



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

GIULIA MARCHIORETO PAGOTTO

**INFLUÊNCIA DO SILENCIAMENTO DA ENZIMA ÁCIDO
GRAXO SINTASE (FASN) SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES
ASSOCIADOS À AUTOFAGIA EM CÉLULAS DERIVADAS DE
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS (CCE) ORAL**

PIRACICABA

2023

GIULIA MARCHIORETO PAGOTTO

**INFLUÊNCIA DO SILENCIAMENTO DA ENZIMA ÁCIDO
GRAXO SINTASE (FASN) SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES
ASSOCIADOS À AUTOFAGIA EM CÉLULAS DERIVADAS DE
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS (CCE) ORAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para obtenção do título de
Cirurgião Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Edgard Graner.

Coorientadora: Prof(a). Dr(a). Débora Campanella Bastos.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DO
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO APRESENTADO
PELO(A) ALUNO(A) GIULIA MARCHIORETO PAGOTTO E
ORIENTADO(A) PELO(A) PROF(A). DR(A). EDGARD
GRANER.

PIRACICABA

2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

P149i Pagotto, Giulia Marchioreto, 2001-
Influência do silenciamento da enzima ácido graxo sintase (FASN) sobre a expressão de genes associados à autofagia em células derivadas de carcinoma de células escamosas (CCE) oral / Giulia Marchioreto Pagotto. – Piracicaba, SP :[s.n.], 2023.

Orientador: Edgard Graner.
Coorientador: Débora Campanella Bastos.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Carcinoma de células escamosas oral. 2. Ácido graxo sintase. 3. Autofagia.
I. Graner, Edgard, 1968-. II. Bastos, Débora Campanella, 1981-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações adicionais, complementares

Palavras-chave em inglês:

Oral squamous cell carcinoma

Fatty acid synthases Autophagy

Titulação: Cirurgião-Dentista

Banca examinadora:

Everton Freitas de Moraes

Lilianny Querino Rocha de Oliveira

Data de entrega do trabalho definitivo: 19-12-2023

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha querida avó Ângela, que sempre esteve na retaguarda me ajudando a não deixar a “peteca cair”.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro e institucional (processo nº 2022/16712-9. Vigência de 01/06/2023 a 31/03/2024).

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba e à Área de Patologia Bucal.

Ao meu orientador Prof. Dr. Edgard Graner, por confiar na minha capacidade de aprender e me desenvolver na pesquisa. Também por toda a atenção e dedicação à minha orientação, desde o primeiro contato.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Débora Campanella Bastos, por todos os ensinamentos teóricos, práticos e de vida. Também, por todos os bons conselhos e pela atenção que dedicou ao meu trabalho.

Obrigada por permitirem que eu vivenciasse todas as faces da ciência. E por me direcionarem da melhor forma possível, com muita resiliência, quando passamos por uma de suas faces difíceis. A vocês dois, toda a minha admiração e gratidão.

À Profa. Dra. Ana Paula de Souza e ao doutorando Vitor Marinho por ceder, acompanhar e orientar a utilização do equipamento de RT-PCR do Laboratório de Histologia da FOP-Unicamp.

À minha colega de pesquisa (ou melhor, “irmã científica”), Ana Laura Bizeli, que tornou este trabalho possível não só por ter de fato participado de sua execução, mas também por ter tornado esta jornada muito mais leve, com risadas, conselhos e muita parceria. Obrigada de coração, Ana.

À Dra. Iara Aquino e à doutoranda Amanda Mazzaro, por terem ajudado diretamente com alguns experimentos.

Aos meus demais colegas de laboratório, por toda a ajuda prática e pelos momentos de descontração na rotina.

Aos meus amigos, em especial à minha dupla Isadora, às minhas parceiras de carona Nadine e Camila, às minhas irmãs piracicabanas Gabriella, Julia e Viviann, e aos “capivarers” Livia, Luísa, Isadora, Isabelle, Laís, Julia, Marina, Relli, Léo e Tulio. Sem esquecer também de todas do “bonde de Chernobyl” e dos queridos do “G13”. Vocês tiveram grande papel neste trabalho. Obrigada pelo apoio, descontração e toda ajuda emocional nesses 5 anos.

A todos da minha família por nunca medirem esforços para me verem bem e feliz. Pai, obrigada por cada carona e conselhos dados no trajeto. Mãe, obrigada por todo o conforto que sempre me proporcionou, deixando tudo impecável para que eu passasse a semana focada nos estudos. Elisa,

obrigada por cada escuta ao pé da cama quando minha cabeça não estava dando conta de organizar os pensamentos. Lailinha, por cada recepção calorosa às sextas-feiras. Vó Ângela, por sempre estar disposta a me escutar e também por pensar em todos os detalhes... nesses 5 anos eu sentia o poder das suas orações de longe. Vó Ana, por todas as vezes que me chamava de canto nos almoços de domingo com um potinho na mão para que eu fizesse minha marmitinha. Vô Rei, por todas as vezes que me levou e me buscou, pelos almoços no shopping e boas conversas. Tia Cê e Tia Letícia, obrigada por confiarem o sorriso dos seus pequenos a mim e à Isa nesse processo. Tia Dri, obrigada por sempre me apoiar. Tia Lena e tio Zezinho, obrigada por me receberem em suas casas para que eu pudesse fazer o curso que era um grande sonho pra mim. É impossível mensurar minha gratidão a todos vocês. Essa conquista foi resultado de um trabalho em equipe e sem dúvidas vocês foram a minha.

Ao meu namorado, Lucas. Por mesmo sendo de uma área totalmente diferente, se permitir entrar no meu universo de pacientes, células e experimentos. E procurar entender sobre isso para me aconselhar. Obrigada por toda paciência, escuta e por ser solução, acima de tudo.

RESUMO

O carcinoma de células escamosas (CCE) oral é o décimo sexto tipo de neoplasia maligna mais comum no mundo, com altos índices de recidiva e metástases. A síntese endógena de ácidos graxos mediada pela enzima ácido graxo sintase (FASN) tem se mostrado importante para a sobrevivência, proliferação e emissão de metástases no CCE oral. Um outro processo que tem se destacado recentemente na patogenia das neoplasias malignas é a autofagia, com papel ainda controverso e pouco conhecido no CCE oral. Assim, o presente trabalho objetivou estudar se o silenciamento da enzima FASN teria alguma influência sobre a expressão de genes relacionados à autofagia em células derivadas de CCE oral. Isto foi realizado por meio de RT-PCR *arrays* contendo primers para a amplificação de RNAm associados à autofagia. Foram estudadas 2 linhagens celulares de CCE oral: SCC-9 (como controle) e SCC-9 shFASN-A4C (SCC-9 com modificação genética que silencia especificamente o gene que codifica FASN). Observamos no presente estudo que o silenciamento de FASN interferiu no comportamento das células em cultura e na expressão de diversos genes diretamente associados à autofagia. Experimentos futuros serão realizados para validar os resultados obtidos e entender o mecanismo biológico que governa estas alterações.

Palavras-chave: Carcinoma de células escamosas oral. Ácido graxo sintase. Autofagia.

ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the sixteenth most common human malignant neoplasm worldwide, with high rates of recurrence and metastasis. The endogenous fatty acid synthesis mediated by the anabolic enzyme fatty acid synthase (FASN) has shown to be important for OSCC cell survival, proliferation and metastasis. Another recently described biological process in the pathogenesis of malignant neoplasms is autophagy, with a still controverse role in OSCC tumorigenesis. The aim of this study was to understand how FASN silencing interferes with the expression of autophagy-related genes in OSCC cells. This aim was carried out using RT-PCR *arrays* containing primers for the amplification of autophagy-associated mRNAs from two OSCC cell lines: SCC-9 (as a control) and SCC-9 shFASN-A4C (SCC-9 with FASN specific inhibition). The results here described suggest that FASN knockdown changes some phenotypic characteristics the studied cells as well as modulates the expression of several autophagy-related genes. Future experiments of the laboratory will validate these results and elucidate some of the biological mechanisms that correlate FASN activity and autophagy.

Key words: Oral squamous cell carcinoma. Fatty acid synthase. Autophagy.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1 CÂNCER ORAL- CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS (CCE) ORAL.....	13
2.1.1 Estatísticas	13
2.1.2 Etiologia.....	13
2.1.3 Perfil de risco	14
2.1.4 Apresentação clínica	14
2.1.5 Características histopatológicas	15
2.1.6 Características moleculares	15
2.1.7 Diagnóstico e tratamento	16
2.2 A ENZIMA ÁCIDO GRAXO SINTASE (FASN)	17
2.2.1 O papel da FASN nas neoplasias malignas	17
2.2.2 FASN e CCE oral	17
2.3 AUTOFAGIA	19
2.3.1 O que é autofagia e como ela ocorre.....	19
2.3.2 Autofagia e CCE oral.....	23
2.3.3 Autofagia e FASN	24
3 PROPOSIÇÃO	26
3.1 PROPOSIÇÃO GERAL.....	26
3.2 PROPOSIÇÃO ESPECÍFICA.....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 CULTURA CELULAR.....	27
4.1.1 Cultura celular para extração de RNA.....	27
4.1.2 Cultura celular para reação de western blotting com kit LC3I-LC3II	27
4.2 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS, QUANTIFICAÇÃO E REAÇÕES DE WESTERN BLOTTING	28
4.2.1 Para avaliar a expressão de FASN.....	28
4.2.2 Para avaliar a expressão de LC3I e LC3II	29

4.3 EXTRAÇÕES DE RNA TOTAL, GÉIS PARA AVALIAR A QUALIDADE DOS RNAS OBTIDOS E CONVERSÃO PARA CDNAS.....	30
4.3.1 Extrações de RNA total e quantificação em equipamento Nanodrop.....	30
4.3.2 Géis para avaliação da qualidade dos RNAs totais obtidos.....	31
4.3.3 Conversão dos RNAs totais em cDNAs	31
4.4 REAÇÕES DE RT-PCR	32
4.5 ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR	34
5 RESULTADOS.....	35
5.1 CULTURA CELULAR, EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS, E REAÇÕES DE WESTERN BLOTTING	35
5.1.1 Western blotting para avaliar a produção de FASN nas células SCC-9 e SCC-9 shFASN-A4C.	35
5.1.2 Avaliação da produção de LC3I e LC3II nas linhagens celulares estudadas...	36
5.2 EXTRAÇÕES DE RNA TOTAL, LEITURA EM NANODROP E ANÁLISES EM GÉIS DE QUALIDADE	38
5.3 REAÇÃO DE RT-PCR	39
5.4 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR	42
6 DISCUSSÃO.....	44
7 CONCLUSÕES.....	47
REFERÊNCIAS	48
ANEXOS.....	58
ANEXO 1 – VERIFICAÇÃO DE ORIGINALIDADE E PREVENÇÃO DE PLÁGIO.....	58
ANEXO 2 – COMISSÃO INTERNA DE BIOSSEGURANÇA	59
ANEXO 3 – INICIAÇÃO CIENTÍFICA	60

1 INTRODUÇÃO

O CCE oral é o décimo sexto tipo de neoplasia mais comum no mundo, ocupando a quinta posição dos tipos de câncer que mais acometem a população masculina no Brasil (GLOBOCAN, 2020; Instituto Nacional de Câncer, 2022). Seu prognóstico é ruim em cerca de 50% dos casos e isto se deve, principalmente, ao diagnóstico geralmente tardio desta doença (van der Waal, 2013). Mesmo se tratando de uma neoplasia relativamente comum e com alta taxa de mortalidade, o CCE oral ainda carece de biomarcadores validados para diagnóstico e prognóstico (Instituto Nacional de Câncer, 2022; Pillai et al., 2021). Um processo catabólico intracelular que tem ganhado recente destaque na patogênese das neoplasias malignas é a autofagia, nas quais parece ter um papel duplo: impedindo a ocorrência de danos ao DNA e limitando o crescimento tumoral no processo inicial de carcinogênese, e, em tumores avançados, favorecendo a sobrevivência das células malignas e o crescimento da massa tumoral (Abd El-Aziz et al., 2021; Cao et al., 2021). Por estas razões, o processo de autofagia tem se mostrado promissor na definição de futuros biomarcadores prognósticos para o CCE oral (Li et al., 2021).

Outro processo intracelular que tem destaque no estudo de neoplasias malignas é a síntese de ácidos graxos, mediada pela enzima FASN (Fhu e Ali, 2020), bastante estudada pelo nosso grupo de pesquisa. Estudos prévios têm demonstrado que a alta atividade de FASN é favorável para as células neoplásicas, aumentando as taxas de proliferação e o processo de metástases (Fhu e Ali, 2020). Assim, torna-se importante compreender os efeitos da inibição farmacológica de FASN no desenvolvimento tumoral. Neste sentido, Agostini et al. (2014) estudaram os efeitos do fármaco orlistat em CCE oral *in vitro* e *in vivo*. *In vitro*, observaram uma redução na proliferação e migração de células SCC-9 ZsGreen LN-1, além de induzi-las à apoptose e estimular a secreção de VEGFA_{165b} (Agostini et al., 2014). Já *in vivo*, o tratamento com orlistat em CCE oral ortotópico de língua foi capaz de diminuir o volume e as taxas de proliferação do tumor, além de reduzir em 43% o número de linfonodos cervicais acometidos por metástases (Agostini et al., 2014).

Outros fármacos inibidores de FASN são cerulenina, C75, triclosan, TVB2640, dentre outros (Fhu e Ali, 2020; Boelcke et al., 2022). Boelcke et al. (2022) estudaram os efeitos *in vitro* de alguns dos inibidores supracitados sobre os processos de necrose e apoptose em células de CCE oral da linhagem SCC-9. Estas células foram tratadas com o IC₅₀ (concentração inibitória média) destes fármacos e observou-se que apenas parte delas se apresentaram-se positivas para Anexina V (indicador de apoptose e apoptose tardia) ou Pi (iodeto de propídio, indicador de necrose) em citometria de fluxo, o que indica que outros processos de morte celular, como a autofagia, podem ser desencadeados pela inibição farmacológica da FASN (Boelcke et al., 2022).

Desta forma, o presente trabalho buscou compreender se FASN tem alguma influência sobre o processo de autofagia. Isto foi realizado a partir de uma linhagem celular com silenciamento genético específico para FASN (SCC-9 shFASN-A4C), utilizando a linhagem SCC-9 parental como controle. Estas células tiveram seu RNA extraído e, a partir dele, foram realizadas reações de RT-PCR com primers de genes associados à autofagia, de modo a avaliar a expressão gênica destes nestas linhagens celulares. Futuramente, estes resultados serão validados por reações de *western blotting* e imunofluorescência. Paralelamente aos experimentos supracitados, foram também realizados ensaios de proliferação celular e reações de *western blotting* para LC3BI e LC3BII com proteínas extraídas das linhagens celulares estudadas. Os ensaios de proliferação foram realizados para verificar diferenças fenotípicas observadas em cultura da linhagem parental SCC-9 e a SCC-9 shFASN-A4C. As reações de *western blotting* para LC3BI e LC3BII forneceram informações sobre o estado de ativação do mecanismo de autofagia (Fhu e Ali, 2020).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER ORAL- CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS (CCE) ORAL

2.1.1 Estatísticas

“Câncer oral” é o termo utilizado para se referir de forma genérica às lesões malignas que acometem o epitélio de revestimento dos lábios e da cavidade oral e que correspondem, em sua grande maioria, ao carcinoma de células escamosas (CCE) oral, neoplasia mais comum nesta região anatômica (cerca de 95% dos casos). Mundialmente, este é o décimo sexto tipo de neoplasia maligna mais comum, representando cerca de 2% de todos os casos (GLOBOCAN, 2020). Para o ano de 2020, estimaram-se 377.713 novos casos em todo o mundo, com taxa de mortalidade de 2,3% (GLOBOCAN, 2020). Ainda neste ano, o CCE oral foi classificado como o sétimo tipo de câncer mais comum na população brasileira (Instituto Nacional de Câncer, 2020). Para o triênio de 2023 a 2025, estima-se 15.100 novos casos de câncer da cavidade oral por ano no Brasil, com a previsão de que se mantenha como o quinto tipo de câncer que mais acomete a população masculina, com cerca de 10.900 novos casos (Instituto Nacional de Câncer, 2023). No cenário mundial, Índia é o país com maior prevalência de câncer oral, estando o Brasil 8º lugar (GLOBOCAN, 2020).

2.1.2 Etiologia

O CCE oral tem etiologia multifatorial, ou seja, abrange desde fatores ambientais como tabagismo (com e sem fumaça), etilismo, infecções virais por HPV16/18 (para os CCE de orofaringe) e exposição à luz solar (para os casos de CCE de lábio inferior), até fatores genéticos, que podem levar a alguma predisposição ao desenvolvimento da doença (INCA, 2021; Bugshan e Farooq, 2020). Na Índia, a alta prevalência do CCE oral está associada ao hábito cultural de mascar a folha de betel, com ou sem tabaco e noz de areca, o que expõe cronicamente a mucosa oral a uma série de substâncias carcinogênicas e leva a um acúmulo de mutações (Gupta e Johnson, 2014; Shah et al., 2012).

Além da natureza multifatorial do CCE oral, ainda se tem uma ação sinérgica entre tabagismo e etilismo, a qual aumenta em 35 vezes o risco para desenvolvimento da doença (Hashibe et al., 2007). Assim, é difícil determinar precisamente como cada fator atua no desenvolvimento deste tipo de câncer (Reidy et al., 2011). O que se sabe até então é que, como supracitado, o álcool é um fator etiológico independente e um possível mecanismo que explica isto é a formação de acetaldeído pela oxidação do etanol, o qual age como metabólito intermediário capaz de formar adutos de DNA altamente mutagênicos (Stornetta et al., 2018; Hashibe et al., 2007). Outra possível explicação é que o etanol age como solvente de agentes carcinogênicos, como os provenientes do tabaco,

potencializando a penetração destes nas células de revestimento da cavidade oral (Kawakita e Matsuo, 2017).

