modificações no protocolo foram necessárias, já que as linhagens em questão necessitam de uma confluência mínima para expansão. Dessa maneira, a obtenção e expansão dos clones foi possível utilizando 50% de meio condicionado e um adicional de 10% de soro fetal bovino (totalizando 20% de soro). Mesmo com essas modificações, foi necessário um período de aproximadamente 60 dias para que os clones expandissem na placa seguido do isolamento com anéis de clonagem. Para tal procedimento, as placas contendo os clones expandidos foram lavadas com PBS 2x, seguidas de incubação por um minuto com *Cell dissociation buffer enzyme-free* (Gibco). Após a retirada do tampão, os anéis de clonagem previamente autoclavados foram lubrificados em suas extremidades com silicone industrial (também autoclavado) e posicionados sobre cada colônia de células de modo a isolar do restante da placa. Foi então adicionado $\sim 20 \mu$ L de tripsina-EDTA 0,25% (Gibco) dentro dos anéis de modo que cobrissem completamente cada colônia. Passados ~ 7 -10 minutos, adicionou-se 200 μ L de meio de cultivo em cada um dos anéis de modo que fosse possível homogeneizar as células com a tripsina e, ajudado com o processo de pipetagem *up-down*, remover todas as células que foram então, transferidas para placas de 48 poços.

A partir do isolamento dos clones, as células que alcançavam 70% dos poços eram transferidas para placas maiores até ter uma massa de células suficiente para extração de DNA, RNA e proteínas e, dessa forma, confirmar em quais clones houve a edição gênica.

3.4.8. Caracterização do nocaute e ativação gênica

A caracterização do nocaute da *Stratifin* foi verificada através de *Western Blot* (conforme em 3.3.1.), sendo que os clones que não apresentaram nenhum sinal para sua expressão foram validados por sequenciamento dos alelos. O objetivo dessa etapa é o de verificar como ocorreu a edição gênica em nível genômico, já que os processos de

recombinação após quebra de dupla fita de DNA são randômicos. Eventualmente pode haver a deleção ou inserção de múltiplos de três nucleotídeos, levando à adição ou eliminação de alguns poucos aminoácidos de modo a não ser mais reconhecida pelos anticorpos monoclonais anti-*Stratifin*, porém manter algum de seus motivos funcionais. À *Stratifin* foram atribuídas interações com inúmeras proteínas celulares de forma que é crucial confirmar que não haja uma proteína parcial/truncada sendo expressa (Benzinger *et al.*, 2005).

Para a caracterização da ativação gênica, foram realizados ensaios de PCR quantitativo em tempo real, conforme 3.2.1. e *Western Blot*, conforme 3.3.1. Para a abordagem de ativação gênica, não se faz necessária a seleção de clones, já que não há modificação na sequência do DNA genômico.

3.4.8.1. Extração de DNA e precipitação em etanol

As amostras de DNA de cada clone e seus controles (das 3 linhagens celulares) foram obtidas através da metodologia de Fenol-Clorofórmio (Sambrook *et al.*, 1989). Cada poço da placa de 6 poços e com 85-90% de confluência tiveram as células tripsinizadas e o *pellet* acrescentado de 200µL de tampão de digestão (50mM de Tris-HCl pH 7,5; 1mM de EDTA; 0,5% de Triton X-10) e 200µL de Tampão de Proteinase K (200µg/mL de Proteínase K liofilizada solubilizada em TE (10mM de Tris-HCl; 1mM de EDTA)). As amostras foram incubadas por 24 horas a 55°C em banho seco com agitação. **Após 24 horas foram acrescentadas de 50µL de Tampão de Proteinase K no caso de células remanescentes em suspensão.

Ao término da digestão foi adicionado igual volume da solução de Fenol: Clorofórmio: Álcool Isoamílico, na proporção 25:24:1 em cada tubo e agitado vigorosamente (vórtex) por 1 minuto. Foram então submetidas à centrifugação por 12.000 rpm/ 15 minutos em temperatura ambiente e o sobrenadante de cada amostra foi transferido para um tubo limpo. A esses novos tubos foram adicionados 10% do volume de uma solução de acetato de sódio 3M e 2,5 vezes do volume de etanol 100% gelado (<0°C). As amostras ficaram precipitando por um período mínimo de 12 horas a -20°C. Após esse período as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm/ 15 minutos a 4°C para favorecer a formação do *pellet*. O etanol foi removido por inversão e o *pellet* resultante foi submetido à mais duas centrifugações nas mesmas condições, só que agora com etanol 70% gelado, com o objetivo de eliminar o acetato de sódio e possíveis reagentes utilizados nas etapas anteriores. Após a segunda lavagem, o etanol foi cuidadosamente removido e os tubos foram invertidos por 15 minutos para que o etanol remanescente pudesse

evaporar. O DNA foi ressuspenso em 50 μ L de água *nuclease-free* com posterior quantificação em ng/ μ L e pureza atestadas pelas razões 260nm/280nm e 260nm/230nm no espectrofotômetro NanoDrop2000® (*Thermo Scientific*, Wilmington, DE, USA).

3.4.8.2. Amplificação, clonagem e sequenciamento de DNA

A PCR para amplificação da região alvo do nocaute de *Stratifin* foi padronizada e otimizada com a enzima GoTaq® Flexi DNA Polymerase (*Promega Corporation*, Madison, Wisconsin, EUA), com reagentes nas seguintes concentrações finais: GoTaq® Flexi DNA Polymerase 2U, GoTaq® Flexi Reaction Buffer 1x; 200 μ M de cada dNTP, 0,7 μ M de MgCl₂ e 1 μ M de cada *primer*. Os *primers* foram desenhados flanqueando a região em que se espera ter havido a edição gênica. Para isso foi utilizado novamente o *primer blast* e *OligoAnalyzer* IDT conforme citado em 3.2.1.

<i>Primer Forward – Stratifin sequencing</i>	5'- GATGATTCACCCCCACATCC -3'
<i>Primer Reverse – Stratifin sequencing</i>	5'- CGATCTCGTAGTGGAAGACGG -3'

O protocolo de amplificação foi realizado com um ciclo inicial de 95°C para ativação da polimerase por 5 minutos, seguido de 35 ciclos a 95°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos, finalizando com um ciclo de extensão de 68°C por 45 segundos, ao final da reação foi realizado um ciclo de 68°C por 7 minutos de modo a garantir a atividade da polimerase em deixar um nucleotídeo de adenina *overhang* para a etapa de clonagem.

Para a corrida eletroforética em gel de agarose, 10 μ L dos produtos de PCR foram adicionados a 2 μ L de tampão de amostra. Foi preparado 100 ml de tampão Tris/Borato/EDTA -1x TBE- com 1% agarose, adicionado de 0,5% de GelRed® (*Biotium Inc*, Califórnia, EUA). A partir da eletroforese dos produtos da reação de PCR em gel de agarose, fragmentos contendo as bandas dos *amplicons* a serem sequenciados e purificados foram excisionados do gel utilizando bisturis descartáveis com auxílio de uma fonte de luz ultravioleta.

Para a purificação das bandas, foi utilizado o kit *ReliaPrep™ DNA Clean-Up and Concentration System* (*Promega Corporation*, Madison, Wisconsin, EUA), conforme orientação do fabricante.

A clonagem do fragmento no vetor, para posterior sequenciamento de cada alelo editado, foi realizada com o kit TOPO® TA Cloning® Kit (*Thermo Scientific*, Wilmington, DE, USA). O protocolo foi realizado com 4 μ L de produtos de PCR purificado, 1 μ L de solução

salina e 1 μL do vetor TOPO®. A reação foi homogeneizada e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente, e então diluídas com mais 18 μL de água. A partir desse total, 4 μL dessa reação foi adicionada à 50 μL de bactérias competentes e submetida a eletroporação. As bactérias então foram recuperadas em meio SOC por 1 hora à 37°C sob agitação e plaqueadas em meio seletivo com antibiótico. Após incubação *overnight* (16 horas), foram selecionadas 10 colônias de cada uma das amostras, de modo a contemplar os dois alelos gênicos. A partir desses clones, procede-se novamente com um PCR de colônia utilizando o mesmo par de *primers* seguido de purificação com Exosap-IT™ (*Thermo Scientific*, Wilmington, DE, USA) conforme orientação do fabricante.

As amostras foram preparadas para o sequenciamento Sanger utilizando BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit e submetidas o sequenciador ABI 3730 (*Thermo Scientific*, Wilmington, DE, USA). O resultado do sequenciamento foi analisado no software *SnapGene* (*Insightful Science*, disponível em snapgene.com).

3.5. Análise *in silico*

Com o avanço das tecnologias ômicas, disponibilidade de bancos de dados públicos e ferramentas de bioinformática mais intuitivas, tem sido possível explorar inúmeras vias e processos biológicos. Com a escassez de publicações que envolvam *Stratifin* com CCECP e HPV, a utilização desses bancos de dados trouxeram informações que enriqueceram mais ainda o projeto.

A primeira e mais ampla abordagem teve como objetivo comparar a expressão em nível transcricional da *Stratifin* e seu padrão de metilação entre o tecido normal e tumoral, e para isso foi utilizada a plataforma *Ualcan* que é ferramenta de bioinformática de busca rápida que utiliza bancos de dados ômicos entre eles o TCGA (Chandrashekar *et al.*, 2017).

Após a abordagem inicial, e de modo a explorar mais criteriosamente o perfil de *Stratifin* em amostras de CCECP, foi utilizada a plataforma CbioPortal que permite a aquisição dos dados brutos da expressão gênica e características clínico-patológicas (Cerami *et al.*, 2012). A partir do total de 530 amostras disponíveis, 7 delas foram excluídas por não apresentarem dados de expressão de *Stratifin*, resultando em 523 amostras. Calculou-se então, a expressão média da *Stratifin*, e estabeleceu-se um *threshold* de ± 2 , baseado em *z-score*, o que possibilitou a elaboração de uma tabela de contingência, a qual associou-se a expressão gênica em função das características clínico-patológicas, assim como perfil de mutação de alguns genes relacionados com o processo tumorigênico específicos para CCECP. Para a análise estatística foi utilizado a

ferramenta *GraphPad Prism 5* para Windows (*GraphPad software, La Jolla, California, USA*) e considerado um valor p inferior à 0,05 como significância estatística.

3.6. Ensaio de proliferação (cinética de crescimento)

As linhagens celulares SCC78, SCC143 e SCC154 parentais e seus respectivos clones nocauteados para *Stratifyn*, assim como os transduzidos com vetores de ativação gênica foram semeados em placas de 24 poços. A padronização para a densidade de cada uma das linhagens foi realizada a partir das células parentais semeadas em 4 densidades diferentes (1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 e 4×10^4) de modo que a célula alcançasse a confluência do poço em 9 dias. Isso porque as linhagens de CCECP utilizadas nesse projeto tem um manejo bastante peculiar, já que em baixa densidade não proliferam e em uma densidade maior proliferam muito rapidamente. Dessa forma, os ensaios de proliferação foram realizados algumas vezes para que fossem confirmadas as tendências de proliferação para cada uma das linhagens. A proliferação celular foi verificada a cada 48 horas em triplicata com o uso do hemocitômetro. Cada experimento foi realizado no mínimo três vezes, os dados das contagens foram transferidos para uma planilha e analisados no *GraphPad Prism 5* para Windows (*GraphPad software, La Jolla, California, USA*).

3.7. Ensaio de viabilidade celular com administração de agentes genotóxicos

O reagente Alamar Blue® (*Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA*) foi desenvolvido para medir quantitativamente a proliferação celular e pode ser usado para estabelecer a citotoxicidade relativa entre diferentes condições como administração de quimioterápicos e ação de radiação ionizante. Por ser atóxico, pode ser administrado diretamente na cultura celular e seu indicador de crescimento colorimétrico/ fluorimétrico é baseado na detecção da atividade metabólica. Especificamente, o sistema é um indicador de processos de oxidação-redução que tanto fluoresce quanto muda de cor em resposta à redução química do meio de crescimento resultante da atividade metabólica celular.

Essa atividade metabólica resulta na redução química do Alamar Blue que muda de cor de azul/não fluorescente (forma oxidada) para a cor vermelha/bastante fluorescente (forma reduzida). Duas variáveis que afetam grandemente a resposta ao Alamar Blue são o tempo de incubação e o número de células plaqueadas e isso deve ser determinado para cada linhagem celular utilizada. Dessa forma, para cada linhagem celular foram plaqueadas diferentes

densidades, seguidas de incubação com meio de cultivo adicionado de 10% de Alamar Blue e a fluorescência verificada a cada 1 hora durante 8 horas. Dessa forma, para uma dada linhagem celular, qualquer tempo de incubação selecionado deve corresponder de forma linear dentro de uma faixa de densidades celulares que seja proporcional à redução do Alamar Blue (verificado por fluorescência). Digno de nota, para uma dada densidade celular determinada, o tempo máximo de incubação pode ser determinado como o intervalo máximo que as células controle sejam capazes de transformar o indicador em sua forma oxidada (azul) para a forma totalmente reduzida (vermelha). A detecção de fluorescência deve ser realizada com uma excitação de 530-560 nm e 590 nm de emissão. Dessa forma, para cada uma das linhagens foi feito o plaqueamento com 5 diferentes densidades celulares com um intervalo entre 5×10^3 e $2,5 \times 10^4$ células/poço em placa de 96 poços em octoplicata. A partir desse plaqueamento, a fluorescência foi detectada a partir de 1 hora até 8 horas e os dados plotados de modo que foi possível determinar o número de células e o tempo de incubação adequado para proceder com os experimentos seguintes. A partir da determinação desses parâmetros, foi possível determinar a citotoxicidade de dois quimioterápicos que são utilizados para o tratamento de neoplasias disponíveis no laboratório (Cisplatina e Doxorubicina).

As linhagens celulares SCC78, SCC143 e SCC154 parentais e seus respectivos clones nocauteados para *Stratifin* assim como os transduzidos com vetores de ativação gênica foram semeados em placas de 96 poços. Além dos parâmetros citados acima com relação à densidade celular e tempo de ação do reagente, a padronização para a densidade de cada uma das linhagens levou em consideração que os agentes genotóxicos seriam administrados 24 horas após a semeadura e deveriam permanecer mais 72 horas sem que alcançasse a confluência. Dessa forma, foram semeadas 10^4 células por poço para SCC78 e SCC143 e $1,5 \times 10^4$ para SCC154 e mantidas em estufa com 5% de CO_2 a 37°C .

Os parâmetros para determinação do IC 50 dos quimioterápicos foram baseados na variação da sensibilidade verificada para 40 linhagens celulares de CCECP disponível em (<http://cancerrxgene.org>). Dessa forma, a faixa para doxorubicina foi de 0,0125 a $4,29 \mu\text{M}$ e para cisplatina foi de 4,22 a $491 \mu\text{M}$. As células foram plaqueadas de acordo com os parâmetros citados acima e desafiadas com diferentes doses dos quimioterápicos. As doses para doxorubicina foi de $7 \mu\text{M}$ para SCC78, $8 \mu\text{M}$ para SCC 143 e $5 \mu\text{M}$ SCC154 enquanto para cisplatina foi de $0,4 \mu\text{M}$ para SCC78, $0,2 \mu\text{M}$ para SCC143 e $0,07 \mu\text{M}$ para SCC154.

A viabilidade celular foi determinada após 72 horas com a completa aspiração do meio contendo os fármacos e substituição por 100 μL de meio de cultivo contendo 10% do reagente Alamar Blue® (*Thermo Scientific*, Wilmington, DE, USA). O tempo para leitura da placa foi

de 120-180 minutos a partir da administração do reagente, conforme padronização do experimento e a leitura realizada no equipamento *GloMax® Discover Microplate Reader* (Promega, Madison, USA). Os dados de fluorescência foram transferidos para uma planilha e analisados no *GraphPad Prism 5* para Windows (*GraphPad software, La Jolla, California, USA*).

3.8. Crescimento em suspensão de agarose (livre de ancoragem)

Foram confeccionadas placas de 24 poços revestidas com agarose em *DMEM High Glucose* com 10% de soro fetal bovino, com o objetivo de verificar a capacidade de proliferação em substrato semissólido. Para a confecção da placa, foram utilizadas duas concentrações de agarose (1,2% e 0,6%) preparadas em água bidestilada e autoclavadas. Paralelamente foi preparado o meio de cultivo e seus suplementos com o dobro de concentração de modo que após o resfriamento da agarose 1,2% até ~45°C, esse meio é adicionado gerando um substrato de agarose 0,6% em meio de cultivo. Cada poço da placa é adicionado de 450 µL de substrato e após a completa polimerização é adicionado de 100 µL de meio contendo 10⁴ células de cada uma das linhagens celulares com seus respectivos nocautes/ativação gênica. Após 40 minutos uma nova camada de agarose 0,6% em meio concentrado é preparada e adicionada cuidadosamente sobre as células resultando em uma camada levemente viscosa de 0,3%. Por fim, após 24 horas é adicionado 500 µL de meio que deve ser trocado a cada 72 horas com auxílio de uma ponteira fina encaixada na ponta da pipeta pasteur. As placas foram mantidas em incubadoras a 5% CO₂ e 37° por períodos de 15 a 30 dias e os registros feitos periodicamente e fotografadas em microscópio Primo Vert (Zeiss, Jena, DE).

3.9. Análise de ciclo celular após irradiação

A análise do ciclo celular tem como objetivo analisar a distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular após a irradiação e em diferentes condições (células não modificadas, nocautes e com superexpressão de *Stratifin*). O conteúdo de DNA genômico é inferido através do intercalante de DNA iodeto de propídio que é excitado a um comprimento de onda de 488 nm e, desta forma, podemos classificar as células em G₀/G₁, S ou G₂. Além disso, podemos verificar um conteúdo de DNA inferior a 2n que é considerado sub-G₀ e é frequente quando se verifica apoptose/morte celular. Assim, um conteúdo 2n corresponde à

população de células em G₀/G₁, um conteúdo entre 2n e 4n corresponde à população de células na fase S (síntese de DNA) e um conteúdo 4n que corresponde à população de células em G₂.

3.9.1. Determinação da dose de radiação

Em placas de 6 poços, $2,5 \times 10^4$ células de cada uma das três linhagens parentais foram semeadas e após 24 horas submetidas à irradiação com doses de 2, 3, 4 e 5 Grays no irradiador biológico RS2000 (*Rad Source*, Buford, GA, USA). Após 24 horas da irradiação, as células foram tripsinizadas e $1,5 \times 10^4$ células de cada uma das linhagens foram semeadas em placas de 96 poços em octoplicata. Para cada uma das linhagens a célula parental não irradiada também foi semeada como controle. Ensaios de viabilidade baseados em Alamar Blue foram realizados 48 e 72 horas após o plaqueamento conforme descrito em 3.7.

3.9.2. Irradiação e preparação das células para citometria de fluxo

Uma vez determinadas essas doses, 3×10^4 células de cada uma das linhagens e seus respectivos nocautes/ativação gênica foram semeadas e 24 horas submetidos a irradiação após. Imediatamente após a irradiação o meio foi trocado e decorridas mais 24 horas, as células foram tripsinizadas, 10% das células reservadas para o ensaio clonogênico e o restante foi lavado com PBS gelado, fixadas gentilmente com leve agitação em etanol 70% e armazenadas a -20°C .

Antes de submeter às células à citometria, o etanol foi removido após centrifugação (4000 rpm por 10 minutos a 4°C), as células foram ressuspensas em 1 mL de PBS gelado e, após outra centrifugação (1500 rpm por 10 minutos a 4°C) seguida do descarte do sobrenadante, foram incubadas por 30 minutos (protegido da luz) em 200 μL do mix contendo 1 mg/mL de RNase A GE101-01 (*Transgen Biotech Co., Beijing, China*), 50 $\mu\text{g/mL}$ do intercalante de DNA iodeto de propídeo (PI) (*Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA*) e 0,1% de TritonTM-X100 (*Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA*).

