



UNICAMP

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

FERNANDA DOS SANTOS MOREIRA

**CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL: EFEITOS DA
ASSOCIAÇÃO DO ORLISTAT COM PACLITAXEL IN
VITRO E EM MODELO ORTOTÓPICO E
CARACTERIZAÇÃO INICIAL DE ENXERTOS
DERIVADOS DE PACIENTES**

**Piracicaba
2017**

FERNANDA DOS SANTOS MOREIRA

**CRCINOMA ESPINOCELULAR ORAL: EFEITOS DA
ASSOCIAÇÃO DO ORLISTAT COM PACLITAXEL IN
VITRO E EM MODELO ORTOTÓPICO E
CARACTERIZAÇÃO INICIAL DE ENXERTOS
DERIVADOS DE PACIENTES**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Estomatopatologia, na Área de Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Edgard Graner

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO FERNANDA DOS SANTOS MOREIRA E ORIENTADA PELO PROF. DR. EDGARD GRANER

Piracicaba
2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 152166/2014-9

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

M813c Moreira, Fernanda dos Santos, 1986-
Carcinoma espinocelular oral : efeitos da associação do orlistat com paclitaxel in vitro e em modelo ortotópico e caracterização inicial de enxertos derivados de pacientes / Fernanda dos Santos Moreira. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Edgard Graner.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Carcinoma de células escamosas. 2. Ácido graxo sintases. I. Graner, Edgard, 1968-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Oral squamous cell carcinoma : effects of the association of orlistat with paclitaxel in vivo and orthotopic model and initial characterization of patient derived tumor xenograft

Palavras-chave em inglês:

Carcinoma, squamous cell

Fatty acid synthases

Área de concentração: Patologia

Titulação: Doutora em Estomatopatologia

Banca examinadora:

Edgard Graner [Orientador]

Fábio de Abreu Alves

Estela Kaminagakura Tango

Márcio Ajudarte Lopes

Jacks Jorge Junior

Data de defesa: 22-09-2017

Programa de Pós-Graduação: Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 22 de Setembro de 2017, considerou a candidata FERNANDA DOS SANTOS MOREIRA aprovada.

PROF. DR. EDGARD GRANER

PROF. DR. FÁBIO DE ABREU ALVES

PROF^ª. DR^ª. ESTELA KAMINAGAKURA TANGO

PROF. DR. MÁRCIO AJUDARTE LOPES

PROF. DR. JACKS JORGE JUNIOR

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, a quem tudo devo, pelo amor, dedicação, suporte e apoio em todas as minhas escolhas, possibilitando assim a realização dos meus objetivos e por me mostrarem como alcançá-los com honestidade e bondade.

Ao meu filhote Schummy, por esses anos de intensa saudade, fazendo sempre muita festa nos meus retornos para casa, tornando estes ainda mais felizes!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, por todas as bênçãos a mim concedidas, por me amparar em todos os momentos e não me deixar desistir.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, Prof. Dr. **Guilherme Elias Pessanha Henriques**.

Ao Prof. Dr. **Alan Roger dos Santos Silva** e Prof. Dr. **Márcio Ajudarte Lopes** coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba pela atenção e disponibilidade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Edgard Graner** agradeço pelos ensinamentos ao longo deste período, mostrando-se sempre presente em minha formação profissional. Agradeço ainda por conviver com seu exemplo de pessoa humilde, paciente, persistente, dedicada e acima de tudo ética. Registro aqui toda minha admiração e respeito.

Aos Profs. Drs. **Alan Roger dos Santos Silva, Jacks Jorge Júnior, Márcio Ajudarte Lopes, Oslei Paes de Almeida, Pablo Augustin Vargas e Ricardo Della Coletta** das áreas de Patologia Oral e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pelo exemplo de profissionais dedicados e renomados em suas respectivas áreas de atuação. Expresso minha gratidão, admiração e respeito.

Agradeço em especial ao Prof. Dr. **Márcio Ajudarte Lopes** por sua colaboração nesta pesquisa, sem a qual, teríamos muita dificuldade em realizá-la. Agradeço ainda por compartilhar de forma simples e sincera todo seu conhecimento acadêmico. Registro todo meu respeito, admiração e gratidão tanto pelo profissional como pela pessoa.

Ao Prof. Dr. **Antonio Carrilho Neto** da Universidade Estadual de Londrina (UEL), quem me iniciou na Estomatologia, agradeço por ter me guiado nas fases iniciais da minha formação acadêmica e principalmente pela amizade construída. Registro toda a minha gratidão, admiração e respeito.

Aos amigos **Renato Assis** e **Rodrigo Neves** pela nossa sincera amizade e por estarem presentes em todos os momentos, sem vocês tudo seria mais difícil!

Às doutoras **Andréia Bufalino**, **Debora Campanella Bastos**, **Flávia Sammartino Mariano**, **Luciana Yamamoto de Almeida** e **Rose Mara Ortega** por todos os ensinamentos iniciais no laboratório de Biologia Molecular.

Aos colegas de turma **Juscelino Freitas**, **Harim Tavares**, **Mauricio Dourado** e **Cesar Riveira** pelos momentos compartilhados.

Aos colegas de laboratório **Ana Camila Messeti**, **Carine Ervolino**, **Carolina Carneiro**, **Florence Cuadra**, **Nilva Cervigne**, **Rebeca Barros** e **Rodrigo Soares** pela troca de experiências e momentos compartilhados.

Aos profissionais do Laboratório de Patologia Oral **Fabiana Facco Casarotti**, **Fábio Haach Téó** e **João Carlos Gomes da Silva Junior** por toda atenção e colaboração, sempre solícitos quando precisei.

Aos **pacientes** atendidos no OROCENTRO, razão de nossas pesquisas, dedicação e esforços.

Aos colegas de OROCENTRO **Diego Tetzner**, **Érika Graf**, **Isabel Schausltz**, **José Laurentino**, **Patrícia Fernandes** e **Pedro Curioso** pelo aprendizado, momentos compartilhados e pela ajuda nesta pesquisa.

Aos funcionários do OROCENTRO **Aparecida Campion**, **Daniele Morelli** e **Rogério Elias** agradeço por toda colaboração e receptividade. Meu muito obrigada!

Aos funcionários do Biotério **Wanderley Francisco Vieira**, **Raphael Soares** e dona **Miriam** agradeço pela atenção e colaboração em tudo o que precisei, sendo estes indispensáveis para um ambiente de trabalho adequado.

Aos **camundongos**, sem os quais essa pesquisa não se realizaria.

A todos os **colegas** que passaram pelo programa de pós-graduação em Estomatopatologia durante estes cinco anos, pelo compartilhamento de conhecimentos e momentos divididos.

Aos meus **familiares**, por todo apoio e carinho.

EPÍGRAFE

“Experiência é o nome que damos aos nossos próprios erros”

Oscar Wilde

RESUMO

O carcinoma espinocelular (CEC) oral representa mais de 90% das neoplasias malignas que acometem a cavidade oral e tem como principal determinante de prognóstico a presença de metástases em linfonodos da cadeia cervical, o que diminui a taxa de sobrevida em cerca de 50%. Em casos de recorrência ou de metástases à distância uma abordagem quimioterápica é realizada, no qual os taxanos representam um dos principais compostos utilizados em diversos protocolos. Vários tumores malignos humanos apresentam um fenótipo lipogênico, dentre os quais se inclui o CEC oral. Nestes, a elevada expressão e atividade da enzima ácido graxo sintase (FASN) aumenta a biossíntese de ácidos graxos e permite, dentre outras coisas, uma rápida proliferação das células neoplásicas. Por esta razão, FASN vem sendo apontada como uma oncoproteína metabólica e potencial alvo molecular no tratamento oncológico. No presente trabalho, avaliamos os efeitos da combinação do inibidor de FASN orlistat (ORL) com o quimioterápico paclitaxel (PTX) sobre a linhagem celular metastática de CEC oral LN-1 e sobre o crescimento tumoral e disseminação metastática *in vivo*, utilizando um modelo ortotópico de CEC de língua. Iniciamos também a padronização de um novo modelo de enxertos xenográficos derivados de pacientes (PDTX). Para os estudos *in vitro*, as células LN-1 foram tratadas com as drogas isoladas e associadas, em suas respectivas IC₅₀, e avaliadas com relação à viabilidade celular, taxas de apoptose e de necrose, progressão do ciclo celular, migração e expressão dos marcadores de transição epitélio-mesenquimal (EMT). A viabilidade celular foi reduzida de forma dose-dependente com ambas as drogas, houve sinergismo entre ORL e PTX, com aumento das taxas de apoptose e acúmulo das células na fase G2 do ciclo celular, além de redução do potencial migratório e reversão, pelo menos em parte, do fenótipo de EMT. *In vivo*, verificou-se, com a mesma combinação, uma drástica redução tanto do volume dos tumores primários (99,6%) como da disseminação para os linfonodos cervicais (80,8%). No modelo PDTX, observamos que quase todos os xenoenxertos obtidos mantiveram as características histopatológicas dos tecidos doadores. Em conjunto, estes resultados sugerem que a inibição de FASN associada ao tratamento quimioterápico com paclitaxel apresenta forte efeito antitumoral para os CECs orais e pode servir de base para futuros estudos clínicos com inibidores de FASN. Por fim, o modelo PDTX, caso tenha sua reprodutibilidade comprovada, pode ser útil para a compreensão da biologia

dos CECs orais e eventualmente prever a resposta dos pacientes mediante diferentes agentes quimioterápicos.

Palavras-chave: Carcinoma espinocelular oral. Ácido graxo sintase. Modelos ortotópicos. Enxertos xenográficos derivados de pacientes.

ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) accounts for more than 90% of the malignant neoplasias affecting the oral cavity and its main prognostic factor is the presence of metastasis in cervical lymph nodes, which may decrease the survival rate by approximately 50%. For recurrent or metastatic OSCC, a chemotherapeutic approach is performed and taxanes are included in several protocols. Several human malignant tumors, including OSCC, have a lipogenic phenotype with high expression and activity of fatty acid synthase (FASN) and increased production of palmitate, which sustains the rapid proliferation of neoplastic cells. For this reason, FASN has been pointed as a metabolic oncoprotein and potential molecular target for cancer treatment. In the present study, we evaluated the effects of the combination of orlistat (ORL), an inhibitor of FASN activity, and the chemotherapeutic agent paclitaxel (PTX) on the metastatic cell line SSC-9 LN-1 and on tumor growth and metastatic dissemination in an orthotopic model of tongue SCC. We also initiated here the establishment of a new patient-derived tumor xenograft model for OSCC (PDTX). For the *in vitro* studies, LN-1 cells were treated with both drugs isolated or associated at their respective IC₅₀, and the viability, apoptosis, necrosis, cell cycle progression, migration, and production of epithelial-mesenchymal transition markers (EMT) evaluated. Cell viability was reduced in a dose-dependent manner by both drugs and the synergism between ORL and PTX determined increased rates of apoptosis and cell cycle arrest in G₂. In addition, ORL and PTX reduced cell migration and partially reversed EMT in LN-1 cells. *In vivo*, ORL plus PTX promoted a drastic reduction in the volume of primary orthotopic tongue SCC (99,6%) and their metastatic spread to cervical lymph nodes (80,8%). In the PDTX model, it was possible to observe that almost all xenografts preserved the histopathological characteristics of the donor tumor tissues. Taken together, these results here presented suggest that the FASN inhibitors associated with paclitaxel have strong antitumor effect on OSCC and may serve as a basis for future clinical studies. Finally, the PDTX model, if reproducible in additional studies, may be useful for the understanding OSCC biology and possibly for the prediction of patient response to different chemotherapeutics.

Key words: Oral squamous cell carcinoma. Fatty acid synthase. Orthotopic models. Patient derived tumor xenografts.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ L: Microlitro

μ M: Micromolar

7-AAD: *7- Aminoactinomycin D*

ACP: *Acyl carrier protein* – Proteína transportadora de acil

CEC: Carcinoma espinocelular

CI: *Combination index* - Índice de combinação

DMEM/F-12: *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*

DMSO: Dimetil sulfóxido

EGF: *Epidermal growth factor* - Fator de crescimento epidérmico

EGFR: *Epidermal growth factor receptor* – Receptor do fator de crescimento epidérmico

EMT: *Epithelial-Mesenchymal Transition* – Transição epitélio-mesenquimal

ErbB: *Epidermal Growth Factor Receptor* - Receptor de fator de crescimento epidérmico

ERK: *Extracellular signal-regulated kinases* - Quinases regulatórias de sinais extracelulares

FASN: *Fatty acid synthase* – Ácido graxo sintase

FDA: *Food and Drug Administration*

HPV: Papilomavírus humano

IC₅₀: *Half maximal inhibitory concentration* – Concentração inibitória média

INCA: Instituto Nacional do Câncer

MEK: *Mitogen-activated protein / ERK* - Proteína ERK ativada por mitógeno

MTT: *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) - 2,5-diphenyltetrazolium bromide*

ORL: Orlistat

PBS: *Phosphate Buffered Saline* - Solução salina tamponada com fosfato

PDTX: *Patient-derived tumor xenografts* – Tumores xenográficos derivados de pacientes

PerCP: *Peridinin-chlorophyll-protein complex*

PI3K: *Phosphatidylinositol - 3 - kinase* - Fosfatidilinositol - 3 – quinase

PTX: Paclitaxel

SFB: Soro fetal bovino

SREBP: *Sterol regulatory element binding proteins* - Proteínas ligantes da região regulada por proteínas

TNM: Tumor Nódulo Metástase

VEGF: *Vascular endothelial growth factor* - Fator de Crescimento Endotelial Vascular

VEGFR: *Vascular endothelial growth factor receptor*- Receptor de Fator de crescimento endotelial vascular

Xg: Força centrífuga g

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
3 PROPOSIÇÃO	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
5 RESULTADOS	47
6 DISCUSSÃO	86
7 CONCLUSÃO	93
REFERÊNCIAS	94
ANEXOS	108
ANEXO 1	108
ANEXO 2	109

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma espinocelular (CEC) oral corresponde a mais de 90% das neoplasias malignas diagnosticadas na cavidade oral e, apesar de todos os avanços até hoje alcançados no seu tratamento, a taxa de sobrevivência em 5 anos não melhorou ao longo das últimas décadas permanecendo estacionada em torno de 55% (Scully & Bagan, 2009; van Dijk *et al.*, 2016). Um dos principais fatores determinantes do prognóstico desta doença é a presença de metástases em linfonodos cervicais, que ocorrem com maior frequência a partir de tumores localizados na língua, onde a lesão cresce de forma mais invasiva e espalha-se através dos vasos linfáticos (Sano & Meyers, 2007; Scully & Bagan, 2009). O estadiamento clínico da doença, realizado pelo sistema TNM e a localização do tumor norteiam a escolha do tratamento, que pode consistir em excisão cirúrgica ampla, radioterapia, quimioterapia ou combinações destas terapias (Chabner & Roberts Jr, 2005; Barnes *et al.*, 2005). Na ocorrência de metástases ou de tumores para os quais a cirurgia seja contra indicada, é realizada abordagem sistêmica com agentes quimioterápicos, dos quais os principais compostos utilizados para CECs orais e de cabeça e pescoço são os agentes platinícos (cisplatina e carboplatina), as drogas antimetabólicas (5-fluorouracil e metotrexato) e os taxanos (paclitaxel e docetaxel), isoladamente ou em combinação (Hennequin *et al.*, 2009; revisado por Fury & Pfister, 2011).

Ao contrário do que ocorre nas células normais, diversas neoplasias malignas apresentam o chamado fenótipo lipogênico, onde as células necessitam de elevada biossíntese de ácidos graxos, o que permite uma rápida e constante proliferação (Kumar-Sinha *et al.*, 2003; Menendez & Lupu, 2007). A ácido graxo sintase (FASN) é a principal enzima envolvida na lipogênese neoplásica, responsável pela síntese de ácidos graxos saturados de cadeia longa a partir dos precursores malonil-CoA e Acetil-CoA, tendo como produto final o ácido graxo saturado palmitato (Flavin *et al.*, 2010). A expressão desta enzima é elevada em diversos tipos de cânceres, dentre eles no CEC da cavidade oral (Krontiras *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2008). O conjunto de publicações sobre o papel de FASN em neoplasias malignas levou à sugestão de que esta pode atuar como uma oncoproteína metabólica, por favorecer o crescimento e sobrevivência das células tumorais, sendo hoje considerada assim um potencial alvo terapêutico para o tratamento oncológico (Menendez & Lupu, 2007, Flavin *et al.*, 2010).

Vários são os compostos capazes de inibir a atividade de FASN, dentre eles a cerulenina, seu análogo sintético c75 e o orlistat (Menendez & Lupu, 2007). Diversos estudos mostraram que a inibição da atividade de FASN causa aumento nas taxas de morte celular por apoptose em células de câncer de mama (Hsu *et al.*, 2011), ovário (Uddin *et al.*, 2011), endométrio (Menendez *et al.*, 2004a), estômago (Dowling *et al.*, 2009), próstata (Brusselmans *et al.*, 2003; de Schrijver *et al.*, 2003) e melanoma (Carvalho *et al.*, 2008; Zecchin *et al.*, 2011). Em estudo realizado em nosso laboratório utilizando um modelo ortotópico de CEC de língua, no qual células metastáticas (LN-1) foram implantadas na borda lateral da língua de camundongos atímicos, Agostini *et al.* (2014) observaram significativa redução no volume dos tumores primários dos animais tratados com orlistat, quando comparados aos do grupo controle, com nítida redução do índice de proliferação celular. Entretanto, o principal achado deste estudo foi a redução em 43% do número de linfonodos cervicais metastáticos no grupo que recebeu a terapia com orlistat, sugerindo que a inibição de FASN pode apresentar um papel no controle da disseminação metastática desta doença.

Apesar de muito reprodutível a doença criada em modelos ortotópicos realizados pela implantação de linhagens celulares, uma grande limitação é imposta pela modificação dos perfis de expressão gênica que ocorre durante as diversas subculturas pré-implantação *in vitro*, além da falta de heterogeneidade celular e da arquitetura tridimensional encontrada no microambiente dos tumores sólidos (Peng *et al.*, 2013; Willians *et al.*, 2013). Com o intuito de minimizar estas deficiências, têm sido recentemente estabelecidos, para vários tipos de neoplasias malignas humanas, os chamados modelos de tumores xenográficos derivados de pacientes (*Patient-derived tumor xenografts* - PDX). Modelos PDX consistem no transplante do tecido tumoral humano diretamente para camundongos imunossuprimidos a fim de reproduzir, com maior fidelidade, o tumor que existe no paciente e manter, pelo menos em parte, a heterogeneidade molecular, genética e histopatológica do tumor de origem (Revisado por Tentler *et al.*, 2012).

Mediante o exposto, no presente estudo investigamos os efeitos do bloqueio de FASN com orlistat, droga já utilizada em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, associada ao quimioterápico paclitaxel, que em nossa Dissertação de Mestrado apresentou evidente sinergismo quando associado ao orlistat, sobre as células metastáticas LN-1 *in vitro* e sobre o processo metastático *in vivo*, considerando-se que linfonodos regionais metastáticos são marcadores de

prognóstico importantes em pacientes com CEC oral. Nesta pesquisa, iniciamos também o estabelecimento do modelo PDTX a partir de pacientes com CEC oral diagnosticados no OROCENTRO da FOP-UNICAMP, visando reproduzir a lesão do paciente e possibilitar o teste da resposta tumoral frente a terapias convencionais e em desenvolvimento.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carcinoma espinocelular (CEC) oral

O câncer da cavidade oral é considerado um grave e crescente problema de saúde em muitas partes do mundo, principalmente nos países em desenvolvimento, com uma estimativa global de incidência de aproximadamente 275 mil novos casos por ano, resultando em altas taxas de mortalidade e morbidade (Warnakulasuriya, 2009; Vargas-Ferreira *et al.*, 2012). No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), estimam-se para o ano de 2016, 15.490 novos casos de CEC oral, sendo 11.140 em homens e 4.350 em mulheres, o que coloca este tipo de câncer na sétima posição em incidência na população brasileira (INCA, 2016). No estado de São Paulo, dados da fundação Oncocentro mostraram a ocorrência de 8.056 casos de câncer afetando a cavidade oral entre os anos 2000 a 2008, sendo que destes, 55% foram diagnosticados em estádios avançados (Curado *et al.*, 2016).

O CEC origina-se dos queratinócitos da membrana mucosa que reveste a cavidade oral e representa aproximadamente 90-95% de todas as neoplasias malignas que acometem a cavidade oral, sendo os demais, tumores malignos de glândulas salivares, sarcomas, tumores odontogênicos malignos, neoplasias hematopoiéticas e metástases (Daley & Darling, 2003; Scully & Bagan, 2009). O principal fator de risco associado ao desenvolvimento desta doença é o tabaco, sendo que, este tem ação sinérgica quando associado ao álcool, o que favorece o desenvolvimento do tumor (Scully & Peti, 2010). Outros fatores de risco vêm sendo estudados, como a associação com o papiloma vírus humano (HPV), radiação solar (para os CECs de lábio inferior) e imunossupressão devido à transplantes ou a síndrome da imunodeficiência adquirida (Revisado por Scully & Bagan, 2009). O perfil clássico do paciente acometido pelo CEC oral corresponde a homens, entre a sexta e sétima décadas de vida, tabagistas e etilistas crônicos, sendo o principal sítio acometido pelas lesões a borda lateral da língua (revisado por Moore *et al.*, 2000; Scully & Bagan, 2009). Entretanto, nas últimas décadas vem se notando um aumento do número de casos de CEC em pacientes jovens e também do sexo feminino, em contraste com o perfil clássico estes apresentam limitada associação aos tradicionais fatores de risco, o que sugere outros fatores de risco, como por exemplo instabilidade genética (Santos-Silva *et al.*, 2011; Majchrzak *et al.*, 2014).

Clinicamente, o aspecto de um CEC pode ser variado, podendo apresentar-se de forma leucoplásica, eritroplásica ou eritroleucoplásica, estas ainda em estágios iniciais, quando aumentos de volume ou ulcerações não estão presentes, sendo estes geralmente assintomáticos. Entretanto, como a lesão é frequentemente diagnosticada tardiamente, esta é encontrada como uma úlcera de curso crônico, com bordas elevadas e endurecidas, com áreas de necrose central, concomitante a sinais e sintomas de doença localmente avançada, como dor, disfagia, sangramento, perda de peso, além de linfadenopatia regional (Barnes *et al.*, 2005; Neville *et al.*, 2009; Pontes *et al.*, 2012). Microscopicamente, ilhas e cordões invasivos de células escamosas malignas, oriundas do epitélio de superfície, caracterizam os CECs orais. As células apresentam variados graus de pleomorfismo, núcleos aumentados e hiper cromáticos, eventuais figuras mitóticas atípicas e frequentes pérolas de queratina. Segundo o grau de diferenciação histológico, os CECs orais podem ser classificados em bem diferenciados, moderadamente diferenciados e pobremente diferenciados ou indiferenciados, classificação esta que mostra associação direta com o comportamento biológico desta neoplasia (Regezzi *et al.*, 2008; Neville *et al.*, 2009).

Assim como outros cânceres humanos, os CECs orais resultam do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas, dentre elas perdas de heterozigidade, inativações gênicas por metilação e ampliações gênicas. Estudos mostram que a ativação de oncogenes, como aqueles que codificam EGFR, ciclina D1, COX-2 e Bcl-2 e a inativação de genes supressores tumorais, dentre eles *p53*, *p21* e *p27*, são eventos capazes de alterar o complexo mecanismo que regula o crescimento e a proliferação celular, assim como as alterações envolvidas no processo de angiogênese, como a elevada expressão das isoformas da proteína VEGF (Regezzi *et al.*, 2008; Scully & Bagan, 2009; Sinevici & O'sullivan, 2016). Além destas alterações mais clássicas, estudos recentes sugerem que a capacidade que as células de CEC oral têm de invadir tecidos adjacentes, colonizar linfonodos regionais e disseminar-se para órgãos distantes é influenciada por um fenômeno biológico denominado transição epitélio-mesenquimal (*Epithelial-Mesenchymal Transition* - EMT) (Natarajan *et al.*, 2014). A EMT é um processo dinâmico, no qual as células tumorais de natureza epitelial adquirem, com o passar do tempo, características mesenquimais como a mudança de polaridade, perda de adesão, aumento da capacidade de migração e invasão além de adquirir resistência à apoptose (De Craene & Berx, 2013; Smith *et al.*, 2013).

A disseminação metastática dos CECs orais ocorre principalmente através dos vasos linfáticos em direção aos linfonodos cervicais ipsilaterais, com ocasionais metástases contralaterais ou bilaterais, e cerca de 2% dos pacientes apresentam metástases à distância para os pulmões, fígado e ossos no momento do diagnóstico (Neville *et al.*, 2009). Apesar dos representativos avanços tecnológicos no tratamento obtidos nas últimas décadas, o CEC oral ainda é caracterizado por pobre prognóstico e baixas taxas de sobrevida que, ao longo das últimas décadas, permaneceram em torno de aproximadamente 50 a 55% no período de 5 anos (Revisado por Noguti *et al.*, 2012; van Dijk *et al.*, 2016). No entanto, quando esta neoplasia é diagnosticada em seus estádios mais iniciais, as taxas de sobrevida em 5 anos podem atingir de 80 a 90% (Bagan *et al.*, 2010). Atualmente, o principal determinante do prognóstico dos CECs orais é a presença de metástases cervicais, sendo que nódulos linfáticos metastáticos podem ser observados em cerca de 40% dos pacientes (Revisado por Noguti *et al.*, 2012), e estudos têm mostrado que a incidência de metástases linfonodais ocultas no estágio I/II da doença pode chegar a 30%, com uma taxa ainda maior de metástase nodal vista em pacientes com câncer de língua, visto que, a lesão cresce de forma invasiva e se espalha através dos vasos linfáticos, ao invés de se espalhar por disseminação hematogênica (Sano & Meyers, 2007).

O estadiamento clínico da doença, realizado pelo sistema TNM, e a localização anatômica do CEC oral norteiam a escolha do tratamento, que pode consistir em excisão cirúrgica ampla, radioterapia, quimioterapia ou combinação destas modalidades (Neville *et al.*, 2009). A cirurgia é o tratamento de escolha para CECs orais em estádios iniciais e localização acessível. De modo geral, a radioterapia é empregada no tratamento de tumores localizados, comumente associada à cirurgia, podendo aumentar a eficácia desta última. Entretanto, na ocorrência de metástases ou tumores nos quais a cirurgia é contraindicada, uma abordagem sistêmica com agentes quimioterápicos é utilizada, sendo os mais utilizados os agentes platínicos (cisplatina e carboplatina), taxanos (paclitaxel e docetaxel) e as drogas antimetabólicas (5-fluorouracil e metotrexato), de maneira isolada ou combinada (Barnes *et al.*, 2005; Hennequin *et al.*, 2009; Revisado por Fury & Pfiser, 2011; Feller & Lemmer, 2012).

2.1.1 Paclitaxel

O paclitaxel foi originalmente isolado da casca do tronco da árvore *Taxus brevifolia* no ano de 1971, como parte de um programa do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, e é atualmente obtido de forma semissintética a partir de 10-desacetilbaccatina III, extraída das folhas do *Taxus baccata* (Yue *et al.*, 2010; revisado por Khanna *et al.*, 2015). O paclitaxel é um agente quimioterápico extensivamente utilizado, com um amplo espectro de atividade contra o câncer, e que teve seu uso clínico aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration* – FDA) em 1992 após ensaios clínicos de fase I, II e III para cânceres de ovário avançados, sendo dois anos mais tarde aprovado para o tratamento do câncer de mama metastático, com perspectivas promissoras contra outros tumores, como câncer de pulmão, esôfago e cabeça e pescoço (Rowinsky & Donewoher, 1995; revisado por Khanna *et al.*, 2015).

O paclitaxel pertence à família dos taxanos, que atuam através da inibição do fuso mitótico e, conseqüente, estabilização dos microtúbulos, bloqueando a mitose e provocando apoptose. Os microtúbulos são polímeros proteicos formados por várias unidades das proteínas α e β tubulina, componentes essenciais do citoesqueleto celular e cruciais no desenvolvimento e manutenção da forma da célula, motilidade, sinalização, transporte intracelular e divisão celular (Jordan & Wilson, 2004). O paclitaxel atua ligando-se ao aminoácido N-31 da subunidade β -tubulina, formando microtúbulos estáveis que comprometem a metáfase e impedem a transição da fase G2 para M, levando à morte celular (Jordan & Wilson, 2004; Yue *et al.*, 2010). Além disso, o paclitaxel interage também com moléculas regulatórias, visto que a alteração na formação dos microtúbulos ativa o gene supressor de tumor *p53* e inibidores de quinase dependentes de ciclina (*p21waf1*), além de modular diversas proteína-quinases (Yang *et al.*, 1999; Ferlini *et al.*, 2003).

Nos CECs de cabeça e pescoço, alguns estudos mostram a efetividade do tratamento com paclitaxel. Grau *et al.* (2009), analisaram a atividade antitumoral e a toxicidade da terapia com paclitaxel em pacientes com CECs de cabeça e pescoço em estágio IV resistentes à terapia com agentes platínicos. Neste estudo, 60 pacientes receberam paclitaxel semanalmente, destes, 43% responderam parcialmente e 15% ficaram estáveis, apresentando como principais efeitos colaterais anemia (43%) e fadiga (37%), assim, o uso deste agente quimioterápico apresenta-se como alternativa plausível para aqueles pacientes com resistência aos agentes platínicos. Tahara *et al.* (2011), também avaliaram a terapia com paclitaxel em pacientes com CECs de cabeça e pescoço em estádios avançados, recorrentes ou metastáticos, onde a taxa de

resposta global ao tratamento foi de 29%, com um tempo médio de sobrevida destes pacientes de 14,3 meses, observando assim, atividade favorável da medicação com graus de toxicidade aceitáveis.