Sabe-se também que o fumo de tabaco, com ou sem fumaça, pode levar a alterações no sistema imunológico, prejudicando sua resposta frente a patógenos e sua atividade antitumoral (Lee et al., 2012). Além disso, o tabagismo está associado a um maior risco no desenvolvimento de lesões potencialmente malignas (Muthukrishnan e Warnakulasuriya, 2018). Estas lesões podem ou não envolver algum grau de displasia e, a depender deste, a lesão pode evoluir para um CCE oral invasivo (Chamoli et al., 2021).

Lesões potencialmente malignas com algum grau de displasia podem também estar associadas a alterações genéticas, como deleção em regiões cromossômicas (Salahshourifar et al., 2014). Outras alterações genéticas que levam a uma predisposição ao desenvolvimento de CCE oral são mutações em genes, como o TP53, um gene supressor de tumor, ou em oncogenes como PIK3CA (Desrichard et al., 2018; Batta e Pandey, 2019).

Por fim, existem infecções virais que atuam como cofatores associados ao desenvolvimento do CCE oral, sendo elas as por Epstein Barr (associação indireta por levar a certa imunodeficiência), citomegalovírus, vírus herpes simples tipo 1, além do já citado papilomavírus humano (Inchingolo et al., 2020).

2.1.3 Perfil de risco

Devido aos seus diferentes fatores etiológicos, as características epidemiológicas do CCE oral variam de acordo com idade, gênero, ocupação, localização geográfica, etnia e hábitos dos pacientes (Puram e Rocco, 2015). No entanto, durante muitas décadas, o perfil de maior risco esteve bem definido como sendo o de um homem com mais de 50 anos, tabagista e/ou etilista (Alvarenga et al., 2008). Isto vem se alterando nos últimos anos, com um aumento preocupante dos casos de CCE oral em mulheres com idade menor ou igual a 45 anos, mesmo na ausência de tabagismo e etilismo, ou com curto tempo de exposição a esses fatores de risco, sendo por esta razão necessário um entendimento mais profundo sobre a relação entre agentes etiológicos, predisposição genética, comportamento clínico e prognóstico desta doença (Coletta et al., 2020).

2.1.4 Apresentação clínica

Clinicamente, o CCE oral pode se assemelhar a uma leucoplasia, eritroleucoplasia ou eritroplasia, principalmente nas lesões mais iniciais (Feller e Lemmer, 2012). Nas lesões tardias e maiores, geralmente se observa uma úlcera com centro necrótico e bordas elevadas e endurecidas, podendo também se apresentar como uma massa exofítica de base ampla e superfície lisa a verrucosa

(Feller e Lemmer, 2012). Inicialmente, o CCE oral costuma ser assintomático, podendo evoluir, nos casos mais avançados, para desde leve desconforto até dor intensa, assim comprometendo a fala, mastigação ou até a deglutição (Bagan et al., 2010; Neville e Day, 2002; Scully e Bagan, 2009).

Quando detectada uma lesão na mucosa oral que perdure por mais de 3 semanas, é imprescindível que se faça uma biópsia para exame histopatológico, de modo a diagnosticar precocemente um possível tumor maligno (Scully et al., 2008).

2.1.5 Características histopatológicas

O CCE oral é um tipo de câncer que se desenvolve a partir do epitélio escamoso estratificado da cavidade oral (Tumuluri et al., 2002). Este desenvolvimento tem diferentes etapas e dentre elas está o aparecimento de lesões potencialmente malignas (Rivera e Venegas, 2014). No entanto, nem toda lesão potencialmente maligna evolui para tumor e, por isso, quando identificadas ao exame intraoral, o diagnóstico requer uma biópsia para exame histopatológico (Ernani e Saba, 2015; Neville e Day, 2002).

Para lesões do tipo leucoplasia, podemos encontrar algum grau de displasia ao exame histopatológico, seja ele leve, moderado ou avançado (pode também ser chamado de carcinoma *in situ*) (Neville, 2009). Já no caso das eritroplasias, estas possuem um alto potencial de malignidade e comumente apresentam um grau mais avançado de displasia (Van der Waal, 2009).

O CCE oral apresenta-se microscopicamente como uma severa displasia que acomete toda a porção do epitélio, desde a camada basal (Müller, 2018). Além disto, podem ser classificados de acordo com o grau de diferenciação histológica em bem diferenciados (grau 1), moderadamente diferenciados (grau 2) e indiferenciados ou pouco diferenciados (grau 3) (Almangush et al., 2020). Tumores bem diferenciados contêm células mais semelhantes às do tecido epitelial escamoso normal, com padrão sólido, queratinização e apenas algumas figuras de mitose (Anneroth et al., 1987; Lytle et al., 2018). Por outro lado, as células dos tumores pouco diferenciados apresentam núcleos hipercromáticos, várias figuras mitóticas, pleomorfismo e baixo grau de queratinização (Anneroth et al., 1987; Lytle et al., 2018).

2.1.6 Características moleculares

A transformação maligna requer alterações em genes conhecidos como supressores de tumor e proto-oncogenes. Alterações estas envolvem tanto a inativação dos genes supressores de tumor, como por exemplo o p53, quanto a ativação ou amplificação dos proto-oncogenes, como o RAS (Choy e Myers, 2008). Embora já se tenha razoável informação sobre estes genes e seus respectivos papéis na tumorigênese, incluindo-se no CCE oral, ainda não há correlação direta entre a expressão

destes, a progressão tumoral e o prognóstico. Assim, encontrar um marcador molecular com aplicabilidade clínica permanece como um grande desafio nas pesquisas envolvendo o CCE oral (Gupta et al., 2016; Almangush et al., 2017).

No processo de formação do tumor maligno, as células tumorais desenvolvem uma série de capacidades biológicas denominadas de “*hallmarks* do câncer”. Estas características asseguram a manutenção da malignidade destas células, além de servirem como uma forma de racionalizar as complexidades de uma neoplasia. Algumas delas são resistência à morte, escape da ação de genes supressores de crescimento, indução à angiogênese, dentre outros. Recentemente, Hanahan (2022) destacou também características como reprogramação epigenética e senescência celular, por exemplo. Compreender a fundo estas capacidades biológicas é fundamental para desenvolvimento de tratamentos novos e eficientes contra as neoplasias malignas (Hanahan e Weinberg, 2011).

2.1.7 Diagnóstico e tratamento

O CCE oral apresenta a vantagem, frente a outros tipos de câncer, de permitir o diagnóstico precoce por meio de um exame clínico cuidadoso da cavidade oral. No entanto, apesar do fácil acesso anatômico, na maioria das vezes o diagnóstico é tardio, devido ao desconhecimento da população acerca dos seus riscos e aspectos clínicos, ao fato do CCE oral ser assintomático quando em seus estágios iniciais e, por fim, à postergação na procura por um cirurgião-dentista ou médico, por medo ou falta de acesso aos serviços de saúde (Bugshan e Farooq, 2020). Na literatura, estes fatores são considerados a “primeira perda de tempo” no diagnóstico do CCE oral, sendo a “segunda” dependente do conhecimento da equipe profissional e a “terceira” relacionada ao tempo necessário para o início do tratamento, após o diagnóstico da doença (Hadzic et al., 2017). Assim, ressalta-se bastante a importância do autoexame por parte da população e de uma boa formação dos profissionais responsáveis pelo diagnóstico do câncer oral (Hadzic et al., 2017). Portanto, a população deve saber quando buscar um profissional e este, fazer uma boa indicação de biópsia. Ulcerações solitárias, com aspecto eritroleucoplásico, história clínica mais longa que duas semanas, indolor, em ventre ou região lateral de língua ou assoalho da boca, são indicações para análise histopatológica, principalmente se apresentar aspecto de “bordas elevadas” (Minhas et al., 2019; Mashberg et al., 1989). Além disto, lesões potencialmente malignas como leucoplasias, eritroplasias, queilites actínicas, leucoplasias verrucosas proliferativas e líquen plano, devem ser acompanhadas e submetidas à biópsia se necessário (Bugshan e Farooq, 2020).

Devido às dificuldades e atraso no diagnóstico, o prognóstico do CCE oral em 50% dos casos é muito ruim, pois estágios avançados da doença requerem tratamentos invasivos, complexos e de maior impacto sobre a qualidade de vida do paciente, como a associação entre cirurgia e radioterapia (se o tumor for operável) ou radioterapia e quimioterapia (Warnakulasuriya, 2009; van der Waal, 2013;

Yokota et al., 2020). Por vezes, em lesões muito avançadas, é indicado apenas um tratamento paliativo (Ghoshal et al., 2006).

2.2 A ENZIMA ÁCIDO GRAXO SINTASE (FASN)

2.2.1 O papel da FASN nas neoplasias malignas

A ácido graxo sintase (FASN) é um complexo multi-enzimático que produz, a partir da acetil-coenzima A (CoA) e de malonil-CoA, na presença de NADPH, o palmitato (ácido palmítico- $C_{16}H_{32}O_2$). Este complexo tem uma série de papéis fisiológicos, atuando no desenvolvimento embrionário, na produção de surfactantes em células do epitélio alveolar pulmonar, na regulação de ácidos graxos livres no fígado, nas células-tronco neurais, onde tem papel importante na neurogênese, dentre outros (Fhu e Ali, 2020; Knobloch et al., 2013). A regulação da FASN ocorre principalmente em função da falta ou presença de esteroides, mediada por exemplo pela proteína de ligação ao elemento regulador de esteroides (SREBP, um fator de transcrição), por meio de um mecanismo de feedback negativo (Fhu e Ali, 2020). Há também outros mecanismos de regulação, como a via fosfatidilinositol-3'-quinase/proteína quinase B (PI3K/AKT) (Fhu e Ali, 2020). Estas vias estão atuantes tanto em células normais quanto em células tumorais, no entanto, nas últimas a expressão de FASN tem se mostrado independente da presença ou não de ácidos graxos livres provenientes da dieta (Fhu e Ali, 2020). Esta independência de uma regulação externa explica o aumento da expressão de FASN em muitos tipos de câncer e, conseqüentemente, da lipogênese *de novo*, cujo produto principal (palmitato) atua como precursor na síntese das membranas das células malignas e facilita sua proliferação, sobrevivência e até mesmo a quimiorresistência (Agostini et al., 2014; Buckley et al., 2017). De acordo, a alta expressão imuno-histoquímica de FASN está aparentemente associada a um pior prognóstico para os pacientes portadores de CCE oral (Silva et al., 2008).

2.2.2 FASN e CCE oral

Dentre os tipos de câncer em que a expressão de FASN está aumentada, encontra-se o CCE oral. Em um trabalho de nosso grupo de pesquisa, Silva et al. (2008) confirmaram a existência de uma correlação entre expressão imuno-histoquímica aumentada de FASN e características clinicopatológicas relacionadas à progressão e pior prognóstico do CCE oral em língua. Estes resultados corroboram achados prévios dos mesmos autores (2004) e de Krontiras et al. (1999). Pesquisas com outros tipos de câncer confirmaram que a inibição farmacológica de FASN reduz a progressão do ciclo celular (Kuhajda et al, 1994; Swinnen et al, 2003; Baron et al, 2004). De maneira semelhante, no CCE oral, o bloqueio da atividade de FASN reduz a proliferação, viabilidade e migração celular, aumenta as taxas de apoptose e promove a diminuição do tamanho de CCEs de

língua e suas metástases para linfonodos cervicais em modelo ortotópico (Agostini et al., 2004; Agostini et al., 2014; Aquino et al., 2020).

Como exposto, a expressão aumentada de FASN em diversos tipos de neoplasias malignas humanas a torna um alvo bastante promissor para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos (Flavin et al., 2010). Dentre os inibidores da FASN, temos a cerulenina e seu derivado sintético C75, orlistat (ORL), triclosan (TCS), C93, TVB-3166, TVB-2640, dentre outros (Flavin et al., 2010; Falchook et al., 2021). Estes compostos agem sobre domínios específicos da FASN, inibindo etapas fundamentais na síntese de palmitato. Como exemplo, podemos citar o ORL, que se liga de maneira covalente ao domínio tioesterase da FASN e desta forma, bloqueia sua atividade biológica (Kridel et al., 2004). Em trabalho bastante recente de nosso grupo de pesquisa, Boelcke et al. (2022) demonstraram que, na dependência do domínio catalítico farmacologicamente inibido, obtém-se diferentes efeitos fenotípicos sobre uma linhagem celular derivada de CCE oral (SCC-9). Neste estudo, o TCS apresentou maior efeito sobre estas células, reduzindo a velocidade de progressão do ciclo celular, a capacidade de adesão, de migração e de invasão, além de promover maiores taxas de morte por apoptose, quando comparado ao C75 e ao orlistat. Em estudo anterior, também do nosso grupo, realizado com modelos ortotópicos de CCE de língua, padronizado com a linhagem metastática SCC-9 ZsGreen LN-1, o tratamento com ORL foi capaz de reduzir a proliferação e migração, de promover morte celular por apoptose e de estimular a secreção de VEGFA165b (uma variante do fator de crescimento endotelial vascular com propriedades inibitórias sobre a angiogênese). Observou-se também diminuição do volume e da proliferação celular dos tumores primários, o que culminou com redução de 43% no número de linfonodos regionais acometidos por metástases (Agostini et al., 2014). Aquino et al. (2020), por sua vez, ao estudar o inibidor de FASN TVB-3166 nas linhagens celulares SCC-9 ZsGreen e SCC-9 ZsGreen LN-1A, observaram que esta droga reduz significativamente a viabilidade, migração e proliferação, impede a progressão do ciclo celular, promove apoptose e aumenta a adesão às proteínas da matriz extracelular. Neste trabalho, os autores concluíram que a ação antitumoral de TVB-3166 é importante e que há potencial de progressão para pesquisas clínicas. Já o TVB-2640 foi o primeiro inibidor de FASN a passar para a fase de testes clínicos, com um estudo em humanos já publicado com tumores sólidos (câncer de pulmão de células não-pequenas com gene KRAS mutado, câncer de ovário, coloretal, retal, de próstata, gástrico, cervical, de mama e tumores mistos), o qual demonstrou, através de monoterapia e da associação com taxanos (paclitaxel e docetaxel), que a inibição de FASN com TVB-2640 é eficiente e tem um perfil relativamente seguro, com efeitos adversos reversíveis envolvendo pele e olhos, dentre eles, edema de córnea, queratite, irite, uveíte e eritrodisestesia palmar-plantar (Falchook et al., 2021; Clinicaltrials.gov:NCT02223247).

2.3 AUTOFAGIA

2.3.1 O que é autofagia e como ela ocorre

A autofagia é um processo catabólico intracelular que envolve o direcionamento de estruturas celulares para degradação nos lisossomos. Existem 3 tipos de autofagia, que diferem entre si pela forma como os conteúdos citoplasmáticos a serem destruídos chegam aos lisossomos: autofagia mediada por proteínas chaperonas (*chaperone-mediated autophagy*- CMA), microautofagia e macroautofagia, principal via autofágica. A macroautofagia, conhecida como simplesmente autofagia, consiste na formação de vesículas que podem envolver até organelas inteiras e que são direcionadas à degradação lisossomal (Parzych e Klionsky, 2014). Tal direcionamento ocorre por meio de um envoltório delimitado por uma dupla camada de membrana denominado de autofagossomo, cuja membrana externa se funde com a membrana lisossomal, resultando numa estrutura chamada de autolisossomo. A membrana interna dos autofagossomos é, por sua vez, degradada pelas próprias enzimas lisossomais (Yang e Klionsky, 2010).

De uma maneira geral, a autofagia pode ser dividida em seis etapas distintas e sequenciais: a) iniciação/indução; b) enucleação; c) alongamento/expansão do autofagossomo; d) maturação do autofagossomo; e) fusão do autofagossomo com o lisossomo; e f) degradação propriamente dita do conteúdo já presente no lúmen lisossomal (Parzych e Klionsky, 2014). Cada uma destas etapas é controlada por um grupo de genes relacionados à autofagia (*autophagy-related genes*- ATGs) (Abd El-Aziz et al., 2021). A iniciação (Figura 1) decorre de estímulos internos ou externos à célula, tais como estresse celular (estresse oxidativo, hipóxia, estresse do retículo endoplasmático, danos no DNA), falta de nutrientes, agregados de proteínas danificadas ou malformadas, organelas danificadas e infecções microbianas. Dependendo do estímulo desencadeador, podemos ter autofagia em sua forma seletiva (como, por exemplo, mitofagia, ribofagia, pexofagia, reticulofagia ou nucleofagia) ou não seletiva (Cao et al., 2021; Yoshii e Mizushima, 2015). Para que ocorra a autofagia seletiva, a estrutura danificada emite sinais que induzem à formação do autofagossomo e este a envolve através de receptores e ligantes específicos. Já no segundo tipo, estímulos externos (como falta de nutrientes), levam à formação do autofagossomo, o qual envolve componentes citoplasmáticos que estejam nas proximidades, destinando-os à degradação lisossomal (Nakatogawa, 2020; Jin et al., 2013).