As células foram submetidas ao citômetro FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), analisadas no programa FlowJoTM v10.8 (TreeStar, USA) e os gráficos elaborados no *GraphPad Prism 5* para Windows (*GraphPad software, La Jolla, California, USA*).

3.10. Ensaio clonogênico

A dependência de contato entre as células, que favorece trocas de moléculas capazes de estimular o crescimento de forma autocrina/paracrina, é intrínseca a uma linhagem celular e um excelente parâmetro para avaliar a sobrevivência após determinada abordagem. Nesse projeto, o objetivo de ensaios clonogênicos são verificar a sobrevivência celular após irradiação assim como o papel da *Stratifin* após seu nocaute ou superexpressão.

No ensaio clonogênico, as células são semeadas de modo a serem capazes de proliferar com a mínima necessidade de contato com outras células. Nesse contexto, a maior dificuldade com relação às linhagens CCECP é que elas são muito dependentes de uma densidade mínima de células. Isso refletiu inclusive na obtenção de clones das células nocaute para *Stratifin* que, além de necessitarem de um meio condicionado com 20% de soro fetal bovino, levaram um tempo bastante longo para atingirem um número mínimo de células para o estabelecimento da cultura.

O ensaio clonogênico foi realizado em placas de 6 poços e padronizados de forma a garantir uma subconfluência adequada para as respectivas linhagens. Como mencionado anteriormente, as linhagens de CCECP utilizadas nesse projeto são bastante dependentes de uma densidade mínima de células. Dessa forma, a partir das linhagens parentais, foram semeadas diferentes quantidades de células de modo a gerar colônias maiores que 50 células em 20 dias. O número mínimo de células observado para cada linhagem celular foi 10^4 para SCC78, 3×10^3 para SCC143 e $1,5 \times 10^4$ para SCC154.

As células parentais, seus respectivos nocautes e superexpressão de *Stratifin* foram semeadas em triplicata após 24 horas a partir da irradiação assim como os seus controles não irradiados. O meio de cultivo foi trocado a cada 3 dias por 21 dias. Após esse período, o meio foi retirado, as células lavadas com PBS por duas vezes, fixadas com formaldeído 37% por 5 minutos, seguido de nova lavagem com PBS e incubação com solução de cristal violeta (1% de formaldeído, 1% de metanol, 0,05% de cristal violeta em PBS 1x) por 15 minutos no escuro. Após a incubação, prosseguiu-se com mais duas lavagens consecutivas com PBS e as placas foram secas por inversão. Todas as etapas desse processo foram realizadas em temperatura ambiente. Ao término da secagem, as colônias com mais de 50 células são contadas e fotografadas para documentação. A eficiência de plaqueamento foi determinada pela razão entre o número de colônias obtidas e o número de células plaqueadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. A base de dados do TCGA mostra a expressão aumentada de *Stratifin* em CCECP com relação ao tecido normal

A primeira análise foi verificar se a expressão da *Stratifin* no tecido tumoral era maior com relação ao tecido normal, já que essa foi a hipótese inicial do projeto. Então, utilizando a base de dados do TCGA através da ferramenta UALCAN, foi possível verificar que os níveis de expressão de *Stratifin* são maiores no tecido tumoral quando comparado ao tecido não transformado (figura 8 a.). Adicionalmente, através do perfil de metilação na região promotora do gene, é possível inferir que o controle da expressão gênica possivelmente ocorre por meio de metilação, um evento epigenético relacionado com a regulação negativa da expressão da *Stratifin* já sugerido na literatura (figura 8 b.) (Ferguson *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2001; Lodygin; Hermeking, 2005).

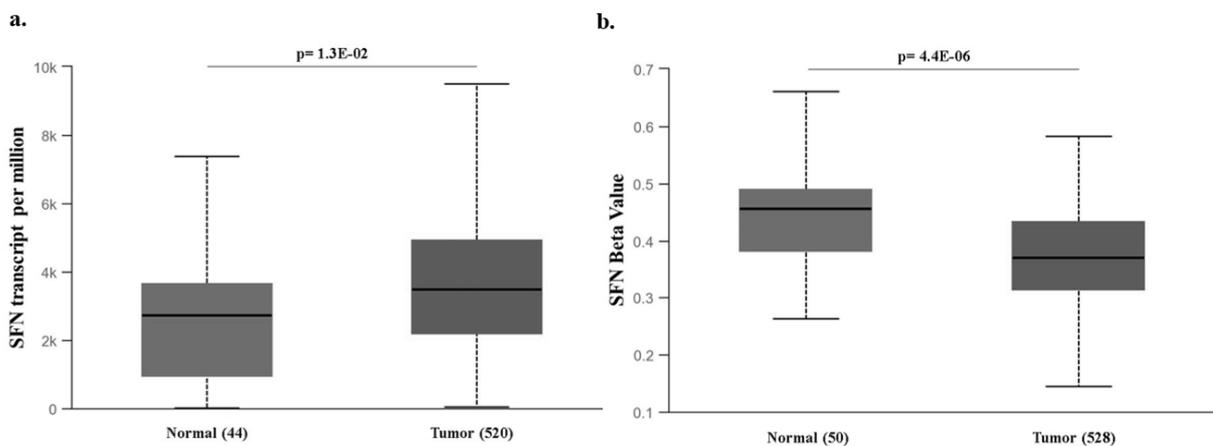


Figura 8 - **Expressão em nível transcricional de *Stratifin* (*SFN*) e perfil de metilação da região promotora do gene:** a. Comparação da expressão em transcritos por milhão de *SFN* entre tecido normal (n=44) e tecido tumoral (n=520) com significância estatística p=0,013; b. Perfil de metilação em *beta value* da região promotora de *SFN*, inferindo um possível papel da metilação no controle da expressão gênica com significância estatística p=0,0000044 (gráficos gerados na ferramenta UALCAN, disponível em <http://ualcan.path.uab.edu/> (Chandrashekar *et al.*, 2017).

A partir do download dos dados de 523 amostras tumorais de pacientes, foi possível a elaboração de uma tabela de contingência que relaciona a expressão de *Stratifin* (a partir de um *threshold* de ± 2 , baseado em *Z-score*) com características clínico-patológicas (tabela 1).

Tabela 1 – Características clínico-patológicas de pacientes de câncer de cabeça e pescoço do banco de dados TCGA, Firehose Legacy.

Parameters	Low		High		<i>p-value</i>
	n	%	n	%	
Sex					
Female	52	19,9	85	32,6	0,001
Male	209	80,1	176	67,4	
Age					
<=50	46	17,6	49	18,8	0,733
>50	215	82,4	212	81,2	
Race Category					
American Indian and Alaska Native	1	0,4	1	0,4	0,089
Asian	2	0,8	9	3,5	
Black or African American	28	11,1	20	7,9	
White	222	87,7	224	88,2	
Ethnicity Category					
Hispanic or Latin	9	3,8	16	6,5	0,176
Not hispanic or Latin	229	96,2	230	93,5	
Daily Alcohol (doses)					
0	24	23,1	34	29,8	0,430
1-3	30	28,8	34	29,8	
>=3	50	48,1	46	40,4	
Smoking History					
Non Smoker	32	15,5	42	22,6	0,191
Reformed Smoker	97	46,9	82	44,1	
Smoker	78	37,7	62	33,3	
Tumor Size*					
T0	0	0,0	1	0,4	0,738
T1	20	9,1	28	11,6	
T2	68	31,1	69	28,6	
T3	50	22,8	49	20,3	
T4	81	37,0	94	39,0	
Lymph Node*					
N0	71	35,5	105	47,3	0,014
N1	32	16,0	35	15,8	
N2	90	45,0	81	36,5	
N3	7	3,5	1	0,5	
Metastasis*					
M0	82	98,8	106	100,0	0,439
M1	1	1,2	0	0,0	
Stage					
Stage I	8	3,8	19	8,1	0,256
Stage II	34	16,0	37	15,7	
Stage III	37	17,5	44	18,7	
Stage IV	133	62,7	135	57,4	

Neoplasm Histologic Grade

G1	13	5,4	50	19,3	
G2	135	56,0	170	65,6	1,40E-11
G3	86	35,7	39	15,1	
G4	7	2,9	0	0,0	
Primary Tumor Site					
Alveolar Ridge	3	1,1	15	5,7	
Base of tongue	20	7,7	7	2,7	
Buccal Mucosa	9	3,4	13	5,0	
Floor of mouth	33	12,6	30	11,5	
Hard Palate	0	0,0	7	2,7	2,30E-12
Hypopharynx	6	2,3	4	1,5	
Larynx	79	30,3	37	14,2	
Lip	1	0,4	2	0,8	
Oral Cavity	24	9,2	49	18,8	
Oral Tongue	44	16,9	86	33,0	
Oropharynx	6	2,3	3	1,1	
Tonsil	36	13,8	8	3,1	
HPV status ish					
Negative	28	59,6	37	94,9	0,000116
Positive	19	40,4	2	5,1	
HPV status p16					
Negative	35	51,5	38	86,4	0,000204
Positive	33	48,5	6	13,6	

Primary Tumor Site

OTHER	199	45,0	243	55,0	<0,0001
BOT/O/T	62	77,5	18	22,5	

High or low expression was classified according to SFN median value. X^2 or Fisher's exact test was applied as appropriated. T: Tumor size, N: Lymph node, M: Metastasis, NHG: Neoplasm Histologic Grade, ish: *in situ* hybridization, HPV: *Human papillomavirus*, BOT: *Base os tongue*, O: *Oropharinx*, T: *Tongue*.

A partir dessa tabela foi possível verificar as variáveis com significância estatística. Conforme observado na figura 9 (a. e b.), a expressão de *Stratifin* é maior em CCECP HPV negativos com relação à sua contraparte. O padrão de expressão da *Stratifin* em tumores HPV positivos é refletido na distribuição por sítio primário do tumor, onde é verificada uma menor expressão em localizações anatômicas relacionadas à tumorigênese por HPV, que se evidencia ainda mais quando agrupamos todos esses tumores (figura 9 c. e d.).

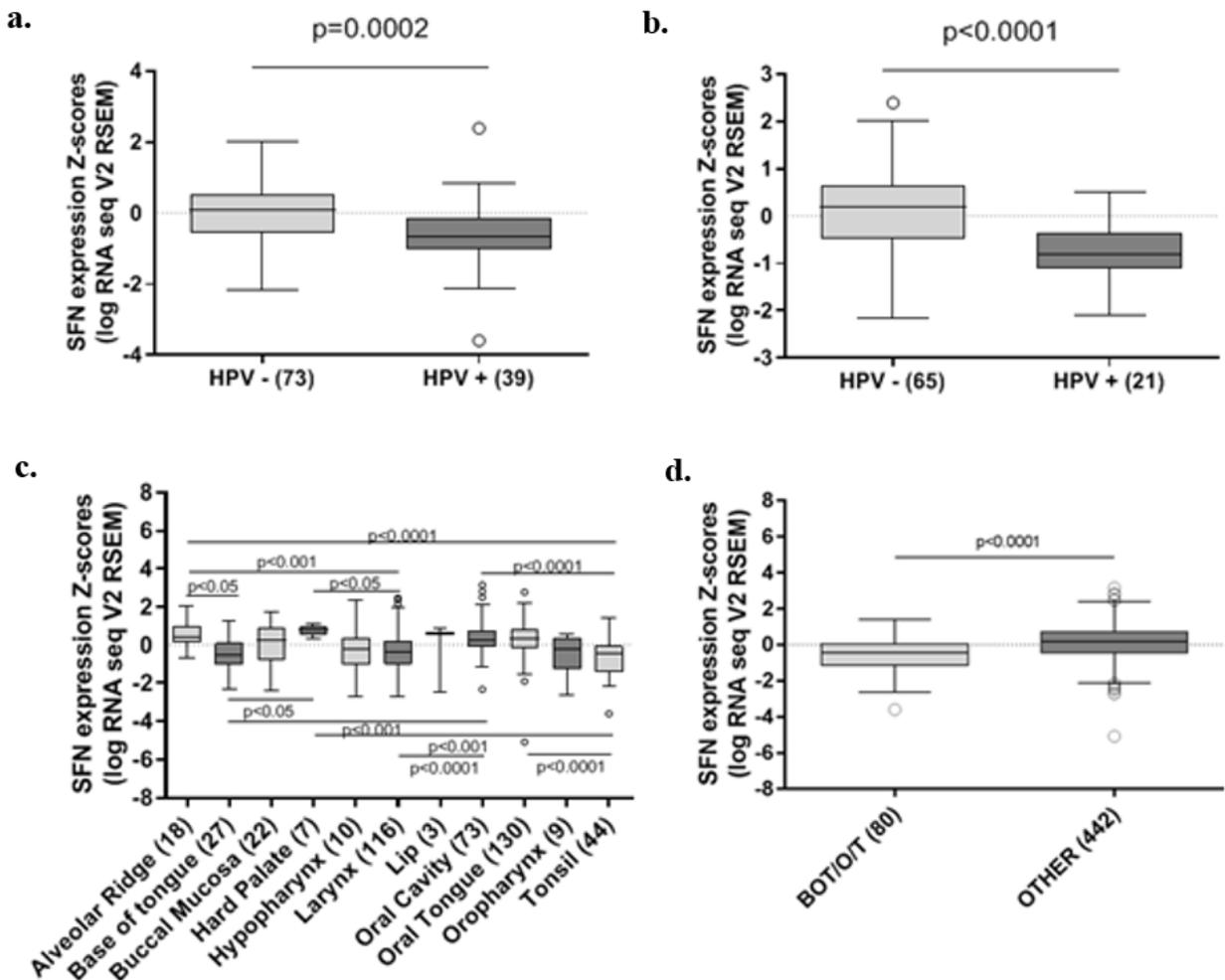


Figura 9 - Perfil de expressão de *Stratifin* (*SFN*) em razão de *status* de HPV e distribuição por sítio primário do tumor: a. Expressão da *SFN* em razão do *status* de HPV, inferido por p16, onde observa-se que CCECP HPV negativo tem maior expressão do que CCECP HPV positivo ; b. Expressão da *SFN* baseada no *status* de HPV inferido por hibridização *in situ*, corroborando os achados de que a expressão de *SFN* é menor em CCECP HPV positivo com relação ao CCECP HPV negativo; c. Expressão da *SFN* em razão do sítio primário do tumor; d. Expressão da *SFN* no sítio primário do tumor, agrupado em localizações anatômicas mais acometidas por HPV (BOT: Base da língua, O: Orofaringe. T:Tonsilas) versus todas as outras localizações anatômicas.

Uma importante alteração genética frequentemente encontrada em CCECP ocorre em *CDKN2A* (gene que codifica p16), que normalmente está silenciado em tumores HPV negativos, enquanto superexpressos em tumores HPV positivos. Isso é refletido quando observamos uma expressão maior da *Stratifin* quando há alteração em p16 (mais frequente em CCECP HPV negativo) com relação à contraparte em que p16 está íntegro (figura 10 b.). Embora tumores HPV positivos tenham uma expressão bastante aumentada de p16 (*surrogate marker* de positividade para HPV), normalmente não há mutação nessa região genômica nesses tipos tumorais. Esse dado inclusive contradiz um trabalho que sugere que o silenciamento de *Stratifin*, em um conjunto de câncer oral, é consequência da ausência de expressão de *CDKN2A* e negatividade para HPV (Gasco *et al.*, 2002). O mesmo pode ser observado para mutação em

TP53, que está frequentemente mutado em tumores HPV negativos e inalterado em tumores HPV positivos (figura 10 a.). Digno de nota, não se observa diferenças na expressão de *Stratifin* relacionada com mutação em *PIK3CA*, que costuma ter uma frequência de alterações similares tanto em CCECP HPV positivos quanto negativos.

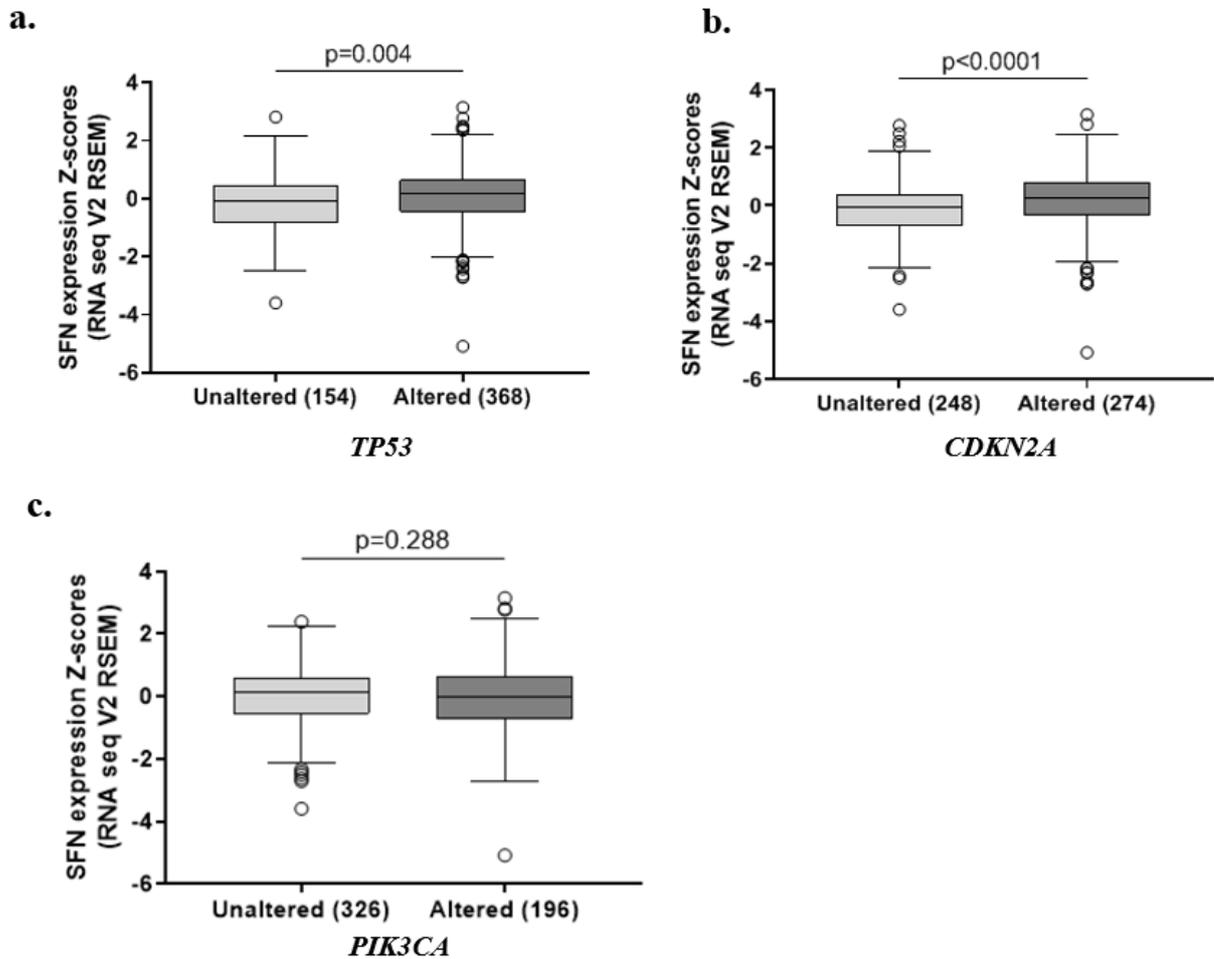


Figura 10 - Perfil de expressão de *Stratifin* em razão de mutação em *TP53*, *CDKN2A* e *PIK3CA*: a. Expressão da *Stratifin* é menor em tumores sem alteração em *TP53*; b. Expressão de *Stratifin* é menor em tumores sem alteração em *CDKN2A*. c. Expressão de *Stratifin* com relação à mutação em *PIK3CA* não mostra significância estatística.