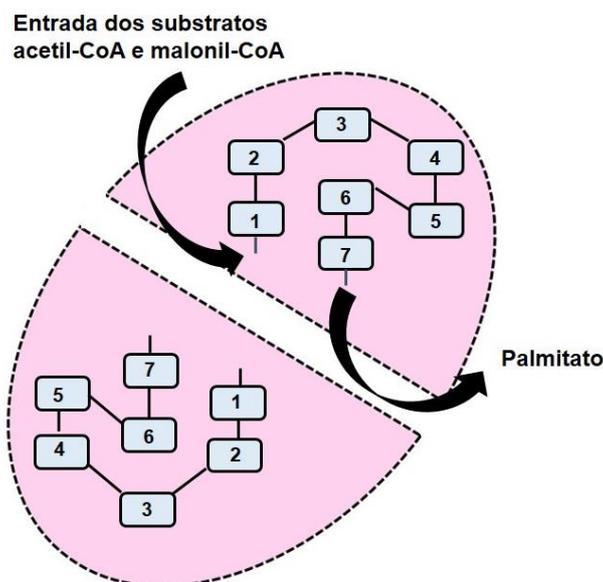
Assim como ocorre com outros agentes quimioterápicos, o surgimento de resistência ao paclitaxel pode interferir em sua eficácia clínica e esta, ocorre principalmente devido a elevada expressão da glicoproteína P, capaz de transportar a droga para o exterior da célula e diminuir sua concentração intracelular a níveis subletais (Yue *et al.*, 2010).

2.2 Ácido graxo sintase (*Fatty acid synthase - FASN*)

Os ácidos graxos são constituintes essenciais das membranas biológicas e importantes substratos para o metabolismo energético, sendo disponibilizados para o metabolismo animal quando ingeridos na dieta ou sintetizados pela enzima lipogênica ácido graxo sintase (FASN) (Menendez & Lupu, 2007). FASN é a enzima metabólica com papel central na homeostase energética, pois converte o excesso de carbono em ácidos graxos para armazenamento. Seu produto final é o palmitato (ácido graxo saturado de 16 carbonos), sintetizado a partir da condensação dos substratos de carbono acetil-CoA e malonil-CoA utilizando a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) como cofator (Baron *et al.*, 2004; Flavin *et al.*, 2010). O palmitato pode ser conjugado a proteínas ou convertido em outros ácidos graxos vitais para 1) síntese de lipídios e estruturas de membrana, tais como as jangadas lipídicas (*lipid rafts*), 2) modificações de proteínas e 3) ativação dos receptores e sinalização das principais vias oncogênicas, tal como a via P13K/ AKT/ mTOR (Jones & Infante, 2015).

Do ponto de vista estrutural, FASN é, em mamíferos, um homodímero formado por duas cadeias polipeptídicas multifuncionais contendo em cada uma delas sete diferentes sítios catalíticos, sendo um deles o sítio da proteína transportadora de acil (ACP) (**Figura 1**). Estes sítios, ordenados a partir da extremidade amino terminal são: β -cetoacil sintase, acetil-CoA e malonil-CoA transferases, β -hidroxiacil desidratase, enoil redutase, β -cetoacil redutase, ACP e o domínio tioesterase, que atuam em sequência até a liberação da molécula de palmitato graxo recém sintetizada (Brink *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2003; Flavin *et al.*, 2010).

Figura 1 – Enzima ácido graxo sintase (FASN). Homodímero formado por duas cadeias polipeptídicas multifuncionais contendo sete sítios catalíticos: 1: β -cetoacil sintase, 2: Acetil-CoA e malonil-CoA transferases (sítios de entrada dos substratos acetil-CoA e malonil-CoA para subsequente reação de condensação), 3: β -hidroxiacil desidratase, 4: Enoil redutase, 5: β -cetoacil redutase, 6: ACP (atuam como redutores sobre o produto formado pela β -cetoacil sintase) e 7: Tioesterase (responsável pela hidrólise do palmitato, que então é liberado). Estes sítios catalíticos atuam em sequência até a liberação da molécula palmitato recém sintetizada.



Fonte: Modificado a partir de Menendez & Lupu, 2007.

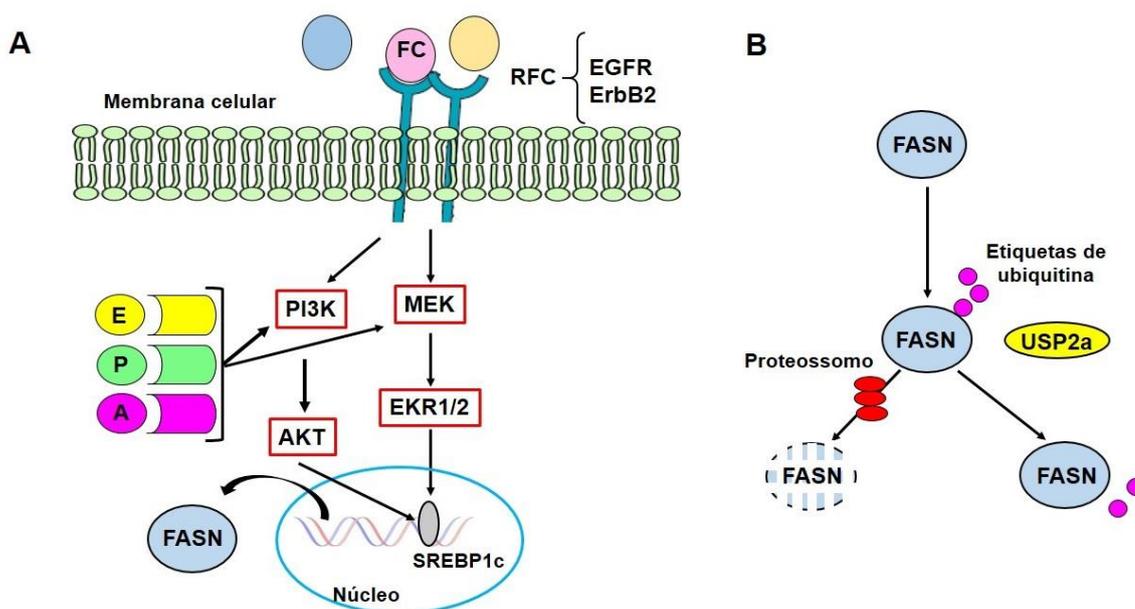
A primeira associação da expressão de FASN com uma neoplasia maligna ocorreu em 1994, quando Kuhajda *et al.* purificaram o então denominado antígeno AO-519, encontrado em carcinomas de mama agressivos. Em seguida identificaram que esta proteína era FASN por meio de análises de homologia de sequência de aminoácidos e enzimologia (Kuhajda *et al.*, 1994). As células malignas sintetizam *de novo* quantidades substanciais de ácidos graxos, independentemente dos níveis lipídicos circulantes, e como resultado podem adquirir vantagens para a proliferação, sobrevivência e resistência a medicamentos (Baron *et al.*, 2004). Kuemmerle *et al.* (2011) mostraram que, além da síntese *de novo*, as células malignas possuem também, a capacidade de obter ácidos graxos pré-formados derivados da dieta por absorção na corrente sanguínea. Assim, ao contrário das células normais (com exceção dos hepatócitos e adipócitos) que apresentam baixa expressão e atividade de FASN, em vários tipos cânceres ocorre elevada expressão de FASN, como os carcinomas de próstata, ovário, mama, endométrio, tireoide, colo e reto, bexiga, pulmão, CEC oral e de cabeça e pescoço, CEC de esôfago, pâncreas, fígado e

estômago, bem como melanoma, mesotelioma, nefroblastoma e retinoblastoma, sarcomas de tecido mole e mieloma múltiplo (Flavin *et al.*, 2010).

A regulação da expressão de FASN em células malignas é complexa e envolve mecanismos transcricionais e pós traducionais. A nível transcricional, dois mecanismos principais estão envolvidos (**Figura 2A**). O primeiro é a via do fator de crescimento epidérmico (*Epidermal growth fator* ou EGF), ativada por meio dos receptores EGFR e ErbB2 e o segundo envolve a via dos hormônios esteroides (estrógeno, progesterona e andrógenos) e seus respectivos receptores (Menendez & Lupu 2007; Flavin *et al.*, 2010). Na superfície das células tumorais, os fatores de crescimento e seus receptores ativam a cascata de sinalização celular da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K-AKT) e das quinases regulatórias de sinais extracelulares (ERK1 e ERK2) e MEK (proteína ERK ativada por mitógeno), que modulam a expressão de FASN por meio da expressão ou maturação nuclear das proteínas SREBP1c (*Sterol regulatory element binding protein 1c*), as quais por sua vez interagem com o sítio de ligação do complexo SREBP no promotor do gene *FASN*. Os hormônios esteroides ligados a seus respectivos receptores podem ativar mecanismos semelhantes (Menendez & Lupu, 2007; Raghov *et al.*, 2008).

Além dos fatores envolvidos no processo de transcrição, elevação na quantidade da proteína FASN pode ser gerada após sua tradução pela sua interação com a enzima desubiquitinante USP2a (**Figura 2B**). De uma maneira geral, enzimas desubiquitinantes impedem a destruição de substratos proteicos por retirar suas etiquetas de ubiquitina, evitando a degradação proteossômica. Em linhagem celular derivada câncer de próstata (LNCaP), Graner *et al.* (2004) demonstraram que USP2a interage e desubiquitina FASN, o que aumenta consequentemente sua meia vida. É importante ressaltar ainda, que o microambiente tumoral também interfere na expressão de FASN, pois os tumores de natureza sólida têm privação de nutrientes, hipóxia e baixo pH em seu interior, o que contribui para a ativação de várias vias de sinalização que regulam a expressão de FASN (Menendez & Lupu, 2007).

Figura 2 - Principais formas de regulação da produção de FASN no câncer. (A) Na superfície das células tumorais, fatores de crescimento (FC) e seus receptores (RFC) ativam a cascata de transdução de sinais de fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) - AKT e quinases regulatórias de sinais extracelulares (ERK 1 e ERK2) e a cascata MEK. Além disso, hormônios esteroides, incluindo estrógeno (E), progesterona (P) e andrógenos (A), ligados aos seus respectivos receptores (R), também podem desencadear mecanismos semelhantes. A expressão ou maturação nuclear de proteínas SREBP1c ativa a expressão de FASN. As interações entre FC - RFC e entre hormônios esteroides e seus receptores (E-RE, P-RP, A-RA) convergem nas cascatas PI3K - AKT e MEK amplificando os sinais para elevação da expressão de FASN. **(B)** A expressão de FASN também pode ser modificada após a sua tradução pela sua interação com USP2a, uma isopeptidase que remove as etiquetas de ubiquitina de FASN e previne sua degradação proteossômica.



Fonte: Modificado a partir de Menendez & Lupu, 2007

A elevada expressão de FASN tem sido associada a um prognóstico ruim e redução da sobrevivência dos pacientes em diversos tipos de cânceres (Flavin *et al.*, 2010). No entanto, o bloqueio da lipogênese *de novo* em células neoplásicas com inibidores de FASN leva a um aumento nas taxas de morte por apoptose, o que já foi demonstrado em câncer de mama (Hsu *et al.*, 2011), próstata (Brusselmans *et al.*, 2003), ovário (Uddin *et al.*, 2011), estômago (Dowling *et al.*, 2009), no melanoma (Carvalho *et al.*, 2008), dentre outros, indicando que FASN tem um importante papel na biologia das células tumorais (Jones & Infante, 2015). A expressão diferencial de FASN em tecidos normais e neoplásicos faz desta enzima um potencial alvo no tratamento oncológico, pois seus inibidores farmacológicos parecem atuar preferencialmente sobre as células neoplásicas e causar a morte destas por alterar a síntese e organização das membranas, modificar proteínas e vias de sinalização oncogênica (Menendez & Lupu, 2007; Jones & Infante, 2015).

Vários são os compostos inibidores da atividade de FASN, dentre eles cerulenina, orlistat e C75, que foram os primeiros a demonstrarem atividade antitumoral em linhagens celulares derivadas de neoplasias malignas e modelos de xenoenxertos, no entanto, nenhum deles chegou a ser clinicamente testado devido às suas limitadas propriedades farmacológicas e efeitos colaterais (Flavin *et al.*, 2010; Jones & Infante, 2015). Por isto, uma nova geração de moléculas como GSK2194069, JNJ-54302833, IPI-9119 e TVB-2640 está em desenvolvimento, entretanto apenas TVB-2640 já está em testes clínicos (Jones & Infante, 2015).

No presente estudo, visando a comparação com os resultados obtidos por Agostini *et al.* 2014, nos concentramos especificamente no estudo dos efeitos biológicos do inibidor de FASN orlistat.

2.2.1 Orlistat

O orlistat (tetrahidrolipstatin) é um derivado semissintético da lipstatina, aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da obesidade por inibir de maneira irreversível as lipases gástricas e pancreáticas (Guercioli *et al.*, 1997). É também capaz de inibir a atividade de FASN por formar adutos covalentes com o domínio tioesterase da enzima, que é o responsável pela liberação do palmitato (Flavin *et al.*, 2010). A identificação do orlistat como um potente inibidor de FASN foi feita por Kridel *et al.* (2004), por meio de estudos proteômicos de enzimas específicas do câncer de próstata. No mesmo trabalho, esta droga mostrou efeitos antiproliferativos em diferentes linhagens celulares de câncer de próstata e provocou inibição do crescimento tumoral em xenoenxertos de câncer de próstata. Por fim, este estudo também mostrou que células tumorais são mais propensas à ação do orlistat do que células epiteliais normais e fibroblastos.

Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa têm mostrado resultados favoráveis com orlistat. Carvalho *et al.* (2008) mostraram em camundongos portadores de melanomas intraperitoneais provocados pela injeção de células B16-F10, uma redução de aproximadamente 50% no número de metástases para linfonodos mediastínicos. No mesmo trabalho, observou-se também inibição da proliferação, com bloqueio da passagem para a fase S do ciclo celular, após o tratamento de células B16-F10 com orlistat. Com o objetivo de esclarecer os mecanismos biológicos envolvidos nestes fenômenos, Zecchin *et al.* (2011) relataram que a indução da

apoptose nas células B16-F10 ocorre por meio da ativação das caspases - 9 e - 3 e liberação de citocromo c, de maneira independente da ativação de *p53* e da transição da permeabilidade mitocondrial. Seguin *et al.* (2012) também observaram redução (53,4%) de metástases pulmonares experimentais, produzidas a partir da inoculação das células B16-F10 nas caudas de camundongos C57BL/6. Ainda neste estudo, foi descrita uma diminuição dos vasos sanguíneos peritumorais em melanomas experimentais cutâneos de camundongos expostos ao orlistat, além de redução na viabilidade, proliferação e capacidade de formação de capilares *in vitro* por células endoteliais RAEC. Por fim, Seguin *et al.* demonstraram ainda, aumento da secreção de VEGFA total e das isoformas VEGFA₁₂₁, ₁₆₅, ₁₈₉ e _{165b} por células de melanoma humano SK-MEL-25 e de CEC de língua SCC-9.

Em nossa dissertação de mestrado (Moreira FS, 2014), mostramos que o tratamento das células metastáticas de CEC de língua (LN-1) com 5-Fluorouracil, cisplatina e paclitaxel reduz a secreção de VEGFA e VEGF_{165b}, em comparação com o tratamento com orlistat sozinho. Um achado importante foi que, a secreção da isoforma antiangiogênica VEGF_{165b} pôde ser parcialmente restabelecida pela associação do inibidor de FASN aos quimioterápicos, sendo que as taxas de apoptose após a associação do orlistat ao paclitaxel foram aumentadas. Além da angiogênese, orlistat parece atuar também no processo de linfangiogênese. Em recente estudo, Bastos *et al.* (2017) mostraram que o tratamento com orlistat inibe a formação de capilares linfáticos, reduz a viabilidade, a proliferação e migração nas células endoteliais linfáticas HDLEC, além de reduzir em 39,25 % o volume das metástases em linfonodos cervicais laterais de camundongos portadores de melanomas experimentais B16-F10. Este mesmo grupo de autores descreveu ainda que orlistat reduz a produção de VEGF-C nestes tecidos tumorais, que atua sobre as células endoteliais linfáticas favorecendo sobrevivência, proliferação e migração.

Mesmo com todos esses resultados positivos, orlistat apresenta limitações farmacológicas, como baixa permeabilidade celular e baixa solubilidade, além de baixa estabilidade metabólica e reduzida absorção por via oral, apresenta também efeitos colaterais que restringem seu uso clínico no tratamento oncológico (Flavin *et al.*, 2010).

2.3 FASN em CECs orais

Com o aumento progressivo nas últimas décadas da quantidade de publicações científicas relacionando FASN com agressividade tumoral e metástase, esta enzima chegou a ser apontada como uma oncoproteína metabólica em cânceres de próstata e mama (Menendez & Lupu, 2007; Flavin *et al.* 2010). Conseqüentemente, alguns estudos foram realizados com CECs orais, inclusive em nosso laboratório. Em 1999, Krontiras *et al.* compararam, por meio de reações imunoistoquímicas, a expressão de FASN em amostras de mucosa oral morfológicamente normal e com displasia epitelial e de 56 CECs primários de língua, onde observada maior imunorreatividade no tecido epitelial displásico e nos CECs do que no epitélio normal.

Em nosso laboratório, Silva *et al.* (2008a) observaram, também em amostras teciduais de CECs de língua, que a expressão do receptor de superfície ErbB2, da enzima FASN e enzima desubiquitinante USP2a é maior nos queratinócitos malignos do que no epitélio oral morfológicamente normal adjacentes aos tumores. Nesta mesma pesquisa, os autores notaram uma correlação positiva entre a expressão imunoistoquímica de ErbB2, FASN e Ki-67 com a progressão tumoral e, conseqüentemente, com maior taxa de recorrência e menor tempo de sobrevida para os pacientes. Utilizando as mesmas amostras, Silva *et al.* (2008b) avaliaram a associação da expressão de FASN com características clinico-patológicas dos tumores. Aproximadamente 80% das amostras foram positivas para FASN, o que foi significativamente correlacionado com o grau histológico, presença de permeação linfática, infiltração perineural e linfonodos metastáticos, sugerindo fortemente que a expressão de FASN em CECs de língua está associada com a progressão da doença e seu prognóstico.

Mais recentemente, Agostini *et al.* (2014) mostraram que o tratamento de células de CEC de língua (SCC-9 e LN-1) com o inibidor de FASN orlistat reduz a proliferação e migração celular, promove apoptose e estimula ao mesmo tempo a secreção da isoforma antiangiogênica de VEGFA, o VEGFA_{165b}. *In vivo*, os mesmos autores observaram, utilizando um modelo ortotópico de CEC de língua por eles padronizado, que os tumores primários do grupo tratado com orlistat apresentaram volume significativamente menor do que os do grupo controle, com nítida redução do índice de proliferação celular das células que compõe nos primeiros. No entanto, ao nosso ver, o principal achado deste estudo foi uma redução de 43% no número de

linfonodos cervicais metastáticos no grupo tratado com orlistat. Estes achados, em conjunto, indicam que a inibição de FASN pode ser benéfica no controle da disseminação dos CECs orais, visto que, sua expressão neste tipo de neoplasia também está associada à agressividade tumoral e pior prognóstico.

2.4 Modelos animais e a pesquisa do CEC oral e de cabeça e pescoço

Nas últimas décadas, a pesquisa sobre o câncer avançou significativamente quanto ao grau de compreensão dos eventos moleculares envolvidos na tumorigênese, tendo uma boa parte deste conhecimento sido obtida em estudos explorando linhagens celulares e modelos animais. No entanto, os estudos dos processos metastáticos, da angiogênese e da resposta imune tumoral, dentre outros, não conseguem mimetizar *in vitro* o que ocorre *in vivo*, sendo bastante artificiais. Assim, modelos animais, embora cada vez menos utilizados por diversos laboratórios ao redor do mundo, ainda são essenciais na investigação da progressão tumoral e no desenvolvimento e teste de novos agentes terapêuticos (Lu *et al.*, 2006; Mognetti *et al.*, 2006; Ruggeri *et al.*, 2014).

Vários modelos animais já foram estabelecidos ou estão sendo desenvolvidos, tendo como instrumento de estudo mais utilizado os camundongos, principalmente nas pesquisas nas áreas de imunologia, genética e oncologia. Isto se deve: 1) ao fato de que estes animais compartilham grandes similaridades genéticas e fisiológicas com os seres humanos, permitindo que diversas características da doença sejam estudadas, e 2) apresentarem características conhecidas e monitoradas por várias gerações das linhagens de camundongos, bastante padronizadas (Hann *et al.*, 2001). No câncer oral, os modelos animais mais utilizados são os de indução química, os transgênicos e os de transplantes (revisado por Mognetti *et al.*, 2006).

Carcinógenos químicos para produzir o câncer oral em animais imunocompetentes já foram muito utilizados, pois compostos químicos presentes no tabaco e no álcool são apontados como os principais responsáveis pela etiologia dos CECs orais (Mognetti *et al.*, 2006). Um dos modelos de câncer oral induzido por carcinógenos químicos mais utilizados até hoje é o que utiliza o óxido de nitroquinolina (4-NQO) em ratos Wistar, geralmente adicionado à água de beber. Esta substância pode provocar CECs no palato, língua, esôfago e estômago, precedidos por aumento

no grau de displasia epitelial, constituindo um bom modelo para o estudo de lesões pré-malignas, no entanto, os carcinomas formados não são invasivos como os que ocorrem em humanos (Revisado por Mognetti *et al.*, 2006; Kim, 2009; Supsavhad *et al.*, 2016).

Uma vez que os cânceres humanos resultam de um conjunto de alterações genéticas e epigenéticas, modelos experimentais mais sofisticados foram desenvolvidos. Camundongos podem ser geneticamente manipulados para expressar (*Knockin*) ou deixar de expressar (*Knockout*) genes específicos e desta forma investigar seu papel na patogênese dos CECs de cabeça e pescoço (Revisado por Supsavhad *et al.*, 2016). O primeiro modelo transgênico para CEC oral e esofágico foi desenvolvido pelo cruzamento de camundongos L2 ciclina D1 (L2D1+), gerados com o promotor ED-L2 do vírus Epstein-Barr (EBV), com camundongos *knockout para p53* heterozigotos (*p53 +/-*). Considerando-se que os camundongos L2D1+ exibem o fenótipo microscópico de displasia nos epitélios oral e esofágico, quando são cruzados com camundongos *knockout para p53* geram como descendentes animais portadores de CEC oral e esofágico com evidências histológicas de invasão (Opitz *et al.*, 2002; Revisado por Mognetti *et al.*, 2006). Os papéis dos produtos codificados pelos genes EGFR, *p53* e CDK4 na patogênese dos CECs de cabeça e pescoço foram demonstrados neste modelo (Revisado por Supsavhad *et al.*, 2016). Outros modelos transgênicos de CECs orais já foram descritos, como o que utiliza os promotores dos genes que codificam as queratinas 5 ou 14 para elevar a expressão do oncogene *K-ras^{G12D}* no epitélio oral de camundongos, mostrando a importância de *K-ras* na iniciação tumoral (Revisado por Kim, 2009). Apesar destes modelos reproduzirem algumas das características dos CECs, apresentam como limitações diferentes microambientes tumorais e a presença de mutações semelhantes em praticamente todas as células dos animais, ao contrário dos tumores humanos nos quais estas surgem apenas em algumas células e novas mutações vão surgindo e se acumulando com o tempo. Por fim, outra limitação destes animais é que neles podem se desenvolver simultaneamente mais de um tumor primário, diferentemente do encontrado na doença humana (Revisado por Mognetti *et al.*, 2006).

O transplante de células neoplásicas ou de fragmentos tumorais para camundongos imunossuprimidos é bastante utilizado para se estudar muitos tipos de câncer. Para os CECs de cabeça e pescoço, esta metodologia começou a ser aplicada no início da década de 80 (Mognetti *et al.*, 2006). Tais transplantes podem ser

realizados de forma subcutânea ou ortotópica. Os enxertos subcutâneos possibilitam um acompanhamento mais preciso do crescimento dos tumores, porém, sem invasão local e com rara disseminação metastática. Além disto, a resposta aos agentes quimioterápicos obtidas nestes modelos não parece se refletir na dos pacientes, o que torna o uso deste modelo limitado (Revisado por Supsavhad *et al.*, 2016). Por sua vez, os modelos ortotópicos são mais apropriados e reprodutíveis para estudar mecanismos envolvidos na progressão tumoral e também potenciais terapias, pois são desenvolvidos nas regiões e estruturas anatômicas correspondentes às dos seres humanos, favorecendo o crescimento das células transplantadas (Mognetti *et al.*, 2006; Revisado por Supsavhad *et al.*, 2016).

A utilização de linhagens celulares originárias de neoplasias malignas humanas é uma prática muito comum no desenvolvimento de modelos animais. No entanto, os mecanismos responsáveis pela tumorigênese podem ser alterados ou mesmo perdidos durante as diversas passagens do cultivo que acarretam alterações genéticas artificiais. Com linhagens celulares, falta ainda o estroma tumoral, de importância reconhecida para o crescimento dos tumores, e o ambiente imunológico, o que pode explicar a limitada eficiência para testar medicamentos em ensaios pré-clínicos, com resultados muitas vezes falso-positivos (Schultz *et al.*, 2014).

2.4.1 Modelo de transplante xenográfico de tumor derivado de pacientes (*Patient-derived tumor xenografts* - PDTX)

Nos últimos anos, vários estudos, tendo como base a heterogeneidade celular encontrada nos tumores primários e suas metástases, têm estabelecido modelos PDTX para diversos tipos de cânceres humanos, com o objetivo central de se estabelecer modelos pré-clínicos que apresentem com maior fidelidade a complexidade e heterogeneidade dos tumores humanos, reproduzindo a doença de cada paciente de forma individual (Rubio-Viqueira & Hidalgo, 2009; revisado por Tentler *et al.*, 2012). Este modelo consiste na implantação, ortotópica ou não, de pequenos fragmentos de tumores humanos em camundongos imunossuprimidos, os quais carregam consigo a diversidade celular e genética do tumor. O crescimento de tumores na forma de xenoenxerto assegura que suas células serão expostas a níveis de oxigênio, de nutrientes e de hormônios fisiologicamente relevantes, o que pode fornecer os substratos naturais para a aderência das células malignas (Willians *et al.*,

2013). Análises citogenéticas realizadas em modelos PDTX mostram significativa preservação da arquitetura cromossomal das células neoplásicas, além de manutenção das características histopatológicas dos tumores de origem (Willians *et al.*, 2013).

Vários tipos de neoplasias malignas humanas já apresentam modelos PDTX bem estabelecidos, dentre eles, os tumores de pâncreas, colón e reto, pulmão, mama e próstata, além do melanoma (Revisado por Tentler *et al.*, 2012). Nos tumores colorretais já existe sucesso no estabelecimento, manutenção e estudos pré-clínicos em modelos PDTX. No ano de 2004, Fichtner *et al.* estabeleceram 15 modelos PDTX bem sucedidos em camundongos Balb/c *nude*, todos mantendo as características histopatológicas e a expressão de marcadores moleculares como E-caderina, EpCAM e CEA muito semelhantes aos tumores dos pacientes doadores. Este estudo comparou ainda a eficácia do tratamento dos animais transplantados com 5-fluorouracil, oxaliplatina e irotecano e mostrou concordância entre as respostas destes últimos com aquelas obtidas nos pacientes correspondentes. Por outro lado, nos cânceres hormônio-dependentes, como os de mama e próstata, os primeiros modelos PDTX tiveram sucesso limitado, o que melhorou com a suplementação hormonal dos camundongos (Revisado por Tentler *et al.*, 2012).

Modelos PDTX com pacientes portadores de CECs de cabeça e pescoço também já foram descritos, com taxas de sucesso variando de 29% a 44% (Revisado por Tentler *et al.*, 2012). Seshadri *et al.* (2009) estabeleceram modelos PDTX a partir de três sítios primários distintos: região retromolar, língua e laringe, que foram transplantados subcutaneamente em camundongos imunossuprimidos. Estes enxertos demonstraram características histopatológicas semelhantes às daquelas dos tumores de origem, porém os enxertos oriundos de CECs da região retromolar e da laringe apresentaram maior queratinização do que os tumores doadores. Peng *et al.* (2013) realizaram o enxerto de 30 CECs de cabeça e pescoço primários nos flancos de camundongos nudes (nu/nu) e, destes, apenas 17% puderam ser passados em série. Neste mesmo estudo, os tumores também mantiveram as características histopatológicas das massas tumorais de origem, com perda do estroma humano após os enxertos. Recentemente, Li *et al.* (2016) realizaram uma análise proteômica comparando os CECs primários e seus respectivos xenoenxertos e descreveram a manutenção da expressão de proteínas nos tumores primários e respectivos enxertos,

apresentando diferenças significantes somente com relação aos componentes do estroma.

Dentre os modelos animais, os PDTX fornecem, sem dúvida, a maior aproximação, de maneira reprodutível, com as neoplasias humanas e refletem com maior precisão a complexa biologia destas. A mais importante característica dos modelos PDTX, em relação aos modelos de xenoenxerto realizados com linhagens celulares, é a possibilidade, mesmo que ainda remota, de se prever a resposta clínica do paciente frente às terapias disponíveis para cada caso em particular. Por fim, este modelo pode favorecer o desenvolvimento de novas terapias que possam impactar significativamente na sobrevida global dos pacientes com câncer (Willians *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2014).