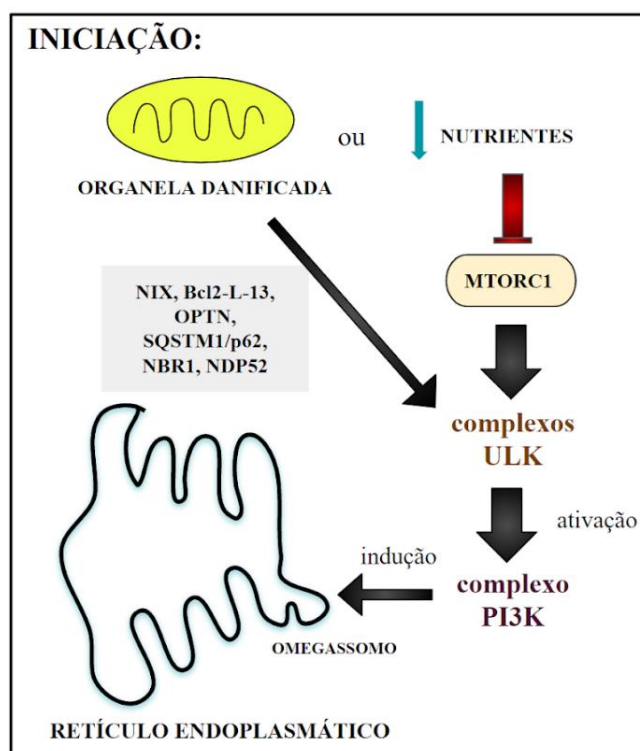


Figura 1- Esquema simplificado da iniciação da autofagia.

Assim, de acordo com suas necessidades, a célula pode ativar um ou outro tipo de autofagia. As autofagias seletiva e a não seletiva ocorrem de forma muito semelhante, pois ambas envolvem a montagem do complexo *Unc-51 like kinase* (ULK) na etapa de iniciação do autofagossomo. Na autofagia não seletiva, a inativação de TORC1 e consequente formação de ULK constituem o mecanismo chave para a iniciação. Na autofagia seletiva, os próprios mediadores do reconhecimento do “carga” selecionado para autofagia (sejam eles mais específicos, como NIX e Bcl2-L-13 que são importantes para a mitofagia, ou menos específicos, como optineurin (OPTN), SQSTM1/p62, NBR1 e NDP52), modulam a montagem dos complexos ULK, independentemente da ação de TORC1, pela interação com FIP200 (Turco et al., 2020; Nakatogawa, 2020).

A proteína FIP200 compõe, juntamente com ULK-1 (ou ULK-2), ATG13 e ATG101, o complexo ULK. A formação de múltiplos complexos ULK é uma etapa comum nas autofagias seletiva e não seletiva, sendo imprescindível para a iniciação da formação do autofagossomo. Além disto, estes complexos recrutam outras proteínas ATG que darão seguimento ao processo (Nakatogawa, 2020).

Uma vez formados os complexos ULK, ocorre ativação do complexo PI3K (PI3K Classe III - complexo PI3K específico da autofagia), composto pelos mediadores Vps34, p150, Beclina-1, ATG14L e AMBRA1 (Abd El-Aziz et al., 2021). Ambos os complexos supracitados se localizam próximos à superfície do retículo endoplasmático, sendo o domínio omegassomo desta organela, o doador dos lipídios que constituirão o autofagossomo (Ylä-Anttila et al., 2009; Nakatogawa, 2020).

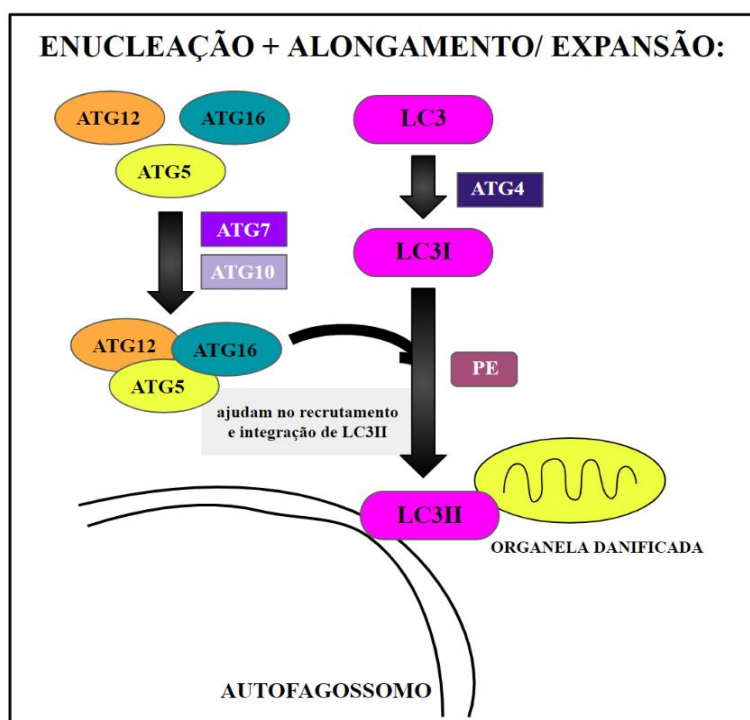


Figura 2 - Esquema simplificado das etapas de enucleação e alongamento/expansão da autofagia.

A partir deste ponto, inicia-se o processo de enucleação (Figura 2), com a formação do fagóforo/pré-autofagossomo, uma estrutura que sofre expansão, por intermédio de dois sistemas de conjugação via ubiquitina: ATG12-ATG5-ATG16 e LC3 (Hamacher-Brady, 2012). A conjugação deste complexo de proteínas ATGs se dá após a ativação de ATG12 por ATG7 e ATG10. Quando o complexo se dissocia da membrana do fagóforo, forma-se uma vesícula de dupla membrana, que recebe o nome de autofagossomo (Glick et al., 2010).

No sistema de conjugação LC3, esta molécula é clivada por ATG4, formando LC3-I que, ao se conjugar com fosfatidiletanolamina (PE), passa a ser chamada de LC3-II. Esta última, ao contrário do complexo ATG 2 supracitado, permanece nas porções interna e externa da membrana do autofagossomo após sua formação, participando da hemifusão de membranas e da seleção do “carga” (material a ser degradado) (Nakatogawa et al., 2007). Como LC3-II tem sua síntese e processamento aumentados durante a autofagia, ele é considerado como um potencial marcador para autofagossomos (Abd El-Aziz et al., 2021). É importante ressaltar que o recrutamento e a integração de LC3-II no fagóforo em expansão é dependente do complexo ATG5-ATG12-ATG16 (Glick et al., 2010).

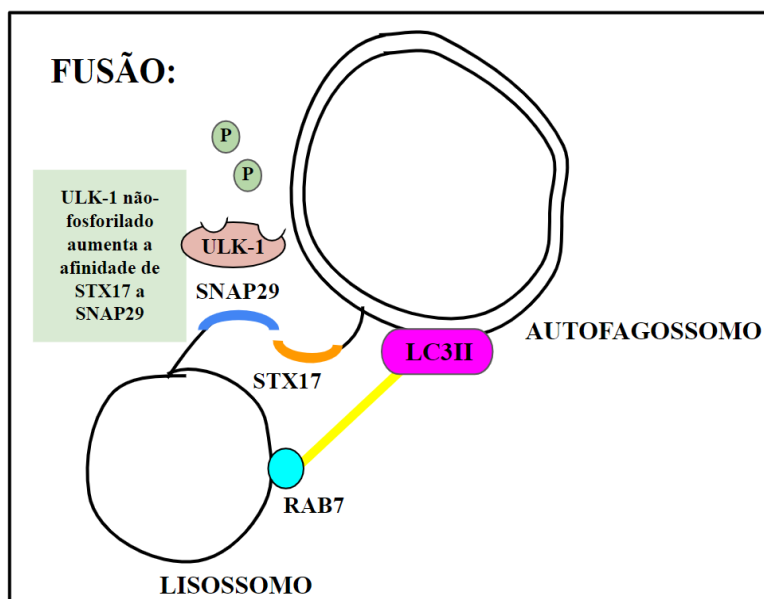


Figura 3 - Esquema simplificado da etapa de fusão da autofagia.

ULK-1, por sua vez, participa também da fusão do autofagossomo com o lisossomo (Figura 3). Quando em seu estado não fosforilado, ela recruta STX17 (membro da família SNARE), aumenta a afinidade desta última para SNAP29 e promove a fusão. Por outro lado, ULK-1 fosforilada tem reduzida afinidade por STX17, o que reduz a fusão entre o autofagossomo e o lisossomo (Wang et al., 2018).

Para que ocorra a fusão do autofagossomo com o lisossomo, é necessário que estas estruturas estejam muito próximas. Em situação de falta de nutrientes, ocorre uma mudança no pH intracelular e os lisossomos se acumulam na região perinuclear, onde estes e os autofagossomos chegam com auxílio dos microtúbulos. Uma vez próximos, a membrana externa do autofagossomo se funde à membrana lisossomal, processo que só é completado após a degradação da membrana interna do autofagossomo e exposição do seu conteúdo ao lúmen lisossomal (Jahreiss et al., 2008). Para que este processo ocorra, 3 categorias de ligantes são necessárias: HOPS, RAB7 e proteínas adaptadoras que conectam componentes do autofagossomo ou lisossomo (como LC3 e ATG12-ATG5) a ligantes específicos (como complexo SNARE, RAB7 ou o próprio complexo HOPS), aumentando a especificidade do processo. HOPS é um complexo proteico que interage com STX17 e favorece a fusão. Por fim, RAB7 é uma pequena GTPase que interage com fatores ligantes, aumentando a especificidade da fusão autofagossomo-lisossomo (Yu et al., 2018).

Durante seu trajeto até o lisossomo, o autofagossomo pode se fundir com endossomos, resultando nos chamados anfissomos (Berg et al., 1998). Esse processo faz parte da maturação do autofagossomo (Zhao et al., 2021). Vale citar também a relação entre os processos de autofagia e apoptose, os quais têm algumas proteínas em comum, como Beclina-1 e p53 (Kang et al., 2011; Mrakovcic e Fröhlich, 2018). Sabe-se que a autofagia pode favorecer a resistência de células malignas

frente às quimioterapias existentes por bloquearem o processo de apoptose. Por outro lado, a inibição da autofagia (por bloqueio da via de sinalização PI3K/AKT/mTOR), tem se mostrado capaz de ativar a apoptose e aumentar a sensibilidade de células malignas ao tratamento (Kondo et al., 2005).

2.3.2 Autofagia e CCE oral

A autofagia desempenha papel aparentemente ambíguo em diversos tipos de câncer, dentre os quais o próprio CCE oral (Abd El-Aziz et al., 2021). Ao mesmo tempo que apresenta atividade supressora de tumor em seus estágios iniciais (limitando danos celulares e a instabilidade genômica por indução do processo de senescência), em estágios mais avançados pode favorecer a progressão tumoral, criando condições para que as células malignas sobrevivam mesmo sob ação de diferentes agentes estressores (Abd El-Aziz et al., 2021). Assim, podemos considerar que tanto o aumento, quanto a diminuição da atividade autofágica podem modular de formas distintas a tumorigênese, dependendo do tipo celular e seu grau de anaplasia, no entanto, existem ainda muitas lacunas no conhecimento sobre o papel da autofagia nas neoplasias malignas (Anderson e Sullivan, 2022).

Marcadores da autofagia têm sido estudados a partir de linhagens celulares de CCE oral (Anderson e Sullivan, 2022). É imprescindível que tais estudos envolvam análises quantitativas e qualitativas destas moléculas, pois o LC3 (marcador mais usado para indicar autofagia), pode ser encontrado na superfície dos autofagossomos em diferentes estágios, desde a sua iniciação até a degradação lisossomal, e isso pode influenciar na análise dos resultados obtidos (Anderson e Sullivan, 2022). Outro fator que pode dificultar a interpretação dos resultados com o marcador LC3 é que seus níveis também podem aumentar em situações de inibição de degradação do autofagossomo, como na presença de inibidores lisossomais (Yoshii e Mizushima, 2017). Além disto, LC3 pode também ser incorporada em agregados proteicos, os quais podem ser confundidos com estruturas autofágicas se a análise se limitar à microscopia de fluorescência (Yoshii e Mizushima, 2017).

Como exemplo da autofagia como favorecedora da progressão do CCE oral, Tang et al. (2015) relacionaram o aumento da proteína ATG16L (que participa do alongamento da dupla membrana do autofagossomo) com uma menor sobrevida e fenótipo mais agressivo do tumor em pacientes portadores de CCE oral. Tem sido relatada também uma forte associação entre a expressão imuno-histoquímica de LC3II e P62, com um prognóstico ruim para pacientes com CCE oral (Liu et al., 2014; Terabe et al., 2018). Quanto à ação supressora de tumor, Xie et al. (2018) inibiram diretamente mTOR, o que permitiu livre formação de complexos ULK, e observaram uma inibição na proliferação celular em linhagens celulares de CCE de cabeça e pescoço (SCC-9, SQ20B e A253). Kim et al. (2012), a partir do tratamento com curcumina em células de CCE oral (linhagem YD10B), demonstraram ação antitumoral por induzir tanto à apoptose como a autofagia. Após o tratamento, os

autores encontraram aumento da conversão de LC3I para LC3II, que é um marcador para a formação de autofagossomos.

2.3.3 Autofagia e FASN

Recentemente, estudos *in vitro* têm confirmado uma relação entre autofagia e a enzima FASN em células de diversos tipos de câncer, como por exemplo nas células de câncer de mama (Huang et al., 2019). Estas células, assim como as do CCE oral apresentam altas taxas de lipogênese (Huang et al., 2019; Walz et al., 2018). Neste sentido, partindo de resultados prévios que confirmaram que a inibição da FASN por alfa-mangostin induz à apoptose e sabendo também que existe uma relação entre esta via de morte celular, estresse do retículo endoplasmático e autofagia, Huang et al. (2019) validaram estas informações associando o alfa-mangostin à inibição do estresse do retículo endoplasmático e da autofagia (Li et al., 2014). Como resultado, observou-se um aumento na indução à apoptose, confirmando a correlação entre estas vias (Huang et al., 2019).

Além disso, Yan et al. (2021) estudaram a correlação entre autofagia e síntese de ácidos graxos endógenos a partir de linhagens de células de adenocarcinoma de pulmão e carcinoma de células escamosas de pulmão. Para isto, utilizaram de resultados prévios com células de câncer de pulmão de células não pequenas, os quais validavam que o sulforafano tem capacidade de inibir a autofagia e ativar a via apoptótica nestas células (Hu et al., 2018). Buscando compreender o porquê desta inibição, Hu et al., (2018) comprovaram que o sulforafano tem uma ação indireta sobre a FASN e que isto leva a danos na membrana plasmática e na morfologia da mitocôndria (Yan et al., 2021). Estes danos na mitocôndria podem levar a um acúmulo de ROS e consequentemente, de mitocôndrias danificadas, o que ativa a via apoptótica da célula (Yan et al., 2021).

Como citado no item 2.2.1, a via PI3K/AKT atua na regulação da FASN e é também uma das principais vias associadas à ativação da autofagia, juntamente ao mTOR (Fhu e Ali, 2020; Xu et al., 2019). Em osteossarcomas, foi observado que uma ativação da via PI3K/AKT tem uma correlação positiva com a superexpressão de FASN (Wang et al. 2014). Além disto, evidências sugerem que substâncias que tenham como alvo a via PI3K/AKT interferem na autofagia e podem, por isto, suprimir o crescimento tumoral (Xu et al., 2019).

Por fim, é importante ressaltar que nosso grupo de pesquisa, ao tratar células SCC-9 com diferentes inibidores farmacológicos de FASN nas concentrações relativas ao seu IC50 (concentração inibitória média), observou que apenas parte das células pôde ser identificada pela marcação com Anexina V (indicador de apoptose e apoptose tardia) ou Pi (iodeto de propídio, indicador de necrose) em citometria de fluxo (8,83% com C75, 5,14% com ORL e 22,62% com triclosan) (Gráfico 1). Em

conjunto, estes resultados indicam que outros processos de morte celular, como por exemplo a autofagia, podem ser desencadeados pelos inibidores da atividade de FASN (Boelcke et al., 2022).

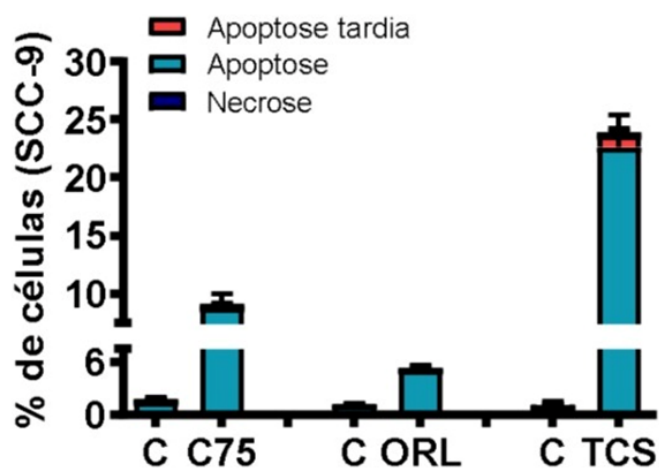


Gráfico 1- Porcentagem de células positivas para Anexina V (apoptose e apoptose tardia) e Pi (necrose) por citometria de fluxo após tratamento com diferentes inibidores de FASN em suas respectivas IC50.

Fonte: Boelcke et al., 2022.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 PROPOSIÇÃO GERAL

Avaliar se a enzima FASN tem algum papel sobre a expressão de genes relacionados ao processo de autofagia em linhagens celulares de CCE oral.

3.2 PROPOSIÇÃO ESPECÍFICA

Avaliar, por meio da técnica de qRT-PCR, a expressão de genes associados à autofagia nas células SCC-9 e SCC-9 shFASN-A4C.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CULTURA CELULAR

4.1.1 Cultura celular para extração de RNA

Nesta pesquisa utilizamos 2 linhagens celulares: SCC-9 (American Type Culture Collection) e SCC-9 shFASN-A4C (que derivam das células SCC-9 por serem transduzidas com plasmídeo short hairpin FASN).