Outra variável que apresentou significância estatística foi com relação ao sexo, mostrando uma expressão maior de *Stratifin* em pacientes do sexo feminino, reforçando que a maior parte desses tumores não tem a infecção por HPV como fator etiológico (figura 11 a.). E por último, a expressão de *Stratifin* por grau histológico, onde se verifica uma redução gradual da expressão quanto maior o grau tumoral. Isso pode ser interpretado como uma maior capacidade de disseminação já que *Stratifin* está relacionado com processos de diferenciação celular, isso é, quanto mais *Stratifin*, mais diferenciado o tumor (figura 11 b.).

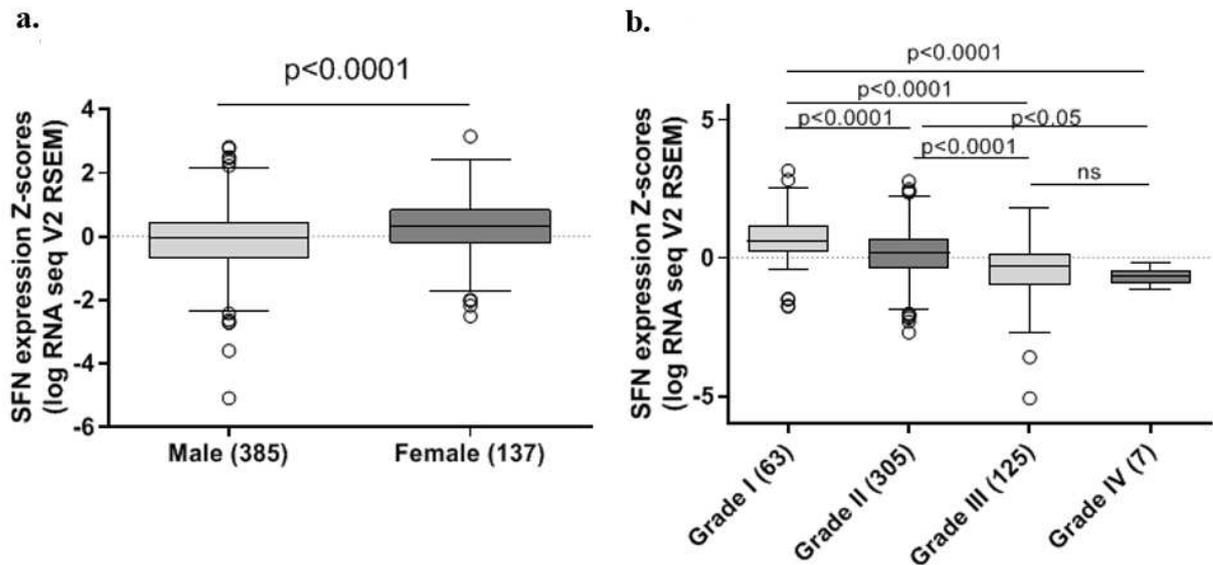


Figura 11 - Expressão de Stratifin por sexo e grau tumoral: a. Expressão menor de *Stratifin* em pacientes do sexo feminino; b. A expressão de *Stratifin* diminui quanto maior o grau tumoral.

4.2. *Stratifin* está expressa nas diferentes linhagens celulares para o estudo de CCECP

A primeira etapa da caracterização molecular da expressão de *Stratifin* em nível transcricional foi a verificação da pureza do RNA, inferida pelas razões de densidade ópticas 260/280 e 260/230 (nm) geradas pelo *Nanodrop2000*®, além da qualidade inferida pelo RIN ≥ 7 do *TapeStation2100*® (figura 12 a. e b.).

a.

Linhagem Celular	Quantificação	260/280	260/230	Qualidade RNA
OKF-TERT1	905 ng/ μ L	2,09	2,04	RIN: 8,40
SCC 78	1200 ng/ μ L	2,10	2,08	RIN: 9,10
SCC 143	517 ng/ μ L	2,07	1,91	RIN: 8,60
SCC 154	246 ng/ μ L	2,14	1,82	RIN: 7
MDA-MB435S	1167 ng/ μ L	2,10	2,07	RIN: 8,30
MCF7	459 ng/ μ L	2,10	1,90	RIN: 8,30

b.

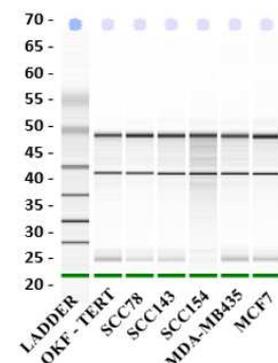


Figura 12 - Pureza e qualidade do RNA: a. Tabela relacionando as diferentes linhagens celulares com suas respectivas quantificações, razões de densidade óptica 260/280 e 260/230 através do *Nanodrop2000*®; qualidade do RNA inferida pelo *TapeStation2100*® através do RIN (*RNA integrity number*); b. Eletroferograma gerado pelo *TapeStation2100*® que se baseia em eletroforese capilar e verifica de forma bastante precisa a qualidade do RNA não somente pela razão das subunidades ribossomais 28S e 18S mas pela amostra como um todo. Para RT-qPCR são considerados adequados valores de RIN ≥ 7 com relação à robustez e reprodutibilidade dos dados segundo Pazzagli et al., 2013.

A padronização dos experimentos incluiu especificidade dos *primers*, inferido através do pico único na curva de *melting* seguida de eletroforese em gel de agarose dos produtos da

RT-qPCR, que apresenta também uma banda única e específica na altura de 132 pares de bases, o tamanho previsto do *amplicon* (figura 13 a. e b.). Adicionalmente, foi elaborada uma curva padrão para verificar a eficiência da reação e escolha do(s) gene(s) de referência (figura 13 c. e d.) conforme mencionado em 3.2.3. O ponto de maior massa da curva padrão contém 100 ng de DNA, ou seja, aproximadamente 30 000 cópias de *Stratifin*. Dessa forma foi possível determinar uma eficiência de ~102% e um coeficiente de correlação próximo de 1. Além da padronização utilizando primers para *Stratifin*, foram realizadas curvas para os demais genes de referência (dados não mostrados).

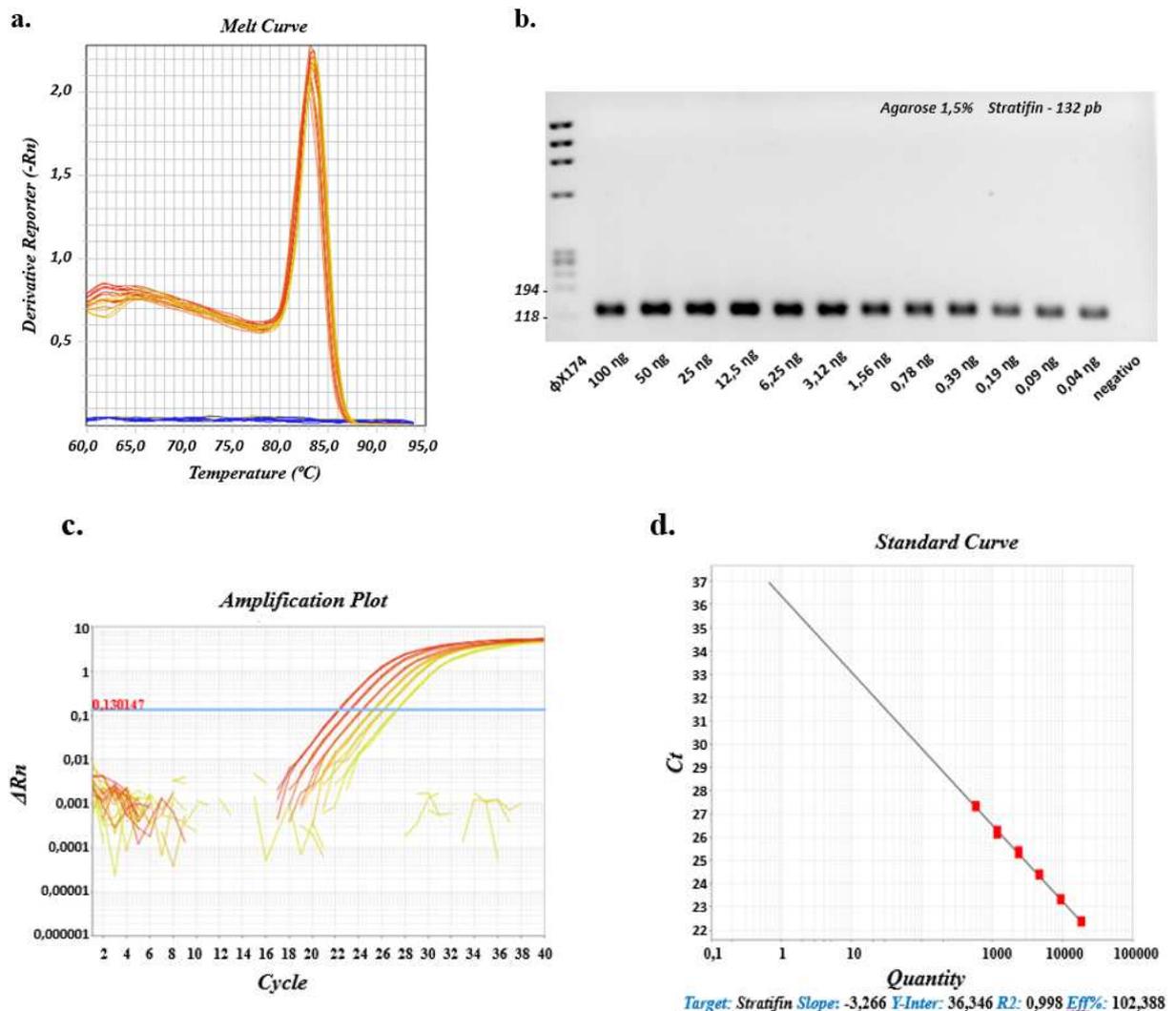


Figura 13- Padronização dos ensaios de RT-qPCR para caracterização da *Stratifin*: a. Curva de Melting da amplificação com 200nm de primers para *Stratifin* mostra um pico único e específico; b. Corrida eletroforética com diferentes massas de DNA extraído de OKF-hTERT1, para verificar especificidade de amplificação inferida pela banda única de 132 pb; c. Amplificação da curva padrão construída com as seis maiores massas de DNA indicadas em b. (100 – 3,125 ng); e d. Cálculos de eficiência baseados no coeficiente de correlação e slope para amplificação de *Stratifin*.

A elaboração da curva padrão, com diluições limitantes de DNA permitiu ainda a determinação de dois parâmetros importantes para ensaios quantitativos: os limites de detecção (*LOD*) e quantificação (*LOQ*). O primeiro se refere à menor concentração do gene alvo que permite a detecção em 50% das amostras, enquanto que o segundo se refere à menor quantidade que permite determinar a quantidade do alvo com acurácia e reprodutibilidade. Como resultado foi observado que a sensibilidade do método permite captar o sinal de 1 única cópia do gene (limite de detecção) e um mínimo de 30 cópias do gene para o limite de quantificação.

A partir da padronização com os respectivos controles, qualidade do RNA verificada e gene de referência selecionado, foi possível verificar a expressão de *Stratifin* no painel proposto para o projeto. Nenhuma análise estatística foi realizada para esta etapa já que nesse momento o papel da *Stratifin* nessas linhagens celulares é desconhecido (figura 14 c.). A partir dos extratos celulares também foi possível verificar a expressão em nível proteico que corrobora os dados de expressão em nível transcricional (Figura 14 a. e b.). Embora tenham sido encontrados 3 genes de referência adequados, os quais tem eficiências parecidas e variação entre os *Cts* das diferentes linhagens não variando mais do que 1,5, o gene endógeno *GAPDH* foi selecionado.

O painel celular proposto para este projeto contempla as características moleculares mais frequentemente encontradas em CCECP (Tabela 2). A mutação em *TP53*, a mais frequente entre elas, está presente na linhagem SCC78 que também apresenta uma amplificação no *locus* 11q13 conforme já caracterizado por White *et al.*, 2007. Essa linhagem é proveniente de uma lesão recorrente de um paciente de 60 anos de idade, do sexo masculino, branco, com histórico familiar de câncer, etilista, porém não refere o uso de tabaco. A lesão foi classificada com grau histológico 2, estadiamento T2N0, negativa para HPV e oriunda do assoalho da boca. Embora trabalhos recentes que utilizaram dados de sequenciamento de última geração apontem uma frequência de 75-85% de mutação em *TP53* em CCECP HPV negativos (revisado por Zhou; Liu; Myers, 2016), foi incluído nesse estudo, a contraparte *TP53WT* representada pela linhagem SCC143. A linhagem SCC78, que foi utilizada para o *biopanning* (*Phage Display*), é a linhagem que apresenta os maiores níveis de *Stratifin* tanto em nível transcricional quanto em nível proteico.

A linhagem SCC143 também oriunda de assoalho de boca recorrente, proveniente de uma paciente do sexo feminino, branca, 76 anos, tabagista, sem histórico familiar de câncer nem consumo de bebidas alcoólicas. A lesão foi classificada com grau histológico 3, estadiamento T4N2, HPV negativa e sem amplificação no *locus* 11q13 (White *et al.*, 2007).

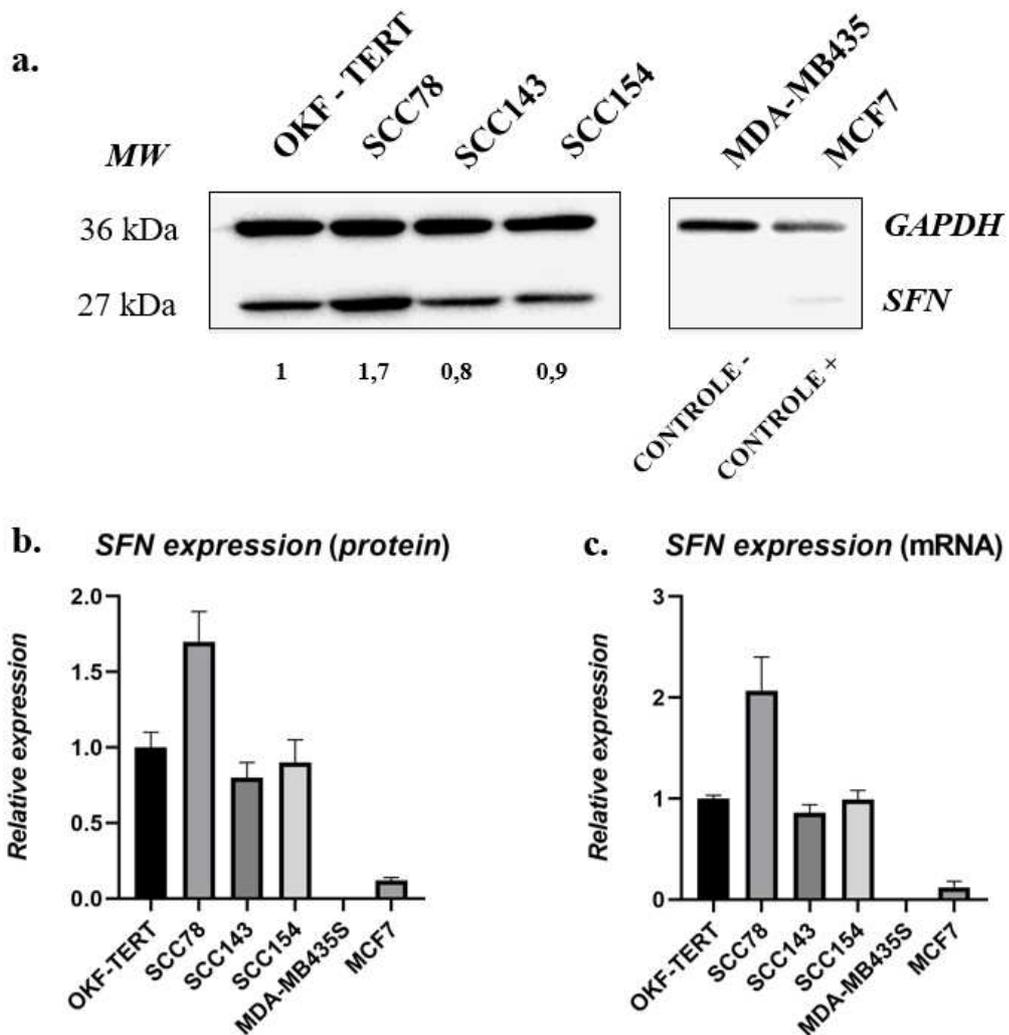


Figura 14 Caracterização Molecular de *Stratifin* das linhagens celulares OKF-hTERT (queratinócitos orais não transformados e imortalizados), SCC78 (CCECP: TP53mut, ampl 11q13, HPV-), SCC143(TP53WT, HPV-), SCC154 (TP53WT, HPV+), MDA-MB435S (controle negativo) e MCF7 (controle positivo): a. Western Blot (imagem representativa) utilizando 50 μ g de proteína e *GAPDH* como gene de referência; b. Expressão relativa de *Stratifin* das linhagens tumorais com relação à linhagem OKF-hTERT em nível proteico; c. Expressão relativa de *Stratifin* das linhagens tumorais com relação à linhagem OKF-hTERT em nível transcricional (mRNA).

Tabela 2 - Principais características clínicas e moleculares do painel de células CCECP:

Linhagem	Status <i>TP53</i>	Ampl. 11q13	Status HPV	Estadiamento	Álcool/Tabaco	Histórico Familiar
SCC78	Mutado	presente	negativo	T2N0	Álcool	Sim
SCC143	WT	ausente	negativo	T4N2	Tabagista	Não
SCC154	WT	ausente	positivo	T4N2	Álcool/Tabaco	Não

Uma importante característica molecular desses tipos tumorais e um dos escopos das análises desse projeto é a positividade para o HPV e, dessa forma, a linhagem SCC154 foi incluída. SCC154 é proveniente de um paciente do sexo masculino, 54 anos de idade, branco, sem histórico familiar de câncer, porém tabagista e etilista. A lesão primária de língua foi classificada histologicamente como grau 3, estadiamento T4N2, HPV positivo e sem amplificação no locus 11q13 (White *et al.*, 2007). Digno de nota, podemos ressaltar a diferença de expressão entre a linhagem HPV positiva SCC154 com uma expressão menor de *Stratifin* com relação à linhagem HPV negativa SCC78, corroborando os dados da análise *in silico* (figuras 14 a. b. e c.; 9 a. e b.).

Como a expressão de *Stratifin* em CCECP pouco havia sido reportada na literatura e não havia nenhuma experiência prévia sobre esse gene no nosso grupo de pesquisa, foram incluídas as linhagens celulares MDA-MB435S (metastática de melanoma) e MCF7 (carcinoma mamário) como controles negativo e positivo respectivamente, conforme Ferguson *et al.*, 2000. Embora a expressão de *Stratifin* em MCF7 é bastante baixa quando comparado ao modelo de CCECP, foi um importante parâmetro já que alguns trabalhos trazem esse gene como supressor tumoral (geralmente baixa expressão) e em outros como um oncogene (geralmente alta expressão) (Li; Liu; Zhang, 2009) (figura 14 a., b. e c). Essas linhagens controle foram úteis principalmente com relação ao controle negativo, de modo que não serão mais utilizadas no decorrer desse projeto.

A linhagem OKF-hTERT1 é uma linhagem de queratinocitos orais não transformados, imortalizados por *hTERT* e foi utilizada no processo de clarificação da biblioteca de fagos (etapa anterior a esse projeto conforme descrito na introdução). Embora essa linhagem também expresse *Stratifin*, não é possível determinar a compartimentalização celular, expressão na superfície celular junto às moléculas de MHC ou outra variável que tenha favorecido a especificidade do bacteriófago à célula tumoral em detrimento da célula não transformada.