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da combinação do inibidor de FASN orlistat com o quimioterápico paclitaxel sobre a linhagem celular metastática de CEC oral LN-1 e sobre o processo metastático *in vivo*, utilizando o modelo ortotópico de CEC de língua. Estabelecer o modelo de xenoenxerto ortotópico de CECs orais derivados de pacientes (PDTX).

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Identificar as concentrações de orlistat e de paclitaxel necessárias para inibir o crescimento celular em 50% (IC₅₀), na linhagem celular LN-1.

3.2.2 Analisar *in vitro* os efeitos dos tratamentos com orlistat, paclitaxel e a combinação destes sobre as taxas de apoptose, a progressão do ciclo celular e a capacidade migratória das células LN-1.

3.2.3 Avaliar *in vitro* os efeitos dos tratamentos com orlistat, paclitaxel e a associação destes sobre os seguintes marcadores de EMT: Vimentina, N-Caderina, E-Caderina, Beta-Catenina, Twist e Snail.

3.2.4 Avaliar e comparar os efeitos *in vivo* da terapia com orlistat combinado ao paclitaxel sobre os tumores primários e respectivas disseminações metastáticas para linfonodos cervicais no modelo ortotópico de CEC de língua.

3.2.5 Estabelecer e padronizar o modelo de xenoenxertos ortotópicos derivados de pacientes portadores de CECs orais pelo transplante de fragmentos de tumores primários de pacientes do OROCENTRO da FOP-UNICAMP para camundongos NOD/SCID.

3.2.5.1 Comparar as características histopatológicas dos enxertos, o grau de diferenciação dos tumores e os padrões de marcação em reações imunohistoquímicas para FASN, p21, Ki-67 e CD44 com os tumores dos pacientes doadores.

4 MATERIAL E MÉTODOS

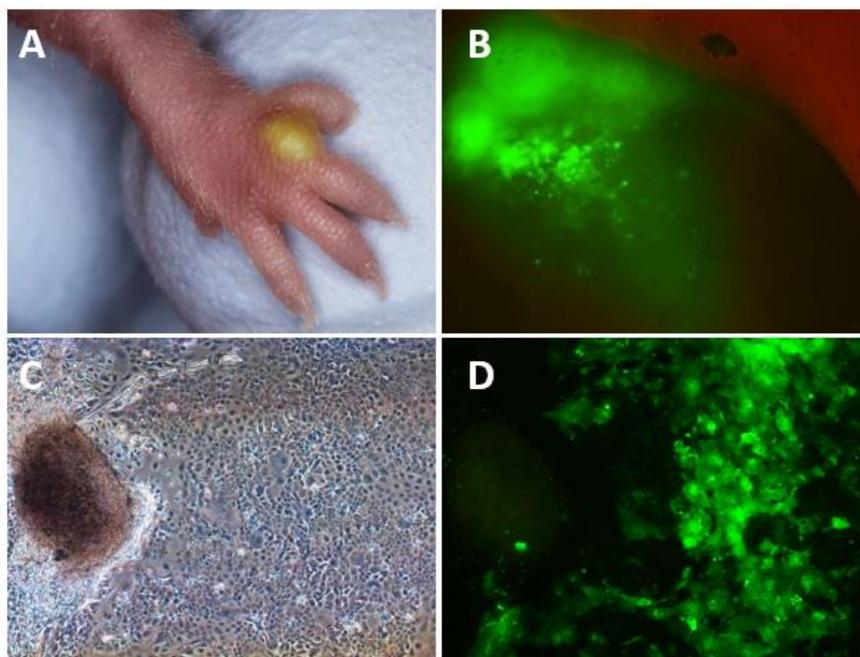
4.1 Aprovação do comitê de ética

Todos os experimentos deste estudo foram realizados de acordo com as normas relativas à ética em pesquisa envolvendo seres humanos e animais sob deliberação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP (protocolo nº 141/2014 - anexo1) e do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNICAMP (protocolos nº4142-1 e 4018-1 - anexos 2 e 3)

4.2 Cultura de células

A linhagem celular metastática de CEC oral humano utilizada nesta pesquisa - SCC-9 *ZsGreen* LN-1 (LN-1) – foi novamente estabelecida a partir da linhagem SCC-9 *ZsGreen*, proveniente da transfecção da proteína verde fluorescente *ZsGreen* em células SCC-9 adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC, E.U.A.) (Agostini *et al.*, 2014). Para isso, 1×10^6 células SCC-9 *ZsGreen* ressuspendidas em 10 μ L de solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 (*phosphate buffered saline* - PBS) foram transplantadas nas patas dianteiras de dois camundongos atímicos, BALBc/*nude* machos, com auxílio de uma seringa de 0,3 mL com agulha de 30G (BD Ultra-Fine II), estes previamente anestesiados com injeção subcutânea de ketamina (100 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg). Após 60 dias de transplante das células, os camundongos foram sacrificados e os linfonodos axilares coletados, colocados em placa de petri de 40 x 11 mm (NUNC, Dinamarca) contendo meio de cultura DMEM/F-12 (Invitrogen, E.U.A.) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Brasil), 400 ng/mL de hidrocortisona (succinato sódico de hidrocortisona, Eurofarma, Brasil) e solução antibiótica e antimicótica (Invitrogen, E.U.A.) na diluição de 1:100, e analisados sob microscópio de fluorescência para a detecção de células SCC-9 *ZsGreen* metastáticas. Após isso, os linfonodos metastáticos foram lavados com PBS, seccionados com lâmina de bisturi e colocados em cultura em frascos plásticos de 25 cm² contendo 0,5 mL de meio de cultura DMEM/F-12 suplementado com 10% de SFB, este, trocado a cada 2 dias. Trinta dias após o plaqueamento, os fragmentos do tecido foram removidos e as células passadas para frascos plásticos de 25 cm², estabelecendo-se assim a nova linhagem celular denominada SCC-9 *ZsGreen* LN-1 (LN-1) (**Figura 3**).

Figura 3 - Isolamento da linhagem celular LN-1. Em A, tumor induzido pela implantação de células SCC-9 *ZsGreen* na pata dianteira de camundongo BALB/c *nude*. B representa um linfonodo axilar metastático invadido pelas células SCC-9 *ZsGreen*, os quais foram colocados em cultura, pela técnica do explante, a partir do qual as células LN-1 foram isoladas (C e D).



Nesta pesquisa, as células SCC-9 *ZsGreen* e LN-1 foram cultivadas em frascos plásticos de 75 cm² (Corning, E.U.A.) em meio de cultura DMEM/F-12 suplementado com 10% de soro fetal bovino a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade, e, ao atingirem uma confluência de aproximadamente 70%, o meio de cultura foi removido, as células lavadas com 10 mL de PBS e incubadas a 37°C com 500 µL ou 2 mL de tripsina (Invitrogen, E.U.A.), para frascos de 25 cm² e 75 cm² respectivamente. Após o desprendimento total das células do assoalho do frasco, a ação da tripsina foi inativada pela adição de 5 mL (para frascos de 25 cm²) e 10 mL (para frascos de 75 cm²) de meio de cultura DMEM/F-12 com 10% SFB. As suspensões de células foram então transferidas para tubos plásticos estéreis de 15 mL e estes centrifugados a 800 xg durante 3 minutos, após isso os sobrenadantes foram descartados, os *pellets* de células ressuspensos em 5 mL de meio de cultura DMEM/F-12 com 10% de SFB e 10 µL destas suspensões utilizados para contagem das células em contador automático *Countess® Cell Counter* (Invitrogen, E.U.A.) para a realização dos experimentos.

Em todos os procedimentos de cultivo celular foram tomados os devidos cuidados para manutenção da esterilidade e para prevenir contaminações com outras

linhagens utilizadas em nosso laboratório. As células foram periodicamente testadas para verificar contaminação por mycoplasma, por meio de reações em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction* - PCR). Com o intuito de trabalhar com células apresentando características morfológicas semelhantes e também evitar o acúmulo de alterações genéticas, as linhagens celulares foram subcultivadas neste trabalho por no máximo dez passagens e então descartadas.

4.3 Preparo das soluções de orlistat e de paclitaxel

Para os experimentos em cultura de células, o composto ativo do orlistat (Orlistate[®], Neoquímica, Brasil) foi extraído de acordo com Knowles *et al.* (2004), dissolvendo-se o conteúdo de uma cápsula em 1 mL de etanol absoluto (Merck, Alemanha), seguido de agitação a cada 10 minutos, por um período de 30 minutos a temperatura ambiente. A seguir, a solução foi centrifugada a 12.000 xg por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado e filtrado. Foram feitas alíquotas e estas foram mantidas a - 80°C até o momento da realização dos experimentos. Para os experimentos *in vivo*, foram utilizadas soluções de orlistat preparadas de acordo com Kridel *et al.* (2004), para as quais o conteúdo de cada cápsula foi solubilizado em 1 mL de etanol a 33% (diluído em PBS) durante 30 minutos e agitados a cada 10 minutos, o que foi seguido de 5 minutos de centrifugação a 12.000 xg a 4°C e os sobrenadantes coletados, filtrados e armazenados a -80°C. O quimioterápico paclitaxel (Ontax[®], 150mg), adquirido na forma de solução injetável em frasco-ampola, foi diluído em PBS antes do uso.

4.4 Ensaio de viabilidade celular por MTT e cálculo da IC₅₀ e do índice de combinação

A viabilidade das células após o tratamento com orlistat e paclitaxel foi determinada utilizando-se o kit de proliferação celular MTT (*Cell Titer 96[®] Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* – Promega). O experimento com MTT (3 - (4,5-dimetil-2-yl) -2,5 difeniltertrazolim brometo) baseia-se na clivagem do sal tetrazólio, que apresenta coloração amarela, para cristais azuis de formazan por células metabolicamente ativas. Assim, 8 x 10³ células ressuspendidas em 100 µL de meio suplementado com 10% de SFB foram semeadas em placas de 96 poços (Corning, E.U.A.). Após 24 horas, o meio de cultura foi trocado por meio fresco contendo

concentrações crescentes de cada droga. Passadas 48 horas de tratamento, foram adicionados 15 µL da solução corante em cada poço e as células incubadas a 37°C por mais 4 horas. Após este período, 100 µL da solução de parada foram adicionados e as células incubadas por 2 horas. A suspensão foi então homogeneizada, com auxílio de uma micropipeta multicanal, e as absorbâncias mensuradas em leitor de placa de 96 poços (*BioRad, Hercules, CA, E.U.A*) ajustado para 570 nm. A viabilidade celular foi expressa em porcentagem em relação aos controles.

As análises dose-efeito foram realizadas a partir do cálculo da fração de efeito (Fe) de cada droga nas diferentes concentrações, através da equação: $Fe = 1 - (\text{absorbância das células tratadas} / \text{absorbância das células controle})$. Assim, o valor da IC₅₀ (metade da concentração inibitória) foi calculado para a realização dos experimentos *in vitro*. O efeito da combinação de diferentes drogas, principalmente as antineoplásicas, pode ser estimado pelo índice de combinação (*Combination index- CI*) método desenvolvido por Chou e Talalay (1984), onde o valor de CI<1 indica sinergismo, valor de CI>1 indica antagonismo e valor igual a 1 indica efeito aditivo. O IC₅₀ e o CI foram calculados com auxílio do *software* CompuSyn (Chou & Martin, 2005).

4.5 Avaliação das taxas de morte celular por apoptose e necrose

A detecção das células em apoptose e necrose foi realizada por citometria de fluxo, através da marcação com Anexina V-PE (BD Pharmingen™, E.U.A.) e 7AA-D – PerCP (BD Pharmingen™, E.U.A.), respectivamente. Para isto, 3,5 x 10⁵ células LN-1 foram semeadas em 5 mL de meio DMEM/F-12 com 10% de SFB em frascos de 25 cm². Após 24 horas, o meio de cultura foi removido e trocado por meio fresco, suplementado com 2 % e 10 % de SFB, contendo as drogas orlistat, paclitaxel e orlistat associado ao paclitaxel, todas nas concentrações de seus respectivos IC₅₀, além do controle (etanol + PBS) e incubadas por 48 horas. Após as incubações, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e incubadas com 0,2 µg/µl de Anexina V-PE e 7AA-D–PerCP em tampão de ligação contendo 10 mM de HEPES (pH 7,4), 150 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de MgCl₂ e 1,8 mM de CaCl₂ por 20 minutos protegidos da luz e à temperatura ambiente. A aquisição das amostras foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences) em canal FL2 e FL3 e as análises realizadas

com o auxílio do programa CellQuest (Becton Dickinson). Foram analisados 10.000 eventos para cada uma das condições experimentais.

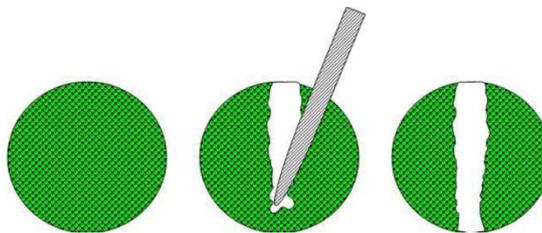
4.6 Análise do ciclo celular

A porcentagem de células em cada fase do ciclo celular foi determinada após marcação do conteúdo total de DNA com iodeto de propídeo. Foram semeadas $3,5 \times 10^4$ células em 5 mL de meio de cultura suplementado com 10% de SFB em frascos de 25 cm² e após 24 horas o meio de cultura foi trocado por meio fresco sem SFB, a fim de se promover a sincronização dos ciclos celulares em cada cultura analisada. Passadas mais 24 horas, o meio de cultura foi trocado por meio fresco suplementado com 10% de SFB contendo orlistat, paclitaxel e a associação destes em seus respectivos IC₅₀. Após 36 horas, as células foram lavadas com 5 mL de PBS, tripsinizadas, ressuspensas em etanol 70% gelado e mantidas por 24 horas a -20°C. Em seguida, as células foram centrifugadas a 800 xg durante 3 minutos, o sobrenadante descartado e estas tratadas com 10 µg / mL de RNase (Sigma) em PBS a 37°C por 1 hora. Após coloração com 50 µg / mL de iodeto de propídeo a 4°C, no escuro por 2 horas, as células foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences) no canal FL2. A porcentagem de células em cada fase do ciclo celular foi obtida através do programa ModFit LTTM (Verity Software House, E.U.A.).

4.7 Migração celular

O potencial migratório das células LN-1 foi avaliado através do ensaio de migração em monocamada, utilizando o método “*scratch*”, baseado na criação de uma interrupção na continuidade da monocamada celular (“ferida”), como descrito por Liang *et al.* (2007). Para isso, $2,4 \times 10^5$ células ressuspensas em 500 µL de meio suplementado com 5% SFB foram semeadas em placas de 24 poços e mantidas por 24 horas, até formarem uma monocamada confluenta. Em seguida, a “ferida” foi confeccionada com auxílio de uma ponteira estéril de 200 µL (**Figura 4**), as culturas lavadas 3 vezes com PBS para a remoção dos debrís celulares e novo meio de cultura suplementado com 2% de SFB, contendo orlistat, paclitaxel, a associação destes e o controle, adicionados às células para nova incubação de 24 horas.

Figura 4- Esquema representativo do ensaio de migração pelo método “*scratch*”. Uma área de descontinuidade é confeccionada em uma monocamada confluyente, dentro da qual posteriormente é avaliado o potencial migratório das culturas celulares.



Modificado a partir de Hulkwoer & Herber, 2011.

Foram realizadas fotomicrografias em microscópio de contraste de fase nos tempos 0 e 24 horas e a contagem das células presentes no interior das áreas das respectivas “feridas” feitas com o auxílio do *software* ImageJ.

4.8 Análise dos marcadores da transição epitélio mesenquimal (*epithelial-mesenchymal transition* – EMT) por western blotting

Para análise proteica em western blottings, os *pellets* das células tratadas por 48 horas com as drogas estudadas foram obtidos através da raspagem dos frascos de cultura com *cell lifters* descartáveis (Costar, E.U.A.). As proteínas foram extraídas em aproximadamente 100 μ L de tampão de lise (10 % de sacarose, 1 % de Triton X-100, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 137 mM de NaCl, 10% de glicerol, 2 mM de EDTA e 1 mM de NaF) suplementado com inibidores de protease (Complete Mini Cocktail, Roche Diagnostics – Mannheim, Alemanha). Os *pellets* foram dissociados por pipetagem e os homogenatos resultantes mantidos no gelo por 30 minutos, sendo agitados a cada 10 minutos. Passado esse tempo, as amostras foram centrifugadas a 12.000 $\times g$ por 15 minutos a 4°C e os sobrenadantes coletados e armazenados a -80°C até o momento do uso. As concentrações de proteínas totais foram estimadas pelo método de Bradford (Sigma-Aldrich, E.U.A) com comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro Spectronic Genesys 2.

Quantidades relativamente iguais de proteína de cada extrato obtido foram misturadas com tampão de amostra redutor concentrado quatro vezes (8% de SDS, 0,25 M de Tris-HCl (pH 6,8), 30 % de glicerol e 0,2% de azul de bromofenol) contendo 20 % do volume total de Ditiotretol (DTT, Sigma-Aldrich, E.U.A), aquecidas por 5

minutos a 100°C (Thermoblock, Labnet, E.U.A.), separadas eletroforéticamente em géis de poliacrilamida-SDS a 8% ou 12% e então transferidas para membranas de nitrocelulose (*Hybond*, GE Healthcare, E.U.A.). Estas membranas foram bloqueadas por 18 horas a 4°C em solução de leite em pó desnatado a 5% (Nestlé, Brasil) dissolvido em tampão contendo 20 mM de Tris-HCl (pH 7,6), 150 mM de NaCl e 1% de Tween 20 (TBST) e incubadas com os anticorpos primários (**Tabela 1**) diluídos em TBST com 5% de leite em pó desnatado, por 2 horas a temperatura ambiente e sob agitação constante. Após 3 lavagens consecutivas com TBST, as membranas foram incubadas com os respectivos anticorpos secundários (anti-mouse, conjugado com APC cy7- ABCAM, na diluição de 1:1000 e anti-rabbit, conjugado com Alexa fluor 790- ABCAM, na diluição de 1:10.000) e após uma nova série de lavagens com TBST, os resultados foram documentados com o auxílio do equipamento Alliance 4.7 (Uvitec, Cambridge, Inglaterra) e do *software* Alliance 16.06. Todas as bandas tiveram seus valores normalizados pelo valor da leitura das bandas de β -actina, utilizada como controle de *loading*.

Tabela 1: Anticorpos primários utilizados para reações de *western blotting*.

ANTICORPO	CLONE	MARCA	DILUIÇÃO
FASN	23	BD Biosciences	1:1.000
E-caderina	24E10	Cell signaling	1:1.000
N-caderina	32/N-Cadherin	BD Biosciences	1:1.000
Vimentina	V9	Sigma-Aldrich	1:500
β -catenina	14/Beta-Catenin	BD Biosciences	1:1.000
Twist	H-81	Santa Cruz	1:200
Snail	H-130	Santa Cruz	1:200
β -actina	AC-15	Sigma-Aldrich	1:30.000

4.9 Estudo da formação de tumores primários e metástases regionais em modelo ortotópico murino de CEC de língua

O transplante ortotópico das células LN-1 foi realizado em 64 camundongos atímicos BALBc/*nude* machos, com idade entre 6 e 8 semanas obtidos junto ao Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

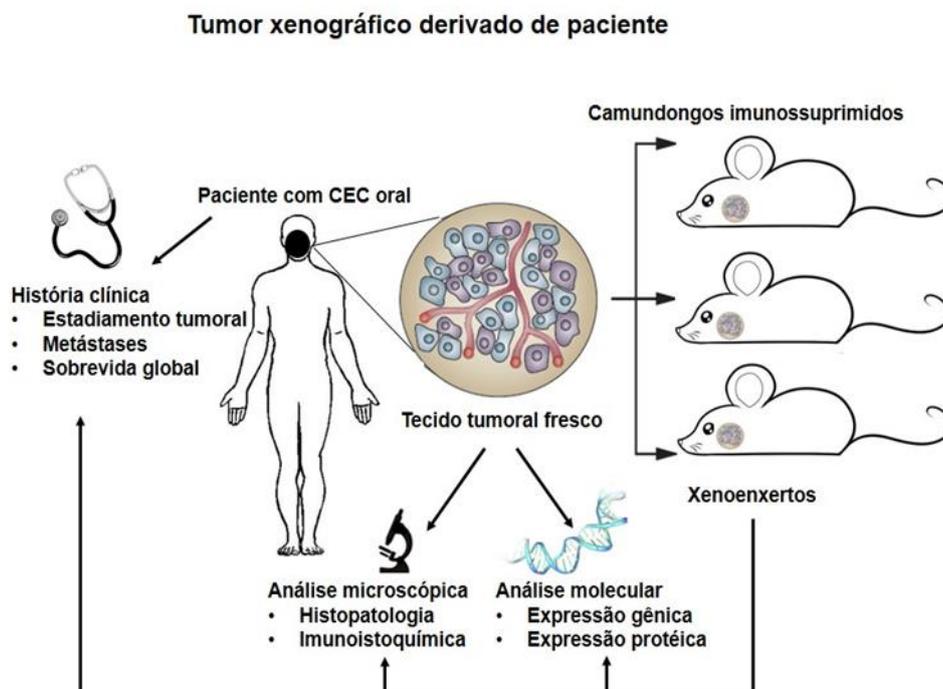
Após anestesia com injeções intramusculares de ketamina (100 mg / Kg) e xilazina (10 mg / Kg), 1×10^5 células LN-1 ressuspendidas em 20 μ L de PBS foram transplantadas, com o auxílio de uma seringa de 0,3 mL com agulha 30 G (BD Ultra-Fine II), na borda lateral do lado direito da língua de cada camundongo. Passadas 24 horas dos transplantes, iniciaram-se os tratamentos que totalizaram 14 dias. Os animais foram divididos em 4 grupos: Controle, Orlistat, Paclitaxel e Orlistat + Paclitaxel, cada um deles com 8 animais. Os grupos controles receberam injeções intraperitoneais diárias de etanol a 33% em PBS e os grupos Orlistat receberam injeções de orlistat pela mesma via (240 mg/Kg/dia), ambos por 14 dias ininterruptos. A dose de paclitaxel utilizada neste estudo foi determinada previamente por nosso grupo de pesquisa, por meio do ensaio de dose máxima tolerada (Almeida, L.Y; 2015). Assim, os grupos Paclitaxel receberam injeções intraperitoneais de paclitaxel diluído em PBS (30 mg/Kg/dia), apenas nos quintos e nos décimos dias de tratamento, totalizando dois ciclos quimioterápicos. Os grupos Orlistat + Paclitaxel receberam 14 dias de injeções de orlistat (240 mg/Kg/dia) e nos quintos e décimos dias de paclitaxel, como descrito acima. Quando os experimentos chegaram ao décimo quinto dia de duração, os animais foram sacrificados através da inalação de CO₂ e os tumores primários e linfonodos coletados. As línguas foram todas observadas em câmara com iluminação ultravioleta e documentadas com o auxílio do equipamento Alliance 4.7 (Uvitec, Cambridge, Inglaterra) e os linfonodos foram observados e fotografados em microscópio de epifluorescência (Nikon, Eclipse Ti - Japan) e posteriormente fixados em formol 10%. Os volumes dos tumores foram calculados pela fórmula: $V = 0,5 \times \text{comprimento} \times \text{largura}^2$ e expressos em cm³. O experimento foi realizado duas vezes de maneira independente.

4.10 Estabelecimento do modelo de enxertos xenográficos derivados de pacientes (*patient-derived tumor xenografts* – PDTX) portadores de CECs orais

Visando aproximar o modelo ortotópico de CEC de língua, descrito acima, da realidade clínica dos pacientes portadores desta neoplasia, iniciamos, durante a parte experimental da presente tese, a padronização dos modelos PDTX derivados de pacientes com CECs orais. Para este fim, pequenos fragmentos de CECs orais foram obtidos no momento da biópsia de pacientes atendidos no OROCENTRO da FOP-UNICAMP. Uma parte do material foi mantida em nitrogênio líquido para

posteriores estudos de expressão gênica e proteica e o restante foi seccionado em pequenos pedaços de formato regular, com aproximadamente 2 mm³, os quais foram lavados com meio de cultura contendo solução antibiótica e antimicótica na diluição de 1:50. Como receptores, 3 camundongos NOD.CB17-Prkdcscid/JUnib machos, com 6 a 10 semanas, adquiridos do CEMIB/UNICAMP, foram anestesiados com injeção intraperitoneal de ketamina (100mg/Kg) e xilazina (10mg/kg) e cada fragmento de tumor acomodado em leitos cirúrgicos preparados com lâmina de bisturi na região dorso-lateral da língua, o que foi seguido de sutura com fio Vycril 6.0, Ethicon (**Figura 5**). Os animais foram acompanhados durante as semanas subsequentes, tendo o aspecto geral, peso corporal e a taxa de crescimento dos enxertos avaliados quinzenalmente. O momento do sacrifício (através de inalação de CO₂) foi determinado pelo volume dos tumores primários e/ou peso corporal (perda de 20% do peso inicial). Após o sacrifício, as línguas foram coletadas, assim como os linfonodos das cadeias cervicais, pulmões, fígados e rins, e fixados em formol a 10%. Todos os tecidos foram incluídos em parafina e os cortes obtidos utilizados para coloração com H&E e reações imunoistoquímicas. As características histopatológicas dos transplantes e os padrões de positividade observados nas reações imunoistoquímicas foram comparados com aqueles observados nos tumores primários originais de cada doador.

Figura 5 – Esquema do protocolo de trabalho realizado para a padronização do modelo PDTX com amostras derivadas de CECs orais de pacientes do OROCENTRO da FOP-UNICAMP.



Modificado de Tentler *et al.* 2012.

4.10.1 Reações imunistoquímicas

As reações de imunistoquímica foram realizadas no Laboratório de Imunistoquímica da Área de Patologia Bucal da FOP-UNICAMP, com o auxílio da doutoranda Celeste Sánchez Romero. Para isto, cortes de 3 μm foram colocados sobre lâminas tratadas com 3-aminopropil-trietoxi-silano (Sigma, E.U.A.), desparafinizados, hidratados e lavados em água corrente. A recuperação antigênica foi feita utilizando-se ácido cítrico na concentração de 10 mM (pH 6,0) em panela de pressão. Após resfriamento por 20 minutos em temperatura ambiente foi feita uma lavagem em água corrente. Posteriormente, a peroxidase endógena foi bloqueada com H_2O_2 (10 volumes) em 5 trocas de 5 minutos cada, seguido de lavagem em água corrente, água destilada e finalmente imersão em PBS. Foram feitas incubações com anticorpos primários por 16 horas a 4°C em câmara úmida, estes anticorpos foram previamente diluídos em diluente de anticorpo (Antibody Diluent, Background Reducing, Dako) (**Tabela 2**). Em seguida, foram realizadas 3 lavagens com PBS,

sendo estas de 1 minuto cada, subsequentemente foram realizadas as incubações com os anticorpos secundários biotinizados (Anti-rabbit e anti-mouse, LSAB2 Kits, Universal, HRP) por 30 minutos a 37°C. As reações foram evidenciadas com solução de tetracloreto de 3,3' diaminobenzidina (DAB) a 0,06% (Sigma, E.U.A.) em PBS contendo H₂O₂ e dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, E.U.A.) a 37°C por 5 minutos seguida de uma lavagem em água corrente por mais 5 minutos. Por fim, os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Carazzi por 3 minutos e após a eliminação dos excessos de corante, foi realizada desidratação, diafanização e montagem com Bálsamo do Canadá (Corporation, E.U.A.).

Tabela 2: Anticorpos primários utilizados para reações de imunistoquímica.

ANTICORPO	CLONE	MARCA	DILUIÇÃO
FASN	23	BD Biosciences	1:200
Ki67	MIB-1	Dako	1:100
CD44	DF1485	Dako	1:75
p21	C-19	Santa Cruz	1:150

4.11 Análise estatística

Os resultados foram realizados através da análise de variância One-Way com as comparações múltiplas de Bonferroni ou com o teste de comparações múltiplas de Dunnet. Foi ainda utilizado test *t* de Student pareado. O nível de significância estabelecido foi de 5% ($p < 0,05$). Todos os dados foram analisados com auxílio do programa GraphPad Prism, versão 6.0.

5 RESULTADOS

5.1 Efeitos do orlistat, paclitaxel e da combinação destes sobre a viabilidade das células LN-1 e cálculo do IC₅₀

Os efeitos do orlistat, paclitaxel e da combinação destas drogas sobre a viabilidade das células LN-1 foram avaliados após 48 horas de tratamento pelo ensaio MTT. O tempo experimental de 48 horas e as concentrações de orlistat aqui utilizadas foram estabelecidos com base em estudo prévio realizado em nosso laboratório (Agostini *et al.*, 2014). As concentrações de paclitaxel foram escolhidas pela análise de dados existentes na literatura (Takahashi *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2004; Zoli *et al.*, 2005).

Nestes ensaios, pôde-se verificar uma redução da viabilidade celular de forma dose-dependente, em relação aos controles, tanto nas células que foram expostas ao orlistat quanto ao paclitaxel (**Gráficos 1 e 2**).

Gráfico 1 - O tratamento com orlistat reduziu a viabilidade das células LN-1 de forma dose-dependente. As células LN-1 foram incubadas com doses crescentes de orlistat por um período de 48 horas, quando a viabilidade celular foi determinada pelo método MTT. O gráfico representa a média de 3 experimentos independentes. ORL: Orlistat; ** $P < 0,005$, *** $P < 0,001$. Teste de *Dunnet*.