Estas células foram cultivadas em frascos plásticos de 75 cm² (Corning, EUA) com meio de cultura DMEM/F12 (Invitrogen, E.U.A) enriquecido com 2% de soro fetal bovino (FBS, Cultilab, Brasil), 400 ng/mL de hidrocortisona (succinato sódico de hidrocortisona- Eurofarma, Brasil) e solução antimicótica e antibiótica (Invitrogen) diluída na proporção de 1:100 a 37°C, sob atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade. Atingidas confluências de aproximadamente 70%, os meios de cultura foram removidos, as células lavadas com PBS (solução salina tamponada com fosfato, pH 7,4) e posteriormente incubadas com tripsina-EDTA (0,25%) a 37°C por no máximo 5 minutos, até a liberação total das células do assoalho dos frascos (determinada por visualização em microscópio de contraste de fase). Para interromper a ação da tripsina, foram adicionados 10mL de meio de cultura enriquecido com 10% de FBS, criando desta forma uma suspensão de células que foi transferida para tubos estéreis de 15mL (Kasvi, Brasil), os quais foram centrifugados a 900 xg durante 3 minutos. Após a centrifugação, foram removidos os sobrenadantes e os pellets então ressuspensos em 5mL de meio de cultura contendo 2% de FBS. Com isso, foi possível a contagem das células em câmara de Neubauer e o replaqueamento em novos frascos de cultura celular. Os meios de cultura foram substituídos a cada 48 horas e todos os procedimentos realizados dentro de cabine de fluxo laminar.

O padrão de confluência celular definido para a realização das extrações de RNA e reações de western blotting foi de 70%, nos frascos plásticos de 75 cm² (Corning, EUA). Como as linhagens celulares estudadas apresentam diferentes comportamentos em cultura, foram utilizadas quantidades distintas de células no momento do plaqueamento (para realizarmos as extrações de RNA total após 48 horas, foram utilizadas 1,5 x 10⁶ células para a linhagem SCC-9 e 3,7 x 10⁵ células para a linhagem SCC-9 shFASN-A4C).

4.1.2 Cultura celular para reação de western blotting com kit LC3I-LC3II

O protocolo utilizado para manutenção das células em cultura foi o mesmo citado no item 4.1.1. Neste experimento, foram utilizadas 6 placas de cultura 10cm² (Biofil, China) para cultivo das duas linhagens celulares aqui estudadas. Foram 5 placas contendo a linhagem parental SCC-9 (p.47),

uma contendo apenas meio de cultura DMEM/F12 (Invitrogen, E.U.A) enriquecido com 2% de FBS (Cultilab, Brasil) e outras 4 tratadas ou não com Triclosan (TCS) em concentrações decrescentes a partir do IC50 do TCS (1x IC50; 0,5; 0,25 e 0) previamente calculado por nosso grupo de pesquisa (10,93 µg/mL para o tempo de 24 horas) (Boelcke et al., 2022). O TCS foi usado como controle positivo para autofagia, ao passo que o DMSO é o veículo desta droga. Para a linhagem SCC-9 shFASN-A4C (p. 14) utilizou-se apenas 1 placa contendo apenas meio de cultura DMEM/F12 (Invitrogen, E.U.A) enriquecido com 2% de FBS (Cultilab, Brasil).

Foram 5 dias corridos de experimento em cultura celular, segundo o Quadro 1.

Quadro 1- Cronograma seguido para cultura celular das linhagens SCC-9 p.47 e SCC-9 shFASN p. 14 para western blotting com kit LC3I-LC3II.

	SSC-9 (p. 47)	SCC-9 shFASN (p. 14)
Dia 1	Plaqueamento de 8.10^5 células em cada placa (5) em 6mL de meio de cultura DMEMF12 + 10% FBS.	Plaqueamento de 2.10^5 células em 6mL de meio de cultura DMEMF12 + 10% FBS.
Dia 2	Carenciamento de FBS.	
Dia 3	- 6mL de meio de cultura DMEMF12 + 2% FBS; - Tratamento dos controles com as concentrações de TCS citadas no item 4.1.2.	6mL de meio de cultura DMEMF12 + 2% FBS.
Dia 4	Registro fotográfico com microscópio de contraste de fase (Nikon Eclipse Ti).	
Dia 5	- Registro fotográfico com microscópio de contraste de fase (Nikon Eclipse Ti). - Congelamento de pellets celulares obtidos para preparação de extratos proteicos	

4.2 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS, QUANTIFICAÇÃO E REAÇÕES DE WESTERN BLOTTING

4.2.1 Para avaliar a expressão de FASN

No momento das extrações de RNA total das linhagens estudadas, foram congelados 2 pellets para cada uma delas, a partir de frascos de cultura mantidos nas mesmas condições de cultura celular (meio DMEMF12 + 2% FBS e 70% de confluência). Para isto, as células foram tripsinizadas, centrifugadas a 900 xg por 3 minutos, os sobrenadantes removidos e os pellets ressuspensos em 1mL de PBS. Este conteúdo foi transferido para frascos do tipo eppendorf de 1,5mL, os quais foram centrifugados novamente por 3 minutos a 900 xg a 4°C. Em seguida, os sobrenadantes foram

removidos e as amostras armazenadas a -80°C. Para a extração de proteínas, adicionou-se a cada um destes pellets 70µL de tampão de lise contendo 1g sacarose, 500µL de NP40, 1mL de Tris/HCl 1M, 6,85 mL de NaCl 1M, 5 mL de glicerol e 200µL de EDTA 5mM, e inibidores de protease 7x concentrado em proporção de 8,5:1,5 (Complete Mini Cocktail, Roche Diagnostics – Mannheim, Alemanha) e, após agitação em vórtex por 3 vezes de 10 segundos, com intervalo de 10 minutos em gelo, os sobrenadantes foram coletados, transferidos para outros tubos e imediatamente armazenados a -80°C. Para quantificação da concentração de proteínas de cada amostra, utilizou-se o método de Bradford (Bradford, 1976), com o reagente de Bradford (Bio-Rad, EUA) em um espectrofotômetro Spectronic Unicam Genesys com ajuste para 595 nm.

Trinta microgramas de cada extrato proteico foram separados em géis de poliacrilamida-SDS a 8%, transferidas para membranas de nitrocelulose (Protran, Schleicher e Schuell, Keene, NH) e corados com Ponceau S (Sigma) para verificação da qualidade da eletroforese e da transferência. Em seguida, as membranas foram bloqueadas com leite em pó desnatado a 5% diluído em Tris-HCl pH 7,6, contendo 150 mM de NaCl e 0,1% de Tween-20 (TBST), e receberam os anticorpos primários específicos contra FASN (diluídos a 1:3000, para detectar bandas de aproximadamente 265kDa) e contra beta-actina (diluídos a 1:10.000, para detectar bandas ao redor de 42kDa). Feito isto, as membranas foram lavadas em TBST e incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase, diluídos a 1:1.000 em TBST. Posteriormente, as membranas foram novamente lavadas e as reações reveladas com sistema de detecção (ECL detection kit, Amersham Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL), seguindo-se as instruções do fabricante.

4.2.2 Para avaliar a expressão de LC3I e LC3II

No quinto dia (descrito no Quadro 1) foram congelados os pellets de células obtidos a partir de cada uma das placas em cultura. Para isto, as células foram tripsinizadas, centrifugadas a 900 xg por 3 minutos, os sobrenadantes removidos e os pellets ressuspensos em 1mL de PBS. Este conteúdo foi transferido para tubos do tipo eppendorf de 1,5mL, os quais foram centrifugados novamente por 3 minutos a 900 xg a 4°C, os sobrenadantes removidos e as amostras armazenadas a -80°C. Para a extração de proteínas, foram adicionados a cada um deste pellets 70µL de tampão de lise contendo 1g sacarose, 500µL de NP40, 1mL de Tris/HCl 1M, 6,85 mL de NaCl 1M, 5 mL de glicerol e 200µL de EDTA 5mM, e inibidores de protease 7x concentrado em proporção de 8,5:1,5 (Complete Mini Cocktail, Roche Diagnostics – Mannheim, Alemanha), os tubos vortexados por 10 segundos por 3 vezes, com intervalo de 10 minutos em gelo, os sobrenadantes coletados e transferidos para outros frascos do tipo eppendorf e imediatamente armazenados a -80°C. Para quantificação de proteína de cada amostra, utilizou-se o método de Bradford (Bradford, 1976), com o reagente de Bradford (Bio-Rad, EUA) em um espectrofotômetro Spectronic Unicam Genesys com ajuste para 595 nm.

Cinquenta microgramas de cada extrato proteico foram separados em géis de poliacrilamida-SDS a 10%, transferidos para membranas de nitrocelulose (Protran, Schleicher e Schuell, Keene, NH) e corados com Ponceau S (Sigma) para verificação da qualidade da eletroforese e da transferência. Em seguida, as membranas foram bloqueadas com leite em pó desnatado a 5% diluído em Tris-HCl pH 7,6, contendo 150 mM de NaCl e 0,1% de Tween-20 (TBST), e receberam os anticorpos primários específicos contra LC3BI e LC3BII (Abcam 51520), diluídos a 1:3000, para detectar bandas de aproximadamente 15kDa, e contra gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH, Cell Signaling 14C10), a 1:1000, para detectar bandas ao redor de 37 kDa. Feito isto, as membranas foram lavadas em TBST e incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase, diluídos a 1:1.000 em TBST. Posteriormente, as membranas foram novamente lavadas e as reações reveladas com sistema de detecção (SuperSignal West Pico Plus Chemiluminescent Substrate Thermo 34580), seguindo-se as instruções do fabricante.

4.3 EXTRAÇÕES DE RNA TOTAL, GÉIS PARA AVALIAR A QUALIDADE DOS RNAS OBTIDOS E CONVERSÃO PARA CDNAS

4.3.1 Extrações de RNA total e quantificação em equipamento Nanodrop

Como supracitado, a extração de RNA foi realizada apenas quando as células atingiram uma confluência de 70% em frascos plásticos de 75 cm² (Corning, EUA). Portanto, a escolha do momento da coleta das células e extração do RNA total foi principalmente o estado de confluência e não somente o tempo de cultivo.

Atingidas as confluências celulares de cerca 70%, adicionou-se 1,5 mL de reagente Trizol em cada frasco de cultura, o que foi seguido de agitação suave por 15 minutos. Posteriormente, as soluções foram homogeneizadas e transferidas para tubos eppendorf de 2mL, aos quais foram também adicionados 300µL de clorofórmio. Estas misturas foram agitadas manualmente por 30 segundos e, em seguida, deixadas em repouso por 3 minutos a temperatura ambiente. Após o repouso, os tubos foram centrifugados a 4°C e 11.652 xg durante 15 minutos. Esta etapa de centrifugação resulta em 3 diferentes fases, das quais foram coletadas cuidadosamente apenas as fases transparentes, que foram em seguida transferidas para tubos eppendorf de 1,5 mL. A estes tubos foram adicionados 750 µL de isopropanol, o que foi seguido de nova homogeneização manual, lenta e delicada, por 30 segundos. A mistura foi incubada a temperatura ambiente por 10 minutos, quando os tubos foram centrifugados a 4°C e 11.652 xg por mais 10 minutos. Os sobrenadantes foram removidos e aos pellets obtidos foi adicionado 1 mL de etanol a 75% gelado, seguido de nova centrifugação a 4°C por 5 minutos, desta vez a 7.903 xg. Neste momento, todo o etanol foi removido, mantendo cuidadosamente os pellets nos fundos dos tubos até a secagem completa.

Após a secagem (por cerca de 30 minutos), foram adicionados 20 μ L de água DNA/RNase-free para a dissolução dos RNAs totais obtidos e os tubos colocados imediatamente no gelo para posterior leitura em aparelho Nanodrop (2000C, Thermo Scientific). As leituras foram realizadas adicionando-se 2 μ L de água DNA/RNase-free no leitor como “blank”. Em seguida, foram adicionados 2 μ L das amostras de cada RNA total para as avaliações das concentrações e razões. Por fim, as amostras de RNA total foram imediatamente armazenadas em freezer -80°C. Cada purificação de RNA foi feita em duplicata.

4.3.2 Géis para avaliação da qualidade dos RNAs totais obtidos

Agarose (0,65g) foi diluída em 5mL de 10X FA buffer com 45mL de água MiliQ autoclavada. Após homogeneização, a suspensão foi levada ao forno de micro-ondas por cerca de 45 segundos, para a completa dissolução da agarose. Em seguida, 900 μ L de formaldeído foram adicionados e, após a mistura completa, esta solução foi vertida no suporte do aparato de eletroforese, onde recebeu 5 μ L do corante gel Red e, finalmente, foi encaixado o pente. Após a solidificação (cerca de 30 minutos), o pente foi removido e o gel cuidadosamente inserido na cuba de eletroforese. Feito isto, adicionou-se o RNA running buffer (FA Buffer 1X) e aguardou-se mais 30 minutos para estabilização.

As amostras foram preparadas em tubos de 600 μ L, adicionando-se 2 μ L de RNA Loading dye, 8 μ L de água RNA/DNase-free e 2 μ g de cada amostra de RNA total, os quais foram homogeneizados delicadamente. Dez microlitros de cada amostra recém preparada foram adicionados em cada poço do gel e a eletroforese iniciada com a fonte ajustada para 100V, durante 40 minutos. Após finalização da corrida, os géis foram analisados e documentados em aparelho fotodocumentador (Uvitec, Cambridge).

4.3.3 Conversão dos RNAs totais em cDNAs

Para a conversão dos RNAs totais em moléculas de cDNA, foi utilizado o kit RT2 First Strand (Qiagen), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Primeiramente foi preparada a solução para eliminação de traços DNA genômico, como mostrado na Tabela 1, adicionando-se, em sequência, a água RNase-free, o tampão GE e, por fim, a amostra de RNA total (0,5 μ g).

Tabela 1- Componentes da solução para eliminação de DNA genômico (kit RT2 First Strand, Qiagen).

Linhagem celular	Leitura Nanodrop	RNA (uL)		Água RNase-free (uL)
	(ng/uL)		Buffer GE (uL)	
SCC-9 p.42	1928,5	0,26	2	7,74
SCC-9 shFASN A4C p. 9	1752,6	0,28	2	7,72

Cada uma das amostras foi suavemente misturada por pipetagem e, em seguida, foram brevemente centrifugadas. A seguir, cada tubo foi incubado por 5 minutos a 42°C e imediatamente colocado no gelo por 1 minuto, quando receberam 10uL de mistura de transcrição reversa, preparada de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2- Reação de transcrição reversa (kit RT2 First Strand, Qiagen).

Componente	Volume para 2 reações (µL)
Água RNase-free	6
5X Buffer BC3	8
Control P2	2
RE3 mix de transcriptase reversa	4
Volume total	20

Fonte: Elaborada a partir de protocolo disponível em www.qiagen.com, referente ao kit RT² Profiler PCR Array (96-Well Format, número de catálogo 330231 PAHS-084ZA).

Os tubos contendo a mistura de eliminação de DNA genômico e de transcrição reversa foram incubados em equipamento termociclador (Veriti 96 Well Thermal Cycler, Applied Biosystems) de forma sequencial a 42°C por 15 minutos e 95°C por 5 minutos. Por fim, foram adicionados 91µL de água RNase-free a cada tubo, misturando-se por pipetagem. As amostras foram armazenadas em freezer -20°C.

4.4 REAÇÕES DE RT-PCR

As reações de RT-PCR foram preparadas a partir do master mix RT2 SYBR Green (Qiagen) de acordo com protocolo do fabricante, uma vez que utilizamos placas de 96 poços contendo primers para amplificação de genes específicos para autofagia da mesma empresa (RT2 Profiler PCR Array, Qiagen). Para isto, o master mix RT2 SYBR Green foi brevemente centrifugado para trazer o conteúdo para o fundo do tubo. Em seguida, foi preparada a mistura de componentes de PCR em um tubo de 5mL, de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3- Preparo da amostra para PCR (kit RT2 First Strand, Qiagen).

Componente	Volume (μL)
Mastermix 2x RT2 SYBR Green	1350
Amostra de cDNA	102
Água RNase-free	1248
Volume total	2700

Fonte: Elaborada a partir de protocolo disponível em www.qiagen.com, referente ao kit RT² Profiler PCR Array (96-Well Format, número de catálogo 330231 PAHS-084ZA).

A reação de RT PCR para a linhagem SCC-9 shFASN-A4C p.9 foi realizada a partir da distribuição dos componentes acima no RT2 PCR Array (25μL da mistura em cada poço). A seguir, a placa foi selada com filme adesivo óptico do próprio fabricante e centrifugada por 1 minuto a 1000xg em temperatura ambiente para remoção de possíveis bolhas de ar e levada imediatamente para o gelo, enquanto se realizava a configuração do programa de ciclagem de PCR no termociclador LightCycler 480 (Roche). Ajustada a configuração do programa, de acordo com as instruções do fabricante (Quadro 2), a reação de RT-PCR foi realizada.

Quadro 2- Configuração do programa de ciclagem de PCR realizado, de acordo com as instruções do fabricante (Qiagen) para o termociclador Roche Light Cycler 480.

Program	Target (°C)	Acquisition mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp rate (°C/s)	Acquisition (per °C)	Sec target (°C)	Step size (°C)	Step delay (cycles)
Heat activation (1 cycle)	95	None	00:10:00	4.4	-	0	0	0
PCR Cycling (45 cycles)	95	None	00:00:15	1.5	-	0	0	0
	60	Single	00:01:00	1.5	-	0	0	0
Melt Curve (1 cycle)	60	None	00:00:15	4.4	-	-	-	-
	95	Continuous	-	0.03	20	-	-	-

Fonte: Elaborado a partir de protocolo disponível em www.qiagen.com, referente ao kit RT² Profiler PCR Array (96-Well Format, número de catálogo 330231 PAHS-084ZA).