Nesse projeto, porém, será utilizada apenas para a caracterização molecular da expressão de *Stratifin*.

4.3. Caracterização dos nocautes para *Stratifin*

Uma vez constatado que todas as linhagens celulares expressam *Stratifin* e, de modo a explorar funcionalmente sua atividade nas linhagens de CCECP, seguimos com a modulação da sua expressão através do nocaute gênico (sua total eliminação da célula) e ativação gênica (aumento da sua expressão). Conforme descrito detalhadamente em 3.4.1., dois *sgRNAs* foram

utilizados para o nocaute de *Stratifin*, entretanto apenas um deles foi efetivo para a obtenção de clones nocauteados. Embora os algoritmos de predição da edição gênica tenham sido melhorados, ainda não é possível determinar com precisão o desfecho de cada evento.

Conforme detalhado em 3.4.7. os extratos celulares foram submetidos a ensaios de *Western Blot* para verificar quais clones tinham sido possivelmente editados e a expressão de *Stratifin* abolida (figura 15 a.). Os clones que não apresentaram expressão de *Stratifin* foram sequenciados para verificação da resolução de cada um dos alelos em nível genômico. Dois clones de nocaute de cada uma das linhagens celulares foram selecionados para o seguimento dos ensaios funcionais (figura 15 a. e f.).

Modificações pelo sistema CRISPR devem ser bem caracterizadas de modo a explorar a possibilidade de *offtargets*, quando houver. Conforme descrito na metodologia, não houve necessidade de testar possíveis *offtargets* pelo número de *mismatches* entre o *guide* e um possível *offtarget*. Além disso outras isoformas da família da *Stratifin* não compartilham a mesma sequência genômica ou mesmo proximidade gênica. A utilização de estratégias de transfecção, que normalmente são processos transitórios, também reduz a possibilidade de *offtargets*. Entretanto, decidimos explorar dois clones de nocaute para cada uma das linhagens celulares, isso porque mesmo dentro de uma mesma linhagem celular, podem existir diferenças fenotípicas entre as células que poderiam favorecer o estabelecimento do nocaute.

De acordo com os resultados de sequenciamento, pode se observar que nos clones de nocaute escolhidos, a maior parte da resolução dos alelos gerou um *stop códon* precoce com deleção de apenas alguns nucleotídeos. Observou-se também que a eficiência do nocaute foi proporcional à cinética de crescimento das linhagens celulares de modo que dos 10 clones obtidos para SCC78, que tem uma cinética maior que SCC154, mas inferior à SCC143, apenas 5 deles tiveram a *Stratifin* nocauteada. De 8 clones da SCC154, observou-se o nocaute apenas em 3 ao passo que todos os 10 clones da SCC143 apresentaram nocaute de *Stratifin* (dados não mostrados). Para cada clone nocauteado foram realizados 10 sequenciamentos de modo a contemplar com redundância os dois alelos da *Stratifin*.

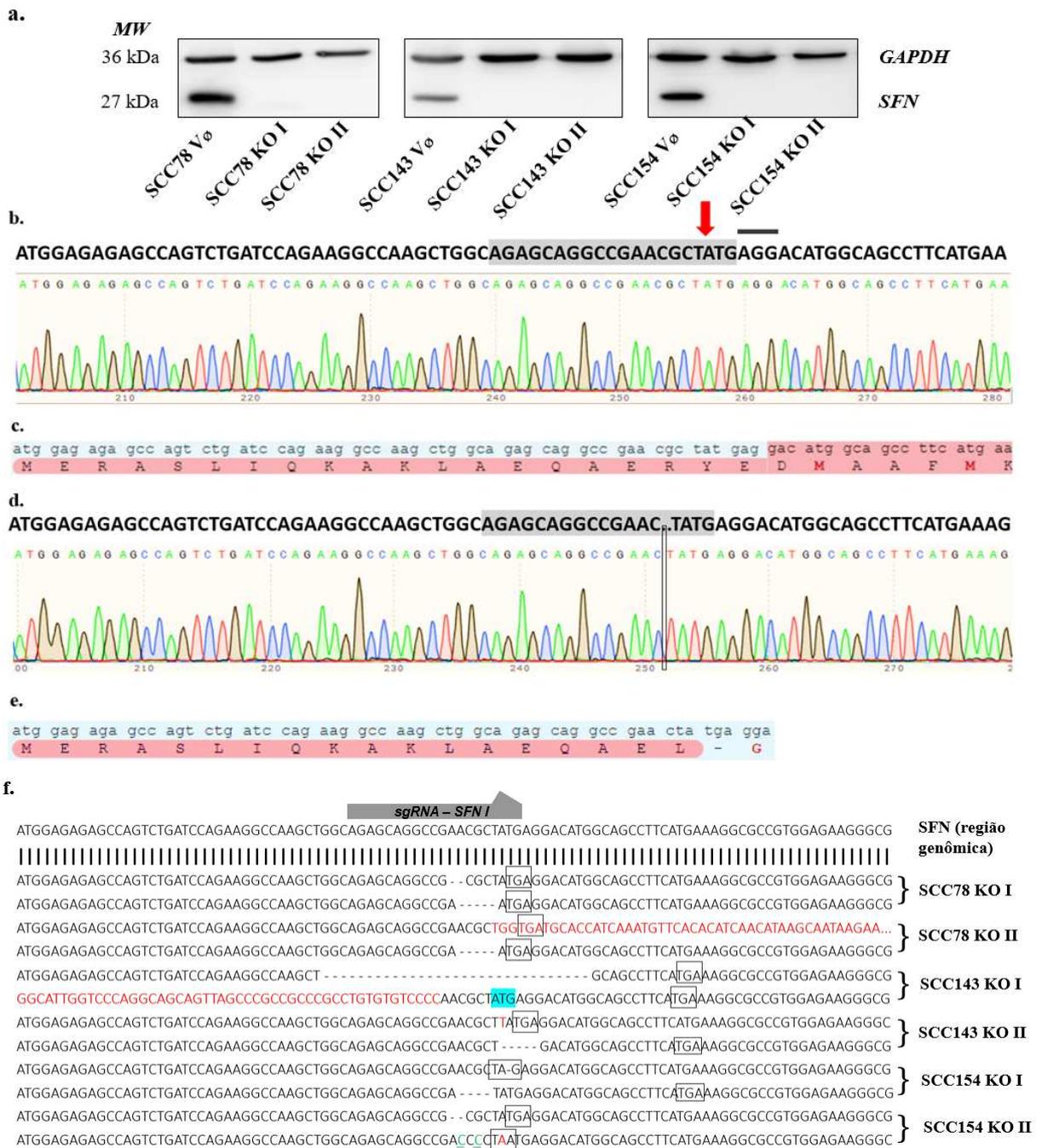


Figura 15 Caracterização e validação do nocaute gênico - a. Western Blot realizado com dois clones de cada uma das linhagens e seus respectivos controles positivos; b. Eletroferograma representando parte da sequência obtida por meio de sequenciamento dos fragmentos inseridos no vetor pCRTM4-TOPO® a partir do primer *upstream* à região alvo da Cas9. Acima do eletroferograma, uma seta vermelha indica o local previsto para a quebra de dupla fita pela Cas9 dentro da região do *guide* (em cinza), e que precede a sequência PAM (abaixo do traço preto); c. Sequência genômica da região representada em b. com os respectivos aminoácidos para cada códon; d. Eletroferograma representativo de um dos clones nocauteados mostrando a deleção de dois nucleotídeos indicado pelos pontos na sequência genômica; e. Sequência genômica com *Stop Códon* gerado pela deleção de dois nucleotídeos; f. Resolução de cada um dos alelos de cada um dos clones selecionados para caracterização. Os retângulos representam os *stop códon* gerados pelos *indels* e que levam a parada precoce da tradução da *Stratifin*; no alelo 1 da SCC78 KO II observa-se a inserção de uma sequência nucleotídica aleatória *downstream* à região alvo do *guide*; no alelo 2 da SCC143 KO I, a resolução levou à perda da região genômica que contempla o códon de início da tradução e a região em vermelha faz parte da região 5'-UTR do gene da Stratifin. Destaca-se no retângulo azul o primeiro códon de iniciação após a edição gênica que está *upstream* em apenas 8 códon até um códon de terminação.

4.4. Ativação de *Stratifin* pelo sistema CRISPR/Cas9 (SAM/Cas9)

Para essa etapa não há necessidade de seleção de clones, já que o sistema promove o aumento da expressão do gene no *pool* de células selecionadas por cada um dos antibióticos. Para a seleção foram determinadas as doses de morte para Blastomicina, Higromicina e Zeocina em cada uma das linhagens celulares (SCC78, SCC143 e SCC154), conforme descrito em 3.4.5. e após seleção foram extraídos RNA e proteína para validar se houve o aumento da expressão através de ensaios de *RT-qPCR* e *Western Blot* (figura 16).

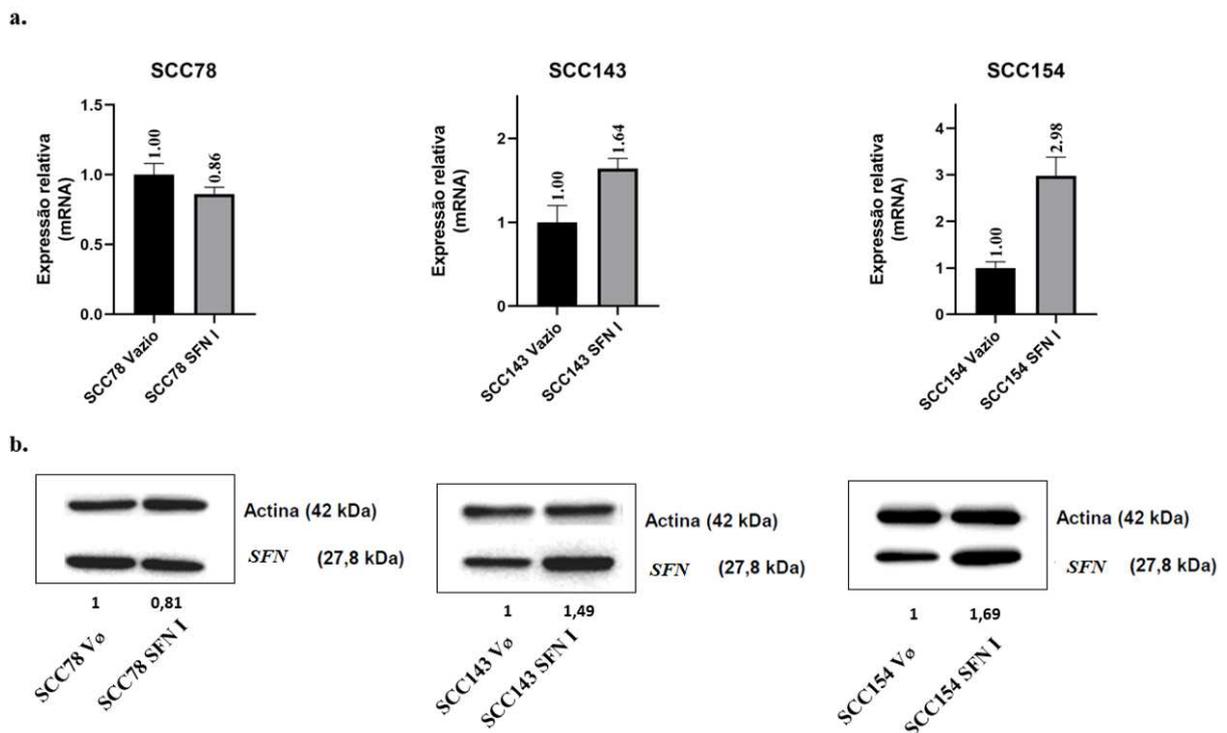


Figura 16 - **Expressão de *Stratifin* em nível transcricional e proteico antes e após ativação pelo sistema SAM-Cas9:** a. Expressão gênica em nível transcricional (RT-qPCR) das linhagem SCC78, SCC143 e SCC154 com o vetor vazio na barra da esquerda e com o *sgRNA* para *Stratifin* à direita; b. Western Blot corroborando o resultado da RT-qPCR mostrando o aumento da expressão em nível proteico nas respectivas linhagens (exceto na SCC78).

Conforme observado nos ensaios de RT-qPCR, verifica-se o aumento da expressão em nível transcricional em ~65% para SCC143 e ~300% para SCC154, porém não são observados os mesmos aumentos para SCC78. Ao invés disso parece ter havido uma redução da expressão tanto em nível transcricional quanto em nível proteico (figura 16 a. e b. SCC78). Embora os aumentos para as duas primeiras linhagens não tenham sido tão robustos, devemos considerar que a hipótese principal desse projeto é que já existe um aumento constitutivo na expressão de *Stratifin* nessas linhagens. Uma possível explicação para a redução na expressão para SCC78

seria que a ligação do complexo *SAM-Cas9* na região promotora do gene deslocaria por interferência estérica os fatores de transcrição endógenos resultando em uma competição com os fatores de transcrição sintéticos.

4.5. A *Stratifin* parece conter a proliferação celular em duas linhagens de CCECP

A partir dos testes realizados durante a padronização, verificou-se a densidade celular ótima para análise de proliferação das três linhagens celulares. Dessa forma, foram semeadas 3×10^4 células por poço para SCC78, 10^4 para SCC143 e 4×10^4 para SCC154 dois dias antes do início da contagem e cultivadas em estufa com 5% de CO_2 a 37°C .

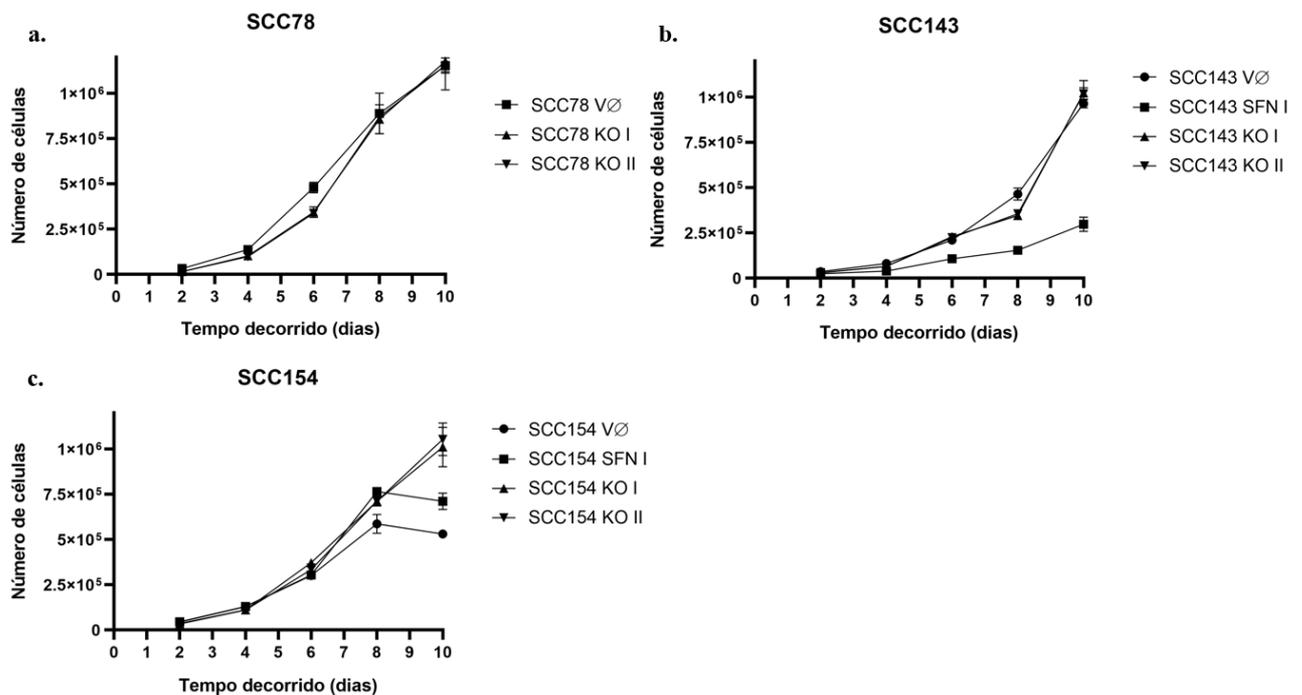


Figura 17 - Curvas de proliferação celular de SCC78, SCC143 e SCC154: a. Perfil de proliferação celular de SCC78 não mostrando diferença entre os clones de nocaute com a linhagem parental; b. A linhagem SCC143 superexpressando *Stratifin* mostra uma redução clara na taxa de proliferação com relação à célula parental e os clones de nocaute; c. A linhagem SCC154 apresenta uma redução na taxa de proliferação na linhagem parental e na linhagem com superexpressão de *Stratifin*, ao passo que os clones de nocaute não reduziram a taxa proliferativa.

Diferentemente do observado em SCC78, SCC143 expressa *Stratifin* de modo bastante parecido com o epitélio não transformado (conforme verificado na figura 14), entretanto o seu principal indutor *TP53* não está mutado nesta linhagem celular. Isso pode ser uma possível explicação de que a superexpressão de *Stratifin* reduziu a proliferação nessa linhagem celular (figura 17 b.). Embora a sinalização celular do processo de proliferação envolva diferentes vias,

uma das principais vias relacionadas com a parada do ciclo celular e/ou apoptose é mediada por p53. Nesse processo, p53 induz *Stratifin* que em um feedback positivo o estabiliza através da degradação proteossômica de Mdm2. Adicionalmente *Stratifin* é capaz de interagir diretamente com tetrâmeros de p53 aumentando sua afinidade por sítios cognatos de ligação ao DNA (Yang *et al.*, 2003). Isso culminaria na indução de potentes inibidores dos complexos ciclina-CDK como p21 além da indução de proteínas antiproliferativas como BTG2 (Benson *et al.*, 2019; Mao *et al.*, 2018). Mesmo que a superexpressão de *Stratifin* observado em SCC143 SFN I não tenha sido tão expressivo, algumas proteínas são altamente controladas de modo que sua expressão aumentada, mas não sua expressão basal, é responsável por uma grande mudança fenotípica.

Considerando que *Stratifin* já foi descrita como uma proteína supressora tumoral em outros modelos de câncer, sua expressão regulada positivamente deveria resultar em algum desfecho favorável no âmbito de algum dos seus processos regulatórios. Uma vez que *Stratifin* aparece como uma proteína chave em diversas vias celulares, mesmo que a hipótese principal desse projeto proponha que ela atue predominantemente como uma proteína oncogênica, não se pode esperar que ela tenha um impacto como tal em todos os processos em que está envolvida.

Um fenômeno parecido foi observado na linhagem SCC154 com a diferença que a célula não modificada por CRISPR, utilizada como controle (VØ), também apresentou uma redução na proliferação celular associada com morte celular evidente, já que há uma diminuição no número total de células no décimo dia de contagem (figura 17 c.). Nesse caso, *Stratifin* parece exercer um papel no controle da proliferação, mantendo alguma característica antitumorigênica nesse processo. Embora a degradação de p53 por *E6* de HPV16 reduza significativamente seus níveis, a expressão de *Stratifin* induzida por outra via (BRCA1, por exemplo), ao se ligar a p53 poderia deslocar a interação com *E6-E6AP* promovendo uma estabilidade parcial capaz de exercer uma atividade antiproliferativa. Digno de nota, a linhagem SCC154 tem uma cinética de crescimento bastante lenta quando comparada às demais e, além disso, exige uma alta dependência de uma densidade mínima para que haja uma proliferação adequada. Por outro lado, quando chega à confluência, as células começam a perder sua aderência à placa de forma irreversível.