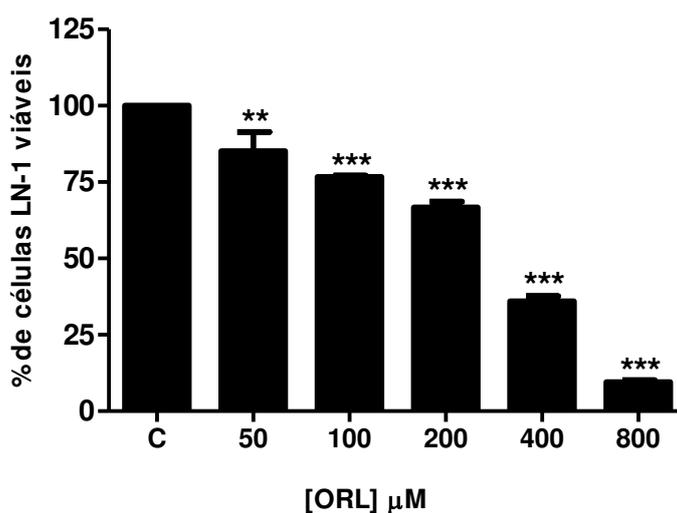
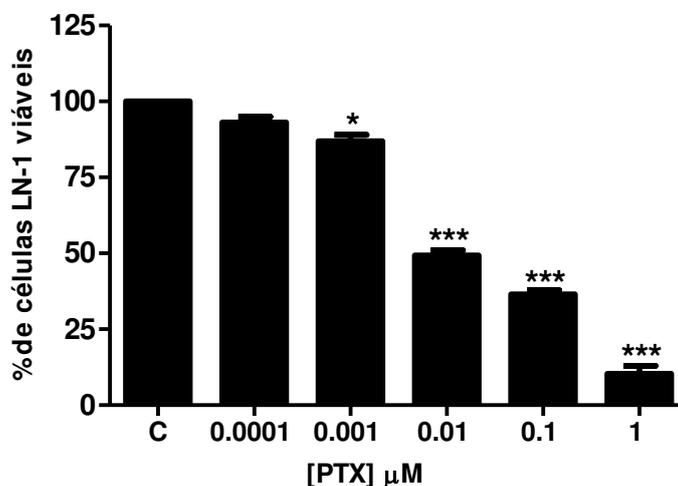


Gráfico 2 - O tratamento com paclitaxel reduziu a viabilidade das células LN-1 de maneira dose-dependente. As células LN-1 foram tratadas com doses crescentes de paclitaxel por um período de 48 horas e a seguir a viabilidade estimada com o método MTT. O gráfico representa a média obtida a partir de 3 experimentos independentes. PTX: Paclitaxel; * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$. Teste de *Dunnet*.



Os valores obtidos a partir das análises colorimétricas descritas acima foram analisados com auxílio do *software* CompuSyn, especificamente desenhado para o estudo de interações entre drogas (Chou, 2010), a partir dos cálculos das IC_{50} , que correspondem às concentrações nas quais os compostos estudados são capazes de causar uma redução de 50% na quantidade de células, aqui inferidas pelo grau de atividade mitocondrial com MTT. Estes estudos revelaram os valores de IC_{50} de 278 μM para o orlistat e de 0,01 μM para o paclitaxel (**Gráficos 3 e 4**), concentrações estas que foram utilizadas para os tratamentos posteriores em todos os experimentos *in vitro*.

Gráfico 3 - Cálculo do IC_{50} . O cálculo dos efeitos das concentrações de orlistat em gráfico gerado pelo *software* CompuSyn, destacando a IC_{50} de 278 μM . Representação dos mesmos 3 experimentos mostrados no Gráfico 1.

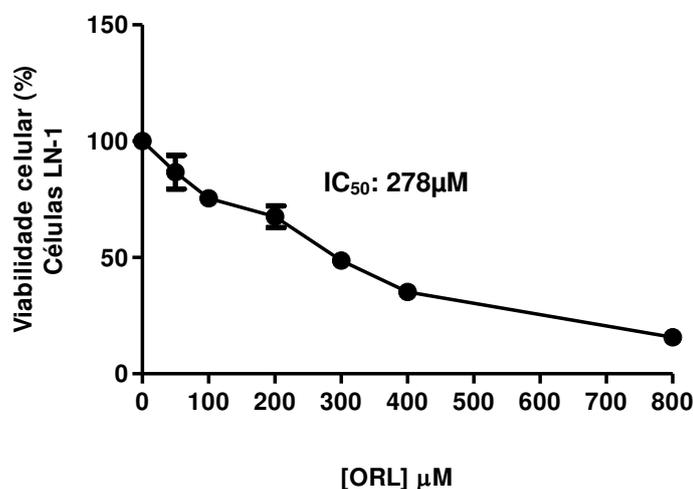
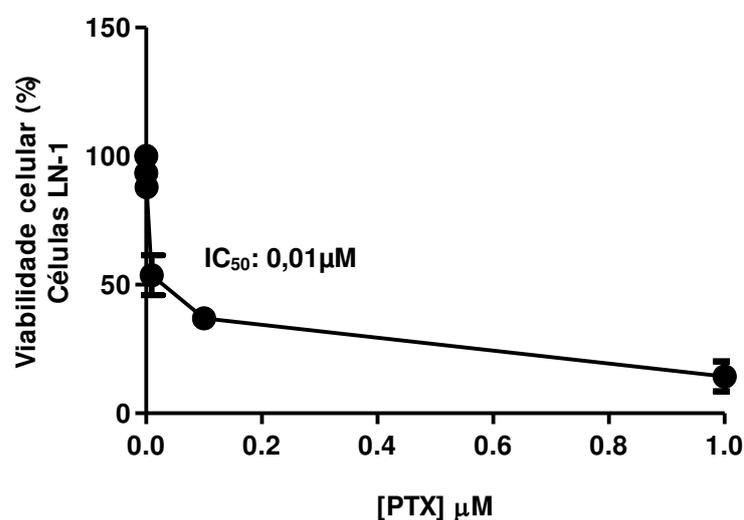


Gráfico 4 - Cálculo da IC_{50} do quimioterápico paclitaxel, em gráfico gerado pelo *software* CompuSyn, destacando a IC_{50} de 0,01 μM . Representação dos mesmos 3 experimentos exibidos no Gráfico 2.



5.2 Análise do índice de combinação do orlistat com o quimioterápico paclitaxel

A quimioterapia combinada é uma das estratégias para o tratamento do câncer, pois pode potencializar a resposta antitumoral. O efeito da combinação de diferentes drogas, principalmente as antineoplásicas, pode ser estimado pelo cálculo

do chamado índice de combinação (*Combination Index* - CI) (Chou e Talalay, 1984). Com este cálculo, temos que $CI < 1$ sugere efeito sinérgico, $CI = 1$ aponta efeito aditivo e $CI > 1$ efeito antagônico. No sinergismo tem-se a potencialização dos efeitos de cada droga, sendo o efeito resultante maior do que os seus efeitos individuais. O antagonismo caracteriza-se por efeito oposto ao esperado, no qual o efeito individual das drogas estudadas é maior do que aqueles da combinação e, por fim, efeito aditivo é aquele no qual efeito combinatório é apenas igual aos efeitos individuais de cada composto.

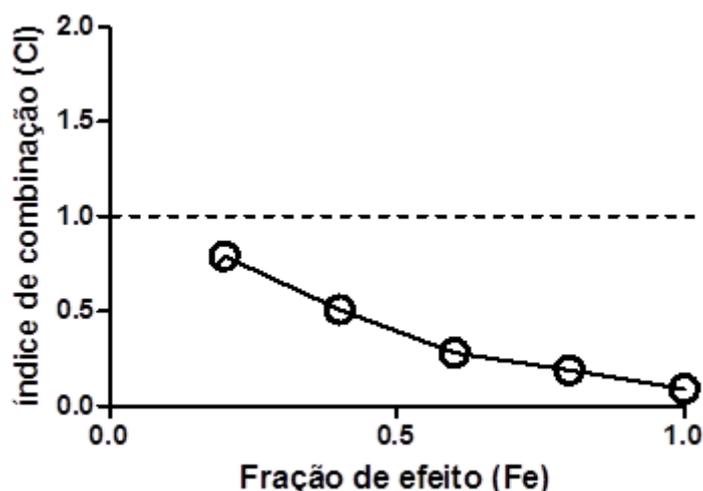
Assim, após a determinação da IC_{50} de cada droga, nosso próximo passo foi avaliar o efeito da combinação de orlistat com paclitaxel por meio do cálculo do CI. Para isto, as células LN-1 foram expostas, por períodos de 48 horas, a concentrações crescentes das drogas isoladas e associadas, em diferentes concentrações (**Tabela 3**).

Tabela 3: Concentrações utilizadas para determinação do CI entre orlistat e paclitaxel.

Droga	Orlistat	Paclitaxel	Combinação
Concentração (μM)	75	0,25	75 + 0,25
	150	0,50	150 + 0,5
	300	1	300 + 1
	600	2	600 + 2
	1200	4	1200 + 4

Os resultados dos ensaios colorimétricos com MTT realizados nas células LN-1 tratadas com as combinações descritas na Tabela 1 foram inseridos no *software* CompuSyn, que apontou significativo efeito sinérgico para a combinação de orlistat com paclitaxel, CI com valor de 0,31, pois quanto menor o valor do CI obtido maior o sinergismo esperado (**Gráfico 5**).

Gráfico 5 - Representação gráfica da curva índice de combinação/fração de efeito, gerada pelo software Compusyn, da associação entre orlistat com paclitaxel na linhagem celular LN-1. Observa-se valores de CI inferiores a 1 (CI=0,31), caracterizando um nítido efeito sinérgico.



5.3 Efeitos dos tratamentos com orlistat, paclitaxel e com a combinação destes compostos sobre as taxas de apoptose e necrose nas células LN-1

As taxas de morte celular por apoptose e necrose foram avaliadas por meio de citometria de fluxo com marcação por anexina V-PE e 7AAD-PerCP. Nas células em início de morte apoptótica, as membranas celulares permanecem impermeáveis, porém, a fosfatidilserina da superfície interna da bicamada lipídica é translocada para a superfície externa, permitindo a ligação da anexina V. O 7-AAD, por sua vez, é um corante nuclear que se intercala ao DNA desde que as membranas já estejam permeáveis, marcando células em processo de necrose ou estágios bastante avançados de apoptose, caracterizadas pela formação dos corpos apoptóticos (Zembruski *et al.*, 2011).

A combinação de orlistat com paclitaxel foi capaz de aumentar significativamente as taxas de apoptose (11,22%) em comparação às células controle (0,64%) e ao orlistat (5,26%) ou paclitaxel (3,96%) sozinhos. Taxas mais baixas de necrose foram detectadas, correspondendo a 3% na combinação de orlistat e paclitaxel, 2,42% na presença de orlistat, 1,62% com paclitaxel e 0,27% nas células controle (**Gráficos 6 e 7**). Avaliamos também, nestes experimentos, as populações duplamente marcadas, positivas tanto para anexina V como para 7-AAD, consideradas como em estágio de apoptose tardia. Similarmente ao que observamos

com a apoptose inicial, porcentagens mais altas de dupla marcação foram detectadas nas células tratadas com a combinação de orlistat com paclitaxel (15,6%) e com orlistat (12,34%). Paclitaxel sozinho provocou apoptose em 8,77% das células e as células controle exibiram apenas 1,66% de dupla positividade (**Gráfico 8**).

Gráfico 6 - Análise das células em estágio inicial de apoptose (células marcadas somente com anexina V_PE) após períodos de 48 horas de tratamento com orlistat (ORL) e paclitaxel (PTX) sozinhos e com a combinação de orlistat e paclitaxel (ORL+PTX). Pode-se observar significativo aumento das porcentagens de células em processo de apoptose após o tratamento com ORL+PTX com relação aos demais tratamentos e às células controle. O gráfico representa a média de 3 experimentos independentes. ** $P < 0,005$; *** $P < 0,001$. Teste de Bonferroni.

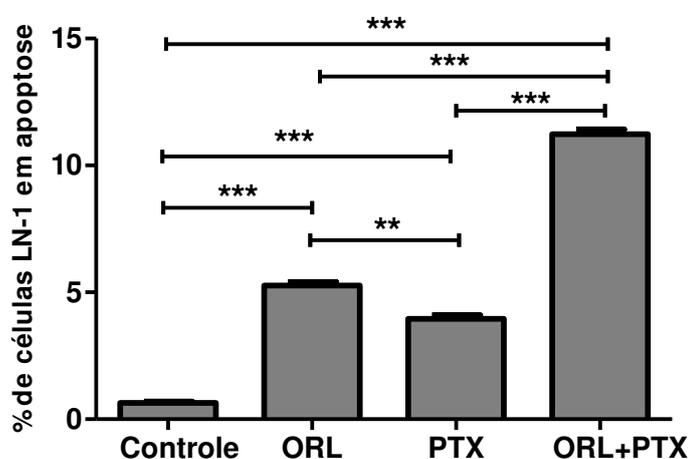


Gráfico 7 - Análise das células em processo de morte por necrose após 48 horas de tratamento com orlistat (ORL) e paclitaxel (PTX) sozinhos e com a combinação destes compostos (ORL+PTX). Observa-se que as taxas de necrose foram mais baixas do que de apoptose, entretanto, todas elas superiores às encontradas nas células controle. Importante salientar aqui que não houve diferença estatisticamente significativa entre o tratamento com ORL e ORL+PTX. Este gráfico representa a média de 3 experimentos independentes. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,001$. Teste de Bonferroni,

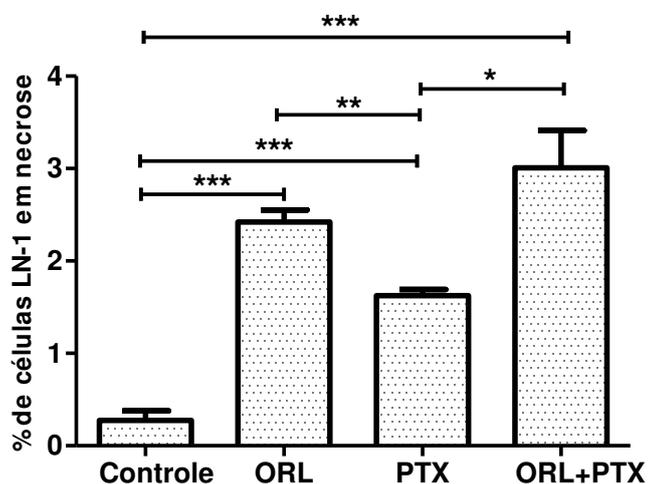
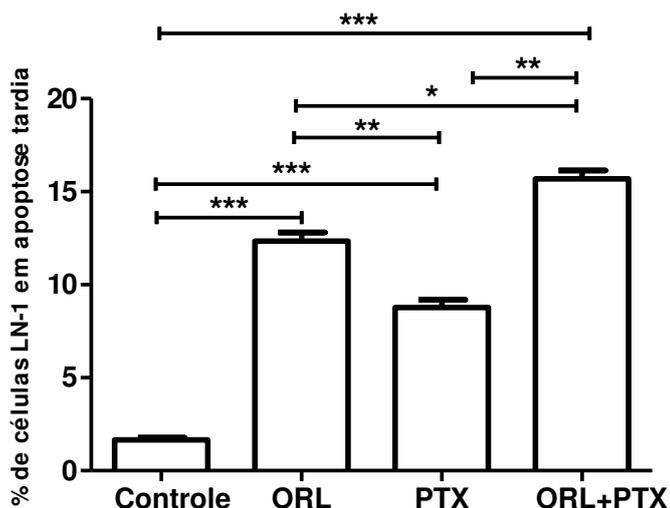


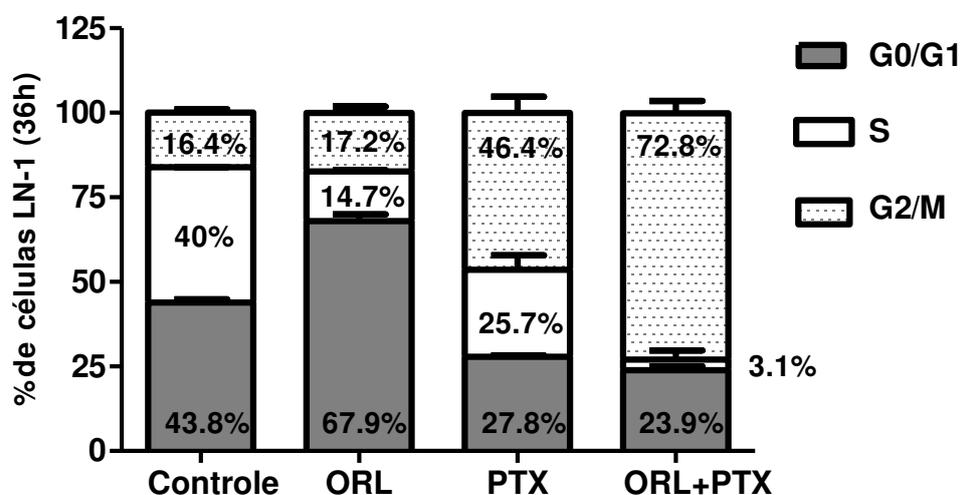
Gráfico 8 - Análise das células em apoptose considerada tardia, após 48 horas de tratamento com orlistat (ORL) e paclitaxel (PTX) sozinhos e com a combinação destes (ORL+PTX). Pode-se observar aumento das células em apoptose tardia em resposta a ORL e ORL+PTX quando comparados aos demais tratamentos, produzindo um perfil relativamente semelhante ao encontrado para apoptose inicial (Gráfico 6). O gráfico representa a média de 3 experimentos independentes. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,001$. Teste de Bonferroni.



5.4 Avaliação dos efeitos do orlistat, paclitaxel e da combinação destas drogas sobre a progressão do ciclo celular na linhagem LN-1

Como as taxas de apoptose foram avaliadas sempre após 48 horas de tratamento (item 5.3 deste capítulo), optamos por realizar as análises de progressão do ciclo celular em período mais curto de tempo (36 horas). Quando comparado às células controle, o tratamento isolado com orlistat resultou em aumento do número de células nas fases G0/G1 (67,9%, $p < 0,001$) e redução das células na fase S ($p < 0,001$), e na fase G2 não foram observadas alterações significativas ($p = 0,3$). Por outro lado, a exposição das células LN-1 ao paclitaxel promoveu um acúmulo de 46,4% destas em G2/M ($p < 0,001$), ficando 25,7% na fase S ($p < 0,005$) e 27,8% em G0/G1 ($p < 0,001$). Ao analisarmos a combinação de orlistat com paclitaxel, nos deparamos com uma evidente potencialização dos efeitos do paclitaxel, com acúmulo de 72,8% das células em G2/M ($p < 0,001$), além de redução considerável da quantidade de células na fase S (apenas 3,1%), quando em comparação ao paclitaxel isolado (25,7%) ($p < 0,001$). Por fim, verificou-se também discreta redução da população em G0/G1 na combinação ($p = 0,05$), em comparação ao tratamento com paclitaxel isoladamente (Gráfico 9).

Gráfico 9 - Distribuição das células LN-1 entre as fases do ciclo celular após 36 horas de tratamento com orlistat (ORL) e paclitaxel (PTX) sozinhos e com a combinação destas drogas (ORL+PTX). O gráfico representa a média obtida de 3 experimentos realizados de maneira independente.



5.5 Efeitos do orlistat e paclitaxel isoladamente e da combinação destes compostos sobre a capacidade migratória das células LN-1

Tendo-se em vista que a linhagem celular LN-1 é altamente metastática em experimentos *in vivo* com camundongos imunossuprimidos (Agostini *et al.*, 2014), nosso próximo objetivo foi avaliar os efeitos do orlistat e paclitaxel isolados e da combinação destas drogas sobre o seu potencial migratório. A **Figura 6** e o **Gráfico 10** mostram que os tratamentos aqui estudados foram capazes de reduzir a migração das células em relação ao início do experimento (0h). Após 24 horas, foi possível observar a grande capacidade migratória das células LN-1 na condição controle, na qual praticamente todo o espaço criado na “ferida” foi prontamente ocupado. A exposição ao orlistat sozinho inibiu em aproximadamente 50% a migração das células LN-1 ($p < 0,001$), em comparação com as células controle, o que ficou ainda mais evidente com paclitaxel ($p < 0,001$) e também com a associação das drogas ($p < 0,001$). Entretanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes quando comparado o tratamento com orlistat ao tratamento com paclitaxel ($p = 0,2$) e ao tratamento com a combinação ($p = 0,1$), assim como não observou-se diferença no tratamento com paclitaxel comparado à combinação ($p > 0,99$).

Figura 6 - Efeitos do tratamento com orlistat (ORL), paclitaxel (PTX) e com a combinação destes compostos (ORL+PTX) sobre o potencial migratório das células LN-1 em culturas com 2% de SFB. Observa-se aqui imagens representativas do ensaio de migração em monocamada nos tempos 0h e 24h, mostrando inibição da migração em todas as condições testadas (microscopia de contraste de fase, aumento original de 100x).

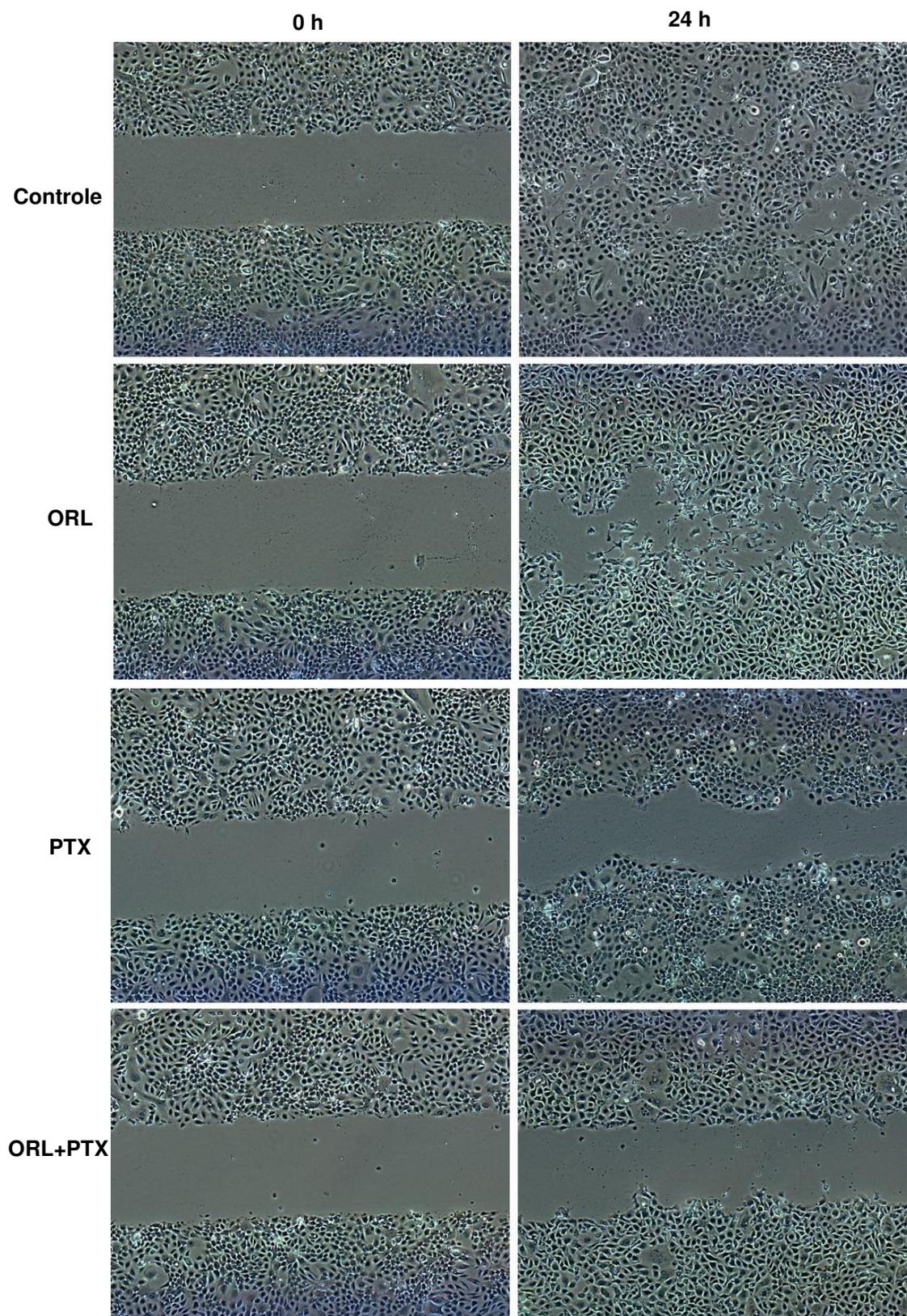
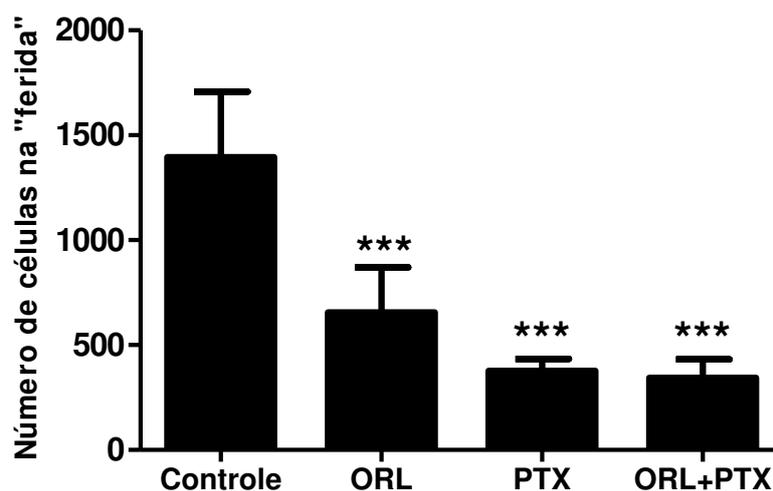


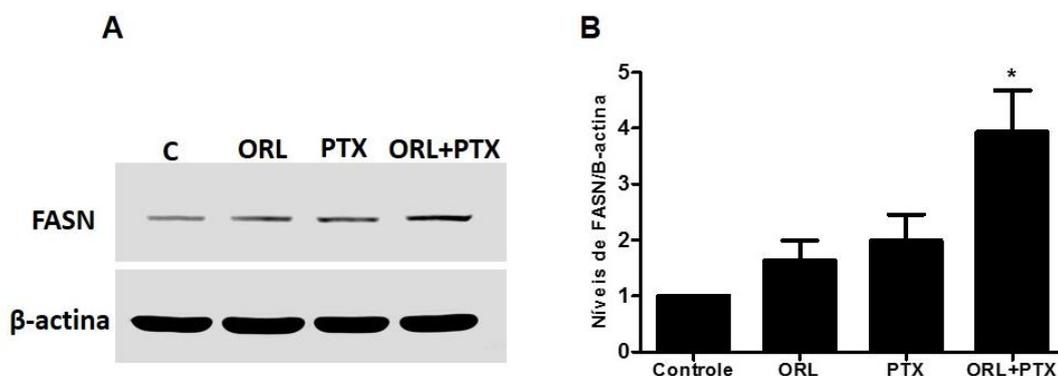
Gráfico 10 – Representação gráfica dos efeitos do orlistat (ORL), do paclitaxel (PTX) e da combinação destas drogas (ORL+PTX) sobre o potencial migratório das células LN-1, durante o período de 24 horas, obtida a partir da contagem do número de células presentes na “ferida”. Nota-se redução significativa do número de células na área da “ferida” após o tratamento com ORL, PTX e ORL+PTX. No entanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes quando comparamos os tratamentos entre si. Os dados representam as médias de dois experimentos independentes realizados em triplicata. *** $P < 0,001$. Teste de Bonferroni.



5.6 Influência do tratamento com orlistat, paclitaxel e da combinação destas drogas sobre a produção de marcadores de transição epitélio-mesenquimal (EMT) pelas células LN-1

A EMT é hoje considerada como um processo fundamental para a progressão das neoplasias malignas, pois proporciona às suas células a habilidade de se afastar da massa do tumor primário, invadir o estroma e migrar para tecidos adjacentes ou distantes (Nguyen *et al.*, 2012). Um dos objetivos do presente trabalho foi verificar, por meio de reações de western blotting, se orlistat, paclitaxel e a combinação destes poderiam modificar a produção de marcadores de EMT. Nesta parte do nosso estudo, começamos avaliando a produção da própria FASN, alvo molecular do orlistat, e detectamos um aumento da quantidade desta enzima nas células LN-1 tratadas com orlistat, paclitaxel e também com a combinação destas drogas. No entanto, diferença do ponto de vista estatístico só foi encontrada com a última condição, em relação ao controle (**Figura 7**).

Figura 7 - Produção de FASN por células LN-1 expostas ao orlistat (ORL), ao paclitaxel (PTX) e a combinação destas drogas (ORL+PTX). Em A, imagem representativa de um dos experimentos de western blotting realizados. Em B, o gráfico mostra a análise densitométrica das bandas obtidas, que evidenciou aumento significativo na quantidade de FASN nas células tratadas com ORL+PTX, em relação ao controle. Estão representados dados de 3 experimentos independentes (* $p < 0.05$). Teste de Bonferroni.