Os valores de Ct (“cycle threshold”) obtidos com a reação de RT-PCR variaram de 0 a 40 e, para organizá-los em uma escala de 0 a 10, dividimos todos estes valores por 4. Em seguida, os subtraímos do valor de 10 e os ordenamos de forma decrescente quanto à expressão gênica. Estes valores foram então comparados aos dados *in silico* da expressão dos mesmos genes aqui estudados na linhagem celular parental SCC-9 (controle), extraídos do portal DepMap (Broad Institute-

www.depmap.org). Este banco público de dados biológicos foi utilizado para contornar a falta dos dados do RT-PCR *array* realizado com as células SCC-9 (controle), os quais foram perdidos por problemas técnicos. Neste banco, os dados estão expressos em TPM (transcritos por milhão) e foram organizados em uma escala de 0 a 10, em ordem decrescente de expressão. A partir destas comparações, realizou-se a seleção dos genes que serão utilizados nas próximas reações de RT-PCR de validação. Os genes selecionados foram aqueles se apresentaram nos extremos opostos no *Heat Map* (Figura 13) das duas linhagens celulares (SCC-9 e SCC-9 shFASN-A4C) e que fazem parte da via principal da autofagia (Figura 14).

4.5 ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Cada ensaio de proliferação teve duração de 1 semana. No primeiro dia, foram plaqueadas $1,25 \times 10^3$ células de cada linhagem estudada em poços de placas de 96 poços, com 250µL de meio de cultura DMEM-F12 com 2% de FBS. Estas células foram incubadas por 24 horas e, após este período, passaram por 24 horas de carenciamento com meio de cultura DMEM-F12 sem FBS, com o objetivo de deixar semelhantes os ciclos celulares. No terceiro dia, o meio de cultura sem FBS foi substituído por um meio de cultura DMEM-F12 enriquecido com 2% de FBS, aguardou-se mais 24 horas, e iniciaram-se as contagens sucessivas nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas. Para cada contagem, as células de poços referentes foram tripsinizadas como descrito anteriormente no item 4.1.1, com diferenças nos volumes de PBS (200µL), tripsina (80µL) e de meio de cultura DMEMF12 + 10%FBS para ressuspender as células (250µL) e contadas em câmara de Neubauer.

5 RESULTADOS

5.1 CULTURA CELULAR, EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS, E REAÇÕES DE WESTERN BLOTTING

5.1.1 Western blotting para avaliar a produção de FASN nas células SCC-9 e SCC-9 shFASN-A4C.

Na Figura 4 pode-se observar registros fotográficos das linhagens celulares estudadas neste projeto. Observa-se uma morfologia semelhante entre elas, principalmente entre a linhagem parental SCC-9 e a SCC-9 EVB, com um aspecto poligonal. No entanto, a linhagem parental SCC-9 possui algumas células mais fusiformes e que tendem a crescer em ninhos, o que não é tão evidente na SCC-9 EVB. Além disto, a linhagem SCC-9 shFASN-A4C possui células que variam de aspecto poligonal a arredondado.

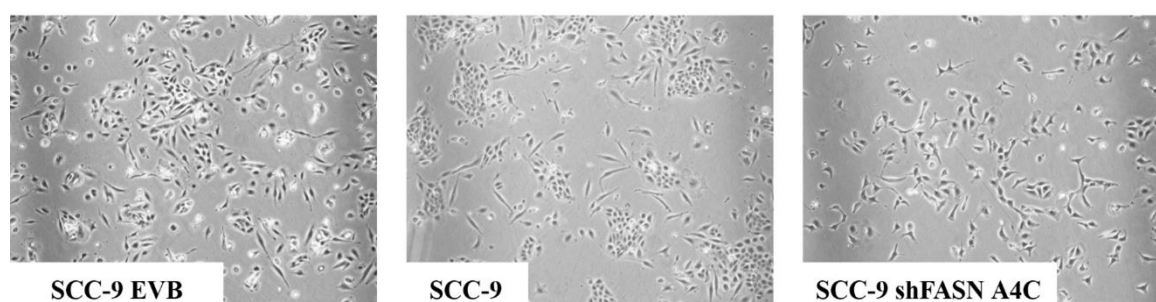


Figura 4 - Registros fotográficos das linhagens celulares SCC-9 EVB (p.13), SCC-9 (p.44) e SCC-9 shFASN-A4C (p.17) durante cultura celular para padronização de confluência. Microscopia de contraste de fase, aumento original 40X.

A partir da observação dos diferentes comportamentos em cultura das linhagens celulares estudadas neste projeto de pesquisa, bem como para confirmar a redução da produção da enzima FASN nas células SCC-9 shFASN-A4C, foram inicialmente realizadas reações de western blotting com anticorpos específicos para esta enzima (Figura 5, parte superior).

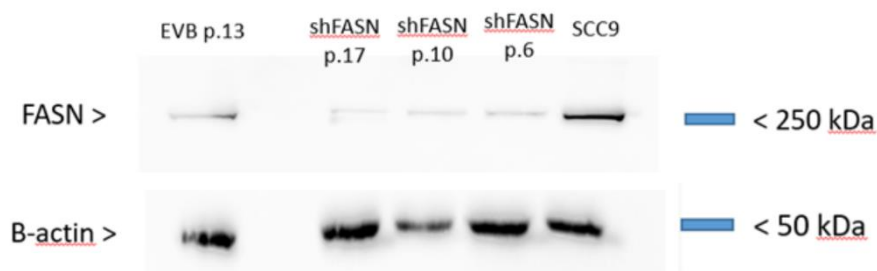


Figura 5 - Western blotting para avaliar a produção de FASN nas diferentes linhagens celulares estudadas no presente projeto.

Esperava-se que a linhagem SCC-9 EVB, construída para ser o controle negativo por portar o vetor vazio, apresentasse expressão de FASN semelhante às células SCC-9. No entanto, como observado no resultado representativo da Figura 5, a SCC-9 EVB mostrou produção baixa de FASN, embora ainda um pouco maior do que a encontrada nas células SCC-9 shFASN-A4C. Este fato pode sugerir alguma falha ou efeito secundário e indesejado em consequência ao processo de transdução pelo qual esta linhagem celular foi submetida. Desta forma, optamos por não mais utilizá-la como controle no presente trabalho. Para esta finalidade, trabalhamos somente com a linhagem SCC-9 parental, que produz grande quantidade da enzima FASN (Figura 5).

Por outro lado, a linhagem SCC-9 shFASN-A4C apresentou, como esperado, as menores taxas de produção da enzima FASN, o que se manteve até a passagem máxima avaliada (p.17, Figura 5). Com este grau de silenciamento do gene que codifica FASN, esperava-se que a capacidade de adesão destas células estivesse comprometida, baseando-se em resultados obtidos em estudo prévio de nosso grupo de pesquisa. Estes resultados mostraram que a inibição farmacológica de FASN com TCS reduz de forma dose-dependente a adesão das células SCC-9 a placas de cultura previamente sensibilizadas com fibronectina ou colágeno tipo I (Boelcke et al., 2022). Curiosamente, comparando-se com a linhagem celular parental SCC-9, a linhagem SCC-9 shFASN-A4C parece aderir à superfície dos frascos plásticos de 75 cm² (Corning, EUA) com maior facilidade, além de crescer mais rapidamente e atingir maiores confluências em menor tempo. Com o objetivo de investigar melhor as características fenotípicas decorrentes do silenciamento de FASN, padronizamos ensaios de proliferação celular.

Partindo da observação do comportamento das duas linhagens celulares trabalhadas em cultura, optou-se por reduzir a concentração de FBS para 2%, de acordo com dados prévios do nosso grupo e de outros pesquisadores (Aquino et al., 2020; Pascual et al., 2017), com o objetivo de atenuar as diferenças de comportamento entre as linhagens SCC-9 shFASN-A4C e SCC-9.

5.1.2 Avaliação da produção de LC3I e LC3II nas linhagens celulares estudadas

Jin et al. (2020) demonstraram em células de melanoma da linhagem A375 que o TCS pode induzir à autofagia. Também, Wang et al. (2018) demonstraram em macrófagos da linhagem Raw264.7 que o tratamento com TCS aumenta a razão LC3II/LC3I e a formação de autofagossomos, o que indica um aumento da atividade autofágica. Neste sentido, este composto foi utilizado como controle positivo para este experimento, em 3 diferentes concentrações. Na Figura 6 podemos observar os registros fotográficos dos dias 4 e 5 de cultura celular da linhagem SCC-9, que manteve seu aspecto padrão poligonal com algumas células de aspecto mais fusiforme. Também, pode-se observar que as células não tratadas com TCS ou tratadas com seu IC_{12,5} tiveram um aumento na confluência tanto no dia 4 como no dia 5, o que não ocorreu nas células tratadas com TCS em seu IC₂₅ ou IC₅₀.

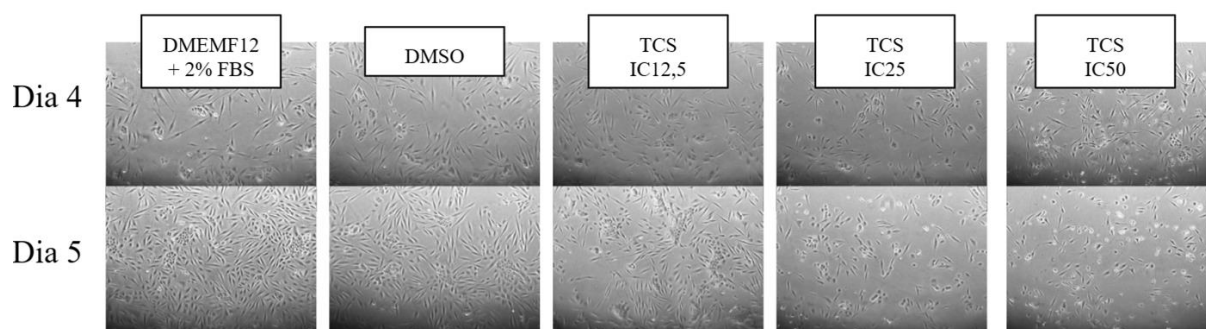


Figura 6 - Registros fotográficos referentes aos dias 4 e 5 da cultura celular da linhagem SCC-9 para o experimento de western blotting para LC3I e LC3II. Microscopia de contraste de fase, aumento original 40X.

Na Figura 7 pode-se observar os registros fotográficos dos dias 4 e 5 da cultura celular da linhagem SCC-9 shFASN-A4C. Nota-se que estas células são capazes de atingir maiores confluências em menor período de tempo e que apresentam morfologia que varia de poligonal a arredondada.

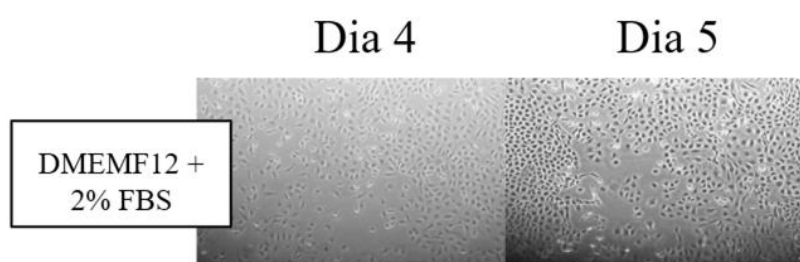


Figura 7 - Registros fotográficos referentes aos dias 4 e 5 da cultura celular da linhagem SCC-9 shFASN-A4C para o experimento de western blotting para LC3I e LC3II. Microscopia de contraste de fase, aumento original 40X.

Na Figura 8 pode-se observar o resultado do experimento de western blotting para LC3BI e LC3BII. Seu objetivo é fornecer informação sobre a atividade autofágica nestas linhagens celulares, uma vez que estudos prévios definem o LC3B como um importante marcador de autofagia, embora se deva ter cautela na interpretação dos resultados (Anderson e Sullivan, 2022; Mizushima e Yoshimori, 2007). Observa-se, nesta figura, que as células SCC-9 shFASN-A4C parecem acumular LC3BI (banda superior), portanto, devem estar mais preparadas para iniciar o processo de autofagia do que as células parentais SCC-9, nas quais esta banda proteica é mais fraca. No entanto, um estudo mais detalhado do processo de conversão de LC3BI para LC3BII nas células SCC-9 shFASN-A4C será necessário para o melhor entendimento deste ponto.

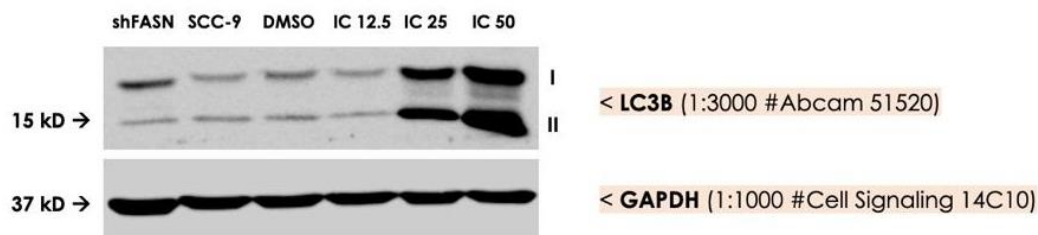


Figura 8 - Western blotting para LC3BI, LC3BII e GAPDH referente às linhagens celulares e tratamentos apresentados no Quadro 1. IC12,5, IC 25 e IC 50 são referentes às doses de TCS utilizadas para tratar as células SCC-9.

5.2 EXTRAÇÕES DE RNA TOTAL, LEITURA EM NANODROP E ANÁLISES EM GÉIS DE QUALIDADE

As extrações de RNA foram feitas quanto atingida confluência celular de aproximadamente 70% para as linhagens estudadas, como demonstra a Figura 9.

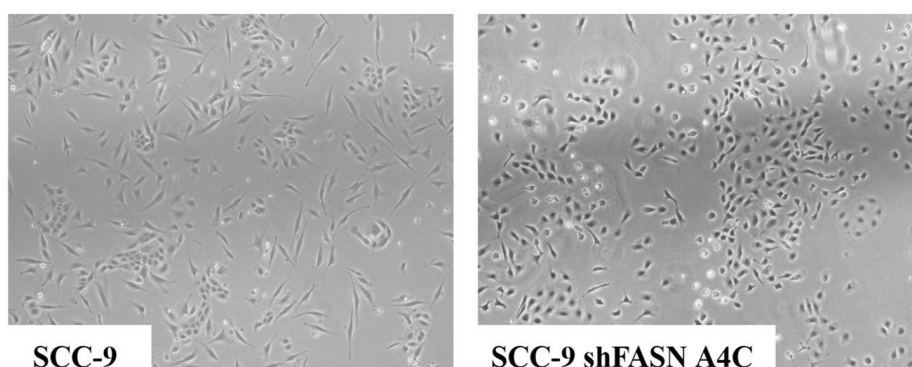


Figura 9 - Padrão de confluência determinado para a extração de RNA total das linhagens celulares estudadas (SCC-9 e SCC-9 shFASN-A4C). Microscopia de contraste de fase, aumento original 40X.

Observamos nitidamente diferenças fenotípicas entre as células parentais e as que tiveram a produção de FASN silenciada. Enquanto a linhagem SCC-9 manteve-se crescendo no formato de ninhos de células poligonais ou fusiformes, as células SCC-9 shFASN-A4C apresentam aspecto poligonal ou arredondado. Os RNAs totais extraídos das linhagens celulares aqui estudadas tiveram a concentração estimada em equipamento Nanodrop (2000C, Thermo scientific), com os valores obtidos exibidos na Tabela 4.

Tabela 4 - Resultados das leituras em aparelho Nanodrop para os RNAs totais extraídos de 2 linhagens celulares estudadas (SCC-9 shFASN-A4C p.9 e p.18, e SCC-9 p.42).

#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type	Factor
1		Patologia	10/07/2023 16:07:33	-0,4							
2	(Reblank)	Patologia	10/07/2023 16:08:00	0,2	ng/ μ l	0,005	0,001	5,24	-0,92	RNA	40,00
3	shFASN P.9	Patologia	10/07/2023 16:12:07	1752,6	ng/ μ l	43,816	22,426	1,95	1,68	RNA	40,00
4	shFASN P.18	Patologia	10/07/2023 16:15:49	2237,1	ng/ μ l	55,927	29,607	1,89	1,34	RNA	40,00
5	SCC9 P.42	Patologia	10/07/2023 16:18:55	1928,5	ng/ μ l	48,213	24,465	1,97	1,65	RNA	40,00

Em seguida, realizou-se a análise subsequente de qualidade dos RNAs totais obtidos por meio de corrida em géis de agarose, com os resultados mostrados na Figura 10. Nesta figura pode-se observar a excelente qualidade de todas as amostras de RNA purificadas, que não apresentam sinais de degradação. Desta forma, pudemos partir para a próxima etapa do nosso trabalho, que consiste nas reações de RT-PCR para análise dos genes relacionados ao processo de autofagia. Este foi o padrão de qualidade seguido também para as amostras de replicata.

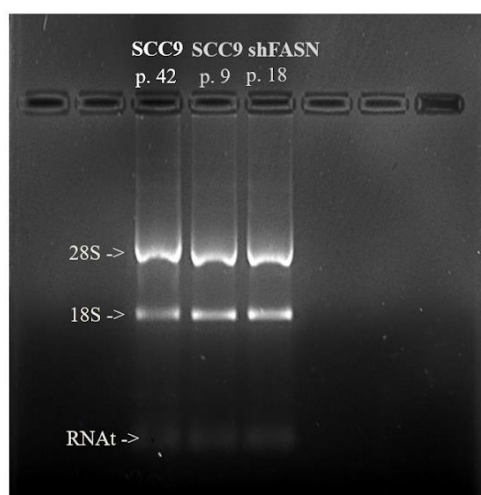


Figura 10- Análise dos RNAs totais purificados em gel de agarose. Cada canaleta do gel contém 1 micrograma de RNA total.