A capacidade proliferativa inferida através de curvas de crescimento é um parâmetro bastante valioso quando se estuda vias de sinalização no contexto neoplásico. A inibição por contato é um importante mecanismo anticâncer que é perdido no processo tumorigênico. Em células normais, a parada do crescimento é mediada por uma sinalização de proteínas de

membrana que promovem a parada do ciclo celular em G1 através da expressão e acúmulo de p27, que por sua vez inibe o complexo ciclina E - CDK2 (Leontieva *et al.*, 2014, Mendonsa *et al.*, 2018). Entretanto, o processo inicial da inibição por contato requer a integridade das vias apoptóticas e de promoção da senescência mediadas principalmente por p53 e p16, e que normalmente encontram-se defectivas em CCECP (Serrano *et al.*, 1997, Seluanov *et al.*, 2009).

De acordo com as curvas de crescimento observadas em dois dos modelos celulares estudados, a expressão/superexpressão de *Stratifin* parece conter a proliferação ao passo que não se observa uma redução da taxa de proliferação nos respectivos nocautes das três linhagens celulares (figura 17 a. b. e c.). Dessa forma, *Stratifin* não parece exercer um papel de promoção da proliferação no modelo celular deste projeto, porém, vale lembrar que essas linhagens celulares são de tumores já estabelecidos e não refletem necessariamente o papel dessa proteína no início do estabelecimento tumoral.

Além disso, uma via indireta no controle da sobrevivência e proliferação mediado por *Stratifin*, ocorre através da inativação de AKT que, quando ativado, promove a proliferação principalmente através da inibição da degradação da ciclina D e inibição da expressão e importação nuclear de p27 (Liang; Slingerlan, 2004; Yang *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2021). Adicionalmente, Ling *et al.*, 2010 reportaram que a deleção de *Stratifin* aumentou a capacidade proliferativa em células epiteliais mamárias.

No caso da linhagem SCC78 que tem uma mutação em *TP53*, não se observa nenhuma alteração na taxa de proliferação entre o vetor vazio e os dois clones de nocaute para *Stratifin* (figura 17a). Considerando a complexidade conhecida dos mecanismos que regulam o ciclo celular e a regulação positiva na proliferação gerada por consecutivas adaptações impostas pelo processo tumorigênico, SCC78 apresenta uma amplificação em 11q13 que contém o locus gênico da *CCND1* e codifica a ciclina D. Por sua vez, o estímulo de entrada permanente no ciclo celular causado pela superexpressão da ciclina D em conjunto com a atividade alterada de p53 parece sobrepor qualquer contra regulação imposta por outra via.

No estabelecimento das curvas de proliferação, a padronização levou em consideração a peculiaridade de cada uma dessas linhagens celulares com relação às condições mínimas para que fossem observados os estágios característicos de curvas de proliferação. Dessa forma, a densidade celular foi determinada pela observação do número de células plaqueadas que chegassem à confluência em 9 dias.

4.6. *Stratifin* promove resistência à agentes genotóxicos em linhagens com alterações em *TP53* seja por mutação ou degradação promovida por HR-HPV

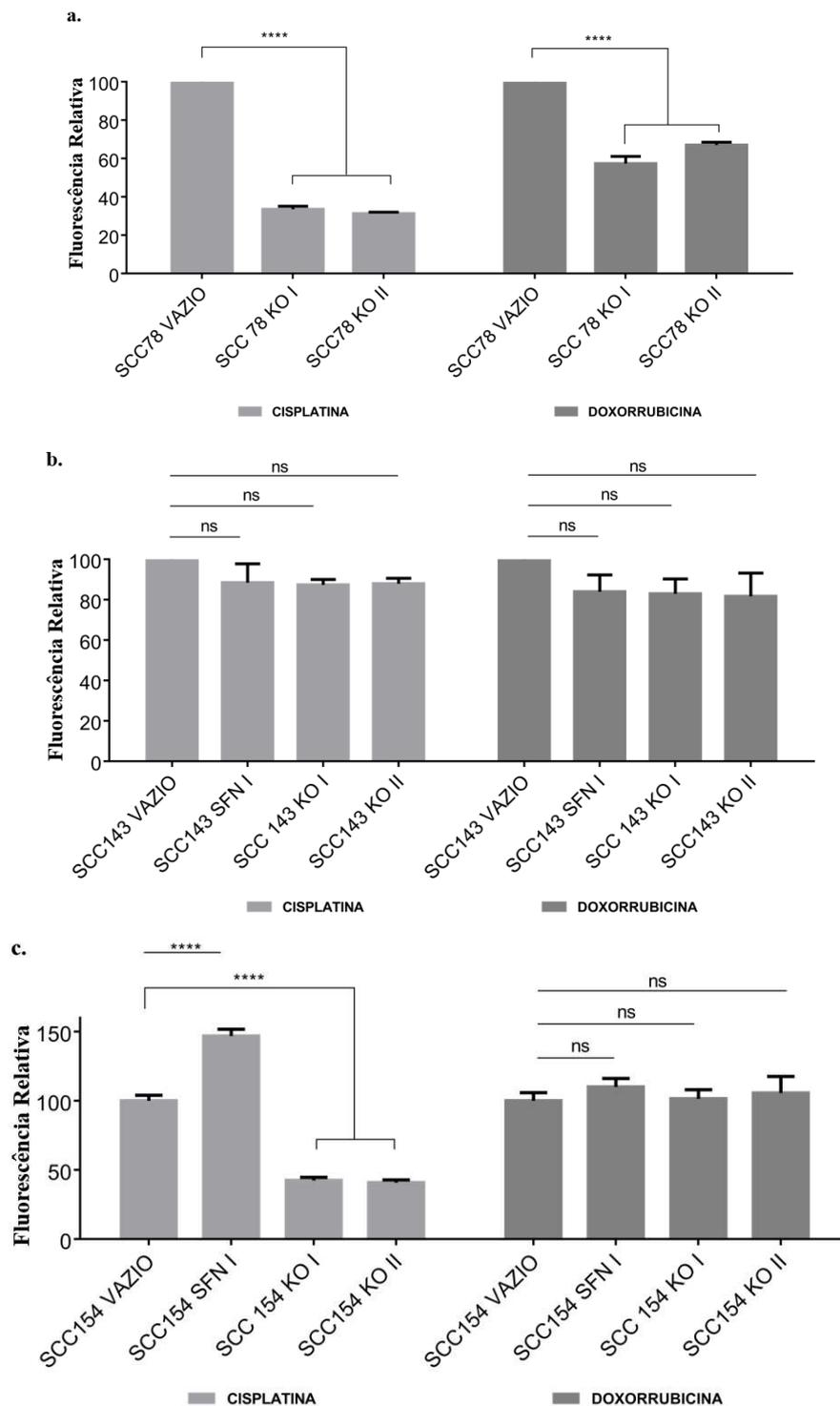


Figura 18 - **Viabilidade celular após administração de Cisplatina e Doxorubicina:** A. Redução da viabilidade observada em SCC78 nocauteadas para *Stratifin* tanto para cisplatina quanto pra doxorubicina; B. Redução da viabilidade para SCC154 nocauteada para *Stratifin* apenas para cisplatina e aumento da viabilidade da linhagem com expressão aumentada de *Stratifin*; C. Leve redução (sem significância estatística) da viabilidade observada para SCC143 tanto das linhagens nocauteadas quanto com o aumento de expressão de *Stratifin* para ambos os quimioterápicos (**** $p \leq 0,0005$; ns= sem significância).

Após determinação do IC₅₀ (dose requerida para inibir 50% do crescimento em 72h) de cada um dos fármacos, foi possível confirmar uma redução na viabilidade à pelo menos um dos quimioterápicos utilizados nas linhagens SCC78 e SCC154 nocauteadas para *Stratifin*. Em SCC78, cuja expressão da *Stratifin* é bastante elevada com relação às demais linhagens, houve uma redução em mais de 60% da viabilidade quando consideramos a administração de cisplatina (18 a. histogramas da esquerda).

A Cisplatina é um dos principais quimioterápicos utilizados no tratamento de CCECP, seu mecanismo de ação é baseado na habilidade desse fármaco em formar adutos de DNA através de purinas que leva ao recrutamento de diversas vias de reparo de DNA resultando em apoptose (revisado por Gosh, 2019). Dessa forma, o papel da *Stratifin* em SCC78 parece atuar como um fator de resistência à apoptose. Isso pode ser ainda mais bem ilustrado em SCC154, que embora tenha uma expressão de *Stratifin* menor do que a linhagem SCC78, houve uma redução parecida na viabilidade. Adicionalmente, SCC154 com a expressão aumentada de *Stratifin* mostrou um aumento expressivo na viabilidade após administração do fármaco (figura 18 c., histogramas da esquerda).

Com relação à SCC143, não foi observado um aumento da viabilidade por nenhum dos dois fármacos utilizados, entretanto, parece ter uma tendência em sua redução de viabilidade tanto nas células expressando *Stratifin* quanto nos respectivos clones nocauteados. Dessa forma podemos concluir que na linhagem que p53 encontra-se em sua forma selvagem, a *Stratifin* parece exercer um papel menos importante na resistência ao tratamento com quimioterápicos.

É bastante evidenciado na literatura que *Stratifin* tem sido relacionada com o processo tumorigênico, seja como supressora tumoral, seja como oncogene. Nesse projeto, a hipótese é que se ela possa ter um papel predominantemente oncogênico já que apresenta uma expressão aumentada nesse conjunto tumoral com relação ao epitélio não transformado, conforme observado em dados do TCGA e corroborado na linhagem SCC78.

Uma variável favorável no tratamento de CCECP, que foi reportada *in vitro*, demonstrada na prática clínica e corroborada nesse projeto é que a expressão reduzida de ciclina D se relaciona com a melhora da resposta à cisplatina (Yip *et al.*, 2006, revisado por Johnson *et al.*, 2020). Isto explicaria em parte a tendência na redução da viabilidade dos nocautes de SCC143 e uma possível adjuvância nas linhagens SCC78 e SCC154, já que a expressão de *CCND1* (que codifica a ciclina D) foi reduzida significativamente nos clones nocauteados das três linhagens analisadas. Por outro lado, verificamos um aumento na expressão de *CCND1* nas respectivas linhagens superexpressando *Stratifin* (figura 19).

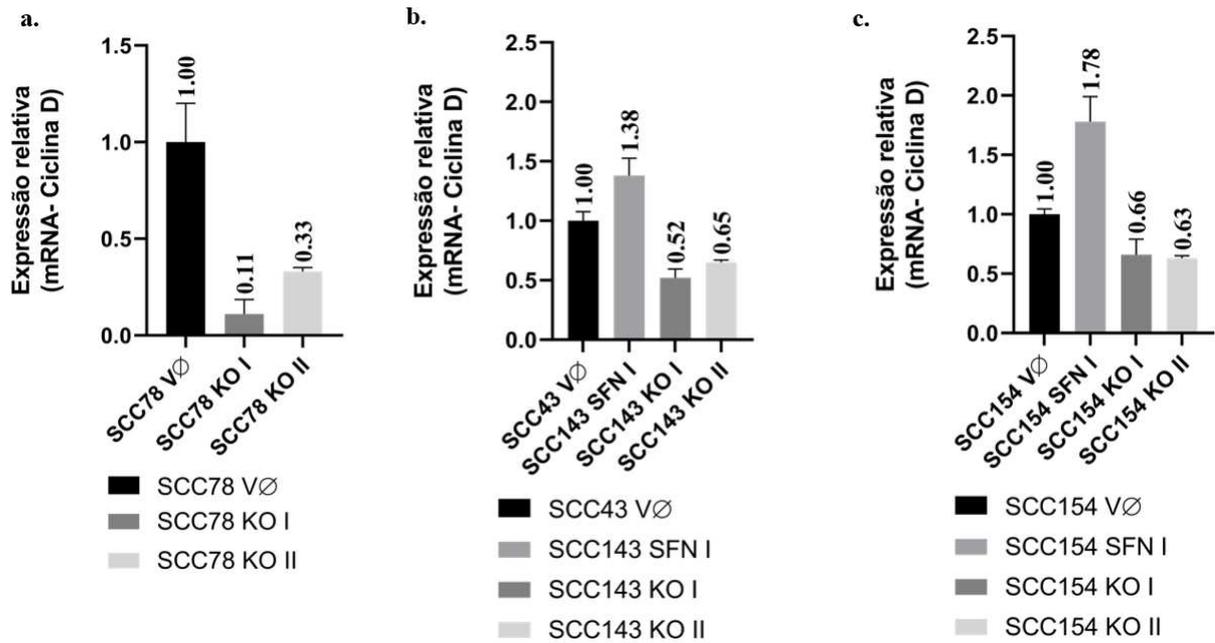


Figura 19 - Expressão em nível transcricional do gene *CCND1* que codifica ciclina D1: a. Redução em nível transcricional do gene *CCND1* nos dois clones de nocaute em SCC78; b. : a. Redução em nível transcricional do gene *CCND1* nos dois clones de nocaute em SCC143 e aumento da expressão na linhagem superexpressando; c. Redução em nível transcricional do gene *CCND1* nos dois clones de nocaute em SCC154 e aumento da expressão nas células superexpressando *Stratifin*. (Imagem representativa da expressão média de três experimentos independentes).

Enquanto a cisplatina é um fármaco amplamente utilizado no tratamento de tumores sólidos, a doxorrubicina é utilizada no tratamento de tumores de tecidos moles, sarcomas e leucemias. Dessa forma, a doxorrubicina não é um tratamento de primeira escolha para CCECP de forma que a utilização nesse projeto se deve a novas modalidades terapêuticas que tem doxorrubicina como uma alternativa para CCECP recorrentes e metastáticos (Jonhson-Arbor; Dubey, 2017). Além disso, a redução da toxicidade observada nas novas formas de apresentação desse fármaco são bastante surpreendentes (Damiani *et al.*, 2017). Dessa forma, e pela disponibilidade desse fármaco em nosso laboratório, a Doxorrubicina foi utilizada como um segundo mecanismo de agente genotóxico. O principal mecanismo de ação da doxorrubicina é a inibição da Topoisomerase II que resulta na inviabilidade da síntese de DNA e RNA, causando danos irreversíveis no DNA que levam à apoptose (Jonhson-Arbor; Dubey, 2017).

A resposta à administração de doxorrubicina em SCC78 foi menos pronunciada que com a cisplatina, com uma redução média da viabilidade em ~30% nas células nocauteadas para *Stratifin* (figura 19 a., histogramas da direita), ao passo que em SCC143 essa redução foi de apenas ~15% (figura 19 b., histogramas da direita). Digno de nota, essa redução sutil da viabilidade observada nas células SCC143 com a expressão aumentada ou nocauteada para

Stratifin foi parecida. Não foi observada redução na viabilidade das células SCC154 após administração da doxorrubicina (figura 19 c., histogramas à direita).

A partir desse resultado, podemos inferir que nessas linhagens celulares (com exceção à SCC78, que teve uma redução um pouco mais expressiva), os danos causados por doxorrubicina contemplam outras vias não relacionadas à *Stratifin*, de modo que sua participação nesse processo foi mais discreta quando comparado à cisplatina.

De acordo com a literatura, em outros modelos tumorais que apresentam uma expressão aumentada de *Stratifin*, sua atividade na resistência ao tratamento e pior prognóstico está baseado na sinalização pós dano no DNA. Nesse processo, *Stratifin* além de promover a parada no ciclo celular, se ligaria a fatores pró-apoptóticos sequestrando-os e, dessa forma, inibindo a suas atividades. Temesgem *et al.*, 2001 descreveu pela primeira vez sua atividade anti-apoptótica em um modelo de câncer de cólon sensível à danos no DNA que quando passou a expressar *Stratifin*, induzida por um adenovírus, recuperou um fenótipo resistente. A isso foi atribuído o sequestro de BAX, presente de forma abundante no citoplasma e ausente na mitocôndria quando se expressou a *Stratifin*, ao passo que o padrão contrário foi observado na ausência de sua expressão. De forma parecida, foi reportado no mesmo ano, a capacidade de interação e sequestro no citoplasma por *Stratifin* de outra proteína pró-apoptótica da família Bcl-2, BAD (Subramanian *et al.*, 2001). Além desse mecanismo, tem sido proposto que a ausência de *Stratifin* pós dano no DNA levaria a um fenômeno chamado de catástrofe mitótica que levaria a célula impreterivelmente à apoptose (Chan *et al.*, 1999; revisado por Li *et al.*, 2009).

Nesse contexto, observa-se uma crescente busca por moduladores da atividade de *Stratifin* como adjuvante na terapia combinada. Por um lado, busca-se um modulador positivo (estabilizador), em processos que *Stratifin* atuaria como uma proteína supressora tumoral, e por outro lado, um inibidor de interações com seus alvos, em processos que ela atuaria como uma oncoproteína. Inúmeras abordagens tem sido exploradas nesse sentido com um destaque para o *Phage-Display*, que além de apresentar alta especificidade e baixa toxicidade, tem um custo relativamente baixo (Stevers *et al.*, 2017; revisado por Aljabal; Yap, 2020).

4.7. O nocaute de *Stratifin* sensibilizou mais a linhagem com p53 mutado

A primeira etapa desse ensaio foi verificar a dose de radiação adequada para que pudéssemos inferir o papel da *Stratifin* na radiosensibilidade. Dessa forma, as doses que

reduziram em 30% a 40% a viabilidade para SCC78 e SCC154 foi de 3 Gy, enquanto para SCC143 foi de 4 Gy.