Uma das alterações mais significativas da EMT é o “*cadherin switching*”, ou seja, a perda da expressão de E-caderina concomitantemente ao aumento de N-caderina, o que já foi previamente descrito em nossa linhagem celular metastática LN-1. Uma observação interessante do presente trabalho foi que, em comparação ao controle, tanto o orlistat ($p=0,04$) como a combinação de orlistat com paclitaxel ($p=0,01$) foram capazes de aumentar a quantidade de E-caderina nos extratos proteicos das células LN-1 (**Figura 8**). A combinação também provocou aumento significativo de E-caderina quando comparada ao paclitaxel ($p=0,02$) usado de forma isolada (**Figura 8**). Por outro lado, N-caderina foi detectada em quantidades menores nas células LN-1 expostas tanto ao orlistat ($p=0,006$) quanto a combinação de orlistat com paclitaxel ($p=0,006$), em relação ao controle (**Figura 9**). Em comparação com as células tratadas com paclitaxel, que praticamente não modificou a produção de N-caderina, orlistat ($p=0,02$) e a combinação ($p=0,03$) também reduziram significativamente quantidade desta proteína (**Figura 9**).

Figura 8 – Quantidade da proteína E-caderina nos extratos proteicos obtidos das células LN-1 tratadas com orlistat (ORL), paclitaxel (PTX) e com a combinação destes compostos (ORL+PTX). Em A observa-se a imagem representativa de um dos ensaios western blotting realizados. Em B, a análise densitométrica das bandas obtidas, revelando que tanto ORL como ORL+PTX aumentam as quantidades de E-caderina, quando comparados ao controle. Fato semelhante também acontece quando se compara ORL+PTX com PTX sozinho. O gráfico contém dados de 3 experimentos independentes ($*p<0.05$). Teste de Bonferroni.

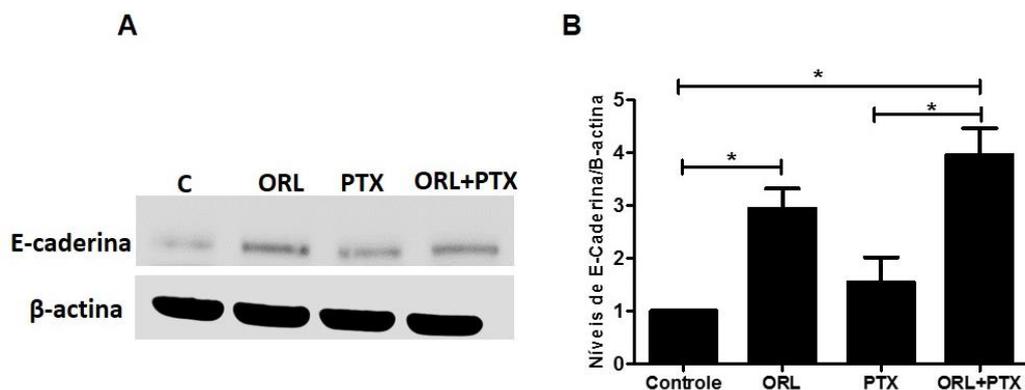
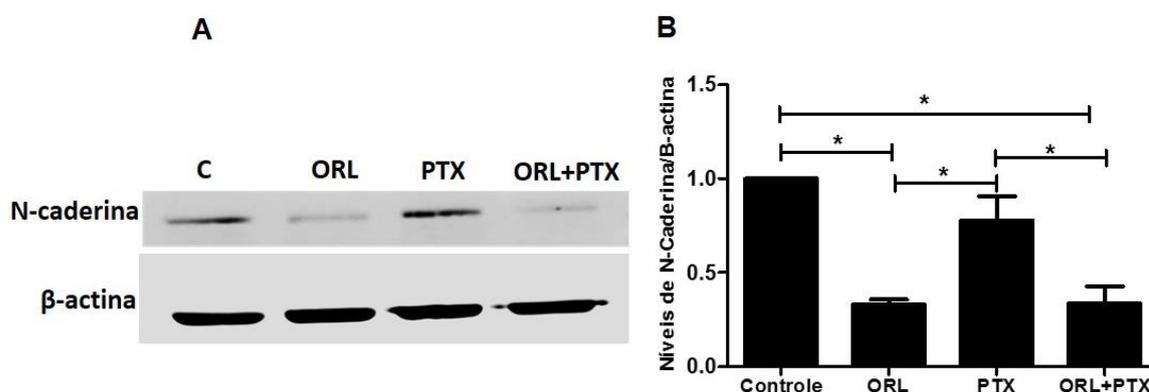


Figura 9 – Análise da produção de N-caderina pelas células LN-1 tratadas com orlistat (ORL), paclitaxel (PTX) e com a combinação destes (ORL+PTX). Em A está a imagem representativa de um dos ensaios de *western blotting* realizados, mostrando bandas de N-caderina menos intensas com ORL e com a combinação. Em B, o gráfico representa análise densitométrica das bandas de N-caderina, confirmando que ORL sozinho reduz a quantidade de N-caderina, assim como ORL+PTX, quando comparados ao controle. ORL e ORL+PTX também exibem menos N-caderina do que PTX, o qual praticamente não alterou a intensidade das bandas de N-caderina ($*p<0.05$). Teste de Bonferroni.



Em nossos experimentos não conseguimos detectar alterações na produção de β -catenina pelas células LN-1, que foi praticamente a mesma em todas condições analisadas (**Figura 10**). As bandas de vimentina, por sua vez, foram menos intensas de forma progressiva, a partir do tratamento com orlistat ($p=0,02$), passando pelo paclitaxel ($p=0,002$) e pela combinação das drogas ($p=0,001$), que apresentou a menor quantidade desta proteína em relação ao controle (**Figura 11**).

Figura 10 – Quantidade de β -catenina nos extratos proteicos obtidos a partir das células LN-1 tratadas com orlistat (ORL), paclitaxel (PTX) e com a combinação destas substâncias (ORL+PTX). Em A observa-se uma imagem representativa de um dos experimentos de *western blotting* realizados, mostrando que praticamente não há diferenças de intensidade nas bandas de β -catenina, em cada condição estudada. Em B, o gráfico confirma, após as análises densitométricas, que não há modificação na produção de β -catenina após os tratamentos realizados. Resultados de 3 experimentos independentes.

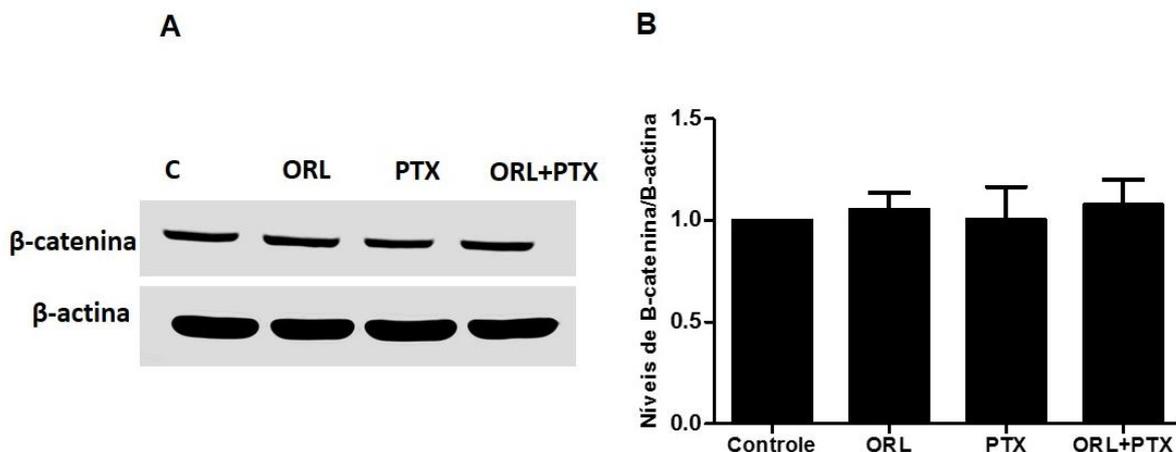
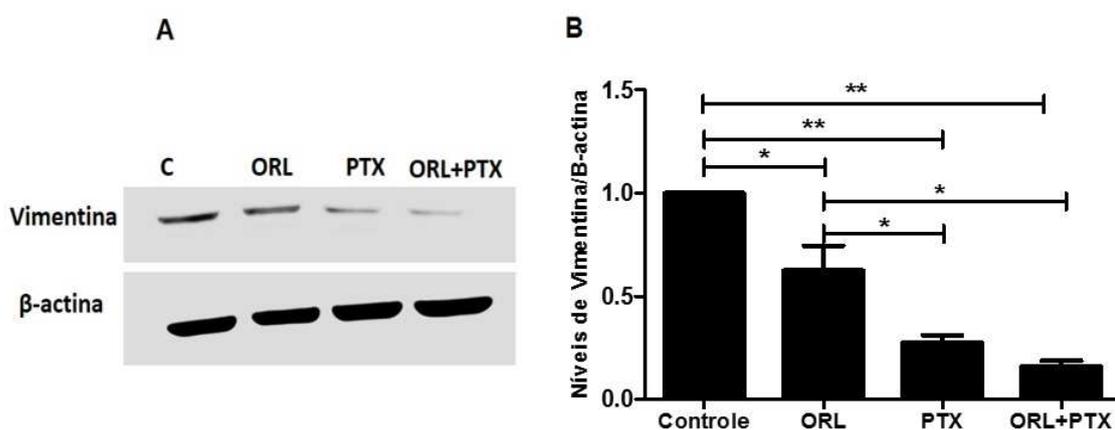
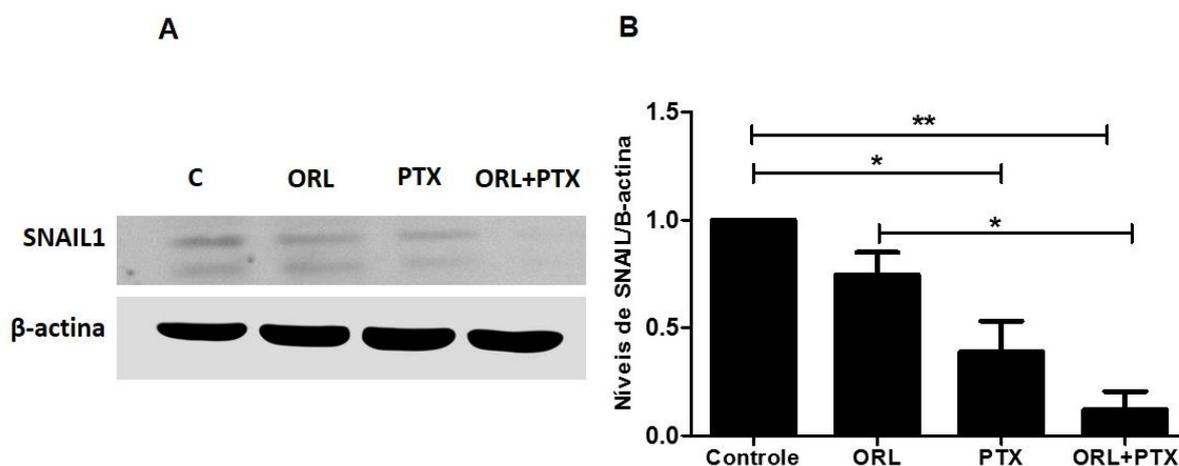


Figura 11- Análise da quantidade de vimentina nas células LN-1 tratadas com orlistat (ORL), paclitaxel (PTX) e com a combinação destes (ORL+PTX). Em A pode-se observar a imagem representativa de um dos ensaios de western blotting realizados, o qual evidencia uma redução progressiva da intensidade das bandas de vimentina, a partir do ORL. Em B, o gráfico representa a análise densitométrica das bandas obtidas, confirmando a redução da quantidade de vimentina com ORL e PTX isolados, bem como ORL+PTX quando comparados ao controle. Pode-se notar ainda redução da intensidade das bandas de vimentina com ORL+PTX em relação ao ORL sozinho. Resultados de 3 experimentos independentes ($*p<0.05$; $**p<0.005$). Teste de Bonferroni.



Por fim, os fatores de transcrição Snail e Twist, descritos como repressores de E-caderina também foram avaliados. Nestes experimentos, observamos redução da quantidade de SNAIL1 sob ação do paclitaxel ($p=0,02$) e da combinação de orlistat com paclitaxel ($p=0,005$), quando comparados ao controle (**Figura 12**). As bandas proteicas de SNAIL1 foram menos intensas nas células LN-1 tratadas com a combinação do que com orlistat sozinho ($p=0,01$) (**Figura 12**). Apesar das diferentes condições experimentais testadas nesta tese, não foi possível detectar as bandas de Twist em nossas reações de western blotting. Nosso laboratório irá retomar a padronização destes ensaios, possivelmente com anticorpos primários de outra marca comercial.

Figura 12 - Quantidade de SNAIL1 nos extratos proteicos preparados a partir das células LN-1 tratadas com orlistat (ORL), paclitaxel (PTX) e com a combinação de ambos (ORL+PTX). Em A, observa-se a imagem representativa de um dos ensaios de *western blotting* realizados, que mostra, apesar da pouca intensidade das bandas, redução de SNAIL1 com PTX e ORL+PTX. Em B, o gráfico representa os dados obtidos a partir das análises densitométricas de todas as bandas obtidas, apontando significativa redução de SNAIL1 com PTX e com ORL+PTX, quando comparados ao controle. Observa-se ainda redução de SNAIL1 com ORL+PTX, em relação a PTX sozinho. Dados de 3 experimentos realizados de maneira independente (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$).



5.7 Efeitos da combinação de orlistat com paclitaxel no desenvolvimento de tumores primários e na disseminação metastática em modelo ortotópico murino de CEC oral

Os efeitos da inibição da atividade de FASN com orlistat, bem como da associação deste último com paclitaxel, no crescimento dos tumores primários e na disseminação metastática para linfonodos regionais foram estudados em modelo ortotópico de CEC oral padronizado com as células LN-1. Vinte e quatro horas após a injeção destas nas línguas de camundongos BALB/c *nude*, iniciou-se o tratamento dos animais durante 14 dias, como descrito no item 4.9 do capítulo Material e Métodos. Para isto utilizamos, em dois experimentos independentes, 64 camundongos que foram sacrificados e dissecados no 15º dia após a inoculação das células.

Os tumores primários, formados exatamente nos locais onde as células LN-1 foram injetadas, exibiram volumes significativamente menores nos grupos tratados com orlistat, com média de 0,0095cm³, quando comparados aos tumores que cresceram nos grupos controles, que apresentaram em média 0,020cm³ (p=0,002). Por sua vez, os tumores primários que cresceram nos grupos de animais que

receberam a terapia com paclitaxel apresentaram volumes ainda menores que os tratados com orlistat, com uma média de $0,0025\text{cm}^3$ ($p < 0,0001$). O achado mais importante relacionado aos tumores primários foi que, nos grupos que receberam a terapia com orlistat associado ao paclitaxel, houve o maior retardo no crescimento tumoral, com volume médio de $0,00025\text{cm}^3$ ($p < 0,0001$) no segundo experimento (nestas mesmas condições, no primeiro experimento não houve formação clinicamente detectável de tumores primários) (**Figuras 13, 14 e Gráfico 11**). Portanto, quando comparados com os tumores desenvolvidos nos animais controle, aqueles dos grupos tratados com orlistat tiveram uma inibição de 55,9% do crescimento, os tumores nos grupos que receberam paclitaxel mostraram 89,3% de inibição e, por fim, os grupos tratados com ambas as drogas tiveram inibição de 99,6% de crescimento das massas tumorais.

Figura 13 - Tumores primários formados pela inoculação das células LN-1 nas línguas de camundongos BALB/c *nude*, após 14 dias de tratamento com orlistat, paclitaxel e com a combinação destas drogas. Na parte superior da figura A, observa-se os tumores formados nos animais do grupo controle, com grandes proporções e evidente coloração esverdeada conferida pela proteína *ZsGreen* presente em grandes quantidades nas células LN-1. Os mesmos tecidos, observados em câmara com iluminação ultravioleta (parte central da figura), exibem tumores com extensões ainda maiores. Na parte inferior da figura A estão estes tumores após a dissecação. A figura B mostra as línguas dos animais tratados com orlistat, com volumes visivelmente menores na macroscopia e na câmara com luz ultravioleta (partes superior e central da figura) e após a dissecação (porção inferior da figura). Em C estão, na mesma sequência, as línguas dos animais que receberam somente paclitaxel (parte superior e central da figura) e os tumores dissecados (parte inferior da figura), menores que os encontrados nos controles e no grupo que recebeu orlistat. Por fim, a figura D mostra o importante efeito obtido com orlistat e paclitaxel juntos, que fortemente inibiram o crescimento dos tumores primários produzidos pelas células LN-1, a tal ponto de impedir a observação clínica e sua dissecação, sendo somente possível observá-los sob iluminação ultravioleta. Imagens do primeiro experimento.

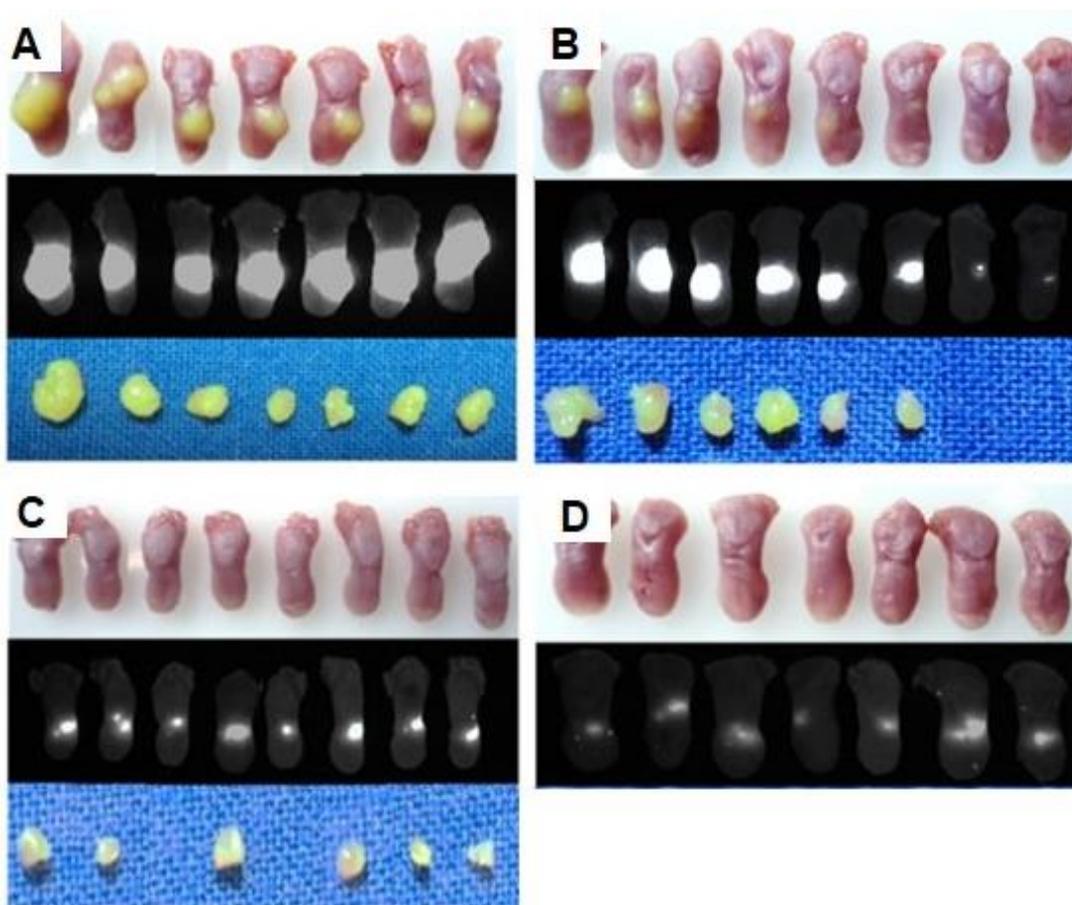


Figura 14 - Experimento idêntico ao mostrado na Figura 1, feito de maneira independente e chamado no texto de segundo experimento. Os tumores primários foram formados através da injeção das células LN-1 nas línguas de camundongos BALB/c *nude*, que foram tratados por 14 dias com orlistat, paclitaxel e com a combinação destes. Observa-se, na parte superior da figura A, os tumores dos animais do grupo controle, facilmente detectáveis à macroscopia devido ao grande volume e coloração esverdeada conferida pela proteína *ZsGreen*. Os mesmos tecidos, documentados em câmara com iluminação ultravioleta (parte central da figura), revelam tumores primários com extensões ainda maiores. Na parte inferior da figura A, estão alinhados os mesmos tumores após a dissecação. A figura B mostra as línguas dos animais tratados com orlistat, com volumes visivelmente menores na macroscopia e na câmara de luz ultravioleta (partes superior e central da figura) e os respectivos tumores após a dissecação (porção inferior da figura). Em C estão, na mesma sequência, as línguas dos animais que receberam paclitaxel. Note que estes são dificilmente observáveis na macroscopia, porém evidentes sob luz ultravioleta (parte superior e central da figura), e os tumores dissecados (parte inferior da figura), menores que os encontrados nos controles e no grupo que recebeu orlistat. Por fim, a figura D mostra o importante efeito obtido com orlistat e paclitaxel juntos, os quais fortemente inibiram o crescimento dos tumores primários produzidos pelas células LN-1, a ponto de impedir a observação na macroscopia e consequentemente e sua dissecação em 6 dos oito animais. Neste grupo, ainda foi possível, com excessão de um animal, observar estes tumores sob iluminação ultravioleta.

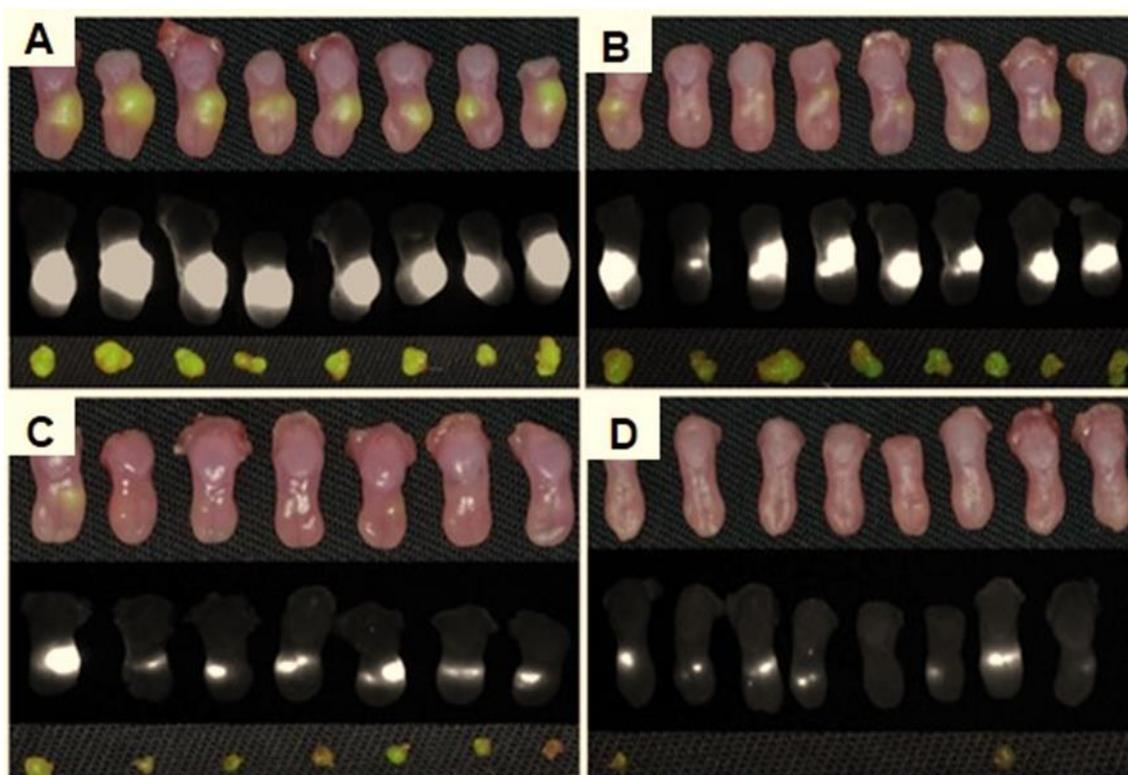
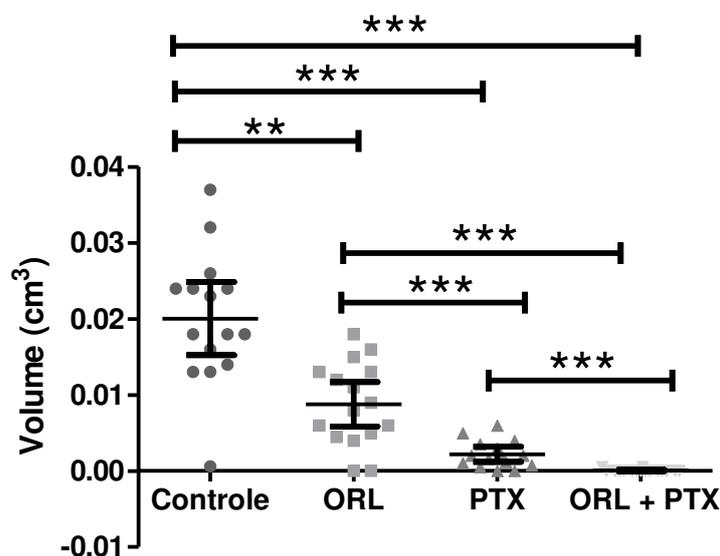


Gráfico 11 - Volumes dos tumores primários obtidos, nos dois experimentos realizados (Figuras 1 e 2), dos animais tratados com orlistat (ORL), paclitaxel (PTX) ou com a combinação destes (ORL+PTX) por um período de 14 dias. Pode-se observar uma clara redução dos volumes tumorais nos animais que receberam ORL e PTX sozinhos, quando comparados aos controles. No entanto, o resultado que mais chama a atenção foi obtido com ORL+PTX, que atuaram de maneira sinérgica e fortemente reduziram os volumes dos tumores primários. ** $P < 0,005$; *** $P < 0,001$. Teste *t* de Student.



Nosso foco principal com estes estudos no modelo ortotópico de CEC oral foi, além da observação dos efeitos do orlistat, do paclitaxel e da combinação de ambos sobre os tumores primários gerados pela inoculação das células LN-1, investigar o efeito destas drogas sobre o processo de disseminação metastática para os linfonodos cervicais, um dos fatores mais relevantes na clínica para se estimar o prognóstico dos pacientes com esta doença. De fato, no presente estudo, o tratamento com o inibidor de FASN orlistat reduziu a disseminação metastática para linfonodos cervicais em cerca de 47%, enquanto que paclitaxel sozinho diminuiu o comprometimento linfonodal em 21,3% e a associação de orlistat com paclitaxel reduziu drasticamente (em 80,8%) estas metástases (**Tabela 4 e Figuras 15 e 16**).

Tabela 4 - Efeitos dos tratamentos com orlistat (ORL), paclitaxel (PTX) e com a combinação de ambas as drogas (ORL+PTX) sobre o processo de disseminação metastática de CECs de língua ortotópicos para linfonodos cervicais (dados referentes aos dois experimentos realizados).

	Controle	ORL	PTX	ORL+PTX
Número de camundongos	16	15	15	16
Número de linfonodos removidos	53	60	59	61
Número de linfonodos com metástase	23	14	18	5
% de metástases	43,5%	23,3%	33,8%	8,1%
% de inibição e metastática	0%	47,4%	21,3%	80,8%

Figura 15 – Imagens representativas dos linfonodos cervicais com metástases, provenientes dos CECs de língua ortotópicos produzidos pelas células LN-1 em camundongos *BABL/c nude*, após 14 dias de tratamento com orlistat (ORL), paclitaxel (PTX) e com a combinação destes compostos (ORL+PTX). Nota-se aqui uma maior intensidade de fluorescência dos focos metastáticos presentes nos linfonodos dos animais controle, em relação aos camundongos tratamentos. A combinação ORL+PTX permitiu a invasão de apenas dois linfonodos, que possuíam metástases de pequeno tamanho. Experimento 1. Imagens obtidas com o auxílio de um de microscópio com epifluorescência, no aumento original de 100x.