5.3 REAÇÃO DE RT-PCR

Após a conclusão da reação de RT-PCR (RT2 Profiler PCR Array, Qiagen) para o cDNA da linhagem SCC-9 shFASN-A4C (p.9), obtivemos a T_m (temperatura de *melting*, Figura 11) e o Ct (“*cycle threshold*”, Figura 11) de cada um dos genes presentes na placa. A T_m das amostras variou entre 60 e 85 °C e o Ct entre 19 e 40 ciclos, sendo os genes mais expressos representados pelos menores valores de Ct. A seguir, os valores dos Cts obtidos foram organizados em um *Heat Map* na escala de 0 a 10, em ordem decrescente de expressão (Figura 12), para que desta forma fosse possível a comparação destes resultados com os valores selecionados dos dados obtidos *in silico* referentes à

linhagem parental SCC-9 (extraídos da plataforma DepMap, Broad Institute – www.depmap.org) e apresentados em TPM (transcritos por milhão).

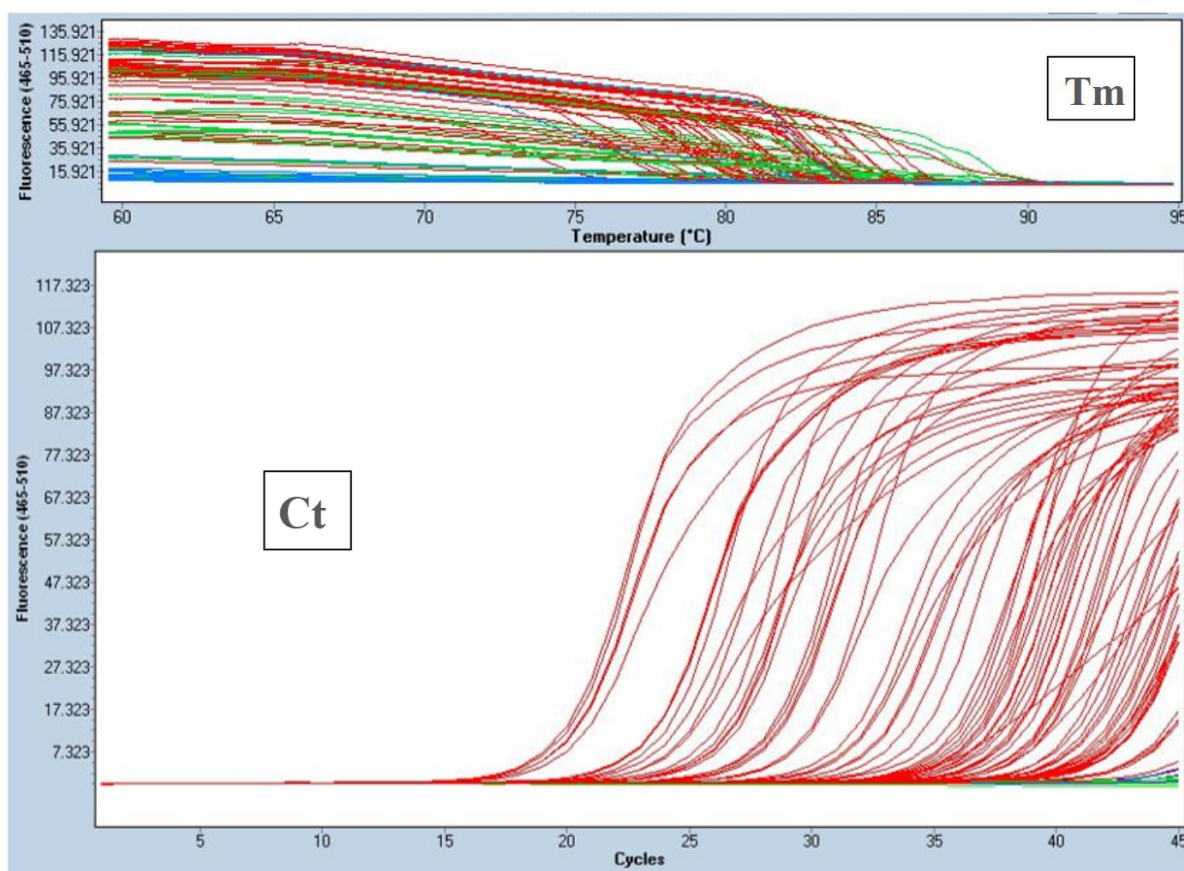


Figura 11- Gráficos fornecidos pelo software do equipamento Light Cycler 480 (Roche) para Tm (fluorescência x temperatura) e Ct (fluorescência x número de ciclos).

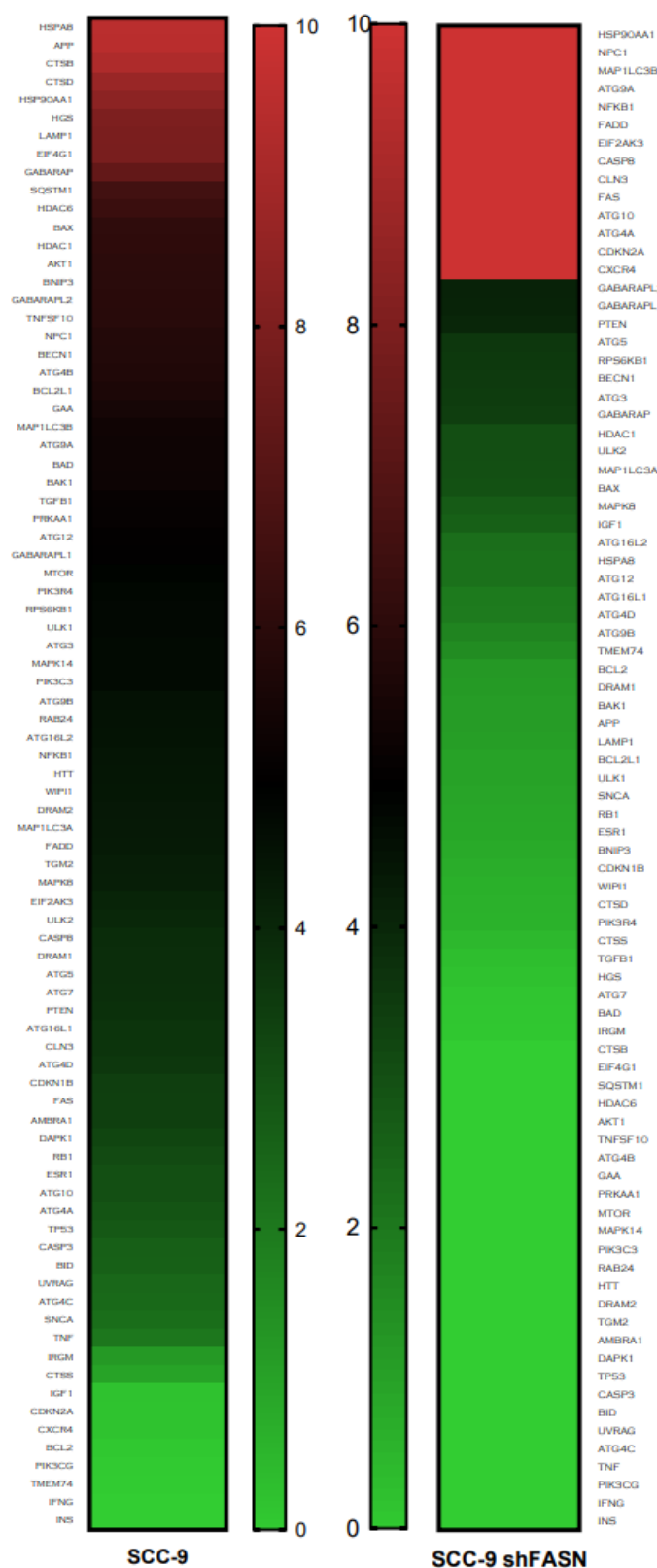


Figura 12 - *Heat Map* da expressão dos genes relacionados à autofagia estudados neste trabalho para as linhagens celulares SCC-9 e SCC-9 shFASN-A4C (ordem decrescente: vermelho = muito expresso, preto = moderadamente expresso, verde= pouco expresso). Os valores apresentados para a linhagem SCC-9 são provenientes de dados *in silico* expressos em TPM (transcritos por milhão) disponíveis na plataforma DepMap (Broad Institute- www.depmap.org). Os valores para a linhagem SCC-9 shFASN-A4C foram obtidos a partir das reações de RT-PCR *array*, realizadas no presente trabalho.

Os genes selecionados para as próximas reações de RT-PCR de validação, foram escolhidos por estarem nos extremos opostos dos dois *Heat Maps* e por apresentarem terem papel direto dentro da via principal da autofagia. São eles SQSTM1/p62 (com papel principal na etapa de iniciação da autofagia, Figura 13A); ATG4A, ATG5, ATG9A, ATG10 e MAP1LC3B (com papel principal nas etapas de enucleação, alongamento e expansão da autofagia, Figura 13B) (Campisi et al., 2022; Glick et al., 2010; Hamacher-Brady, 2012; Nakatogawa, 2020; Turco et al., 2020). O gene SQSTM1/p62 foi o único dos selecionados que apresentou alta expressão na linhagem parental SCC-9 e baixa expressão na linhagem SCC-9 shFASN-A4C. Os demais genes selecionados estão mais expressos na linhagem SCC-9 shFASN-A4C.

Embora o gene ATG9A não apareça em destaque na via principal da autofagia (Figura 13), optamos por mantê-lo na lista dos selecionados, pois participa da formação do autofagossomo e foi sugerido por Tang et al. (2013a) como um biomarcador prognóstico importante para pacientes com CCE oral.

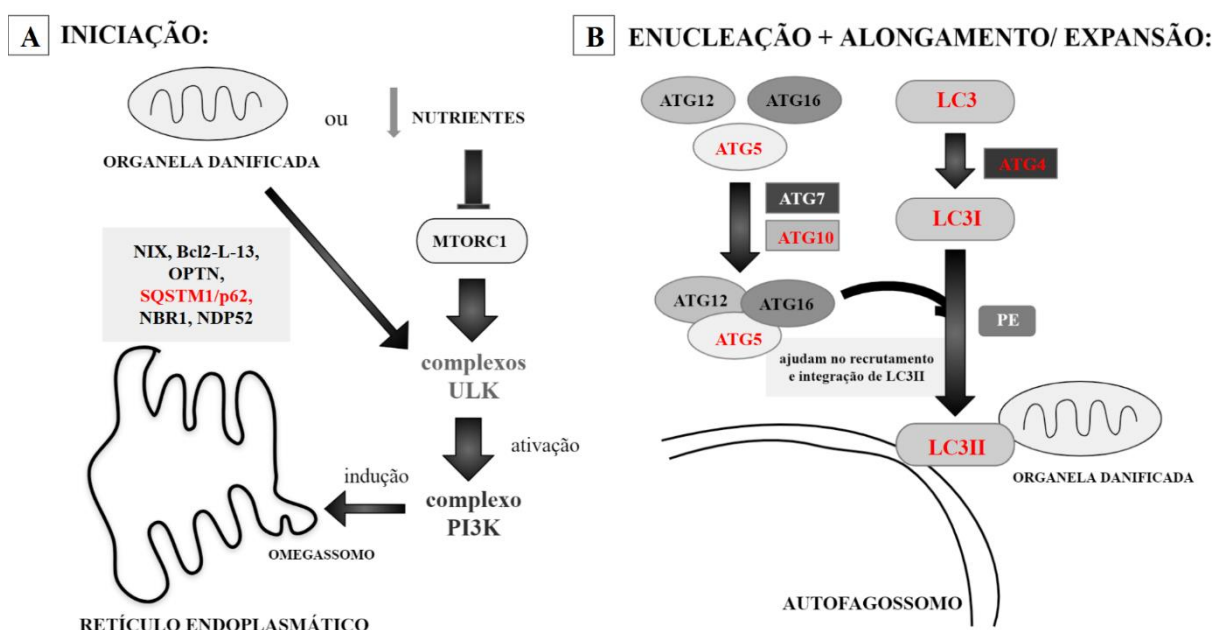


Figura 13- Esquema adaptado das fases de iniciação, enucleação e alongamento/ expansão da autofagia, com os genes selecionados destacados em vermelho. A) Etapa de iniciação da autofagia, com destaque no gene selecionado SQSTM1/p62. B) Etapas de enucleação e alongamento/ expansão da autofagia, com destaque nos genes ATG5, ATG10, ATG4A, LC3I e LC3II (estes dois últimos correspondentes ao MAP1LC3B).

5.4 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

As duas linhagens celulares estudadas neste projeto exibem comportamentos muito distintos em cultura. Enquanto a linhagem parental SCC-9 deva ser semeada em grandes quantidades,

levando mais tempo para aderir às placas de cultura, a linhagem SCC-9 shFASN-A4C requer uma menor quantidade de células para atingir a mesma confluência num dado intervalo de tempo. Assim, visando compreender melhor estas observações, foram conduzidos ensaios de proliferação, em triplicata. No Gráfico 2 pode-se observar o resultado destes ensaios, após plaqueamento inicial de 12.500 células, em placas de 96 poços. Pode-se observar que a linhagem SCC-9 shFASN-A4C prolifera mais rapidamente do que a linhagem parental SCC-9, embora apenas nos períodos de 72 e 96 horas estes valores sejam estatisticamente significativos ($p < 0.05$). Nos períodos anteriores (24 e 48 horas) os valores não apresentaram significância estatística. Estes experimentos validam as observações prévias durante o manejo destas duas linhagens celulares.

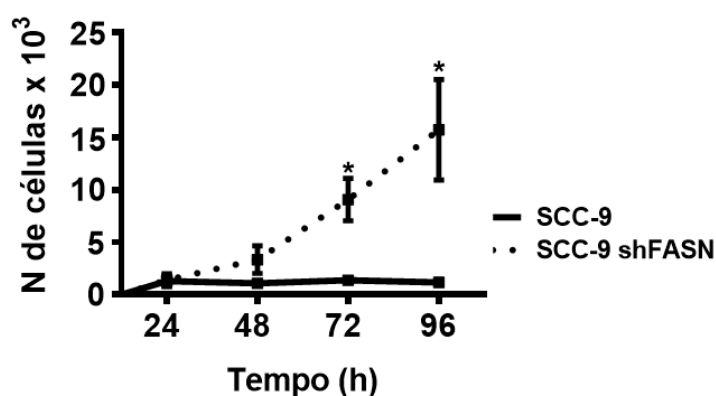


Gráfico 2- Proliferação das células SCC-9 e SCC-9 shFASN-A4C após 24, 48, 72 e 96 horas de acompanhamento. As células foram contadas em câmara de Neubauer, em cada período avaliado. O gráfico representa a média de três experimentos independentes. * $p < 0.05$, Teste T pareado.

6 DISCUSSÃO

FASN é a enzima anabólica responsável pela síntese endógena de ácidos graxos (Kuhajda, 2000; Menendez e Lupu, 2007). Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa têm demonstrado que FASN atua de forma importante na patogênese do CCE oral, pois suas células apresentam expressão aumentada desta enzima, em comparação com o epitélio adjacente morfológicamente normal (Silva et al., 2008). O presente trabalho utilizou uma linhagem celular previamente modificada em nosso laboratório para silenciar o gene que codifica FASN, denominada de SCC-9 shFASN-A4C, a qual, depois de isolada, apresentou comportamento distinto do esperado. Trabalhos prévios de nosso grupo demonstraram que a inibição de FASN com triclosan (TCS) reduz de forma dose-dependente a adesão das células SCC-9 às proteínas de matriz extracelular fibronectina e colágeno tipo I (Boelcke et al. 2022) e que o bloqueio da atividade de FASN com orlistat e TVB-3166 diminui a proliferação, viabilidade e migração das mesmas células (Agostini et al. 2004, 2014 e Aquino et al. 2020). Ao contrário destes consistentes achados anteriores, observamos no início da presente pesquisa, ao cultivar a linhagem SCC9 shFASN-A4C, que ela requer uma menor quantidade de células ao plaqueamento para atingir a mesma confluência que a linhagem parental SCC-9, em um mesmo período de tempo. Para confirmar estes achados, realizou-se ensaios de proliferação celular cujos resultados foram de encontro com o inicialmente observado, pois a linhagem SCC-9 shFASN-A4C mostrou taxas de proliferação significativamente maiores do que as da linhagem parental SCC-9 (Gráfico 2).

Com o objetivo de obter resultados preliminares sobre a atividade autofágica das duas linhagens celulares aqui estudadas, foram realizadas reações de western blotting para detecção das isoformas LC3BI e LC3BII, proteínas que participam da fase de enucleação e expansão da autofagia (Abd El-Aziz et al., 2021). Embora bastante interessante, a interpretação destes resultados deve ser realizada com cautela, uma vez que LC3BII tem maior imunorreatividade que LC3BI, além do fato de que os níveis de LC3BII variam de acordo com a atividade da via de degradação lisossomal (Mizushima e Yoshimori, 2007). Para elucidar este último ponto, serão realizados a seguir, por nosso grupo de pesquisa, experimentos com o inibidor de degradação lisossomal hidroxicloroquina. Até então, podemos concluir que a linhagem SCC-9 shFASN-A4C produz maiores quantidades (ou então acumula) de LC3BI (Figura 8), o que pode indicar que a fase de conjugação do processo de autofagia tenha sido iniciada, embora não esteja evidente a sua conversão para LC3BII, indicativa de formação do autofagossomo (Abd El-Aziz et al., 2021).