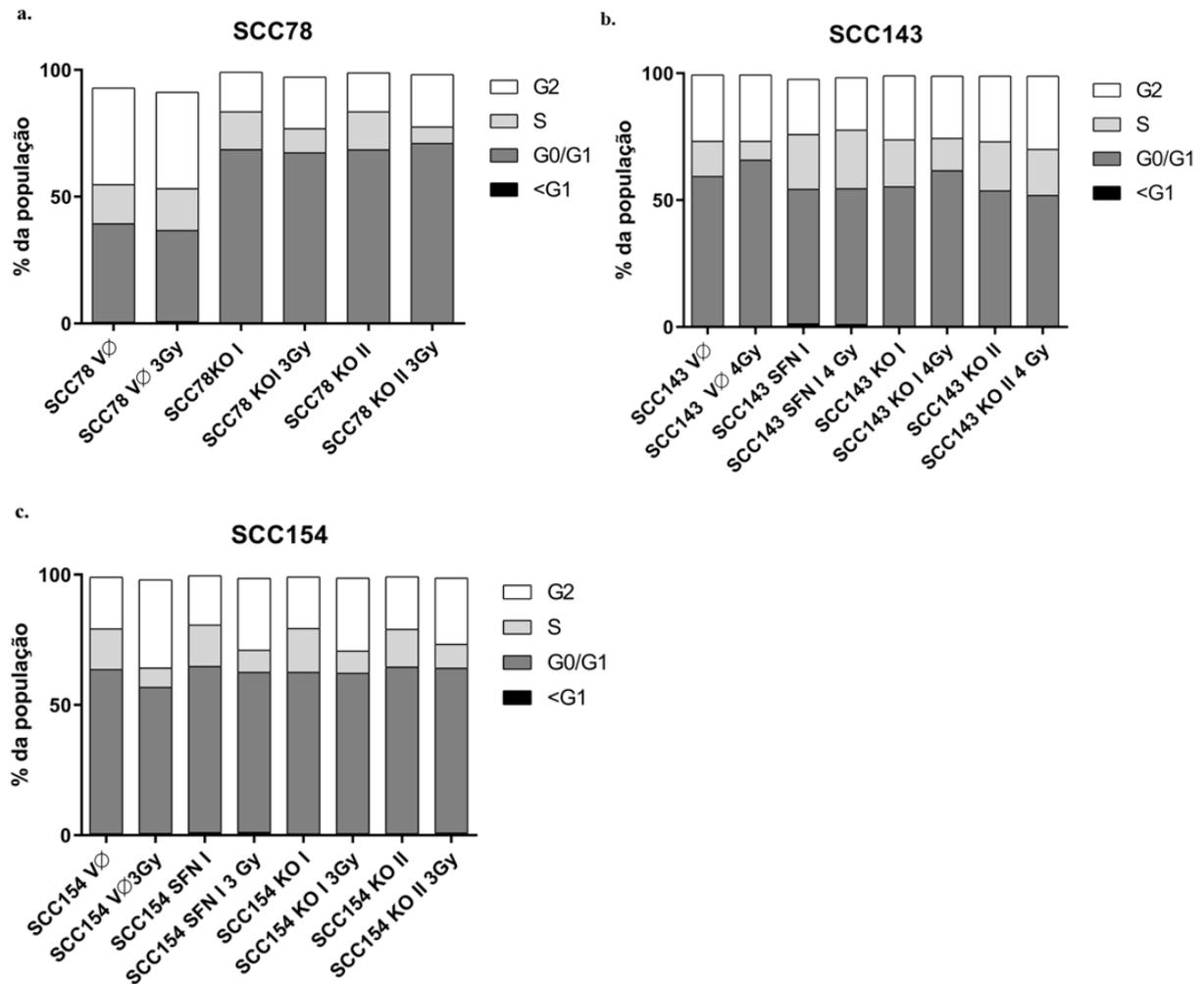


Figura 20 – Distribuição da população de células nas 3 fases do ciclo celular, inferido pelo conteúdo de DNA genômico corado com iodeto de propídio, antes e após irradiação ionizante: a. Distribuição das populações de células em G0/G1, S e G2 na linhagem SCC78 (SCC78VØ, SCC78 KO I e SCC78 KO II) e seus respectivos nocautes para *Stratifin* antes e após irradiação (SCC78VØ 3Gy, SCC78 KO I 3Gy e SCC78 KO II 3Gy); b. . Distribuição das populações de células em G0/G1, S e G2 na linhagem SCC143 e seus respectivos superexpressão/nocautes para *Stratifin* antes (SCC143VØ, SCC143 SFN I, SCC143 KO I e SCC143 KO II) e após irradiação (SCC143VØ 4 Gy, SCC143 SFN I 4Gy, SCC143 KO I 4Gy e SCC143 KO II 4Gy); c . Distribuição das populações de células em G0/G1, S e G2 na linhagem SCC78 e seus respectivos superexpressão/nocautes para *Stratifin* antes (SCC154 VØ, SCC154 SFN I, SCC154 KO I e SCC154 KO II) e após irradiação (SCC154VØ 3 Gy, SCC154 SFN I 3Gy, SCC154 KO I 3Gy e SCC154 KO II 3Gy).

Quando observamos a linhagem SCC78, verificamos que as linhagens nocaute para *Stratifin* - SCC78 KO I/ KO II - apresentam uma população maior de células em G0/G1 quando comparados à linhagem não modificada -SCC78 VØ- (67/70,6% vs 39,9%). A proporção das populações entre as linhagens nocaute irradiadas - SCC78 KO I 3Gy/ KO II 3Gy com relação à linhagem não modificada também irradiada – SCC78 VØ 3Gy - é mantida (68,4/68,1% vs 35,9%). Entretanto, verificamos um discreto aumento da população em S, quando se compara a linhagem não modificada após a irradiação – SCC78 VØ 3Gy - com relação à célula não modificada sem irradiar – SCC78 VØ - (figura 20 a.). Esse aumento na população de células na fase S (15,4% vs 16,5%) sem um aumento em G2 (38,1% vs 38%) e uma discreta diminuição na população G0/G1 (35,9% vs 38,9%) entre a células não modificadas irradiadas vs não modificadas e não irradiadas sugerem a ação da *Stratifin* na parada do ciclo celular em G2. Isso vem acompanhado do fato de que mesmo após a exposição da célula à radiação ionizante, parece não ter havido um aumento da população em G0/G1 após 24 horas.

Quando comparamos os clones nocaute irradiados - SCC78 KO I 3Gy/ KO II 3Gy - vs nocautes não irradiados - SCC78 KO I/ KO II - verificamos um conteúdo G0/G1 sem alteração (67/70,6% vs 68,4/68,1%) enquanto observa-se uma redução acentuada na população na fase S dos nocautes irradiados vs nocautes não irradiados (9,5/6,5% vs 14,9/15%). De forma contrária do que se observa nas linhagens não modificadas, a população G2 aumenta após a irradiação nos nocautes irradiados vs nocautes não irradiados (20,3/20,7% vs 15,3/15,4%). Nesse caso, após dano no DNA, na ausência de *Stratifin*, não há uma parada no ciclo celular em G2 confirmando dessa forma que sua atividade de bloqueio em G2 após dano no DNA é preservada nessa linhagem celular (figura 20 a.).

Com relação à linhagem SCC143, é possível verificar uma redução da população G0/G1 entre as células não modificadas - SCC143 VØ - vs as respectivas células superexpressando/nocauteadas para *Stratifin* – SCC143 SFN I/ KO I/ KO II (59,1% vs 53% vs 55,1/53,4%). Entretanto, quando comparamos as células não modificadas antes e após a irradiação – SCC143 VØ/ SCC143 VØ 4Gy – verificamos um aumento da população G0/G1 (59,1% vs 65,4%), possivelmente por uma atividade de p53 na parada do ciclo celular após dano no DNA. Esse fenômeno, contudo, é perdido quando comparamos as populações G0/G1 de células não modificadas irradiadas -SCC143 VØ 4Gy- com a população de células superexpressando *Stratifin* também irradiadas -SCC143 SFN I 4Gy- (65,4% vs 53,5%). Uma mudança de perfil bastante significativa também é observada com relação às populações de células na fase S entre células não modificadas irradiadas -SCC143 VØ 4Gy- e células

superexpressando *Stratifin* também irradiadas -SCC143 SFN I 4Gy- (7,4% vs 23,1%) (figura 20 b.).

No caso da linhagem SCC143, os nocautes para *Stratifin* tiveram resultados contraditórios sendo que se observa o aumento da população G0/G1 em SCC143 KO I 4Gy com relação à sua contraparte não irradiada – SCC143 KO I (61,3% vs 55,1%) que não é observada nas células nocauteadas irradiadas -SCC143 KO II 4 Gy com relação à sua contraparte não irradiada -SCC143 KO II- (51,3% vs 53,4%) (figura 20 b.). Dessa forma podemos inferir que a *Stratifin* parece influenciar a resposta à irradiação apenas na população de células não modificadas, sendo que a ausência ou aumento da sua expressão não parece ter um impacto positivo. Uma possibilidade seria a realização de novos experimentos com doses extras de irradiação ou mesmo intervalos maiores para a coleta e fixação das células após irradiação. Embora a maioria dos protocolos recomendem que a fixação das células deve ser realizada após 24 horas da irradiação, a diferença na cinética de proliferação é um fator que deve ser considerado.

Por último, e mais intrigante, foi o resultado observado para SCC154 que teve uma resposta à irradiação bastante inesperada. Quando se compara as células não modificadas antes e após a irradiação -SCC154 Ø/SCC154 Ø 3Gy-, observa-se uma redução da população das células em G0/G1 (63% vs 56,1%), uma redução também em S (15,6% vs 7,4%) e um aumento expressivo em G2 (19,8% vs 33,8%). Esse padrão é repetido entre as demais células modificadas (com superexpressão ou nocaute) porém com a manutenção do conteúdo G0/G1 (figura 20 c.). Parece haver uma redução da população em S, porém a entrada em G2 parece que está mantida. Dessa forma, a *Stratifin* não parece exercer um papel da nesse processo após 24 horas da irradiação. Infelizmente esse experimento foi realizado apenas uma vez de modo que ensaios adicionais devem ser realizados para a confirmação desses achados. Entretanto, além das variáveis experimentais que podem interferir nessas observações, como o intervalo de tempo após irradiação para a fixação de células, deve ser considerado que essa linhagem tumoral pode já ter uma radioresistência intrínseca. Esse dado é corroborado no próprio trabalho que descreveu essa linhagem pela primeira vez, que mostra através de curvas de sobrevida, uma pior evolução clínica dos pacientes que originaram o material para o estabelecimento dessas linhagens (White *et al.*, 2007).

Espera-se que CCECP HPV positivos tenham maior radiosensibilidade com relação aos CCECP HPV negativos e essa é uma das principais razões pelas quais acredita-se que eles tenham um melhor prognóstico. Entretanto, uma das dificuldades em segregar tumores em HPV positivos e HPV negativos para o de-escalamento de tratamento é que dentro dessas duas

categorias, possam existir subcategorias que influenciam na resposta. A linhagem SCC154 por exemplo, é uma linhagem que representa tumores HPV positivos, porém é oriunda de um paciente tabagista e etilista. De acordo com esse fato, podemos considerar que a exposição à carcinógenos do tabaco, pioram à resposta ao tratamento possivelmente pela redução de miR-127-3p que resulta em um aumento da expressão de EGFR. (Anantharaman *et al.*, 2016; House *et al.*, 2018). Além disso, a hipóxia causada pelo tabaco durante o tratamento pode interferir na resposta à radioterapia (Lassen *et al.*, 2019)

4.8. Na ausência *Stratifin* a eficiência de plaqueamento em substrato sólido é prejudicada

Stratifin parece ter um papel fundamental na adesão celular de modo que a viabilidade das células nocaute nesse tipo de experimento, foram reduzidas drasticamente. A eficiência pode ser calculada apenas para as células que apresentaram colônias com mais de 50 células. Desse modo, observou-se que a eficiência de plaqueamento para SCC78 com relação aos seus nocautes KO I e KO II reduziu de 2,72% para respectivamente 0,39% e 0,26%. Com relação à sua contraparte irradiada, houve uma redução de ~40% (2,72% vs 1,6%)(figura 21 a. e b.). Não foram observadas colônias com mais de 50 células para os nocautes irradiados (figura 21 a. e b.). Nesse caso, não podemos inferir que a irradiação teve algum impacto na viabilidade porque a redução no número de colônias inviabiliza a utilização dessas células como controle. Dessa forma, não é possível utilizar esse experimento para corroborar os dados de análise do ciclo celular para essa linhagem celular. Uma alternativa a esse desfecho é a realização de novos experimentos com irradiação em uma densidade celular bastante maior de células, de modo a equiparar a eficiência de plaqueamento com as células não modificadas.

Com relação à SCC143 (*TP53WT*), a eficiência de plaqueamento foi de 2,43% para as células não modificadas (SCC143 VØ) enquanto que para as células com superexpressão de *Stratifin* (SCC143 SFN I) essa eficiência foi de 1,46%. Observou-se que a expressão aumentada de *Stratifin* reduz a capacidade clonogênica em 40% nessa linhagem (figura 21 c. e d.). Não foram observadas colônias com mais de 50 células nos nocautes nem na contraparte irradiada para essas linhagens. A superexpressão da SCC143 não necessariamente deveria apresentar um resultado oposto da contraparte nocauteada (figura 21 c. e d.). Embora sejam necessários experimentos adicionais para uma possível explicação desse resultado, a regulação estrita de certas proteínas justificaria o fato de que a mudança dessa expressão tanto positiva quanto negativa resultaria em um desfecho desfavorável para a célula.

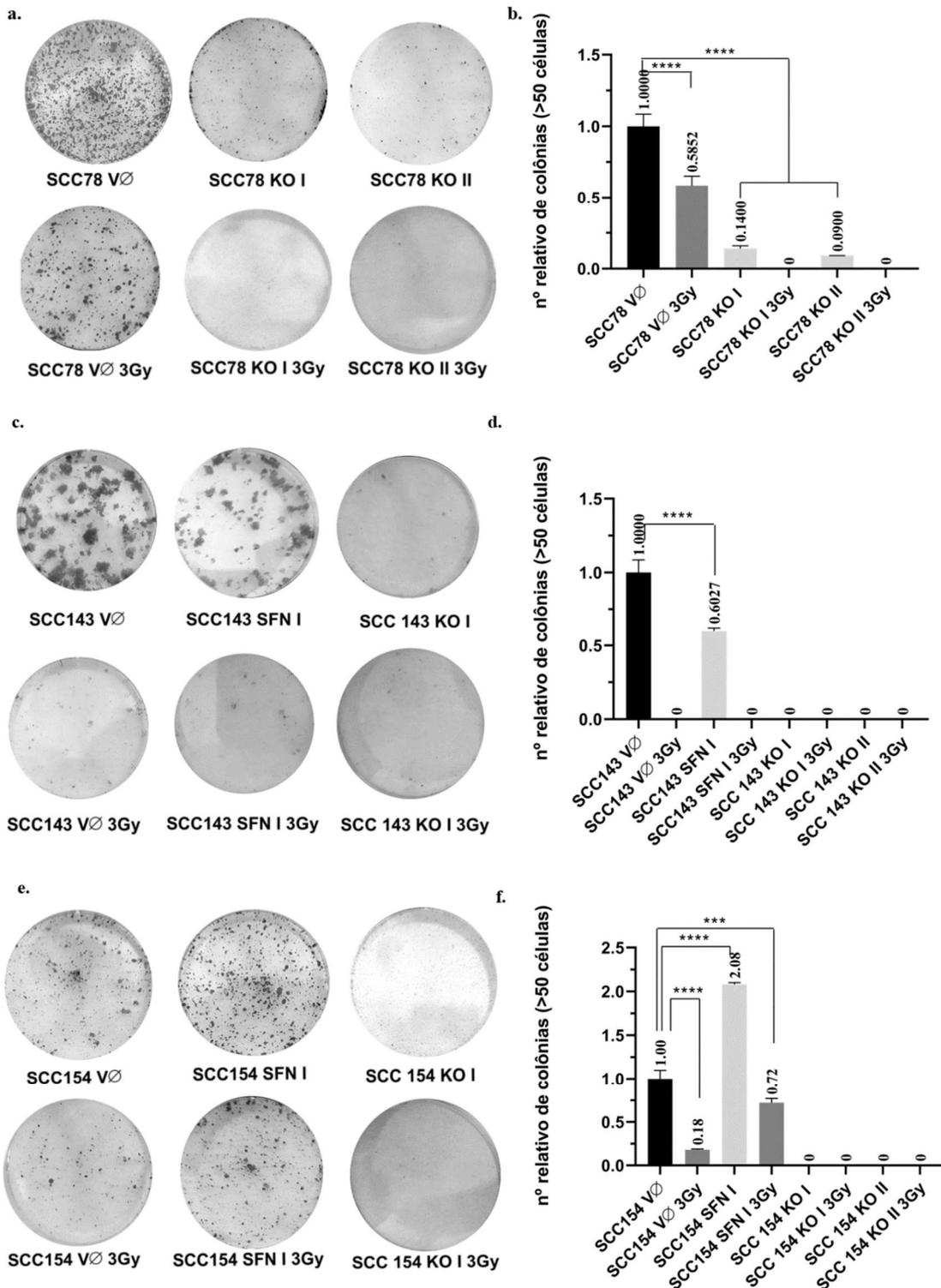


Figura 21 – Eficiência de plaqueamento em baixa densidade celular antes e após irradiação: a. Imagem representativa do padrão de proliferação celular em baixa densidade para SCC78 antes e após irradiação (SCC78VØ/3Gy, SCC78 KO I/3Gy e SCC78 KO II/3Gy); b. Histogramas comparando o número de colônias viáveis após nocaute gênico e relacionando essas variáveis após irradiação celular; c. Padrão de proliferação celular para SCC143 antes e após irradiação (SCC143VØ/4Gy, SCC143 SFN I/4Gy, SCC143 KO I/4Gy); d. Histogramas comparando o número de colônias viáveis após superexpressão e nocaute gênico. Não houve formação de colônias após irradiação para SCC143; e. Padrão de proliferação celular para SCC154 antes e após irradiação (SCC153VØ/3Gy, SCC154 SFN I/3Gy, SCC1543 KO I/3Gy); d. Histogramas comparando o número de colônias viáveis após superexpressão e nocaute gênico. Não houve formação de colônias para os nocautes de SCC154 (**p≤0,005; ***p≤0,0005).

Ao contrário do que foi observado para SCC143, *Stratifin* parece promover a viabilidade em SCC154 quando superexpressa. A eficiência de plaqueamento foi de ~0,33% para as células não modificadas (SCC154 VØ) e ~ 0,69% para as células superexpressando *Stratifin* (SCC 154 SFN I). Com relação às células irradiadas, a eficiência de plaqueamento foi de ~0,06% para SCC154 VØ 3Gy e ~0,24% para SCC154 SFN I 3Gy (figura 21 e. e f.). Conclui-se que a viabilidade dobrou para as células sem irradiar e quadruplicou para as células irradiadas. Dessa forma, *Stratifin* parece ter um efeito bastante importante na radioresistência nessa linhagem tumoral, que de certa forma é corroborado com os dados de ciclo celular (figura 20 c. e 21 e. e f.). Assim como para SCC143, as imagens do segundo nocaute de SCC154 foi omitido por ser similar ao primeiro.

Nesse ensaio se espera uma correlação linear entre o número de células semeadas e o número de colônias observadas, entretanto, a eficiência no plaqueamento para essas linhagens é bastante baixa mesmo em maior confluência. Além disso, outra dificuldade se baseia na contagem do número de colônias já que o padrão de crescimento é muito heterogêneo.

No processo de sobrevivência celular, *Stratifin* parece ter alguma influência na organização e dinâmica do citoesqueleto, sinalização mitogênica, adesão e motilidade celular já que a relação dela nessas vias já foi previamente descrita (Benzinger *et al.*, 2005, revisado por Li *et al.*, 2009). Quando se observa a maioria dos trabalhos que apontam para essas atividades, notamos uma redundância com outras isoformas de 14-3-3 que poderiam substituir *Stratifin*, quando ausente. Entretanto, de acordo com os resultados observados, *Stratifin* parecia ter um papel único no processo de adesão celular nessas linhagens de CCECP.

No tecido normal, a função das caderinas depende bastante da interface entre os desmossomos na adesão intercelular com as placofilinas, que servem como uma plataforma que liga as caderinas desmossomais às desmoplaquinias. Estas por sua vez atuam na ancoragem dos filamentos de queratina. Nesse contexto, diferentes placofilinas atuam de forma a permitirem uma adesão mais estrita ou mais flexível que resulta na modulação tecidual (Rietscher *et al.*, 2018).

Em processos em que há remodelação tecidual, cicatrização ou durante a diferenciação celular, a fosforilação da placa desmossomal parece ser essencial para sua dinâmica. A redução da adesão e ancoragem celular observadas para os nocautes de *Stratifin* pode ser inferido através de uma ruptura da adesão desmossomal que ocorre através da diminuição da estabilização da placofilina-3. A placofilina-3 é estabilizada exclusivamente pela *Stratifin* e à sua ausência tem sido atribuído um aumento da motilidade celular por redução da capacidade de adesão (Roberts *et al.*, 2013; Rietscher *et al.*, 2018).

A baixa eficiência de plaqueamento, associada à redução da viabilidade nos nocautes de *Stratifin* para SCC154 (assim como SCC78 e SCC143), justificam em parte a dificuldade na obtenção de clones durante a execução da edição gênica por CRISPR.

4.9. Apenas a linhagem com *TP53*^{mut} mostrou a habilidade de proliferação livre de ancoragem

Um parâmetro de oncogenicidade proposto para esse projeto foi o de crescimento livre de ancoragem em substrato semissólido (soft-ágar). Esse ensaio também conhecido como, tumorigênese *in vitro*, verifica a capacidade de determinada célula manter a proliferação e evadir à *anoikis*.