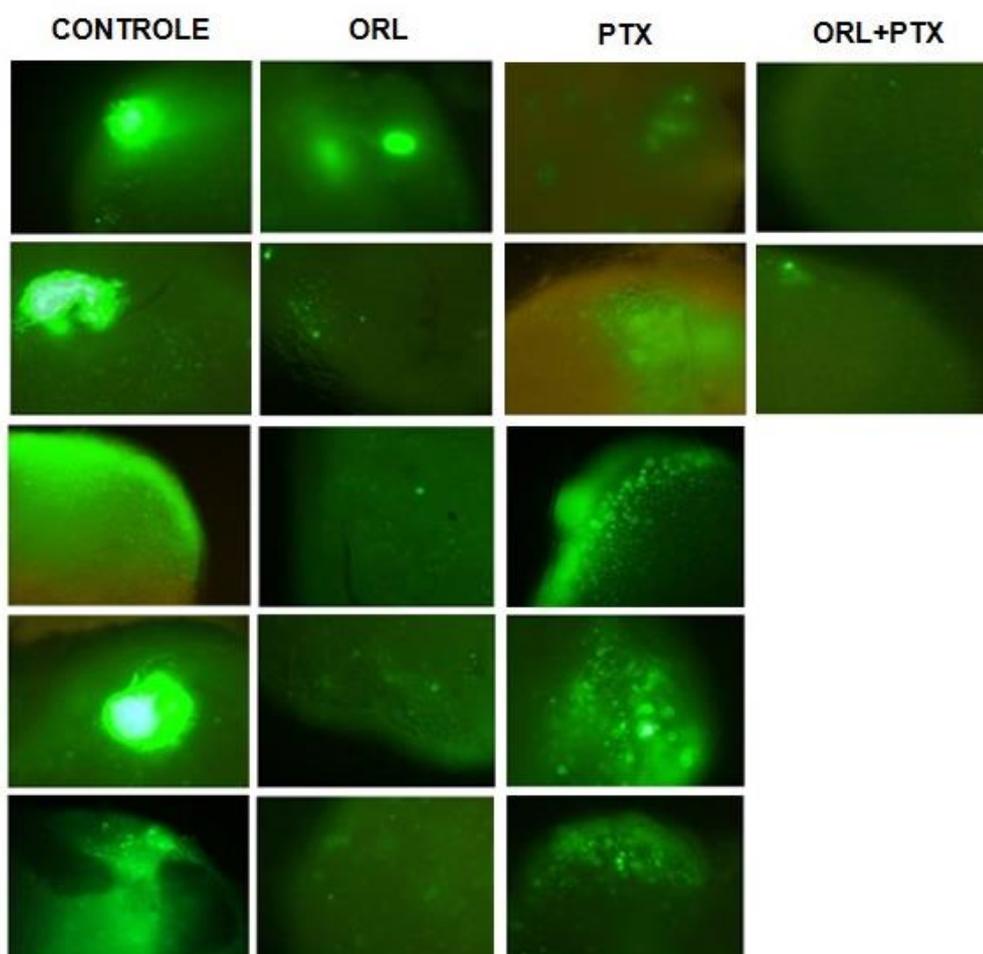
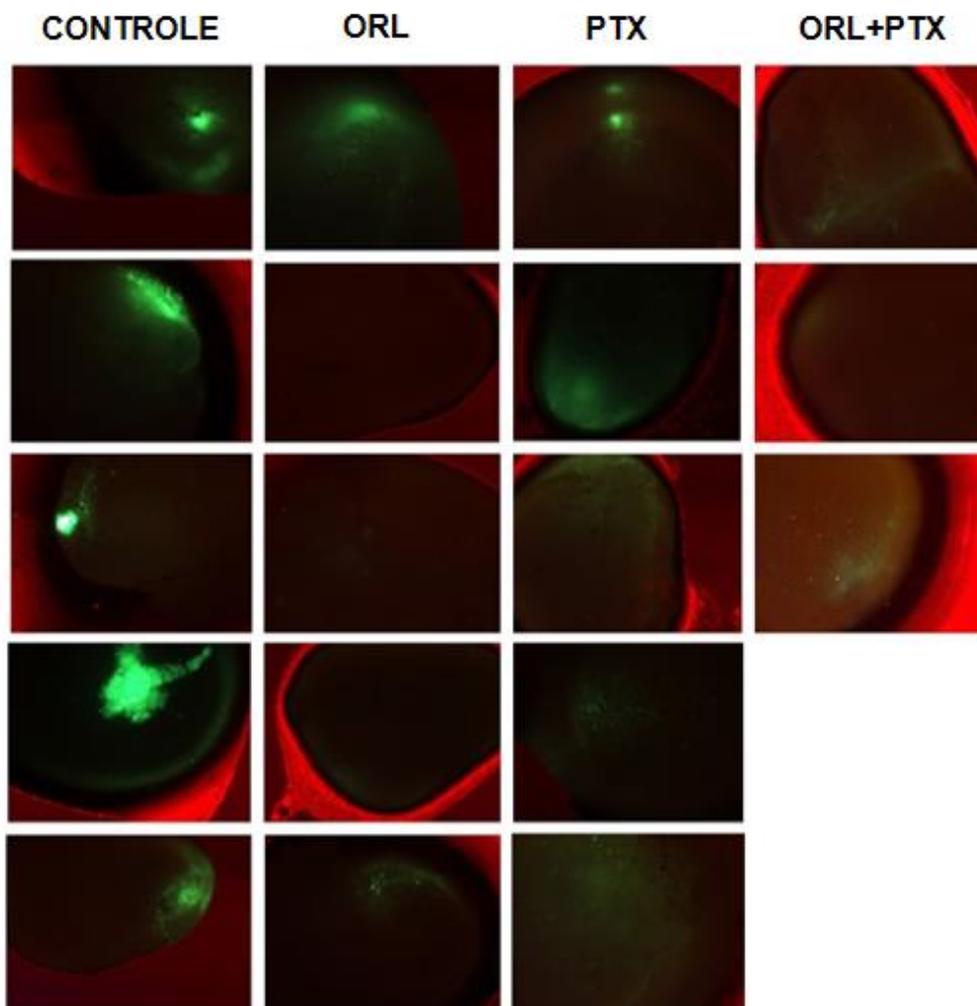


Figura 16 - Imagens representativas dos linfonodos cervicais com metástases, provenientes de CECs de língua ortotópicos provocados pela injeção das células LN-1 em camundongos BABL/c *nude*, após 14 dias de tratamento com orlistat (ORL), paclitaxel (PTX) e com a combinação destas drogas. Em relação ao primeiro experimento (Figura 4), pode-se observar menor intensidade geral da fluorescência dos linfonodos metastáticos, no entanto, maior positividade foi novamente encontrada nos linfonodos do grupo controle, em relação aos que receberam algum tipo de tratamento. Neste experimento, a combinação ORL+PTX permitiu a colonização de apenas três linfonodos cervicais. Imagens obtidas por meio de microscópio equipado com epifluorescência, no aumento original de 100x.



5.8 Enxertos xenográficos derivados de pacientes (*Patient-derived tumor xenografts* – PDX): resultados dos primeiros transplantes

5.8.1 Estabelecimento do modelo PDX de CEC oral

Diversos modelos animais estão em uso para o estudo de vários tipos de neoplasias malignas humanas, incluindo-se aqui o próprio CEC oral. Um dos objetivos iniciais da presente pesquisa foi estabelecer e validar um modelo PDX a partir de pacientes portadores de CECs orais que foram diagnosticados no OROCENTRO da FOP-UNICAMP. Durante todo o período de realização da presente tese de doutorado, conseguimos transplantar fragmentos teciduais de 15 CECs a partir de pacientes com a doença em diversas localizações da mucosa oral. Destes, consideramos como bem sucedidos 6 casos (40%), 4 enxertos (26,6%) não puderam ser avaliados devido a morte precoce dos animais durante o acompanhamento, causada principalmente por agressões entre os animais acondicionados nas mesmas gaiolas, e 5 enxertos (33,3%) cresceram no período imediatamente após o transplante, mas não se desenvolveram satisfatoriamente (**Figuras 16 e 17**) e foram considerados como insucessos experimentais (**Tabela 5**).

Tabela 5 – Características dos pacientes doadores, gradação histológica dos CECs doadores, tempo de vida dos animais após os transplantes e resultados obtidos.

Paciente	Gênero	Localização do tumor primário	Gradação histológica (OMS)	Tempo de enxerto	Resultado
1	Masculino	Soalho bucal	III	76 dias	Sucesso
2	Masculino	Soalho bucal	III	171 dias	Falha
3	Feminino	Rebordo alveolar superior	II	58 dias	Sucesso
4	Masculino	Palato mole	II	40 dias	Não avaliado
5	Masculino	Soalho bucal	III	159 dias	Falha
6	Masculino	Língua	II	21 dias	Não avaliado
7	Masculino	Língua	II	119 dias	Sucesso
8	Masculino	Língua	II	31 dias	Não avaliado
9	Feminino	Língua	III	98 dias	Falha
10	Feminino	Rebordo alveolar superior	II	78 dias	Sucesso
11	Feminino	Palato mole	II	93 dias	Sucesso
12	Feminino	Língua	I	87 dias	Sucesso
13	Masculino	Soalho bucal	II	23 dias	Não avaliado
14	Feminino	Língua	II	93 dias	Falha
15	Masculino	Língua	II	102 dias	Falha

Figura 16 - Enxertos xenográficos derivados de pacientes (PDTX) realizados em camundongos NOD/SCID. Fotomicrografias representativas de 4 diferentes enxertos que obtiveram sucesso, nas quais podemos observar crescimento tumoral francamente invasivo em A e B, com células neoplásicas infiltrando o tecido muscular adjacente, e crescimento mais circunscrito em C e D, com raros pontos de invasão do tecido muscular. Hematoxilina e Eosina, aumento original de 10x

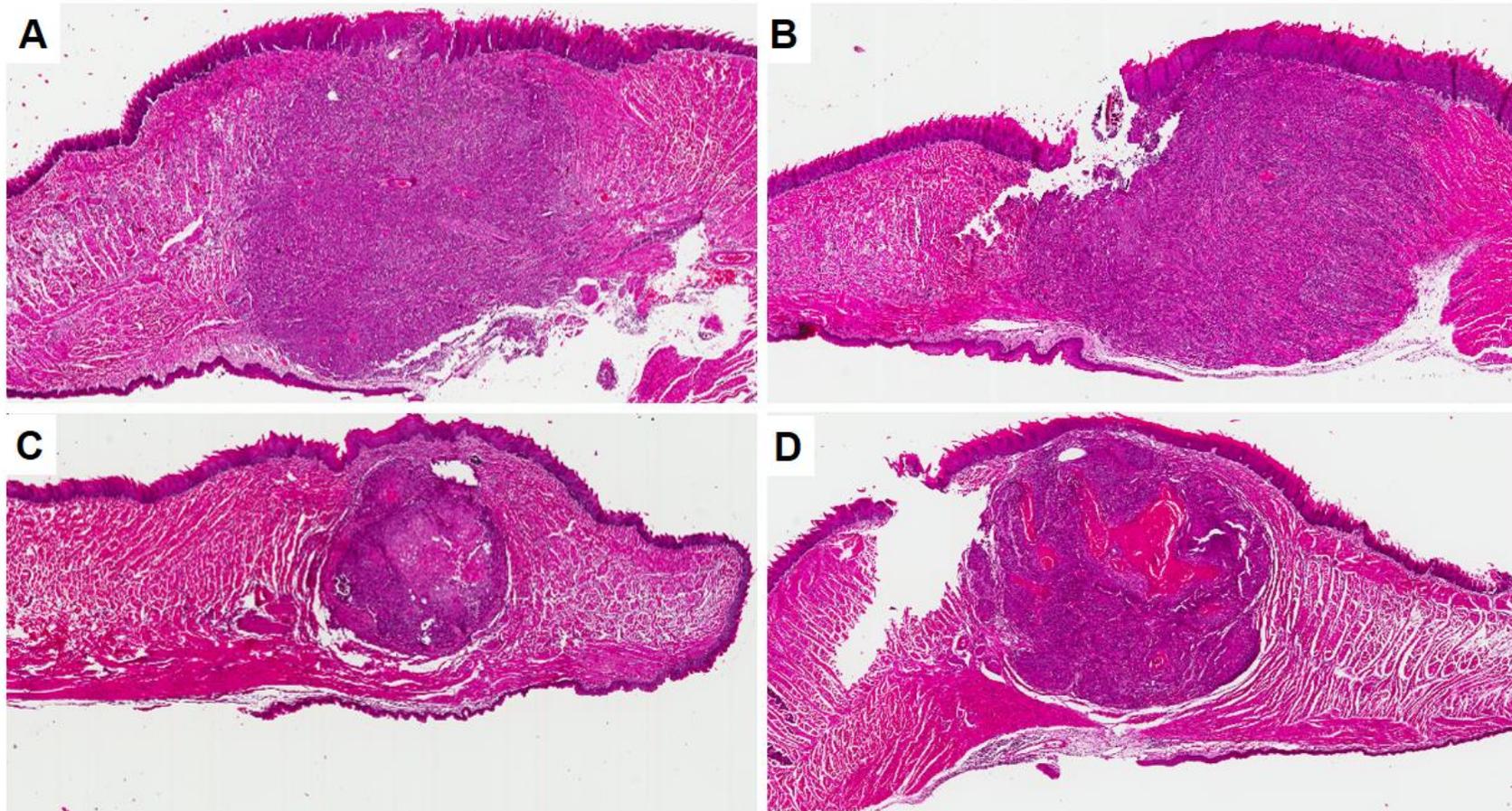
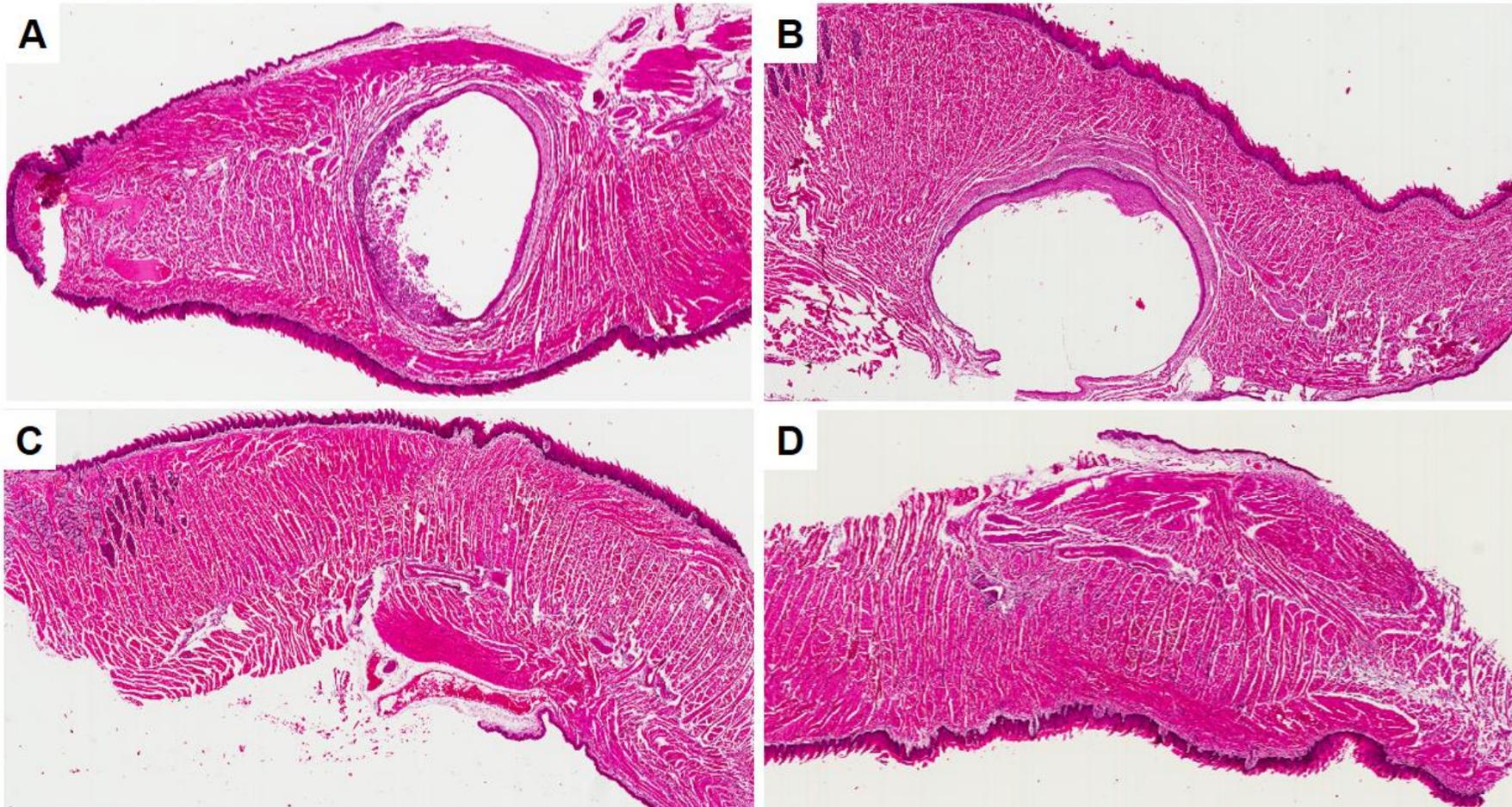


Figura 17 – Fotomicrografias representativas de quatro diferentes enxertos xenográficos derivados de pacientes (PDX) que não obtiveram sucesso no desenvolvimento em camundongos NOD/SCID. Em A e B pode-se notar lojas nas quais houve o crescimento inicial do tumor, no entanto, houve perda do tecido da região central, além de revestimento periférico com aspecto cístico sem as características microscópicas de malignidade do tumor de origem. C e D representam casos nos quais não ocorreu crescimento dos enxertos. Hematoxilina e Eosina, aumento original de 10x.



5.8.2 Análise dos aspectos histopatológicos dos CECs orais parentais e de seus respectivos xenoenxertos (PDTX)

As características microscópicas presentes nas amostras teciduais representadas pelas biópsias dos CECs orais dos pacientes doadores e de seus respectivos PDTX foram analisadas e classificadas de acordo com o sistema de gradação desenvolvido por Broders (1920), preconizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Este critério de classificação histopatológica leva em consideração a estrutura tumoral, o grau de queratinização e de pleomorfismo celular e nuclear e a presença de atividade mitótica. De acordo com este sistema, as lesões são categorizadas em bem diferenciadas (I), moderadamente diferenciadas (II), pobremente diferenciadas (III) e indiferenciadas (IV). Dos 6 PDX que obtiveram sucesso neste trabalho, 1 foi classificado como nível I, 4 como nível II e 1 como nível III (**Tabela 6**). Em 4 destes casos houve concordância com as características histopatológicas dos CECs orais de origem (**Figuras 18, 19, 20, 21, 22 e 23**).

Tabela 6 – Comparação entre as gradações histológicas das amostras teciduais representadas nas biópsias dos CECs orais dos pacientes doadores e dos respectivos xenoenxertos (PDTX) que obtiveram sucesso no presente estudo, de acordo com os critérios da OMS.

Paciente	Localização do tumor primário	Gradação histológica do tumor doador	Gradação histológica de todos PDTX
1	Soalho bucal	III	III, III
3	Palato duro	II	II, II
7	Língua	II	I, I, II
10	Soalho bucal	II	II, II
11	Rebordo alveolar superior	II	II, I
12	Língua	I	I

Figura 18 – Fotomicrografias representativas das principais características histopatológicas do CEC oral do paciente 3 e de um dos enxertos xenográficos (PDTX) gerados a partir dele em camundongos NOD/SCID. Em A, observa-se o CEC doador, representado por uma massa de células pleomórficas com núcleos hipercoreados e discreta formação de pérolas de queratina. O crescimento deste tumor em camundongos NOD/SCID, após 58 dias do transplante, está representado em B. Em C, pode-se observar o mesmo xenoenxerto mostrado em B em maior aumento, evidenciando o fronte tumoral caracterizado por cordões invasivos de células neoplásicas entremendo as fibras musculares. Em D, observa-se com maiores detalhes a displasia das células que compõem a mesma lesão, além de pérolas de queratina. Hematoxilina e Eosina, aumentos originais: A:20x, B: 5x, C: 10x e D:40x.

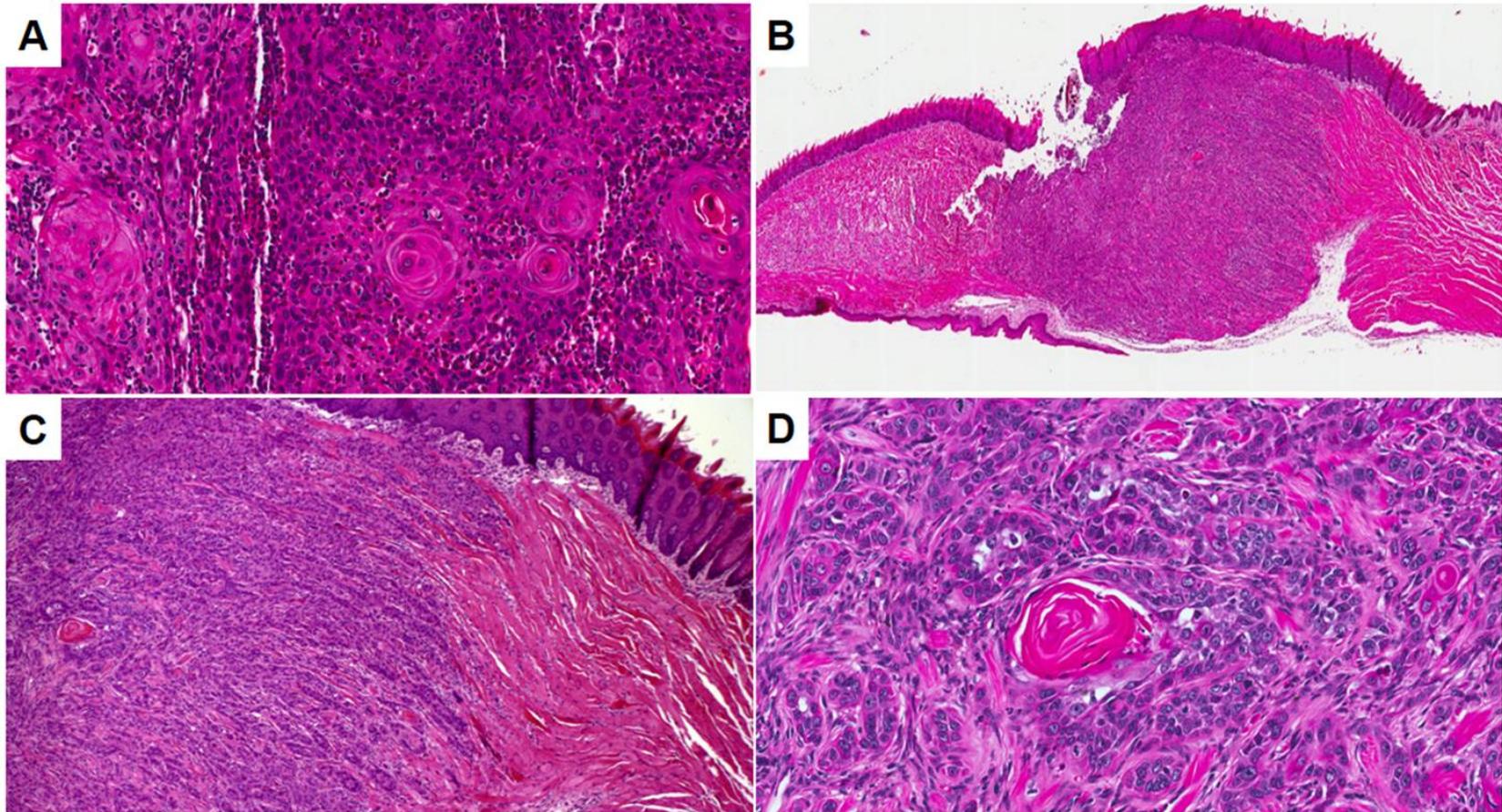


Figura 19 – Fotomicrografias representativas dos aspectos microscópicos observados no CEC oral do paciente 10 e de um de seus enxertos xenográficos (PDTX). Em A, observa-se o tumor doador, que exibe células pleomórficas, com núcleos hipercorados, queratinização individual e poucas pérolas de queratina. Em B, C e D observamos o padrão de crescimento dos transplantes resultantes em camundongo NOD/SCID. Está evidente a falta de limites precisos entre o tumor transplantado e o tecido muscular lingual do animal, que está sendo infiltrado por cordões de células malignas. Em grande aumento (D), pode-se observar células displásicas, com presença de mitoses (seta), invasão perineural (*) e células com queratinização individual. Hematoxilina e eosina, aumentos originais: A:20x, B:5x, C 10xe D:40x.

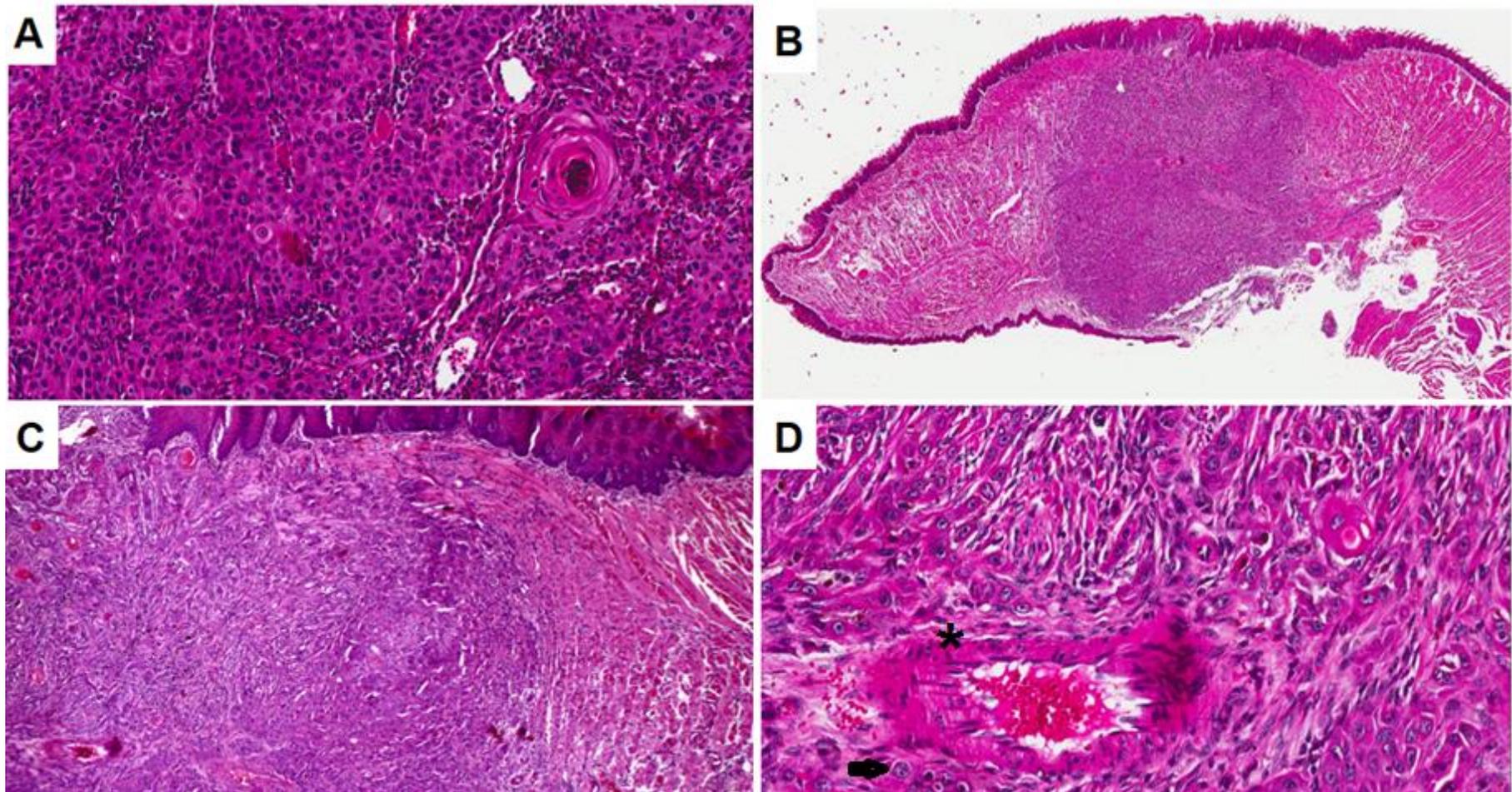
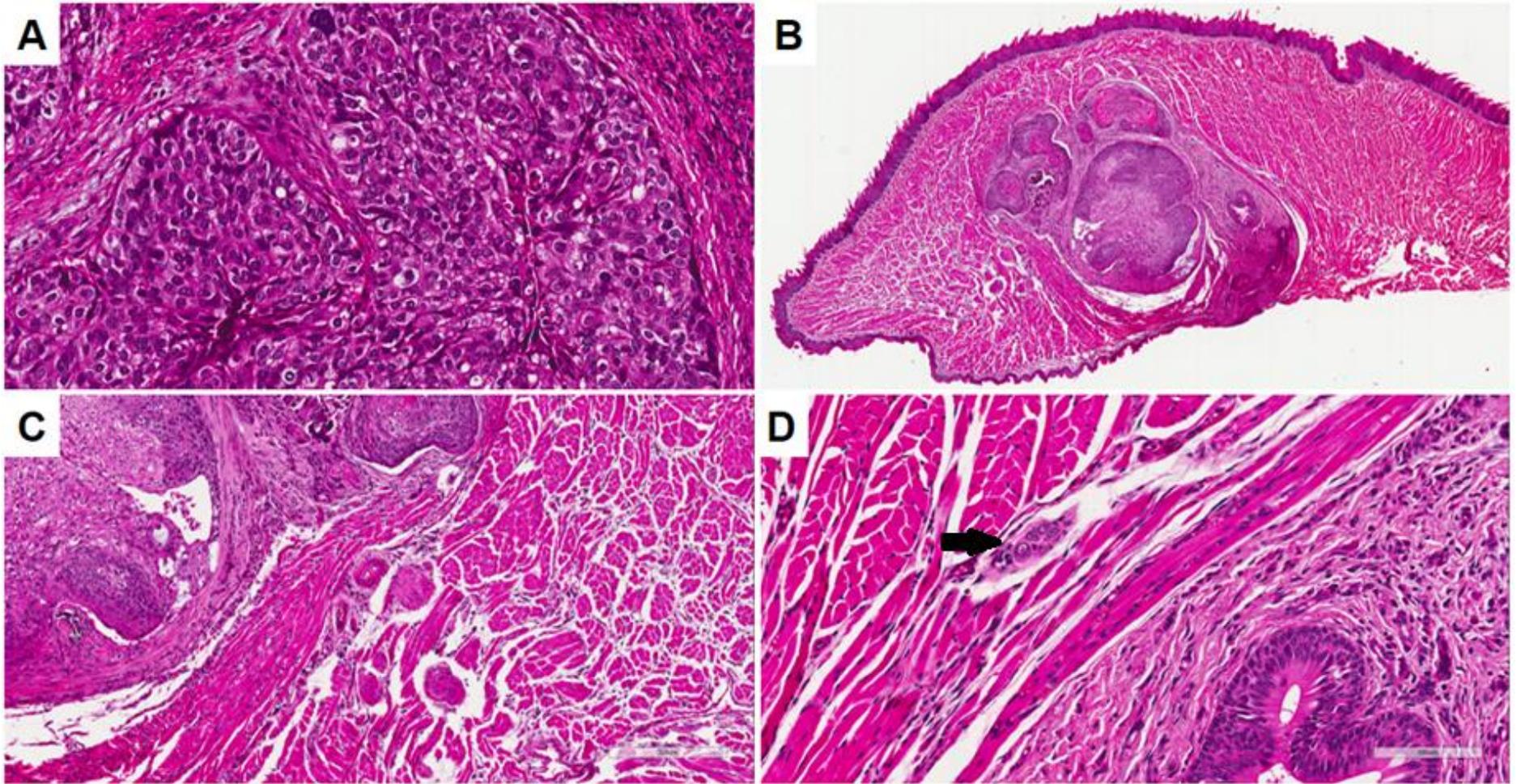


Figura 20 - Características histopatológicas observadas no CEC oral do paciente doador 1 e de um dos enxertos xenográficos (PDTX) dele derivados. Em A, observa-se o CEC doador, formado por uma massa de células bastante pleomórficas, com núcleos hipercoreados e entremeado por escasso estroma. Em B, C e D pode-se observar o padrão circunscrito de crescimento de transplante dele derivado em camundongos NOD/SCID, após um período de 76 dias. Em maior aumento (D), é possível notar ninhos de células neoplásicas (seta) entre as fibras musculares adjacentes.