Além disto, resultados altamente indicativos de que a atividade da enzima FASN modula a autofagia vieram dos ensaios de RT-PCR (RT2 Profiler PCR Array, Qiagen) com primers específicos para genes relacionados às várias etapas da autofagia, realizados com RNA total da linhagem SCC-9 shFASN-A4C. É importante salientar aqui que nossa proposta inicial foi analisar por meio de RT-PCR

a expressão dos genes relacionados à autofagia também nas células parentais SCC-9, experimento que foi executado, mas, por problemas técnicos, seus resultados não puderam ser extraídos corretamente do software de análise do aparelho de PCR. Os resultados do ensaio de RT-PCR das células SCC-9 shFASN-A4C está resumido no *Heat Map* ilustrado na Figura 12. Para contornar a falta dos resultados de RT-PCR com RNA total da linhagem parental, decidimos por extrair dados *in silico* de expressão gênica da linhagem SCC-9 (disponíveis no site DepMap Portal- www.depmap.org e expressas em TPM) (Figura 12). Embora cientes de que estes valores não podem ser comparados de maneira quantitativa, realizou-se análise qualitativa, comparando as posições ocupadas por cada transcrito, organizados em ordem decrescente de expressão. O estudo dos *Heat Maps* obtidos (Figura 12) sugere que a expressão dos genes relacionados à autofagia é bastante diferente nas duas linhagens celulares estudadas. De modo a validar esta observação e compreender se estas diferenças estão ligadas ao silenciamento de FASN, serão realizados na sequência deste trabalho novos ensaios de RT-PCR com primers específicos para 6 genes da via principal da autofagia, os quais apresentaram as maiores diferenças de expressão em nossas análises entre as linhagens SCC-9 e SCC-9 shFASN-A4C. São eles: SQSTM1/p62, ATG4A, ATG5, ATG9A, ATG10 e MAP1LC3B.

Como citado anteriormente, o produto do gene SQSTM1/p62 participa do processo de iniciação da autofagia, sendo capaz de se ligar a MAP1LC3B e a proteínas ubiquitinadas, direcionando-as até o autofagossomo (Liu et al., 2018). No presente trabalho, observou-se que o SQSTM1/p62 está mais expresso na linhagem parental SCC-9 do que na linhagem SCC-9 shFASN-A4C. Alguns trabalhos têm associado a expressão deste gene a um pior prognóstico para o CCE oral (Bortnik e Gorski, 2017; Liu et al., 2014). Porém, Liu et al. (2018), após estudarem CCEs de diferentes sítios da cavidade oral, observaram associação entre o gene SQSTM1/p62 e menor sobrevida, associação que não foi observada em tumores de língua, dos quais a linhagem parental SCC-9 é derivada (Liu et al., 2018).

A proteína correspondente ao gene MAP1LC3B tem papel bem definido na etapa de alongamento do autofagossomo (Abd El-Aziz et al., 2021). Em nossos resultados, observa-se que há maior expressão de MAP1LC3B na linhagem SCC-9 shFASN-A4C do que na linhagem parental. Esta é uma informação que deve ser analisada futuramente com detalhes, pois a alta expressão deste gene tem sido associada a uma maior agressividade do CCE oral e a um pior prognóstico (Lai et al., 2018; Liu et al., 2014).

As proteínas correspondentes aos genes associados à autofagia (ATGs) têm papel na via clássica do processo. ATG4, ATG5 e ATG10 participam da etapa de alongamento do autofagossomo, sendo indispensáveis para a conversão de LC3 em LC3I e LC3II (Abd El-Aziz et al., 2021). Todos estes genes estão mais expressos de forma significativa na linhagem SCC-9 shFASN-A4C, segundo nossos dados. Pode-se associar estes achados ao estudo de Tang et al. (2013b), no qual a alta expressão

de ATG5 foi associada a graus mais avançados de CCE oral, além de maior volume tumoral e metástases linfonodais, embora sem correlação estatística com prognóstico. Estes achados contrastam aqueles descritos no estudo de Weng et al. (2014) mostrando que um aumento de ATG4 e ATG5 pode estar associado a uma inibição da proliferação, migração e invasão tumoral, enfatizam a necessidade de melhor se compreender o papel da autofagia na patogenia do CCE oral.

O gene ATG9A, embora raramente relatado como participante da via clássica da autofagia, tem papel importante na expansão e alongamento do autofagossomo (Tang et al., 2013a). Tang et al. (2013a) estudaram a expressão deste gene em tumores primários de CCE oral e observaram que a presença de ATG9A no citoplasma das células tumorais pode ser um biomarcador independente de prognóstico, recorrência e sobrevivência dos pacientes com esta doença. No presente trabalho, este gene também apresentou alta expressão na linhagem SCC-9 shFASN-A4C.

7 CONCLUSÕES

Baseando-se no que se tem na literatura científica até o presente momento sobre autofagia e CCE oral, os achados deste trabalho são promissores e podem auxiliar na compreensão do papel da síntese endógena de ácidos graxos no processo de autofagia nas células desta neoplasia. Estes resultados necessitam ainda de confirmação com novas reações de RT-PCR para cada um dos transcritos selecionados, de forma individual, e também com reações de western blotting e de imunofluorescência com anticorpos específicos para os seus respectivos produtos proteicos.

De maneira específica:

- a) As reações de western blotting para LC3BI e LC3BII mostram acúmulo de LC3BI na linhagem SCC-9 shFASN-A4C, indicando que a autofagia pode estar ativada.
- b) A linhagem celular com silenciamento genético de FASN tem um comportamento em cultura celular diferente da linhagem parental SCC-9, do qual se destaca a alta taxa de proliferação.
- c) O transcrito oriundo do gene SQSTM1/p62 foi mais expresso nas células parentais, ao passo que os transcritos provenientes dos genes ATG4A, ATG5, ATG9A, ATG10 e MAP1LC3B foram mais expressos na linhagem SCC-9 shFASN-A4C.

REFERÊNCIAS

Abd El-Aziz YS, Leck LYW, Jansson PJ, Sahni S. Emerging Role of Autophagy in the Development and Progression of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2021 Dec 7;13(24):6152. doi: 10.3390/cancers13246152.

Agostini M, Silva SD, Zecchin KG, Coletta RD, Jorge J, Loda M, et al. Fatty acid synthase is required for the proliferation of human oral squamous carcinoma cells. *Oral Oncol*. 2004 Aug;40(7):728-35. doi: 10.1016/j.oraloncology.2004.01.011.

Agostini M, Almeida LY, Bastos DC, Ortega RM, Moreira FS, Seguin F, et al. The fatty acid synthase inhibitor orlistat reduces the growth and metastasis of orthotopic tongue oral squamous cell carcinomas. *Mol Cancer Ther*. 2014 Mar;13(3):585-95. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-1136.

Almangush A, Heikkinen I, Mäkitie AA, Coletta RD, Läärä E, Leivo I, et al. Prognostic biomarkers for oral tongue squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer*. 2017 Sep 5;117(6):856-866. doi: 10.1038/bjc.2017.244.

Almangush A, Mäkitie AA, Triantafyllou A, de Bree R, Strojan P, Rinaldo A, Hernandez-Prera JC, Suárez C, Kowalski LP, Ferlito A, Leivo I. Staging and grading of oral squamous cell carcinoma: An update. *Oral Oncol*. 2020 Aug;107:104799. doi: 10.1016/j.oraloncology.2020.104799.

Alvarenga, L de M, Ruiz, MT, Pavarino-Bertelli, EC, Ruback, MJC, Maniglia, JV, & Goloni-Bertollo, M. (2008). Epidemiologic evaluation of head and neck patients in a university hospital of Northwestern São Paulo State. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 74(1), 68–73. doi: 10.1016/S1808-8694(15)30753-9

Anderson A, O'Sullivan J. The two faces of autophagy in oral squamous cell carcinoma. *Arch Oral Biol*. 2022 Feb;134:105321. doi: 10.1016/j.archoralbio.2021.105321.

Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res*. 1987 Jun;95(3):229-49. doi: 10.1111/j.1600-0722.1987.tb01836.x.

Aquino IG, Bastos DC, Cuadra-Zelaya FJM, Teixeira IF, Salo T, Coletta RD, et al. Anticancer properties of the fatty acid synthase inhibitor TVB-3166 on oral squamous cell carcinoma cell lines. *Arch Oral Biol*. 2020 May;113:104707. doi: 10.1016/j.archoralbio.2020.104707.

Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y. Oral cancer: clinical features. *Oral Oncol*. 2010 Jun;46(6):414-7. doi: 10.1016/j.oraloncology.2010.03.009.

Baron A, Migita T, Tang D, Loda M. Fatty acid synthase: a metabolic oncogene in prostate cancer? *J Cell Biochem*. 2004 Jan 1;91(1):47-53. doi: 10.1002/jcb.10708.

Batta N, Pandey M. Mutational spectrum of tobacco associated oral squamous carcinoma and its therapeutic significance. *World J Surg Oncol*. 2019 Nov 27;17(1):198. doi: 10.1186/s12957-019-1741-2.

Berg TO, Fengsrud M, Strømhaug PE, Berg T, Seglen PO. Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes. *J Biol Chem*. 1998 Aug 21;273(34):21883-92. doi: 10.1074/jbc.273.34.21883.

Boelcke WP, Teixeira IF, Aquino IG, Mazzaro AR, Cuadra-Zelaya FJM, de Souza AP, et al. Pharmacological fatty acid synthase inhibitors differently affect the malignant phenotype of oral cancer cells. *Arch Oral Biol*. 2022 Mar;135:105343. doi: 10.1016/j.archoralbio.2021.105343.

Bortnik S, Gorski SM. Clinical Applications of Autophagy Proteins in Cancer: From Potential Targets to Biomarkers. *Int J Mol Sci*. 2017 Jul 11;18(7):1496. doi: 10.3390/ijms18071496.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54. doi: 10.1006/abio.1976.9999.

Buckley D, Duke G, Heuer TS, O'Farrell M, Wagman AS, McCulloch W, et al. Fatty acid synthase - Modern tumor cell biology insights into a classical oncology target. *Pharmacol Ther*. 2017 Sep;177:23-31. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.02.021.

Bugshan A, Farooq I. Oral squamous cell carcinoma: metastasis, potentially associated malignant disorders, etiology and recent advancements in diagnosis. *F1000Res*. 2020 Apr 2;9:229. doi: 10.12688/f1000research.22941.1.

Campisi D, Desrues L, Dembélé KP, Mutel A, Parment R, Gandolfo P, Castel H, Morin F. The core autophagy protein ATG9A controls dynamics of cell protrusions and directed migration. *J Cell Biol*. 2022 Mar 7;221(3):e202106014. doi: 10.1083/jcb.202106014. Epub 2022 Feb 18.

Câncer, Instituto Nacional de. Câncer de boca - Versão para Profissionais de Saúde. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-boca/profissional-de-saude>. Acesso em: 29 dez. 2021.

Câncer, Instituto Nacional de Câncer de. Estatísticas de cancer. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros>>. Acesso em: 09 dez. 2022.

Cancer, International Agency For Research On. Estimated number of new cases in 2020, worldwide, both sexes, all age. Disponível em: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&group_cancer=1&include_nmssc=1&include_nmssc_other=1. Acesso em: 28 dez. 2021.

Cancer Epidemiology Consortium. J Natl Cancer Inst. 2007 May 16;99(10):777-89. doi: 10.1093/jnci/djk179. Erratum in: J Natl Cancer Inst. 2008 Feb 6;100(3):225. Fernandez, Leticia [added].

Cao W, Li J, Yang K, Cao D. An overview of autophagy: Mechanism, regulation and research progress. Bull Cancer. 2021 Mar;108(3):304-322. doi: 10.1016/j.bulcan.2020.11.004. Epub 2021 Jan 8.

Chamoli A, Gosavi AS, Shirwadkar UP, Wangdale KV, Behera SK, Kurrey NK, et al. Overview of oral cavity squamous cell carcinoma: Risk factors, mechanisms, and diagnostics. Oral Oncol. 2021 Oct;121:105451. doi: 10.1016/j.oraloncology.2021.105451.

Coletta RD, Yeudall WA, Salo T. Grand Challenges in Oral Cancers. Front Oral Health. 2020 Jun 9;1:3. doi: 10.3389/froh.2020.00003.

Depmap portal SCC-9. Broad Institute. [acesso 2023 Ago]. Disponível em https://depmap.org/portal/cell_line/ACH-000181?tab=overview.

Desrichard A, Kuo F, Chowell D, Lee KW, Riaz N, Wong RJ, et al. Tobacco Smoking-Associated Alterations in the Immune Microenvironment of Squamous Cell Carcinomas. J Natl Cancer Inst. 2018 Dec 1;110(12):1386-1392. doi: 10.1093/jnci/djy060.

Ernani V, Saba NF. Oral Cavity Cancer: Risk Factors, Pathology, and Management. Oncology. 2015;89(4):187-95. doi: 10.1159/000398801.

Estimativa 2023. Rio de Janeiro: Coordenação de Ensino Serviço de Educação e Informação Técnico-Científica Área de Edição e Produção de Materiais Técnico- Científicos, 2023. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2023.pdf>. Acesso em: 01 nov. 2023.

Falchook G, Infante J, Arkenau HT, Patel MR, Dean E, Borazanci E, et al. First-in-human study of the safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of first-in-class fatty acid synthase inhibitor TVB-2640 alone and with a taxane in advanced tumors. EClinicalMedicine. 2021 Mar 30;34:100797. doi: 10.1016/j.eclinm.2021.100797.

Feller L, Lemmer J. Oral Squamous Cell Carcinoma: Epidemiology, Clinical Presentation and Treatment. J Cancer Ther. 2012;3:263–268. doi: 10.4236/jct.2012.34037.

Fhu CW, Ali A. Fatty Acid Synthase: An Emerging Target in Cancer. Molecules. 2020 Aug 28;25(17):3935. doi: 10.3390/molecules25173935.

Flavin R, Peluso S, Nguyen PL, Loda M. Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer. Future Oncol. 2010 Apr;6(4):551-62. doi: 10.2217/fon.10.11.

Ghoshal S, Mallick I, Panda N, Sharma SC. Carcinoma of the buccal mucosa: analysis of clinical presentation, outcome and prognostic factors. *Oral Oncol.* 2006 May;42(5):533-9. doi: 10.1016/j.oraloncology.2005.10.005. Epub 2006 Feb 7.

Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol.* 2010 May;221(1):3-12. doi: 10.1002/path.2697.

Gupta B, Johnson NW. Systematic review and meta-analysis of association of smokeless tobacco and of betel quid without tobacco with incidence of oral cancer in South Asia and the Pacific. *PLoS One.* 2014 Nov 20;9(11):e113385. doi: 10.1371/journal.pone.0113385.

Gupta S, Kushwaha VS, Verma S, Khan H, Bhatt ML, Husain N, et al. Understanding molecular markers in recurrent oral squamous cell carcinoma treated with chemoradiation. *Heliyon.* 2016 Dec 5;2(12):e00206. doi: 10.1016/j.heliyon.2016.e00206.

Hadzic S, Gojkovic-Vukelic M, Pasic E, Dervisevic A. Importance of Early Detection of Potentially Malignant Lesions in the Prevention of Oral Cancer. *Mater Sociomed.* 2017 Jun;29(2):129-133. doi: 10.5455/msm.2017.29.129-133.

Hamacher-Brady A. Autophagy regulation and integration with cell signaling. *Antioxid Redox Signal.* 2012 Sep 1;17(5):756-65. doi: 10.1089/ars.2011.4410.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022 Jan;12(1):31-46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.

Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst.* 2007 May 16;99(10):777-89. doi: 10.1093/jnci/djk179. Erratum in: *J Natl Cancer Inst.* 2008 Feb 6;100(3):225. Fernandez, Leticia [added].

Hu Y, Zhou Y, Yang G, Wang Y, Zheng Z, Li J, et al. Sulforaphane-N-Acetyl-Cysteine inhibited autophagy leading to apoptosis via Hsp70-mediated microtubule disruption. *Cancer Lett.* 2018 Sep 1;431:85-95. doi: 10.1016/j.canlet.2018.05.035.

Huang W, Liang Y, Ma X. Alpha-mangostin induces endoplasmic reticulum stress and autophagy which count against fatty acid synthase inhibition mediated apoptosis in human breast cancer cells. *Cancer Cell Int.* 2019 May 31;19:151. doi: 10.1186/s12935-019-0869-z.

Inchingolo F, Santacroce L, Ballini A, Topi S, Dipalma G, Haxhirexha K, et al. Oral Cancer: A Historical Review. *Int J Environ Res Public Health.* 2020 May 2;17(9):3168. doi: 10.3390/ijerph17093168.

Jahreiss L, Menzies FM, Rubinsztein DC. The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. *Traffic*. 2008 Apr;9(4):574-87. doi: 10.1111/j.1600-0854.2008.00701.x.

Jin M, Liu X, Klionsky DJ. SnapShot: Selective autophagy. *Cell*. 2013 Jan 17;152(1-2):368-368.e2. doi: 10.1016/j.cell.2013.01.004.

Jin J, Chen N, Pan H, Xie W, Xu H, Lei S, et al. Triclosan induces ROS-dependent cell death and autophagy in A375 melanoma cells. *Oncol Lett*. 2020 Oct;20(4):73. doi: 10.3892/ol.2020.11934.

Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ*. 2011 Apr;18(4):571-80. doi: 10.1038/cdd.2010.191.

Kawakita D, Matsuo K. Alcohol and head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2017 Sep;36(3):425-434. doi: 10.1007/s10555-017-9690-0.

Kim JY, Cho TJ, Woo BH, Choi KU, Lee CH, Ryu MH, et al. Curcumin-induced autophagy contributes to the decreased survival of oral cancer cells. *Arch Oral Biol*. 2012 Aug;57(8):1018-25. doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.04.005.

Knobloch M, Braun SM, Zurkirchen L, von Schoultz C, Zamboni N, Araújo-Bravo MJ, et al. Metabolic control of adult neural stem cell activity by Fasn-dependent lipogenesis. *Nature*. 2013 Jan 10;493(7431):226-30. doi: 10.1038/nature11689.

Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, Kondo S. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat Rev Cancer*. 2005 Sep;5(9):726-34. doi: 10.1038/nrc1692.

Kridel SJ, Axelrod F, Rozenkrantz N, Smith JW. Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity. *Cancer Res*. 2004 Mar 15;64(6):2070-5. doi: 10.1158/0008-5472.can-03-3645.

Kuhajda FP. Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. *Nutrition*. 2000 Mar;16(3):202-8. doi: 10.1016/s0899-9007(99)00266-x.