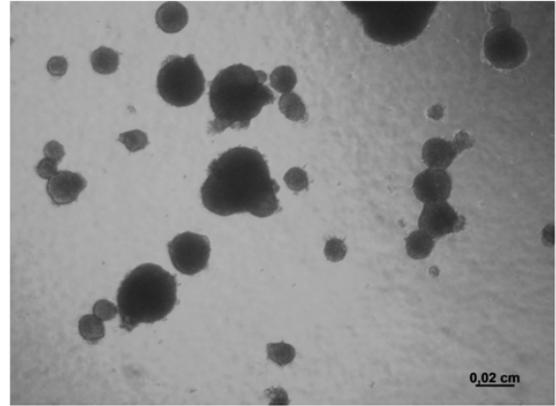
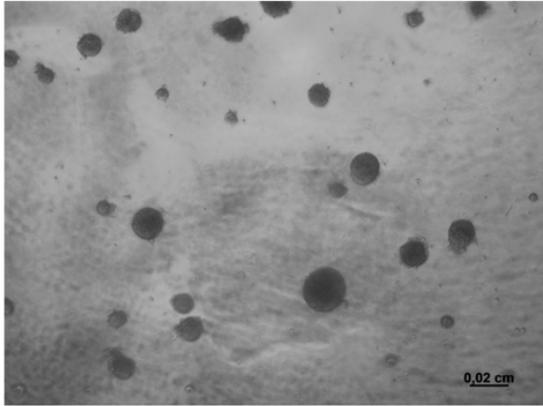
Um desafio dessa metodologia, segundo Lin *et al.*, 2007, é que a maior parte das linhagens CCECP não são capazes de crescer em soft-ágar de modo que só foi possível a realização desse experimento com SCC78. As linhagens SCC143 e SCC154 não cresceram em *soft-agar* em nenhuma das condições de densidade celulares testadas (Lin *et al.*, 2007).

A linhagem SCC78, derivada de um carcinoma de assoalho de boca, é oriunda de um tumor não metastático de estadiamento II (T2N0) segundo a AJCC (*American Joint Comitee on Cancer*), tem registro como sendo um tumor recidivante, conforme descrito anteriormente. Foram realizados 2 ensaios em *soft-ágar* em quadruplicada técnica, após padronização da densidade celular. Cada ensaio foi realizado com a célula não modificada e dois clones de nocaute para *Stratifin* aqui denominados como SCC78 KO I e SCC78 KO II, como já caracterizado anteriormente. Como resultado, foi observado a ausência de formação de esferoides em ambos os clones nocauteados para *Stratifin* com relação às células não modificadas no mesmo período observado (15 dias). Só foi possível a verificação de poucos e pequenos esferoides nos clones nocauteados após um mês de cultivo (figura 22 d. e f.).

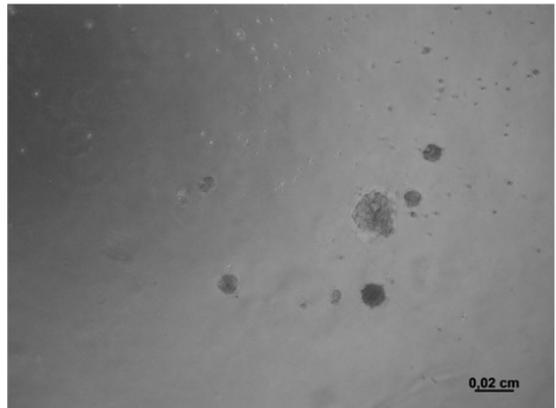
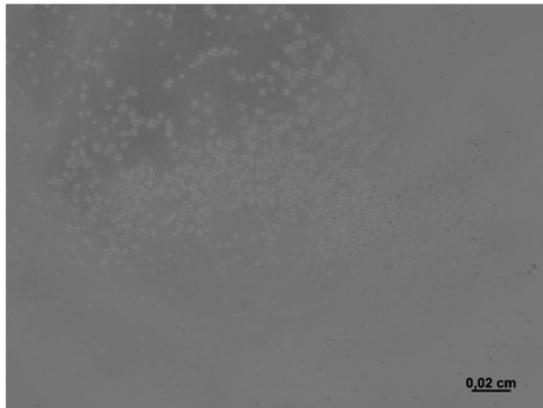
Nesse projeto, a linhagem SCC78 representa mutação em *TP53*, que é a alteração mais comum em CCECP (~84%). Embora mutações diferentes nesse gene promovam fenótipos diferentes, o desfecho no processo tumorigênico será reduzir a atividade de p53 como fator de transcrição de seus alvos, que são genes supressores tumorais. Seja na manutenção da estabilidade genômica, resposta à danos no DNA, senescência ou apoptose. No caso da SCC78, a substituição de aminoácido positivamente carregado (arginina) por um aminoácido neutro (glicina) no códon 158, que é um domínio de ligação com o DNA, foi reportado como um ganho de função (Kong *et al.*, 2020). A especificidade do fator de transcrição pelos sítios cognatos é fortemente alterada com substituições desse tipo, causando um impacto no repertório de genes

induzidos por ele. Mutações *missense* constituem mais de 70% das alterações reportadas nesse gene e podem reduzir o *feedback* negativo de Mdm2, mantendo altas taxas de p53 mutante na célula.

a.



b.



c.

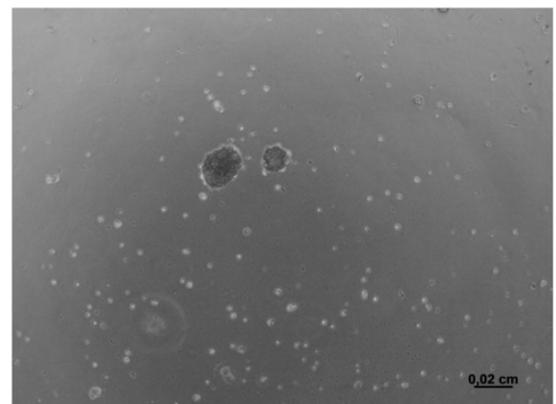
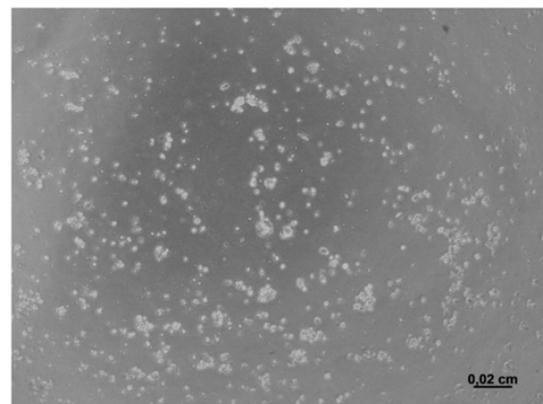


Figura 22 -Ensaio de *soft-ágar* com a linhagem SCC78 vetor vazio e dois clones nocaute para *Stratifin*: a. Esferoides observados após 15 dias de plaqueamento na linhagem SCC78 não modificada ao lado esquerdo e após 30 dias ao lado direito; b. Ausência de formação de esferoides nas células SCC78 KO I (nocaute I para *Stratifin*) em qualquer campo do microscópio após 15 dias de plaqueamento ao lado esquerdo e poucos esferoides e de tamanho bastante reduzidos observados após 30 dias na mesma linhagem após 30 dias.; c. As células SCC78 KO II que representam o clone II para o nocaute de *Stratifin* apresentam o mesmo padrão observado em b. (Imagens representativas de dois experimentos individuais).

O ganho de função em mutp53^{R158G}, gera um papel oncogênico ainda não tão bem caracterizado. Entretanto à essa mutação tem sido atribuídas um crescimento mais agressivo em xenotumores e crescimento livre de ancoragem observado inclusive nesse experimento (Kong *et al.*, 2020).

Uma vez que temos uma forma mutante de p53 com ganho de função e *Stratifin* como um reconhecido estabilizador de p53, é adequado sugerir que *Stratifin* atue como um oncogene e um novo alvo molecular.

Entretanto, ensaios complementares *in vivo* deverão ser realizados de modo a corroborar esses achados, e os mecanismos exatos dessas vias de sinalização corretamente elucidadas. Adicionalmente, pela habilidade que peptídeos selecionados por *Phage Display* apresentam em modular a atividade dos seus ligantes, futuros ensaios fenotípicos utilizando esse peptídeo determinarão sua capacidade de adjuvância junto a abordagens convencionais.

5. Conclusões

- A análise in silico com a base de dados do TCGA mostrou uma expressão aumentada de *Stratifin* CCECP com relação ao tecido não transformado; a expressão aumentada de *Stratifin* foi maior em pacientes do sexo feminino, e tem uma correlação positiva com negatividade pra HPV, mutação em *CDKN2A* e *TP53*. Por outro lado, foi correlacionada negativamente com sítio primário de CCECP, que apresentam maior probabilidade de ter HPV como fator etiológico. Adicionalmente, foi verificado uma diminuição significativa de *Stratifin*, quanto maior o grau histológico.
- O painel de linhagens celulares que representam CCECP utilizadas nesse projeto expressam *Stratifin* tanto em nível transcricional, quanto em nível protéico, com uma expressão bastante aumentada em SCC78 (*TP53* mut), quando comparada à queratinócitos orais não transformados e às linhagens SCC143 (*TP53WT*) e SCC154 (HPV positiva e *TP53WT*).
- O estabelecimento de nocautes para *Stratifin* foi realizado com êxito nas três linhagens de CCECP, e a superexpressão de gene foi possível apenas em SCC143 e SCC154.
- *Stratifin* parece conter a proliferação celular na linhagem SCC 154 tanto nas células parentais quanto nas células que superexpressam o gene, entretanto não se observa uma redução da proliferação nos clones nocauteados. Com relação à SCC 143, apenas o aumento da expressão da *Stratifin* parece conter a proliferação, não havendo alteração na cinética proliferativa entre a linhagem parental e os clones de nocaute. Os nocautes de *Stratifin* para a linhagem SCC78 não apresentou alteração na cinética de crescimento com relação às células parentais.
- A viabilidade celular, após administração dos quimioterápicos cisplatina e doxorrubicina foi reduzida, nos nocautes para SCC78. Não houve significância estatística em redução da viabilidade para SCC143 para nenhum dos dois fármacos, entretanto houve uma sutil redução na viabilidade. Com relação à SCC154, foi observado um aumento significativo da viabilidade após o tratamento com cisplatina nas células superexpressando SCC154 quando comparada à célula parental. Adicionalmente a viabilidade foi reduzida nos nocautes. Não houve aumento ou redução

da viabilidade com relação à administração de doxorubicina para essa linhagem celular. Os nocautes para SCC78 mostraram um aumento da sensibilidade após irradiação apresentando uma proporção bastante aumentada de células em G0/G1 após o nocaute e que foi mantido após a irradiação. A verificação das etapas do ciclo celular para SCC143 e SCC154 foram inconclusivas e devem ser repetidas.

- Houve uma redução substancial da capacidade de formação de colônia para os nocautes de SCC78, SCC143 e SCC154. Entretanto, em SCC143 superexpressando *Stratifin* também foi observada uma redução da eficiência de plaqueamento. Por outro lado, SCC154 superexpressando *Stratifin* mostrou um aumento da capacidade clonogênica pelo aumento da eficiência de plaqueamento, inclusive após irradiação. Resultados inconclusivos para capacidade clonogênica após irradiação dos nocautes já que a eficiência de plaqueamento foi muito baixa nos controles não irradiados. A capacidade de proliferação em substrato semi-sólido só foi possível com a linhagem SCC78, cujos nocautes de *Stratifin* que mostrou uma habilidade bastante reduzida na formação de colônia.

Bibliografia

- ALJABAL, Ghazi; YAP, Beow Keat. 14-3-3 σ and Its Modulators in Cancer. *Pharmaceuticals*, v. 13, n. 12, p. 441, 2020.
- ADELSTEIN, David J. *et al.* Head and neck squamous cell cancer and the human papillomavirus: summary of a National Cancer Institute State of the Science Meeting, November 9–10, 2008, Washington, DC. *Head & neck*, v. 31, n. 11, p. 1393-1422, 2009.
- AITKEN, Alastair. 14-3-3 proteins: a historic overview. In: *Seminars in cancer biology*. Academic Press, 2006. p. 162-172.
- ANANTHARAMAN, Devasena *et al.* Combined effects of smoking and HPV16 in oropharyngeal cancer. *International journal of epidemiology*, v. 45, n. 3, p. 752-761, 2016.
- ANANTHARAMAN, Devasena *et al.* Geographic heterogeneity in the prevalence of human papillomavirus in head and neck cancer. *International journal of cancer*, v. 140, n. 9, p. 1968-1975, 2017.
- ANG, K. Kian *et al.* Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *New England Journal of Medicine*, v. 363, n. 1, p. 24-35, 2010.
- APRELIKOVA, Olga *et al.* BRCA1 is a selective co-activator of 14-3-3 σ gene transcription in mouse embryonic stem cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 28, p. 25647-25650, 2001.
- ASHRAFI, G. Hossein *et al.* E5 protein of human papillomavirus 16 downregulates HLA class I and interacts with the heavy chain via its first hydrophobic domain. *International journal of cancer*, v. 119, n. 9, p. 2105-2112, 2006.
- AUPÉRIN, Anne. Epidemiology of head and neck cancers: an update. *Current opinion in oncology*, v. 32, n. 3, p. 178-186, 2020.
- BARTEL, Maria *et al.* Small molecules, peptides and natural products: getting a grip on 14-3-3 protein–protein modulation. *Future*, v. 6, n. 8, p. 903-921, 2014.
- BASUKALA, Om; BANKS, Lawrence. The Not-So-Good, the Bad and the Ugly: HPV E5, E6 and E7 Oncoproteins in the Orchestration of Carcinogenesis. *Viruses*, v. 13, n. 10, p. 1892, 2021.
- BENSON, Erica Kay *et al.* p53-dependent gene repression through p21 is mediated by recruitment of E2F4 repression complexes. *Oncogene*, v. 33, n. 30, p. 3959-3969, 2014.
- BENZINGER, Anne *et al.* Targeted Proteomic Analysis of 14-3-3 σ , a p53 Effector Commonly Silenced in Cancer* *S. Molecular & cellular proteomics*, v. 4, n. 6, p. 785-795, 2005.
- BODELON, Clara *et al.* Genomic characterization of viral integration sites in HPV-related cancers. *International journal of cancer*, v. 139, n. 9, p. 2001-2011, 2016.
- BOUVARD, Véronique *et al.* A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *The Lancet. Oncology*, v. 10, n. 4, p. 321-322, 2009. CAMPO, M. S. *et al.* HPV-16 E5 downregulates expression of surface HLA class I and reduces recognition by CD8 T cells. *Virology*, v. 407, n. 1, p. 137-142, 2010.
- CARLANDER, Amanda F. *et al.* A contemporary systematic review on repartition of HPV-positivity in oropharyngeal cancer worldwide. *Viruses*, v. 13, n. 7, p. 1326, 2021.
- CERAMI, Ethan *et al.* The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. 2012.
- CERASUOLO, Andrea *et al.* The role of RNA splicing factors in cancer: regulation of viral and human gene expression in human papillomavirus-related cervical cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 8, p. 474, 2020.
- CHAN, Timothy A. *et al.* 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature*, v. 401, n. 6753, p. 616, 1999.

- CHANDRASHEKAR, Darshan S. et al. UALCAN: a portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses. *Neoplasia*, v. 19, n. 8, p. 649-658, 2017.
- CHATURVEDI, Anil K. et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *Journal of clinical oncology*, v. 29, n. 32, p. 4294, 2011.
- CHENG, Lie et al. Expression of nucleotide excision repair genes and the risk for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*, v. 94, n. 2, p. 393-397, 2002.
- CHOW, Laura QM. Head and neck cancer. *New England Journal of Medicine*, v. 382, n. 1, p. 60-72, 2020.
- COBLITZ, Brian et al. C-terminal recognition by 14-3-3 proteins for surface expression of membrane receptors. *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 43, p. 36263-36272, 2005.
- D'ABRAMO, C. M.; ARCHAMBAULT, J. Small molecule inhibitors of human papillomavirus protein-protein interactions. *The open virology journal*, v. 5, p. 80, 2011.
- DAMIANI, Verena et al. Therapeutic efficacy of the novel stimuli-sensitive nano-ferritins containing doxorubicin in a head and neck cancer model. *International journal of molecular sciences*, v. 18, n. 7, p. 1555, 2017.
- DELLAMBRA, Elena *et al.* Downregulation of 14-3-3 σ prevents clonal evolution and leads to immortalization of primary human keratinocytes. *The Journal of cell biology*, v. 149, n. 5, p. 1117-1130, 2000.
- DiMaio, Daniel, and Lisa M. Petti. "The E5 proteins." *Virology* 445.1-2 (2013): 99-114.
- DOORBAR, John et al. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in medical virology*, v. 25, p. 2-23, 2015.
- ECONOMOPOULOU, Panagiota; KOTSANTIS, Ioannis; PSYRRI, Amanda. De-Escalating Strategies in HPV-Associated Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Viruses*, v. 13, n. 9, p. 1787, 2021.
- EGAWA, Nagayasu et al. Human papillomaviruses; epithelial tropisms, and the development of neoplasia. *Viruses*, v. 7, n. 7, p. 3863-3890, 2015.
- FARAJI, Farhoud et al. Molecular mechanisms of human papillomavirus-related carcinogenesis in head and neck cancer. *Microbes and infection*, v. 19, n. 9-10, p. 464-475, 2017.
- FENG, Lin; WANG, Lili. Effects of alcohol on the morphological and structural changes in oral mucosa. *Pakistan journal of medical sciences*, v. 29, n. 4, p. 1046, 2013.
- FERGUSON, Anne T. *et al.* High frequency of hypermethylation at the 14-3-3 σ locus leads to gene silencing in breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 97, n. 11, p. 6049-6054, 2000.
- FORASTIERE, Arlene A. et al. Long-term results of RTOG 91-11: a comparison of three nonsurgical treatment strategies to preserve the larynx in patients with locally advanced larynx cancer. *Journal of clinical oncology*, v. 31, n. 7, p. 845, 2013.
- FUJITA, Naoya; SATO, Saori; TSURUO, Takashi. Phosphorylation of p27Kip1 at threonine 198 by p90 ribosomal protein S6 kinases promotes its binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 49, p. 49254-49260, 2003.
- GASCO, Milena et al. Epigenetic Inactivation of 14-3-3 σ in Oral Carcinoma. *Cancer research*, v. 62, n. 7, p. 2072-2076, 2002.
- GHAFFARI, Abdi et al. 14-3-3 σ associates with cell surface aminopeptidase N in the regulation of matrix metalloproteinase-1. *J Cell Sci*, v. 123, n. 17, p. 2996-3005, 2010.
- GHEIT, Tarik. Mucosal and cutaneous human papillomavirus infections and cancer biology. *Frontiers in Oncology*, v. 9, p. 355, 2019.
- GHOSH, Sumit. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic chemistry*, v. 88, p. 102925, 2019.
- GILLISON, Maura L. et al. Human papillomavirus and the landscape of secondary genetic alterations in oral cancers. *Genome research*, v. 29, n. 1, p. 1-17, 2019.