21 – Fotomicrografias representativas dos aspectos histopatológicos do CEC oral do paciente 12 e do enxerto xenográfico (PDTX) a partir dele gerado em camundongos NOD/SCID. Em A, observa-se o CEC doador, com discreta área de invasão no tecido conjuntivo (seta). O padrão de crescimento deste tumor, após 87 dias do transplante em animais NOD/SCID, está representado em B. As figuras C e D representam o mesmo PDTX mostrado em B em maior aumento, onde visualiza-se melhor o crescimento circunscrito e grande quantidade de queratina (*). Hematoxilina e Eosina, aumentos originais: A: 10x, B: 5x, C: 10x e D: 40x

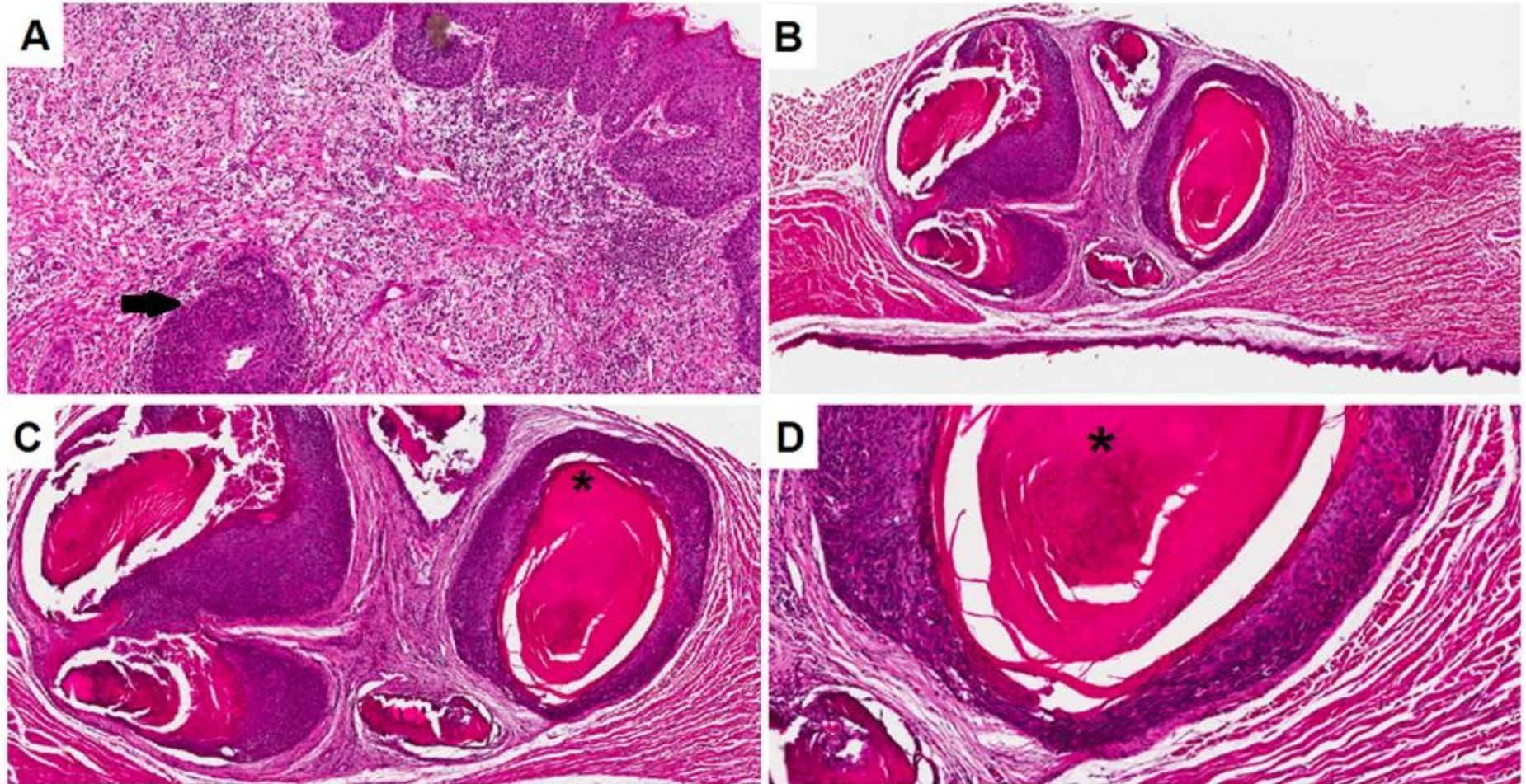


Figura 22 – Fotomicrografias representativas dos aspectos histopatológicos do CEC oral do paciente 11 e de um dos enxertos xenográficos (PDTX) a partir dele obtidos em camundongos NOD/SCID. Em A, nota-se o CEC doador, caracterizado por uma massa de células neoplásicas pleomórficas com poucas pérolas de queratina. O crescimento do PDTX, após 93 dias do seu transplante para o camundongo recipiente, está representado em B, C e D. Pode-se observar um padrão de crescimento mais circunscrito, algumas áreas de invasão no tecido muscular adjacente (setas) e área de queratinização na porção central (*). Hematoxilina e Eosina, aumentos originais: A: 10x, B: 5x, C: 10x e D: 40x.

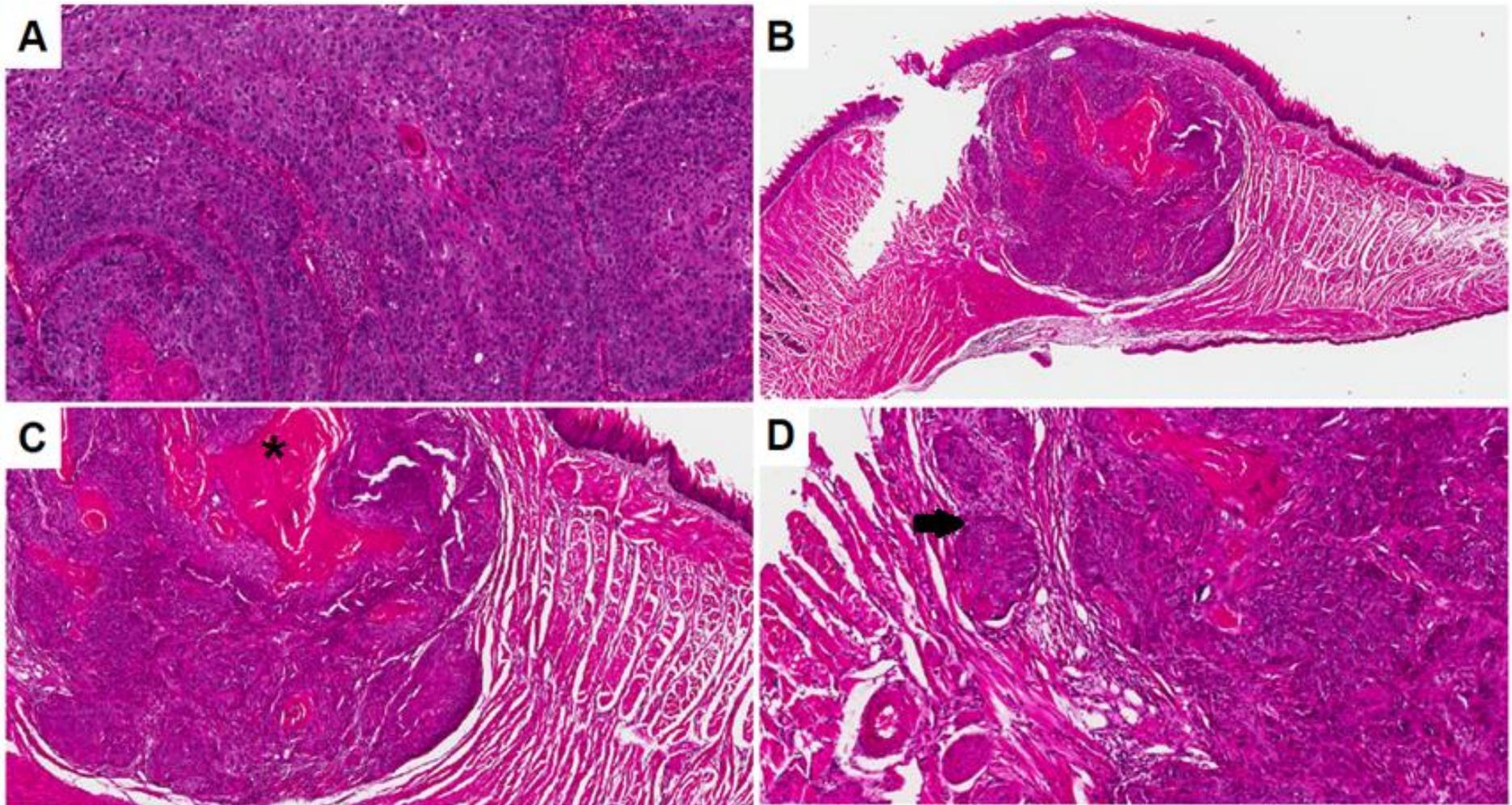
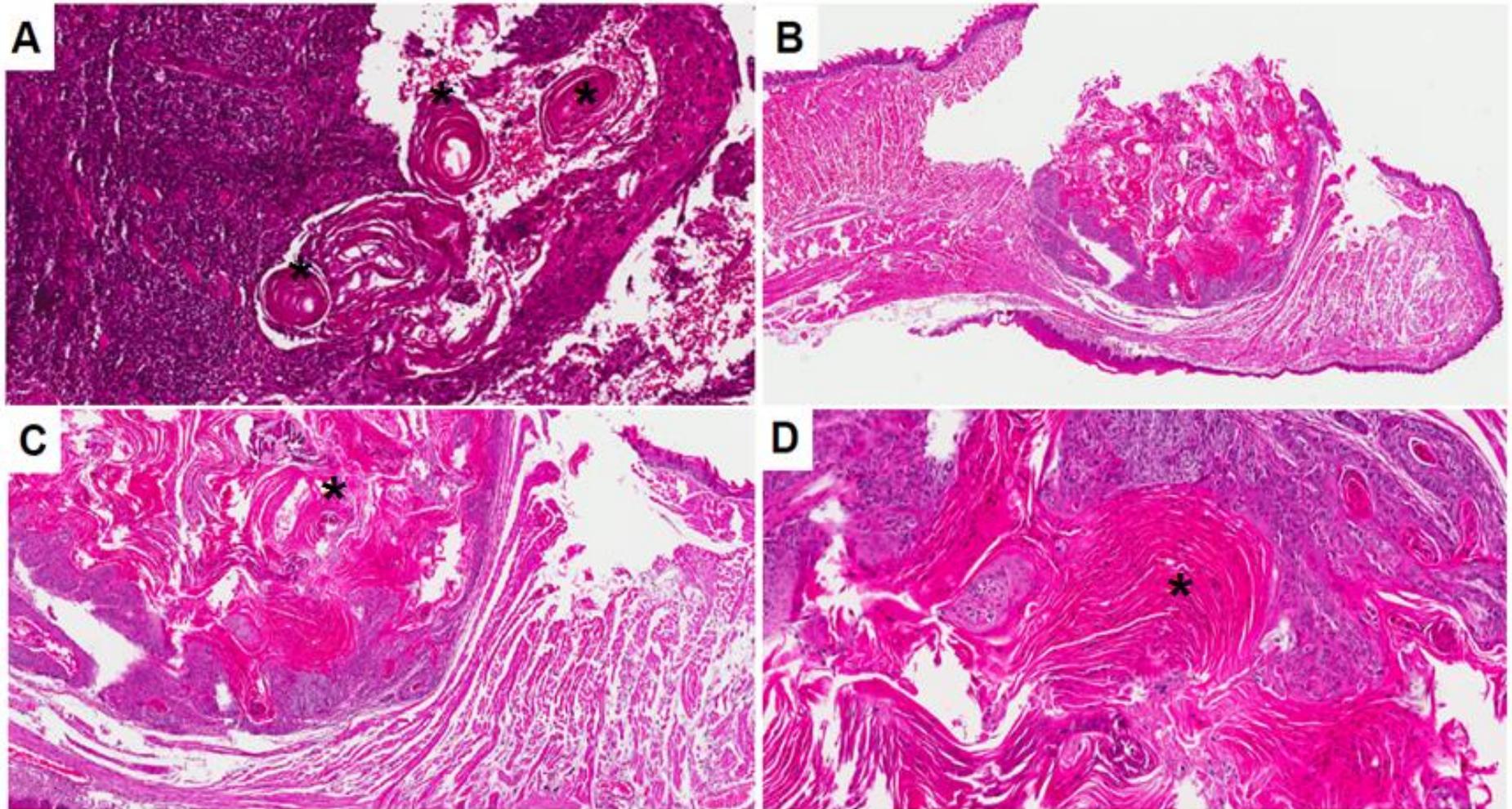


Figura 23 - Características histopatológicas observadas no CEC oral do paciente 7 e de um dos enxertos xenográficos (PDTX) a partir dele derivados. Em A, observa-se o CEC doador, formado por uma massa de células pleomórficas com várias pérolas de queratina (*). Em B, C e D visualiza-se o padrão de crescimento circunscrito do transplante em camundongo NOD/SCID, após um período de 119 dias. Em maior aumento (C e D), pode-se notar a preservação das fibras musculares adjacentes e abundante queratinização (*). Hematoxilina e Eosina, aumentos originais: A: 10x, B: 5x, C: 10x e D: 40x.



5.8.3 Análise da expressão imunoistoquímica de FASN, Ki-67, p21 e CD44 nos CECs orais primários e respectivos xenoinxertos (PDTX)

Para uma análise imunoistoquímica preliminar dos CECs primários dos pacientes doadores e de seus respectivos PDTXs, decidimos investigar a expressão das proteínas Ki-67 e p21, a fim de se estimar o potencial proliferativo destas lesões. CD44, uma molécula de adesão celular que interage com ácido hialurônico, componente da matriz extracelular, foi escolhida por ser bastante expressa em CECs orais, nos quais tem sido sugerida como marcador de células-tronco tumorais (Chen *et al.*, 2014). Juntamente com o estudo do padrão de positividade para FASN, estas análises foram realizadas com o intuito de verificar como a produção destas moléculas é afetada quando os CECs orais são transplantados e se desenvolvem no microambiente da língua de camundongos NOD/SCID. Em geral, observou-se que os xenoinxertos apresentam padrões de positividade até certo ponto semelhantes àqueles encontrados nos tumores doadores.

A positividade para FASN, como esperado, foi fraca no epitélio morfológicamente normal que recobre a língua dos camundongos, restringindo-se às camadas epiteliais inferiores. Em contraste, intensa reatividade intracitoplasmática foi detectada nas células neoplásicas de todos os tumores doadores e xenoinxertos analisados, ao passo que as áreas ocupadas pelo estroma foram sempre negativas (**Figura 24**). A proteína nuclear Ki-67 foi também expressa em todas as amostras derivadas dos CECs orais dos pacientes desta pesquisa, bem como nos respectivos xenoinxertos. Quando áreas de epitélio morfológicamente normal adjacente às lesões estava presente nos cortes histológicos analisados, a positividade para Ki-67 limitou-se a camada basal (**Figura 25**). A análise quantitativa da positividade nuclear para este antígeno mostrou que o potencial proliferativo dos tumores doadores foi semelhante em alguns conjuntos tumor primário/PDTX, embora diferenças significativas tenham sido encontradas (**Figura 26**). Somente quatro dos seis tumores primários e PDTXs analisados exibiram marcação para a proteína p21 (**Figura 27**), que foi semelhante em três conjuntos tumor primário/PDTX (**Figura 28**), porém, diferenças estatisticamente significativas foram encontradas em um deles. Por fim, todas as amostras estudadas foram fortemente marcadas nas reações imunoistoquímicas para CD44, com um padrão nitidamente de membrana plasmática (**Figura 29**)

Figura 24 – Fotomicrografias representativas da expressão imunohistoquímica de FASN nos CECs orais primários doadores e seus respectivos xenoinxertos (PDTX). Pode-se notar intensa positividade intracitoplasmática para FASN nas células dos tumores doadores (A e C) e em seus respectivos PDTX, mostrados em B e D. Quando presente, o epitélio morfologicamente normal adjacente aos tumores e o epitélio que reveste a língua dos camundongos receptores foram fracamente positivos apenas nas suas camadas inferiores. Aumentos originais de 20x.

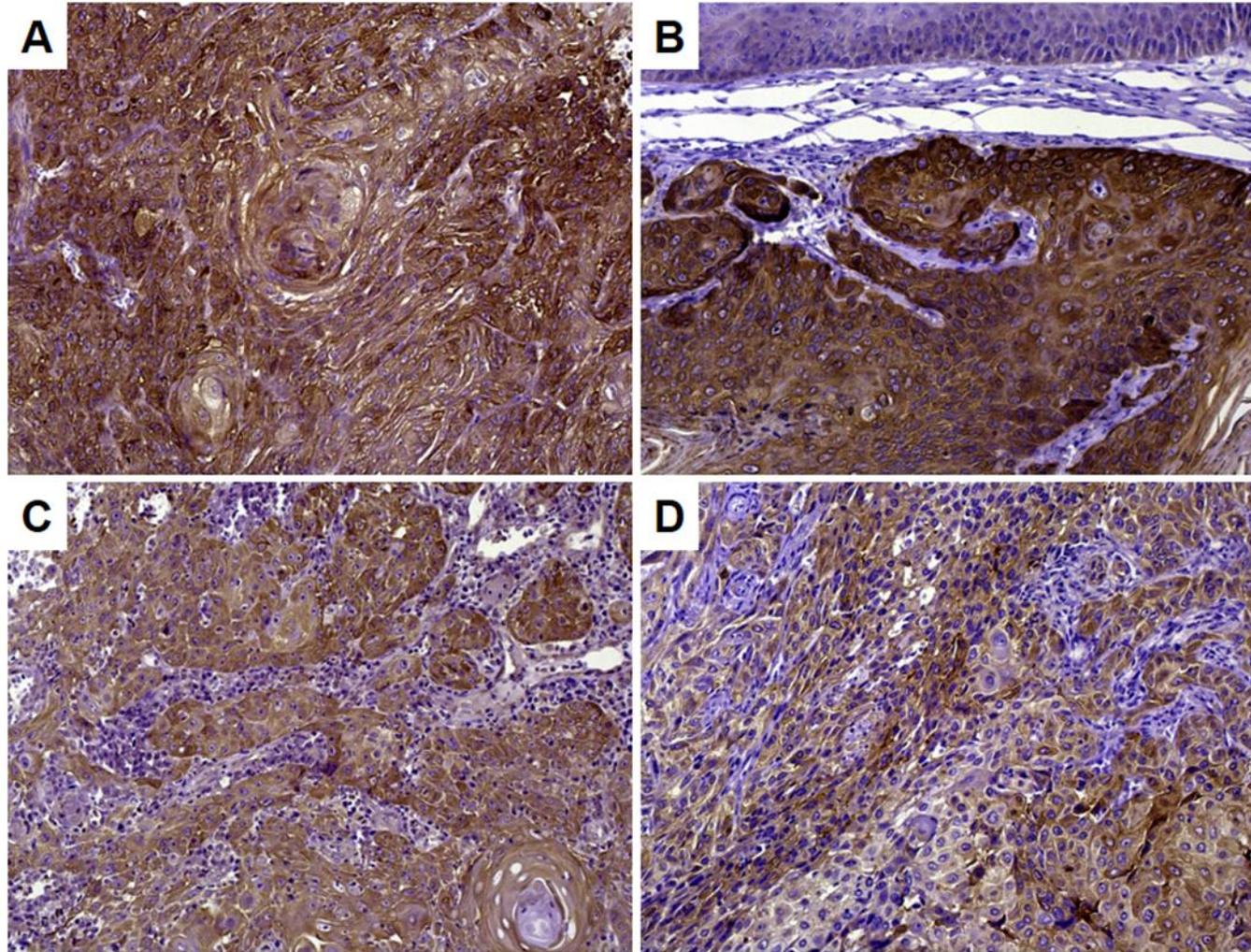


Figura 25 – Fotomicrografias representativas do padrão de positividade imunistoquímica para Ki-67 nos CECs orais primários e xenoenxertos (PDTX). Observa-se nítida positividade nuclear para a proteína Ki-67 tanto nos tumores doadores (A e C) como nos PDTX (B e D). O epitélio morfologicamente normal adjacente aos tumores primários, quando presente, mostrou positividade somente nas suas camadas mais inferiores. Aumentos originais de 20x.

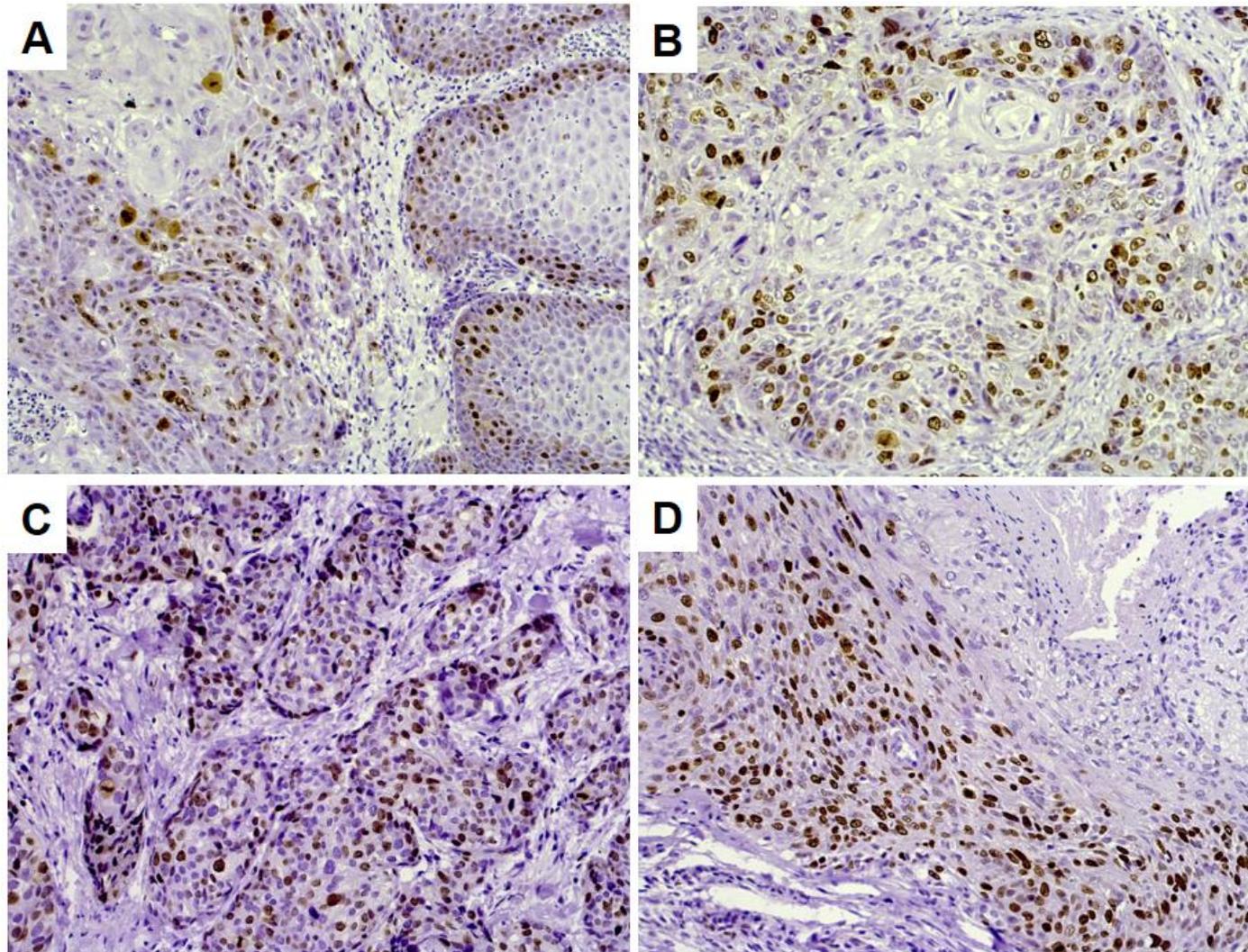


Figura 26: Análise da marcação para Ki-67 nos tumores doadores e seus respectivos xenoinxertos (PDTX). Observa-se potencial proliferativo dos tumores doadores semelhante, até certo ponto, aos respectivos PDTXs. Em A, observa-se positividade semelhante, entretanto, os dois PDTXs tiveram significativamente menos células marcadas. Em B, a marcação também foi parecida, mas o PDX 2 mostrou menor positividade. Em C não foram observadas diferenças estatisticamente significantes, assim como em E. Em D, observa-se maior quantidade de Ki-67 no tumor doador, quando comparado aos dois PDX, e o mesmo observa-se em F, com relação ao único PDX. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$) Teste *t* de Student.

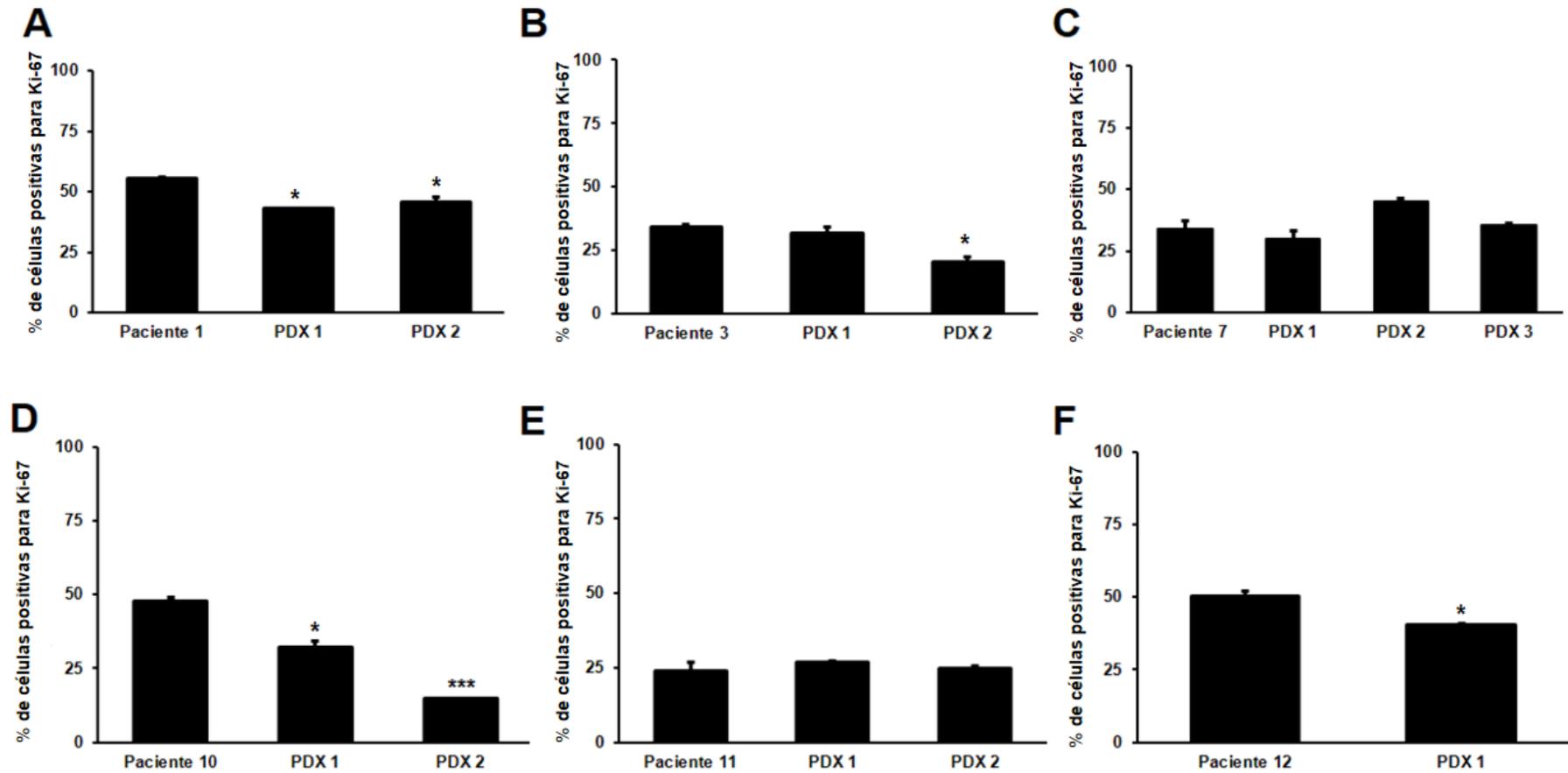


Figura 27 – Fotomicrografias representativas das reações imunistoquímicas para a detecção de p21 em CECs orais primários e xenoenxertos (PDTX). Pode-se observar positividade nuclear nas células dos tumores doadores (A e C) e em seus respectivos PDTX (B e D). Aumentos originais de 20x.