Kuhajda FP, Jenner K, Wood FD, Hennigar RA, Jacobs LB, Dick JD, et al. Fatty acid synthesis: a potential selective target for antineoplastic therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Jul 5;91(14):6379-83. doi: 10.1073/pnas.91.14.6379.

Lai K, Matthews S, Wilmott JS, Killingsworth MC, Yong JL, Caixeiro NJ, Wykes J, Samakeh A, Forstner D, Lee M, McGuinness J, Niles N, Hong A, Ebrahimi A, Lee CS. Differences in LC3B expression and prognostic implications in oropharyngeal and oral cavity squamous cell carcinoma patients. *BMC Cancer*. 2018 Jun 1;18(1):624. doi: 10.1186/s12885-018-4536-x.

Lee J, Taneja V, Vassallo R. Cigarette smoking and inflammation: cellular and molecular mechanisms. *J Dent Res*. 2012 Feb;91(2):142-9. doi: 10.1177/0022034511421200.

Li P, Tian W, Ma X. Alpha-mangostin inhibits intracellular fatty acid synthase and induces apoptosis in breast cancer cells. *Mol Cancer*. 2014 Jun 3;13:138. doi: 10.1186/1476-4598-13-138.

Li H, Zhang X, Yi C, He Y, Chen X, Zhao W, Yu D. Ferroptosis-related gene signature predicts the prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *BMC Cancer*. 2021 Jul 20;21(1):835. doi: 10.1186/s12885-021-08478-0.

Liu JL, Chen FF, Lung J, Lo CH, Lee FH, Lu YC, et al. Prognostic significance of p62/SQSTM1 subcellular localization and LC3B in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2014 Aug 26;111(5):944-54. doi: 10.1038/bjc.2014.355.

Liu PF, Chang HW, Cheng JS, Lee HP, Yen CY, Tsai WL, Cheng JT, Li YJ, Huang WC, Lee CH, Ger LP, Shu CW. Map1lc3b and Sqstm1 Modulated Autophagy for Tumorigenesis and Prognosis in Certain Subsites of Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Med*. 2018 Nov 24;7(12):478. doi: 10.3390/jcm7120478.

Lytle NK, Barber AG, Reya T. Stem cell fate in cancer growth, progression and therapy resistance. *Nat Rev Cancer*. 2018 Nov;18(11):669-680. doi: 10.1038/s41568-018-0056-x.

Mashberg A, Merletti F, Boffetta P, Gandolfo S, Ozzello F, Fracchia F, et al. Appearance, site of occurrence, and physical and clinical characteristics of oral carcinoma in Torino, Italy. *Cancer*. 1989 Jun 15;63(12):2522-7. doi: 10.1002/1097-0142(19890615)63:12<2522::aid-cncr2820631227>3.0.co;2-x.

Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2007 Oct;7(10):763-77. doi: 10.1038/nrc2222.

Minhas S, Sajjad A, Kashif M, Taj F, Waddani HA, Khurshid Z. Oral Ulcers Presentation in Systemic Diseases: An Update. *Open Access Maced J Med Sci*. 2019 Oct 10;7(19):3341-3347. doi: 10.3889/oamjms.2019.689.

Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*. 2007 Nov-Dec;3(6):542-5. doi: 10.4161/auto.4600. Epub 2007 Jun 19.

Mrakovcic M, Fröhlich LF. p53-Mediated Molecular Control of Autophagy in Tumor Cells. *Biomolecules*. 2018 Mar 21;8(2):14. doi: 10.3390/biom8020014.

Müller S. Oral epithelial dysplasia, atypical verrucous lesions and oral potentially malignant disorders: focus on histopathology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2018 Jun;125(6):591-602. doi: 10.1016/j.oooo.2018.02.012. Epub 2018 Mar 1.

Muthukrishnan A, Warnakulasuriya S. Oral health consequences of smokeless tobacco use. *Indian J Med Res*. 2018 Jul;148(1):35-40. doi: 10.4103/ijmr.IJMR_1793_17.

- Nakatogawa H, Ichimura Y, Ohsumi Y. Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell*. 2007 Jul 13;130(1):165-78. doi: 10.1016/j.cell.2007.05.021.
- Nakatogawa H. Mechanisms governing autophagosome biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020 Aug;21(8):439-458. doi: 10.1038/s41580-020-0241-0.
- Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin*. 2002 Jul-Aug;52(4):195-215. doi: 10.3322/canjclin.52.4.195.
- Neville BW. *Oral and Maxillofacial Pathology*. Saunders/Elsevier, 2009.
- Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Jan 20;20(3):460-73. doi: 10.1089/ars.2013.5371.
- Pascual G, Avgustinova A, Mejetta S, Martín M, Castellanos A, Attolini CS, et al. Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36. *Nature*. 2017 Jan 5;541(7635):41-45. doi: 10.1038/nature20791.
- Pillai J, Chincholkar T, Dixit R, Pandey M. A systematic review of proteomic biomarkers in oral squamous cell cancer. *World J Surg Oncol*. 2021 Oct 28;19(1):315. doi: 10.1186/s12957-021-02423-y.
- Puram SV, Rocco JW. Molecular Aspects of Head and Neck Cancer Therapy. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2015 Dec;29(6):971-92. doi: 10.1016/j.hoc.2015.07.003.
- Reidy J, McHugh E, Stassen LF. A review of the relationship between alcohol and oral cancer. *Surgeon*. 2011 Oct;9(5):278-83. doi: 10.1016/j.surge.2011.01.010.
- Rivera C, Venegas B. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review). *Oncol Lett*. 2014 Jul;8(1):7-11. doi: 10.3892/ol.2014.2103.
- Salahshourifar I, Vincent-Chong VK, Kallarakkal TG, Zain RB. Genomic DNA copy number alterations from precursor oral lesions to oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2014 May;50(5):404-12. doi: 10.1016/j.oraloncology.2014.02.005.
- Scully C, Bagan JV. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Dis*. 2009 Sep;15(6):388-99. doi: 10.1111/j.1601-0825.2009.01563.x.
- Scully C, Bagan JV, Hopper C, Epstein JB. Oral cancer: current and future diagnostic techniques. *Am J Dent*. 2008 Aug;21(4):199-209.
- Shah G, Chaturvedi P, Vaishampayan S. Arecanut as an emerging etiology of oral cancers in India. *Indian J Med Paediatr Oncol*. 2012 Apr;33(2):71-9. doi: 10.4103/0971-5851.99726.

Silva SD, Perez DE, Nishimoto IN, Alves FA, Pinto CA, Kowalski LP, et al. Fatty acid synthase expression in squamous cell carcinoma of the tongue: clinicopathological findings. *Oral Dis*. 2008 May;14(4):376-82. doi: 10.1111/j.1601-0825.2007.01395.x.

Stornetta A, Guidolin V, Balbo S. Alcohol-Derived Acetaldehyde Exposure in the Oral Cavity. *Cancers (Basel)*. 2018 Jan 14;10(1):20. doi: 10.3390/cancers10010020.

Swinnen JV, Van Veldhoven PP, Timmermans L, De Schrijver E, Brusselmans K, Vanderhoydonc F, et al. Fatty acid synthase drives the synthesis of phospholipids partitioning into detergent-resistant membrane microdomains. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Mar 21;302(4):898-903. doi: 10.1016/s0006-291x(03)00265-1.

Tang JY, Hsi E, Huang YC, Hsu NC, Chen YK, Chu PY, Chai CY. ATG9A overexpression is associated with disease recurrence and poor survival in patients with oral squamous cell carcinoma. *Virchows Arch*. 2013a Dec;463(6):737-42. doi: 10.1007/s00428-013-1482-5. Epub 2013 Oct 2.

Tang JY, Fang YY, Hsi E, Huang YC, Hsu NC, Yang WC, Chang HW, Chai CY, Chu PY. Immunopositivity of Beclin-1 and ATG5 as indicators of survival and disease recurrence in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*. 2013b Dec;33(12):5611-6.

Tang JY, Hsi E, Huang YC, Hsu NC, Yang WC, Chang HW, et al. Overexpression of autophagy-related 16-like 1 in patients with oral squamous cell carcinoma. *Pathol Oncol Res*. 2015 Apr;21(2):301-5. doi: 10.1007/s12253-014-9821-7.

Terabe T, Uchida F, Nagai H, Omori S, Ishibashi-Kanno N, Hasegawa S, et al. Expression of autophagy-related markers at the surgical margin of oral squamous cell carcinoma correlates with poor prognosis and tumor recurrence. *Hum Pathol*. 2018 Mar;73:156-163. doi: 10.1016/j.humpath.2017.11.019.

Tumuluri V, Thomas GA, Fraser IS. Analysis of the Ki-67 antigen at the invasive tumour front of human oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2002 Nov;31(10):598-604. doi: 10.1034/j.1600-0714.2002.00042.x.

Turco E, Fracchiolla D, Martens S. Recruitment and Activation of the ULK1/Atg1 Kinase Complex in Selective Autophagy. *J Mol Biol*. 2020 Jan 3;432(1):123-134. doi: 10.1016/j.jmb.2019.07.027.

van der Waal I. Are we able to reduce the mortality and morbidity of oral cancer; some considerations. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013 Jan 1;18(1):e33-7. doi: 10.4317/medoral.18486.

van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol*. 2009 Apr-May;45(4-5):317-23. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.05.016.

Walz JZ, Saha J, Arora A, Khammanivong A, O'Sullivan MG, Dickerson EB. Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in feline oral squamous cell carcinoma. *Vet Comp Oncol*. 2018 Mar;16(1):E99-E108. doi: 10.1111/vco.12341.

Wang H, Luo QF, Peng AF, Long XH, Wang TF, Liu ZL, et al. Positive feedback regulation between Akt phosphorylation and fatty acid synthase expression in osteosarcoma. *Int J Mol Med*. 2014 Mar;33(3):633-9. doi: 10.3892/ijmm.2013.1602.

Wang C, Wang H, Zhang D, Luo W, Liu R, Xu D, et al. Phosphorylation of ULK1 affects autophagosome fusion and links chaperone-mediated autophagy to macroautophagy. *Nat Commun*. 2018 Aug 28;9(1):3492. doi: 10.1038/s41467-018-05449-1.

Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol*. 2009 Apr-May;45(4-5):309-16. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.06.002.

Weng J, Wang C, Wang Y, Tang H, Liang J, Liu X, Huang H, Hou J. Beclin1 inhibits proliferation, migration and invasion in tongue squamous cell carcinoma cell lines. *Oral Oncol*. 2014 Oct;50(10):983-90. doi: 10.1016/j.oraloncology.2014.06.020. Epub 2014 Aug 2.

Xie J, Li Q, Ding X, Gao Y. Targeting mTOR by CZ415 Inhibits Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells. *Cell Physiol Biochem*. 2018;46(2):676-686. doi: 10.1159/000488724.

Yang Z, Klionsky DJ. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol*. 2010 Sep;12(9):814-22. doi: 10.1038/ncb0910-814.

Yan Y, Zhou Y, Li J, Zheng Z, Hu Y, Li L, et al. Sulforaphane downregulated fatty acid synthase and inhibited microtubule-mediated mitophagy leading to apoptosis. *Cell Death Dis*. 2021 Oct 7;12(10):917. doi: 10.1038/s41419-021-04198-2.

Ylä-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, Eskelinen EL. 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy*. 2009 Nov;5(8):1180-5. doi: 10.4161/auto.5.8.10274.

Yokota T, Homma A, Kiyota N, Tahara M, Hanai N, Asakage T, Matsuura K, et al. Japan Clinical Oncology Group (JCOG) Head and Neck Cancer Study Group. Immunotherapy for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Jpn J Clin Oncol*. 2020 Sep 28;50(10):1089-1096. doi: 10.1093/jjco/hyaa139.

Yoshii SR, Mizushima N. Autophagy machinery in the context of mammalian mitophagy. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Oct;1853(10 Pt B):2797-801. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.01.013.

Yoshii SR, Mizushima N. Monitoring and Measuring Autophagy. *Int J Mol Sci*. 2017 Aug 28;18(9):1865. doi: 10.3390/ijms18091865.

Yu L, Chen Y, Tooze SA. Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. *Autophagy*. 2018;14(2):207-215. doi: 10.1080/15548627.2017.1378838.

Zhao YG, Codogno P, Zhang H. Machinery, regulation and pathophysiological implications of autophagosome maturation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2021 Nov;22(11):733-750. doi: 10.1038/s41580-021-00392-4.

ANEXOS

ANEXO 1 – VERIFICAÇÃO DE ORIGINALIDADE E PREVENÇÃO DE PLÁGIO

INFLUÊNCIA DO SILENCIAMENTO DA ENZIMA ÁCIDO GRAXO SINTASE (FASN) SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À AUTOFAGIA EM CÉLULAS DERIVADAS DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS (CCE) ORAL.

RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE

13%	12%	4%	2%
ÍNDICE DE SEMELHANÇA	FONTES DA INTERNET	PUBLICAÇÕES	DOCUMENTOS DOS ALUNOS

FONTES PRIMÁRIAS

1	repositorio.unicamp.br Fonte da Internet	5%
2	Submitted to Universidade Estadual de Campinas Documento do Aluno	2%
3	www.repositorio.unicamp.br Fonte da Internet	1%
4	repositorio.ufsc.br Fonte da Internet	1%
5	hdl.handle.net Fonte da Internet	<1%
6	arquivos.info.ufrn.br Fonte da Internet	<1%
7	Everson Willian Fialho Cordeiro. "Modulação da concentração intracelular de NAD⁺/NAD⁺ e seu efeito na	<1%

ANEXO 2 – COMISSÃO INTERNA DE BIOSSEGURANÇA



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
Comissão Interna de Biossegurança



APROVAÇÃO PARA ATIVIDADES EM CONTENÇÃO COM ORGANISMOS
GENETICAMENTE MODIFICADOS E DERIVADOS NB-1

OF-CIBio – 002/2023

Piracicaba, 18 de dezembro de 2023.

Pesquisador(a) responsável: **Edgard Graner**

Prezado(a) Professor(a),

Informamos que seu Requerimento de Autorização para Atividades em CONTENÇÃO com OGM e seus Derivados, para realização do projeto intitulado "A influência da enzima ácido graxo sintase (FASN) sobre a expressão de genes associados à autofagia em células derivadas de carcinoma de células escamosas (CCE) oral.", identificado como nº **002/2023** foi analisado e **aprovado** pela CIBio - FOP/UNICAMP. Este projeto deverá ser executado nos laboratórios credenciados para trabalho com OGM e derivados NB-1 previstos no projeto, durante o período de vigência de 01/06/2023 a 31/03/2024, conforme o requerimento aprovado. O parecer de aprovação é encaminhado em anexo.

Informamos que como responsável por este projeto, estará sob sua responsabilidade:

1. Assegurar a plena capacitação da equipe de trabalho e o cumprimento das resoluções normativas da CTNBio.
2. Manter toda a documentação sobre o projeto e sobre a capacitação da equipe de trabalho em arquivo de pronto acesso, para visitas e inspeções pela CIBio - FOP/UNICAMP e/ou órgãos competentes.
3. Comunicar à CIBio - FOP/UNICAMP através de novo requerimento, eventuais alterações no projeto, na equipe de trabalho ou de seu local de realização.
4. Encaminhar à CIBio - FOP/UNICAMP, o relatório das atividades deste projeto em formulário específico no mês de fevereiro de cada ano e/ou quando do encerramento do projeto.

Solicitamos ainda que **utilize o número de identificação** do requerimento aprovado em mensagens ou documentos impressos, para encaminhar seus relatórios ou eventuais solicitações de alteração.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Antônio Pedro Ricomini Filho
Presidente CIBio - FOP/UNICAMP
e-mail: cibiofop@unicamp.br
Tel. (19) 2106-5712

ANEXO 3 – INICIAÇÃO CIENTÍFICA



VISUALIZAÇÃO DE DESPACHO

Processo	2022/16712-9
Linha de Fomento	Programas Regulares / Bolsas / No País / Iniciação Científica - Fluxo Contínuo
Situação	Em Execução
Vigência	01/06/2023 a 31/03/2024
Beneficiário	Giulia Marchioreto Pagotto
Responsável	Edgard Graner
Vínculo Institucional do Processo	Faculdade de Odontologia de Piracicaba/FOP/UNICAMP
Título	Influência do silenciamento da enzima ácido graxo sintase (FASN) sobre a expressão de genes associados à autofagia em células derivadas de carcinoma de células escamosas (CCE) oral.

Folha de Despacho

Datas do Despacho

Emitido em : 27/10/2023

Objetos de análise

Objeto de análise	Data de Submissão	Resultado
Relatório Científico 1	10/10/2023	Aprovado

Observações / Transcrições / Frases

Observações ao Responsável

Comunicamos que o Relatório Científico relativo ao processo acima referido foi analisado pela assessoria científica da FAPESP.

A transcrição do parecer está sendo enviada exclusivamente ao orientador, sendo de sua responsabilidade compartilhar as partes que considerar relevantes com o bolsista, o qual receberá uma cópia desta mensagem.

Para visualizar o despacho, por favor, acesse o Sistema SAGe (www.fapesp.br/sage), clique no menu Processos/Meus Processos e em Mais Informações/Despachos.

Atenciosamente,

Marcio de Castro Silva Filho
Diretor Científico

Frases para o Responsável

Não há frases associadas.

Transcrição de Parecer para o Responsável

Parecer das Coordenações

O relatório apresenta resultados de abordagens experimentais realizadas pela aluna depois de um treinamento inicial. As técnicas aprendidas são diversas e relacionadas a obtenção dos primeiros resultados do projeto. Participou de evento regional com apresentação do seu trabalho no formato de pôster.

A aluna manteve um desempenho muito bom na graduação com CR de 86% semelhante ao semestre anterior. O orientador avalia seu desempenho como muito bom.

Frases para Termo de Outorga

Não há frases associadas.

Relatório Científico 1 (Aprovado)

Compromisso	10/10/2023
Período Relacionado	01/06/2023 a 10/10/2023
Situação	Atendido