- GRAHAM, Sheila V. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. *Clinical science*, v. 131, n. 17, p. 2201-2221, 2017.
- HAEGGBLOM, Linnea et al. Time to change perspectives on HPV in oropharyngeal cancer. A systematic review of HPV prevalence per oropharyngeal sub-site the last 3 years. *Papillomavirus Research*, 2017.
- HASHIM, D. et al. Head and neck cancer prevention: from primary prevention to impact of clinicians on reducing burden. *Annals of Oncology*, v. 30, n. 5, p. 744-756, 2019.
- HERMEKING, Heiko et al. 14-3-3 σ Is a p53-Regulated Inhibitor of G2/M Progression. *Molecular cell*, v. 1, n. 1, p. 3-11, 1997.
- HERMEKING, Heiko. The 14-3-3 cancer connection. *Nature reviews. Cancer*, v. 3, n. 12, p. 931, 2003.
- HOPPE-SEYLER, Karin et al. The HPV E6/E7 oncogenes: key factors for viral carcinogenesis and therapeutic targets. *Trends in microbiology*, v. 26, n. 2, p. 158-168, 2018.
- HOUSE, Reniqua et al. Smoking-induced control of miR-133a-3p alters the expression of EGFR and HuR in HPV-infected oropharyngeal cancer. *PloS one*, v. 13, n. 10, p. e0205077, 2018.
- HECK, Julia E. et al. Sexual behaviours and the risk of head and neck cancers: a pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium. *International journal of epidemiology*, v. 39, n. 1, p. 166-181, 2010.
- HU, Yi et al. Expression profile and prognostic value of SFN in human ovarian cancer. *Bioscience reports*, v. 39, n. 5, 2019.
- IRALDE-LORENTE, Leire et al. Identification of Phosphate-Containing Compounds as New Inhibitors of 14-3-3/c-Abl Protein-Protein Interaction. *ACS chemical biology*, v. 15, n. 4, p. 1026-1035, 2020.
- JARVIS, Ian WH et al. Interactions between polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures and implications for cancer risk assessment. *Toxicology*, v. 321, p. 27-39, 2014.
- JIANG, Fuguo; DOUDNA, Jennifer A. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms. *Annual review of biophysics*, v. 46, p. 505-529, 2017.
- JINEK, Martin *et al.* Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*, v. 343, n. 6176, 2014.
- JOHANSSON, Ann-Charlotte et al. Cancer-associated fibroblasts induce matrix metalloproteinase-mediated cetuximab resistance in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Molecular cancer research*, v. 10, n. 9, p. 1158-1168, 2012.
- JOHANSSON, Cecilia; SCHWARTZ, Stefan. Regulation of human papillomavirus gene expression by splicing and polyadenylation. *Nature reviews Microbiology*, v. 11, n. 4, p. 239-251, 2013.
- JOHNSON-ARBOR, Kelly; DUBEY, Ramin. Doxorubicin. 2017 - atualizado em agosto de 2021 – (disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459232/> consultado em 16/11/2021).
- JOHNSON, Daniel E. et al. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nature reviews Disease primers*, v. 6, n. 1, p. 1-22, 2020.
- KANG, Hyunseok; KIESS, Ana; CHUNG, Christine H. Emerging biomarkers in head and neck cancer in the era of genomics. *Nature reviews Clinical oncology*, v. 12, n. 1, p. 11-26, 2015.
- KANNO, Yuzuka et al. Molecular mechanisms of chemotherapy resistance in head and neck cancers. *Frontiers in Oncology*, v. 11, 2021.
- KIM, Jane J.; GOLDIE, Sue J. Cost effectiveness analysis of including boys in a human papillomavirus vaccination programme in the United States. *Bmj*, v. 339, p. b3884, 2009.
- KIM, Yunjung et al. Stratifin regulates stabilization of receptor tyrosine kinases via interaction with ubiquitin-specific protease 8 in lung adenocarcinoma. *Oncogene*, v. 37, n. 40, p. 5387-5402, 2018.

- KIMPLE, Randall J. et al. Enhanced radiation sensitivity in HPV-positive head and neck cancer. *Cancer research*, v. 73, n. 15, p. 4791-4800, 2013.
- KONERMANN, Silvana et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*, v. 517, n. 7536, p. 583-588, 2015.
- KUTNER, Robert H.; ZHANG, Xian-Yang; REISER, Jakob. Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors. *Nature protocols*, v. 4, n. 4, p. 495-505, 2009.
- LASSEN, Pernille et al. Impact of tobacco smoking on radiotherapy outcomes in 1875 HPV-positive oropharynx cancer patients. 2019.
- LAW, John C. et al. Variation of p53 mutational spectra between carcinoma of the upper and lower respiratory tract. *Clinical cancer research*, v. 1, n. 7, p. 763-768, 1995.
- LEE, Mong-Hong; LOZANO, Guillermina. Regulation of the p53-MDM2 pathway by 14-3-3 σ and other proteins. In: *Seminars in cancer biology*. Academic Press, 2006. p. 225-234.
- LEE, Yuan-Chin Amy et al. Tobacco smoking, alcohol drinking, betel quid chewing, and the risk of head and neck cancer in an East Asian population. *Head & neck*, v. 41, n. 1, p. 92-102, 2019.
- LEEMANS, C. René; BRAAKHUIS, Boudewijn JM; BRAKENHOFF, Ruud H. The molecular biology of head and neck cancer. *Nature reviews. Cancer*, v. 11, n. 1, p. 9, 2011.
- LEEMANS, C. René; SNIJDERS, Peter JF; BRAKENHOFF, Ruud H. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nature Reviews Cancer*, v. 18, n. 5, p. 269-282, 2018.
- LEONTIEVA, Olga V.; DEMIDENKO, Zoya N.; BLAGOSKLONNY, Mikhail V. Contact inhibition and high cell density deactivate the mammalian target of rapamycin pathway, thus suppressing the senescence program. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 111, n. 24, p. 8832-8837, 2014.
- LEWIS JR, James S. et al. Partial p16 staining in oropharyngeal squamous cell carcinoma: extent and pattern correlate with human papillomavirus RNA status. *Modern pathology*, v. 25, n. 9, p. 1212, 2012.
- LI, Chunying et al. Genetic polymorphisms in DNA base-excision repair genes ADPRT, XRCC1, and APE1 and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*, v. 110, n. 4, p. 867-875, 2007.
- LI, Zhaomin; LIU, Jing-Yuan; ZHANG, Jian-Ting. 14-3-3 σ , the double-edged sword of human cancers. *American journal of translational research*, v. 1, n. 4, p. 326, 2009.
- LIANG, Shufang *et al.* Gene expression and methylation status of 14-3-3 σ in human renal carcinoma tissues. *IUBMB life*, v. 60, n. 8, p. 534-540, 2008.
- LIANG, Jiyong; SLINGERLAND, Joyce M. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell cycle*, v. 2, n. 4, p. 336-342, 2003.
- LING, Chen *et al.* A novel role for 14-3-3 σ in regulating epithelial cell polarity. *Genes & development*, v. 24, n. 9, p. 947-956, 2010.
- LIU, Ya-Ping et al. Molecular mechanisms of chemo-and radiotherapy resistance and the potential implications for cancer treatment. *MedComm*, 2021.
- LO, K. W. et al. Presence of p53 mutation in human cervical carcinomas associated with HPV-33 infection. *Anticancer research*, v. 12, n. 6B, p. 1989-1994, 1992.
- LODYGIN, Dmitri; HERMEKING, Heiko. Epigenetic silencing of 14-3-3 sigma in cancer. In: *Seminars in cancer biology*. Academic Press, 2006. p. 214-224.
- LYFORD-PIKE, Sofia et al. Evidence for a role of the PD-1: PD-L1 pathway in immune resistance of HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer research*, v. 73, n. 6, p. 1733-1741, 2013.
- MA, Yu-Shui et al. Elevated Stratifin promotes cisplatin-based chemotherapy failure and poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Molecular Therapy-Oncolytics*, v. 22, p. 326-335, 2021.

- MAANI, Elizabeth V.; MAANI, Christopher V. Radiation Therapy. 2019 (disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537036/> consultado em 20/11/2021).
- MADUREIRA, Danielle J. et al. Systems toxicology approach to understand the kinetics of benzo (a) pyrene uptake, biotransformation, and DNA adduct formation in a liver cell model. *Chemical research in toxicology*, v. 27, n. 3, p. 443-453, 2014.
- MAO, Bijing; ZHANG, Zhimin; WANG, Ge. BTG2: a rising star of tumor suppressors. *International journal of oncology*, v. 46, n. 2, p. 459-464, 2015.
- MASTERS, Shane C.; FU, Haiyan. 14-3-3 proteins mediate an essential anti-apoptotic signal. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 48, p. 45193-45200, 2001.
- MCBRIDE, Alison A. Replication and partitioning of papillomavirus genomes. *Advances in virus research*, v. 72, p. 155-205, 2008.
- MEDINA, Abelardo et al. The role of stratifin in fibroblast–keratinocyte interaction. *Molecular and cellular biochemistry*, v. 305, n. 1, p. 255-264, 2007.
- MEHANNA, Hisham et al. Geographic variation in human papillomavirus–related oropharyngeal cancer: Data from 4 multinational randomized trials. *Head & neck*, v. 38, n. S1, 2016.
- MENDONSA, Alisha M.; NA, Tae-Young; GUMBINER, Barry M. E-cadherin in contact inhibition and cancer. *Oncogene*, v. 37, n. 35, p. 4769-4780, 2018.
- MINAFRA, Luigi; BRAVATÀ, Valentina. Cell and molecular response to IORT treatment. *Transl Cancer Res*, v. 3, n. 1, p. 32-47, 2014.
- MJELLE, Robin et al. Cell cycle regulation of human DNA repair and chromatin remodeling genes. *DNA repair*, v. 30, p. 53-67, 2015.
- MOIANI, Arianna et al. Lentiviral vector integration in the human genome induces alternative splicing and generates aberrant transcripts. *The Journal of clinical investigation*, v. 122, n. 5, p. 1653-1666, 2012.
- MOODY, Cary A.; LAIMINS, Laimonis A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Reviews Cancer*, v. 10, n. 8, p. 550-560, 2010.
- MORI, Mattia; VIGNAROLI, Giulia; BOTTA, Maurizio. Small molecules modulation of 14-3-3 protein–protein interactions. *Drug Discovery Today: Technologies*, v. 10, n. 4, p. E541-E547, 2013.
- MÜLLER, Marietta et al. Human papillomavirus E5 oncoprotein: function and potential target for antiviral therapeutics. *Future Virology*, v. 10, n. 1, p. 27-39, 2015.
- NEUPANE, Divas; KORC, Murray. 14-3-3 σ modulates pancreatic cancer cell survival and invasiveness. *Clinical Cancer Research*, v. 14, n. 23, p. 7614-7623, 2008.
- O’RORKE, M. A. et al. Human papillomavirus related head and neck cancer survival: a systematic review and meta-analysis. *Oral oncology*, v. 48, n. 12, p. 1191-1201, 2012.
- PAL, Asmita; KUNDU, Rita. Human papillomavirus E6 and E7: the cervical cancer hallmarks and targets for therapy. *Frontiers in microbiology*, v. 10, p. 3116, 2020.
- PAZZAGLI, M. et al. SPIDIA-RNA: first external quality assessment for the pre-analytical phase of blood samples used for RNA based analyses. *Methods*, v. 59, n. 1, p. 20-31, 2013.
- PINATTI, L. M.; WALLINE, H. M.; CAREY, T. E. Human papillomavirus genome integration and head and neck cancer. *Journal of dental research*, v. 97, n. 6, p. 691-700, 2018.
- PHILIP, Deepa et al. Molecular biology of head and neck cancers. *Journal of Head & Neck Physicians And Surgeons*, v. 4, n. 1, p. 16, 2016.
- POL, Scott B. Vande; KLINGELHUTZ, Aloysius J. Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology*, v. 445, n. 1-2, p. 115-137, 2013.
- RAN, F. Ann et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols*, v. 8, n. 11, p. 2281-2308, 2013.

- REN, Hong-Zheng et al. Reduced stratifin expression can serve as an independent prognostic factor for poor survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Digestive diseases and sciences*, v. 55, n. 9, p. 2552-2560, 2010.
- RIECKMANN, Thorsten; KRIEGS, Malte. The failure of cetuximab-based de-intensified regimes for HPV-positive OPSCC: a radiobiologists perspective. *Clinical and translational radiation oncology*, v. 17, p. 47-50, 2019.
- RIETSCHER, Katrin et al. 14-3-3 proteins regulate desmosomal adhesion via plakophilins. *Journal of cell science*, v. 131, n. 10, p. jcs212191, 2018.
- RIVA, Giuseppe et al. HPV meets APOBEC: New players in head and neck cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 3, p. 1402, 2021.
- ROBERTS, Brett J.; REDDY, Roopa; WAHL III, James K. Stratifin (14-3-3 σ) limits plakophilin-3 exchange with the desmosomal plaque. *PloS one*, v. 8, n. 10, p. E77012, 2013.
- ROBIN, Fabien et al. Molecular profiling of stroma highlights stratifin as a novel biomarker of poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *British journal of cancer*, v. 123, n. 1, p. 72-80, 2020.
- SAADA-BOUZID, Esmâ; PEYRADE, Frederic; GUIGAY, Joël. Molecular genetics of head and neck squamous cell carcinoma. *Current opinion in oncology*, v. 31, n. 3, p. 131-137, 2019.
- SAMBROOK, Joseph et al. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press, 1989.
- SAMUEL, Temesgen *et al.* The G2/M Regulator 14-3-3 σ Prevents Apoptosis through Sequestration of Bax. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 48, p. 45201-45206, 2001.
- SANO, Takaaki *et al.* Immunohistochemical expression of 14-3-3 sigma protein in various histological subtypes of uterine cervical cancers. *Pathology international*, v. 54, n. 10, p. 743-750, 2004.
- SCARTH, James A. et al. The human papillomavirus oncoproteins: a review of the host pathways targeted on the road to transformation. *The Journal of General Virology*, v. 102, n. 3, 2021.
- SCHNEIDER, Caroline A.; RASBAND, Wayne S.; ELICEIRI, Kevin W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, v. 9, n. 7, p. 671, 2012.
- SELUANOV, Andrei et al. Hypersensitivity to contact inhibition provides a clue to cancer resistance of naked mole-rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 46, p. 19352-19357, 2009.
- SERRANO, Beatriz et al. Epidemiology and burden of HPV-related disease. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*, v. 47, p. 14-26, 2018.
- SERRANO, Manuel et al. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, v. 88, n. 5, p. 593-602, 1997.
- SHEWALE, Jitesh B.; GILLISON, Maura L. Dynamic factors affecting HPV-attributable fraction for head and neck cancers. *Current opinion in virology*, v. 39, p. 33-40, 2019.
- SHUKLA, Rajiv et al. The Major, N2-dG Adduct of (+)-anti-B [a] PDE Shows a Dramatically Different Mutagenic Specificity (Predominantly, G→A) in a 5'-CGT-3' Sequence Context. *Biochemistry*, v. 36, n. 33, p. 10256-10261, 1997.
- SMITH, Andrew J.; DAUT, Jürgen; SCHWAPPACH, Blanche. Membrane proteins as 14-3-3 clients in functional regulation and intracellular transport. *Physiology*, v. 26, n. 3, p. 181-191, 2011.
- STADLER, Michael E. et al. Molecular biology of head and neck cancer: risks and pathways. *Hematology/oncology clinics of North America*, v. 22, n. 6, p. 1099-1124, 2008.
- STANLEY, Margaret. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecologic oncology*, v. 117, n. 2, p. S5-S10, 2010.
- STEVERS, Loes M. et al. Modulators of 14-3-3 protein-protein interactions. *Journal of medicinal chemistry*, v. 61, n. 9, p. 3755-3778, 2017.

- SUBRAMANIAN, Romesh R. et al. Functional conservation of 14-3-3 isoforms in inhibiting bad-induced apoptosis. *Experimental cell research*, v. 271, n. 1, p. 142-151, 2001.
- SUPEK, Fran; LEHNER, Ben; LINDEBOOM, Rik GH. To NMD or not to NMD: nonsense-mediated mRNA decay in cancer and other genetic diseases. *Trends in Genetics*, 2020.
- SUZUKI, Hiromu et al. Inactivation of the 14-3-3 σ gene is associated with 5' CpG island hypermethylation in human cancers. *Cancer research*, v. 60, n. 16, p. 4353-4357, 2000.
- SYRJÄNEN, Kari et al. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *International journal of oral surgery*, v. 12, n. 6, p. 418-424, 1983.
- SYRJÄNEN, Stina et al. Up-Regulation of 14-3-3 σ (Stratifin) Is Associated With High-Grade CIN and High-Risk Human Papillomavirus (HPV) at Baseline but Does Not Predict Outcomes of HR-HPV Infections or Incident CIN in the LAMS* Study. *American journal of clinical pathology*, v. 133, n. 2, p. 232-240, 2010.
- THIERRY, Françoise. Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma. *Virology*, v. 384, n. 2, p. 375-379, 2009.
- TUMBAN, Ebenezer. A current update on human papillomavirus-associated head and neck cancers. *Viruses*, v. 11, n. 10, p. 922, 2019.
- VAKIFAHMETOGLU, H.; OLSSON, M.; ZHIVOTOVSKY, B. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death & Differentiation*, v. 15, n. 7, p. 1153-1162, 2008.
- VELLUCCI, Vincent F.; GERMINO, F. Joseph; REISS, Michael. Cloning of putative growth regulatory genes from primary human keratinocytes by subtractive hybridization. *Gene*, v. 166, n. 2, p. 213-220, 1995.
- VERDOODT, Berlinda et al. Characterization of 14-3-3sigma dimerization determinants: requirement of homodimerization for inhibition of cell proliferation. *Cell cycle*, v. 5, n. 24, p. 2920-2926, 2006.
- VILLA, Luisa L. et al. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *The lancet oncology*, v. 6, n. 5, p. 271-278, 2005.
- VOKES, Everett E.; AGRAWAL, Nishant; SEIWERT, Tanguy Y. HPV-associated head and neck cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 107, n. 12, p. djv344, 2015.
- WANG, Joshua W.; RODEN, Richard BS. L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology*, v. 445, n. 1-2, p. 175-186, 2013.
- WANG, Zhihui et al. The clinicopathological and prognostic impact of 14-3-3 sigma expression
- WANG, C. C.; PALEFSKY, J. M. Human papillomavirus-related oropharyngeal cancer in the HIV-infected population. *Oral diseases*, v. 22, p. 98-106, 2016.
- on vulvar squamous cell carcinomas. *BMC cancer*, v. 8, n. 1, p. 308, 2008.
- WARD, Matthew J. et al. Staging and treatment of oropharyngeal cancer in the human papillomavirus era. *Head & neck*, v. 37, n. 7, p. 1002-1013, 2015.
- WHITE, Jason S. et al. The influence of clinical and demographic risk factors on the establishment of head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Oral oncology*, v. 43, n. 7, p. 701-712, 2007.
- Yajid, Aidy Irman, et al. "Potential role of E4 protein in human papillomavirus screening: a Review." *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP* 18.2 (2017): 315.
- YANG, Heng-Yin *et al.* 14-3-3 σ positively regulates p53 and suppresses tumor growth. *Molecular and cellular biology*, v. 23, n. 20, p. 7096-7107, 2003.
- YANG, Huiling; ZHAO, Ruiying; LEE, Mong-Hong. 14-3-3 σ , a p53 regulator, suppresses tumor growth of nasopharyngeal carcinoma. *Molecular cancer therapeutics*, v. 5, n. 2, p. 253-260, 2006.

- YIP, Helena T. *et al.* Cisplatin-induced growth arrest of head and neck cancer cells correlates with increased expression of p16 and p53. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, v. 132, n. 3, p. 317-326, 2006.
- ZHAO, Jing *et al.* 14-3-3 proteins as potential therapeutic targets. In: *Seminars in cell & developmental biology*. Academic Press, 2011. p. 705-712.
- ZHENG, Ting *et al.* Profiling single-guide RNA specificity reveals a mismatch sensitive core sequence. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2017.
- ZHOU, Ge; LIU, Zhiyi; MYERS, Jeffrey N. TP53 mutations in head and neck squamous cell carcinoma and their impact on disease progression and treatment response. *Journal of cellular biochemistry*, v. 117, n. 12, p. 2682-2692, 2016.
- ZHOU, Chenhao, Zewen Kelvin Tuong, and Ian Hector Frazer. "Papillomavirus immune evasion strategies target the infected cell and the local immune system." *Frontiers in oncology* 9 (2019): 682.