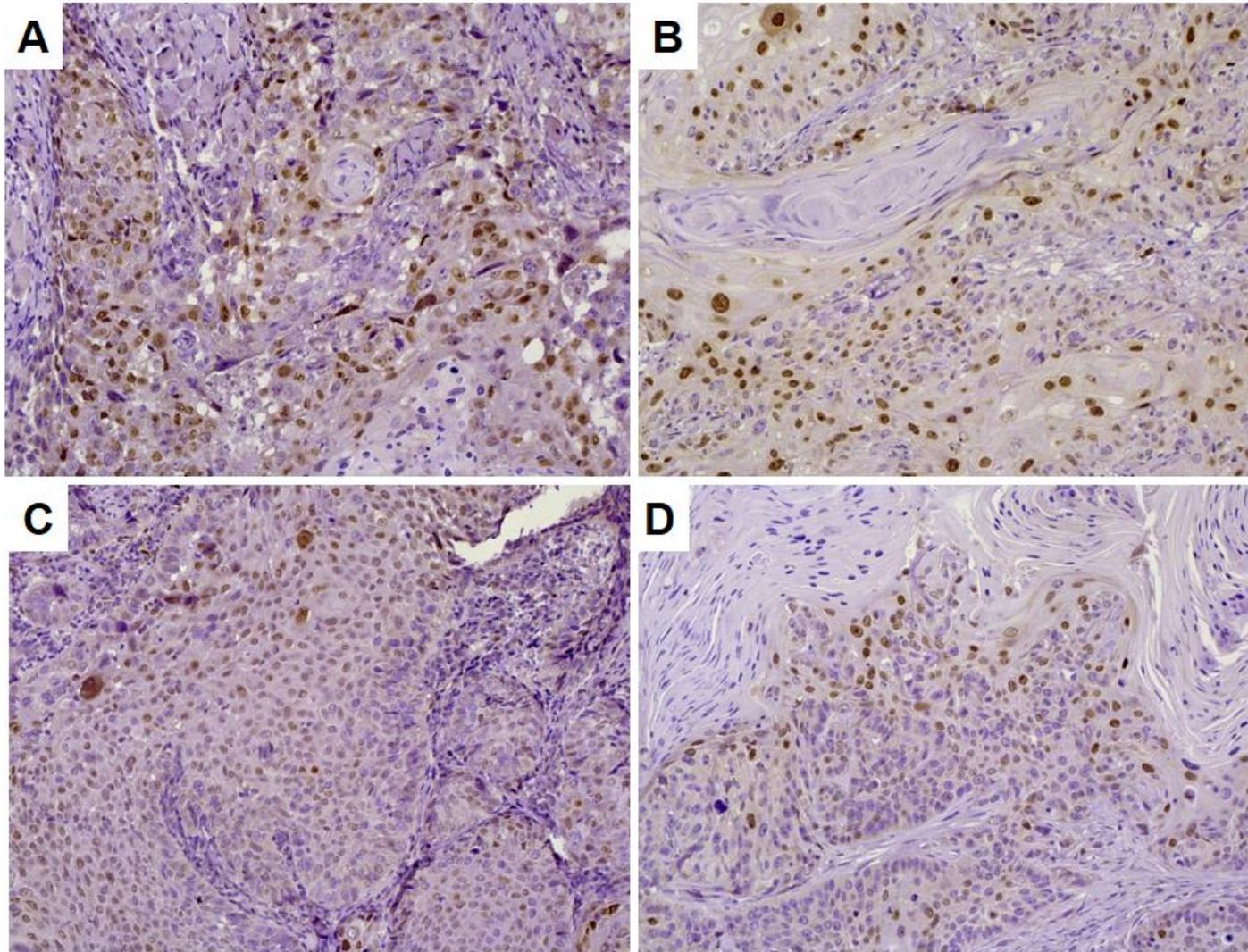


Figura 28: Análise da marcação para p21 nos tumores doadores e seus respectivos xenoinxertos (PDXs). Apesar de semelhantes em alguns dos conjuntos tumor primário/PDX, diferenças estatisticamente semelhantes foram detectadas. Em A, a porcentagem de células marcadas para p21 foi parecida no CEC doador e seus dois PDXs. Em B, observa maior quantidade de células positivas para p21 no tumor doador, quando comparado aos PDX. Em C e D, também nota-se maior quantidade de células marcadas para p21 nos respectivos tumores doadores, com exceção do PDX 2 em C. (***) $p < 0.001$). Teste *t* de Student.

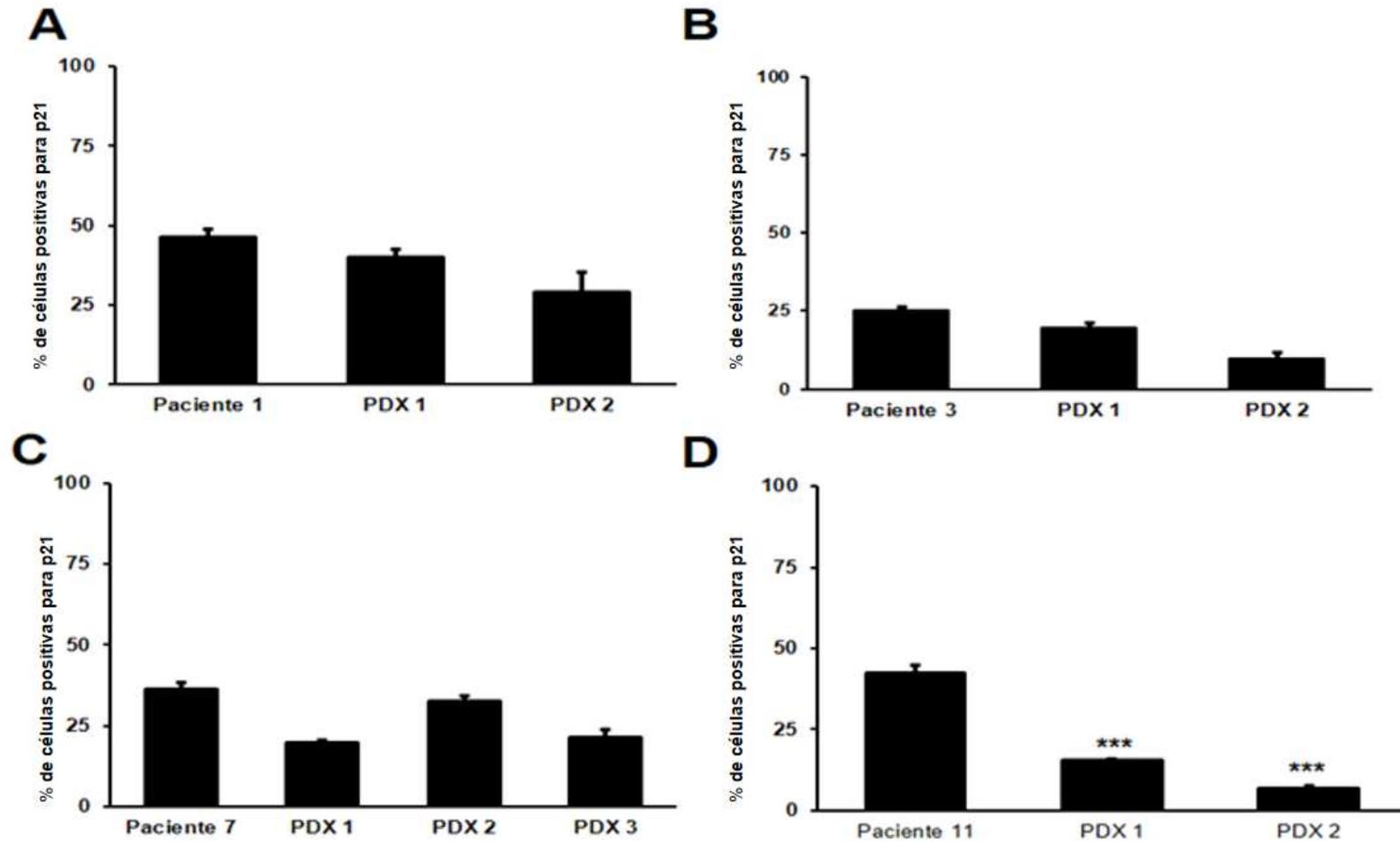
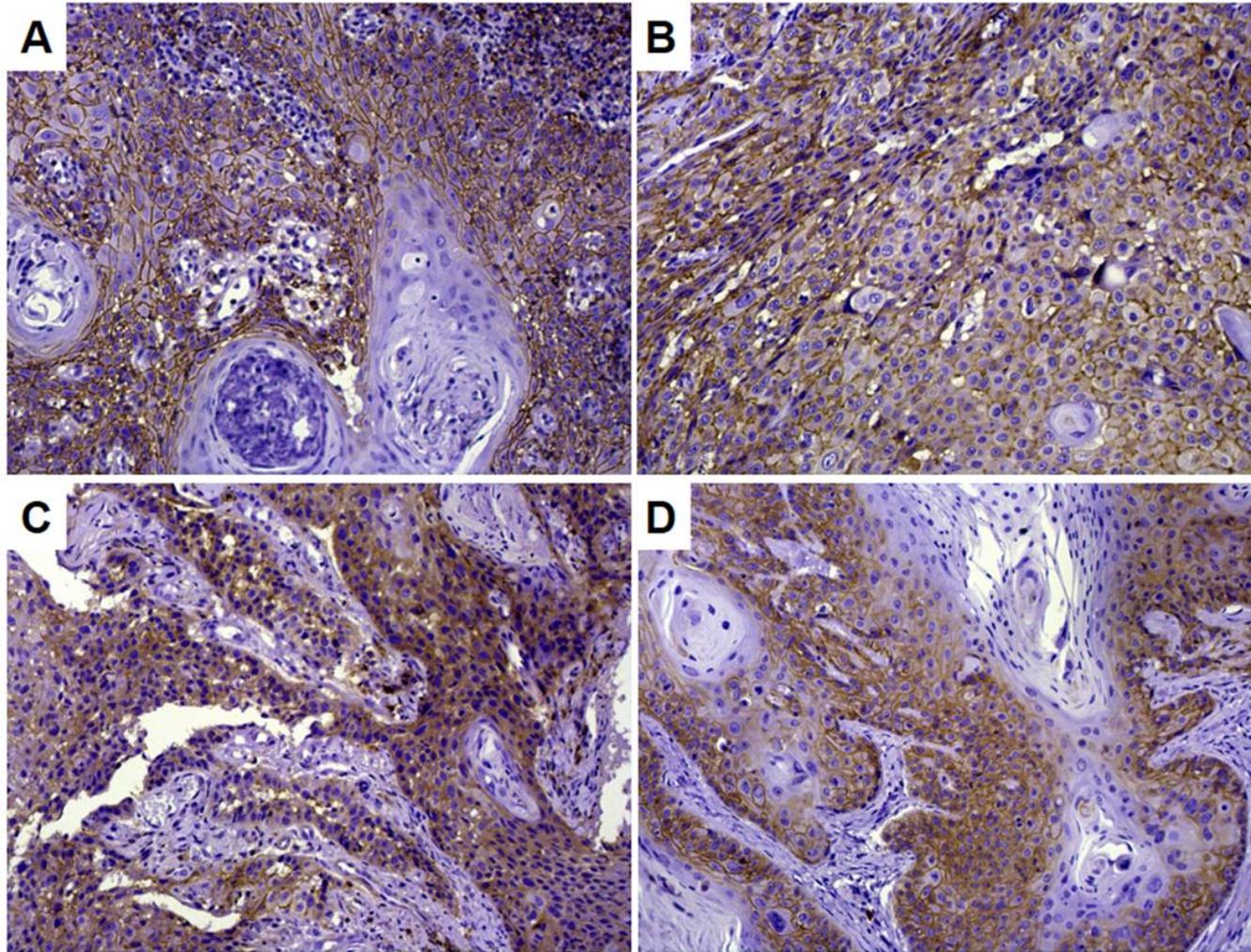


Figura 29: – Fotomicrografias representativas das reações de imunistoquímica para detecção da proteína CD44. Pode-se observar em A e C as células dos CECs orais primários com a membrana plasmática fortemente marcada. Reações com padrão de marcação semelhante (B e D) foram obtidas nos respectivos xenoenxertos (PDTX). Aumentos originais de 20x.



6 DISCUSSÃO

Uma profunda compreensão dos aspectos moleculares envolvidos na progressão do CEC oral, especialmente aqueles relacionados aos processos de invasão e metástase, pode levar a identificação de marcadores moleculares e ao desenvolvimento de terapias mais eficientes do que as hoje existentes. Mesmo com todos os avanços alcançados, a sobrevivência dos pacientes acometidos por esta lesão permanece ao redor de 55% em 5 anos (Alam *et al.*, 2012; van Dijk *et al.*, 2016). A enzima FASN vem sendo considerada como uma oncoproteína metabólica, pois sua expressão e a atividade são geralmente baixas ou até mesmo ausentes na maioria dos tecidos humanos, no entanto, estão elevadas em vários tipos de neoplasias malignas, incluindo-se no CEC oral, o que tem sido associado nos últimos 10 a 15 anos aos mecanismos de progressão tumoral, disseminação metastática, diminuição da resposta aos quimioterápicos e pior prognóstico, o que torna esta enzima metabólica um potencial alvo terapêutico para o tratamento oncológico (Menendez & Lupo, 2007; Flavin *et al.*, 2010; Heuer *et al.*, 2017).

A terapia combinada é uma das estratégias utilizadas no desafiador tratamento oncológico, no qual drogas com diferentes mecanismos de ação são empregadas em conjunto para potencializar os resultados e contornar a resistência adquirida a alguns quimioterápicos (Damaraju *et al.*, 2007). Desta forma, é possível que o uso de inibidores de FASN, associados aos agentes quimioterápicos convencionais, possa resultar em aumento da eficácia do tratamento, visto que estes causam 1) bloqueio da síntese de palmitato, que auxilia o metabolismo celular, participa da estruturação das membranas e da sinalização celular, 2) inibição da sinalização de vias reconhecidas onco-gênicas como Wnt- β -catenina e Akt e 3) indução da apoptose em células malignas (Heuer *et al.*, 2017). Recentemente, nosso grupo de pesquisa avaliou *in vitro* os efeitos da combinação dos quimioterápicos cisplatina, 5-fluorouracil e paclitaxel, todos já utilizados na prática clínica para o tratamento de CECs de cabeça e pescoço, em associação ao inibidor de FASN orlistat. Neste estudo, observamos que a combinação de orlistat com paclitaxel apresenta maior sinergismo que as demais, com aumento significativo dos índices apoptóticos em células de CEC oral (Moreira FS, dados não publicados). No presente estudo, nosso objetivo foi avaliar os efeitos desta combinação sobre as células metastáticas LN-1 *in vitro* e também em modelo ortotópico de CEC oral.

No começo desta pesquisa foi necessário estabelecer uma nova linhagem de células LN-1, a partir das células SCC-9 *ZsGreen*, pois, como relatado por Almeida *et al.* (2015), as LN-1 originais parecem ter sofrido alterações fenotípicas ao longo dos sucessivos subcultivos no laboratório e perdido, em grande parte, sua capacidade metastática. As novas células LN-1 foram então submetidas aos tratamentos com orlistat e paclitaxel, isoladamente e em diferentes concentrações, com o intuito de se estabelecer a IC₅₀ de cada droga e evitar possíveis efeitos citotóxicos inespecíficos. Na sequência, avaliamos também o índice de combinação entre estes compostos, utilizando o método matemático desenvolvido por Chou e Talalay (1984), empregado para avaliação dos efeitos de diferentes drogas em combinação como uma espécie de triagem pré-clínica (Zhao *et al.*, 2004). O tratamento das novas células LN-1 com orlistat e paclitaxel, isoladamente, mostrou redução da viabilidade celular de modo dose-dependente e, assim como observado em nossos experimentos anteriores, a combinação destas duas drogas apresentou elevado grau de sinergismo (CI = 0,31), lembrando que quanto menor em relação a 1 for o CI maior o potencial de interação tipo sinérgica.

A indução da apoptose é um dos efeitos mais desejados no tratamento quimioterápico e os inibidores da atividade de FASN são capazes de bloquear a progressão do ciclo celular, diminuindo a proliferação e ao mesmo tempo aumentando as taxas de apoptose em células derivadas de neoplasias malignas (Pizer *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2003; Kridel *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2008, Agostini *et al.*, 2014). Estes estudos mostraram que a inibição de FASN com orlistat resulta no bloqueio do ciclo celular na fase G₀/G₁ e retarda a entrada na fase S, desencadeando a morte celular por apoptose. Paclitaxel, por sua vez, atua por meio da estabilização dos microtúbulos e provoca o bloqueio do ciclo celular na fase G₂/M, comprometendo a mitose e também induzindo a apoptose, o que já foi relatado em trabalhos com linhagens celulares de carcinomas nasofaríngeo, de ovário, de pulmão e de mama (revisado por Rowinsky & Donehower, 1995; Shu *et al.*, 1997; Frankel *et al.*, 1997; Das *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2012).

Publicações prévias já mostraram que o tratamento conjunto de células derivadas de câncer de mama com inibidores de FASN (cerulenina e C75) e medicamentos antitubulínicos, como paclitaxel e docetaxel, resulta em efeito citotóxico sinérgico com aumento das taxas de apoptose (Menendez *et al.*, 2004b; Menendez *et al.*, 2004c; Menendez *et al.*, 2005). No presente trabalho, os efeitos da terapia

combinada com orlistat e paclitaxel também foram superiores aos das drogas isoladas, resultando em aumento significativo das taxas de morte celular por apoptose e acúmulo das células LN-1 principalmente na fase G2/M do ciclo celular. Estes resultados sugerem que há um predomínio do mecanismo de ação do paclitaxel, que é potencializado pelo orlistat, ou seja, que o tratamento com orlistat aumenta a quimiossensibilidade destas células ao paclitaxel. De fato, Rysman *et al.* (2010) mostraram, por espectrometria de massas, que tecidos tumorais com fenótipo lipogênico apresentam maior grau de saturação lipídica do que tumores não lipogênicos. Ainda neste estudo, foi mostrado que o tratamento de células LNCaP, derivadas de carcinoma de próstata metastático, com o inibidor de lipogênese sorafeno A diminui acentuadamente os fosfolípídeos saturados enquanto aumenta o grau de poliinsaturação, o que, uma vez que as cadeias poliinsaturadas são mais suscetíveis à peroxidação, altera as membranas e facilita a entrada de agentes quimioterápicos. Estes resultados indicam que inibidores da lipogênese tornam as células neoplásicas mais suscetíveis às quimioterapias convencionais. Vale ressaltar, que a elevada expressão de FASN já foi associada à resistência aos tratamentos com cisplatina e paclitaxel em carcinomas de mama e de fígado (Meena *et al.*, 2013; Warmoes *et al.*, 2013), o que reforça a ideia de se inserir inibidores desta enzima nos protocolos quimioterápicos em uso clínico.

As metástases são as principais causas de morte relacionadas ao câncer e estão associadas, pelo menos em parte, com o fenômeno biológico denominado transição epitélio-mesenquimal (EMT). EMT é um processo crucial na progressão do câncer, pois confere às células tumorais a habilidade de sair do tumor primário, invadir o estroma que o circunda e então migrar para sítios anatômicos distantes (Nguyen *et al.*, 2012). Vários eventos moleculares distintos estão envolvidos neste processo, dentre eles a ativação de fatores de transcrição, expressão de proteínas específicas da superfície celular, reorganização e expressão de proteínas do citoesqueleto e produção de enzimas que degradam a matriz extracelular (Natarajan *et al.*, 2014). Uma das alterações mais significativas na EMT é o fenômeno conhecido como “*cadherin switching*”, caracterizado pela diminuição da produção de E-caderina e aquisição da expressão de N-caderina por células epiteliais malignas, em contraste com células normais que expressam somente E-caderina, sendo a N-caderina produzida por células mesenquimais (Wheelock *et al.*, 2008; revisado por Smith *et al.*, 2013).

No presente estudo, observamos que as células LN-1 apresentam elevado potencial migratório. De acordo, nossas reações de western blotting com extratos proteicos destas mesmas células, na ausência de qualquer tipo de tratamento, evidenciaram reduzida quantidade de E-caderina e produção de N-caderina e vimentina, sendo que a última normalmente não é expressa por células epiteliais normais e está associada ao fenótipo invasivo (revisado por Smith *et al.*, 2013). Por fim, encontramos aumento da quantidade do fator de transcrição Snail1, que atua reprimindo a expressão do gene que codifica E-caderina, o que também está associado com diferenciação tumoral, invasão e metástase (revisado por Smith *et al.*, 2013). Em 2007, Pyo *et al.* mostraram, por meio de estudo imunoistoquímico com 71 casos de CECs orais, que a expressão reduzida de E-caderina concomitante ao aumento de N-caderina está associada ao potencial invasivo e disseminação metastática para linfonodos regionais, reforçando que o “*cadherin switching*” desempenha um papel crítico no processo metastático. Nijkamp *et al.*, 2011, observaram grande variação na expressão de E-caderina e vimentina em pacientes com CECs de cabeça e pescoço, entretanto, os tumores com baixa expressão de E-caderina tiveram incidência significativamente maior de metástases (81%), quando comparados aqueles com expressão elevada desta proteína (19%). No mesmo estudo, a alta expressão de vimentina foi também associada a maior risco de metástases (77%), em relação aos tumores que não expressaram esta proteína (19%), e todos os pacientes com baixa expressão de E-caderina e alta expressão de vimentina desenvolveram metástases a distância. Havry *et al.* (2010), por sua vez, descreveram que a expressão de Snail1 em 73 CECs primários de língua se correlaciona com a gradação histológica e com a profundidade de invasão destes tumores. De acordo, Mendelsohn *et al.* (2012) também mostraram que a positividade imunoistoquímica para Snail1 está significativamente associada a CECs de cabeça e pescoço pouco diferenciados, com invasão linfática e metástases regionais.

No presente estudo, a exposição das células LN-1 a combinação de orlistat e paclitaxel promove reversão da EMT e inibição da capacidade migratória, o que foi evidentemente refletido no modelo ortotópico de CEC oral, que mostrou redução significativa do crescimento tumoral e do número de metástases regionais. Orlistat sozinho foi capaz de aumentar a expressão de E-caderina e diminuir a expressão de N-caderina, assim como quando combinado com paclitaxel. Por outro lado, paclitaxel isoladamente mostrou-se mais efetivo na inibição da expressão de vimentina e de

Snail 1, o que se refletiu na combinação. Estudos prévios já mostraram que a inibição farmacológica de FASN reduz a proliferação em diversas linhagens tumorais, em grande parte por inibir a síntese de ácidos graxos necessários para a síntese das membranas (Menendez *et al.*, 2005; Ho *et al.*, 2007; Murata *et al.*, 2010). De acordo, células em processo de EMT, principalmente a EMT do tipo III que é associada à progressão tumoral e disseminação metastática, mostram rápida proliferação em decorrência do aumento do metabolismo de ácidos graxos (Li *et al.*, 2014).

Os resultados aqui obtidos, com orlistat associado ao paclitaxel, nos experimentos *in vitro* com as células LN-1 foram reproduzidos *in vivo* no modelo ortotópico de CEC oral metastático. Neste, obtivemos uma surpreendente inibição de 99,6% do crescimento dos tumores primários formados após a inoculação das células LN-1 na borda lateral de língua de camundongos Balb/c *nude*. Estudos anteriores já relataram a diminuição do tamanho de tumores xenográficos causada pela inibição da atividade de FASN, incluindo aquele realizado por Agostini *et al.* (2014), principal alvo de comparação da presente pesquisa. O tratamento com cerulenina ou C75 causou redução no tamanho de tumores em modelos xenográficos derivados de células de câncer de ovário (Pizer *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2005; Uddin *et al.*, 2011), mama (Pizer *et al.*, 2000), mesotelioma (Gabrielson *et al.*, 2001), rim (Horiguchi *et al.*, 2008), tireóide (Uddin *et al.*, 2008), coloretal (Uddin *et al.*, 2009) e meningioma (Haase *et al.*, 2010). Recentemente, estudo realizado por Heuer *et al.* (2017) mostrou, utilizando o novo inibidor de FASN TVB-3166 associado ao paclitaxel, uma eficácia antitumoral muito significativa. Estes autores utilizaram modelos xenográficos de câncer de pulmão, próstata e pâncreas e encontraram, com a terapia combinada, regressão total dos tumores de pulmão e inibição do crescimento dos tumores de próstata (97%) e de pâncreas (88%).

O foco principal do nosso estudo com o modelo ortotópico foi a investigação do efeito destas drogas sobre o processo de disseminação metastática para os linfonodos regionais dos camundongos, que, em humanos, é um dos fatores mais relevantes para se estimar o prognóstico dos pacientes acometidos por esta lesão. O trabalho realizado por Agostini *et al.* (2014) já havia mostrado que a inibição de FASN com orlistat é capaz de reduzir a disseminação metastática em 43% e resultado muito similar foi encontrado na presente pesquisa, na qual o grupo de animais tratado com orlistat sozinho apresentou 47% de inibição das metástases. Importante ressaltar que o grupo que recebeu apenas paclitaxel apresentou somente 21,3% de inibição

metastática e a terapia combinada com orlistat e paclitaxel reduziu drasticamente a disseminação metastática em 89,8%. Tais resultados sugerem que a atividade de FASN é essencial para a disseminação metastática das células LN-1, possivelmente por reverter a EMT. Alguns trabalhos já analisaram os efeitos da inibição da atividade de FASN sobre a formação de metástases. Carvalho *et al.* (2008) verificou que camundongos C57BL6 portadores de melanomas experimentais tratados com orlistat tiveram redução de até 50% na quantidade de linfonodos mediastínicos metastáticos. Recentemente, Bastos *et al.* (2017) mostraram que o tratamento com orlistat inibe a formação de capilares linfáticos *in vitro*, reduz a viabilidade, a proliferação e a migração nas células endoteliais linfáticas HDLEC e reduz em 39,25% o volume das metástases para linfonodos cervicais laterais de camundongos portadores de melanomas experimentais B16-F10 nas orelhas. Portanto, os resultados aqui relatados reforçam a hipótese de que FASN é um alvo para o tratamento oncológico e revelam a importância de mais estudos pré-clínicos e clínicos que incluam inibidores desta enzima a protocolos quimioterápicos já em uso, principalmente em associação aos taxanos.

Relevantes do ponto de vista biológico e clínico, os modelos animais são essenciais na investigação da progressão de doenças e da eficácia de novos agentes terapêuticos. Os modelos ortotópicos mimetizam o crescimento dos tumores no local anatômico em que ele acomete o paciente permitindo o estudo dos processos de invasão local e sua disseminação metastática (Mognetti *et al.*, 2006). No entanto, os modelos ortotópicos em estudos pré-clínicos não têm a heterogeneidade celular das neoplasias malignas humanas, pois são padronizados com linhagens celulares, perdendo por isto seu potencial preditivo. Os modelos PDTX surgiram recentemente como uma poderosa ferramenta, capaz de reter a heterogeneidade histopatológica e molecular de seus tumores de origem (Cassidy *et al.*, 2015). O último dos objetivos do presente trabalho foi dar início ao estabelecimento de um modelo PDTX para CECs orais, visando reproduzir com mais fidelidade a lesão existente nos pacientes e, futuramente, possibilitar o teste de terapias já em uso clínico ou de novas drogas.

Modelos PDTX tem sido estabelecidos para várias neoplasias malignas, dentre elas os cânceres de ovário, pâncreas, colorretal e de pulmão (revisado por Tentler *et al.*, 2012). No presente estudo, conseguimos estabelecer 6 diferentes PDTX oriundos de CECs orais de sítios anatômicos distintos, sendo a taxa de sucesso de 40%, que está de acordo com a literatura que descreve taxas de sucesso entre 29 a

44% (Tentler *et al.*, 2012). Acreditamos que o sucesso dos enxertos aqui realizados pode ser atribuído a rigorosa seleção do tecido neoplásico, com exclusão de áreas com suspeita de necrose, e utilização fragmentos próximos uns aos outros, o que foi necessário pois todos tecidos tumorais foram provenientes de biópsias. Uma das vantagens atribuídas aos modelos PDTX é a fiel representação da diversidade genética e das características microscópicas e moleculares existentes nos tumores dos pacientes doadores (Peng *et al.*, 2013). Em nosso estudo, ainda que preliminar e não finalizado, foi possível observar, em quase todos os xenoenxertos obtidos, a manutenção das características histopatológicas dos tecidos doadores. De forma semelhante, os padrões de positividade para Ki67, p21, CD44 e FASN estão se mostrando semelhantes nos PDTXs obtidos e nos tumores parentais.

Em resumo, a presente pesquisa demonstra a relevância da associação de um inibidor de FASN ao quimioterápico paclitaxel em diversos aspectos da biologia das células LN-1, seja potencializando a parada do crescimento celular, induzindo apoptose, revertendo a EMT ou inibindo a migração, o que foi refletido nos surpreendentes resultados obtidos no modelo ortotópico, com drásticas reduções de crescimento dos tumores primários e da disseminação metastática.

7 CONCLUSÃO

A associação orlistat/paclitaxel apresentou efeito sinérgico nos estudos *in vitro* desta pesquisa assim como no modelo ortotópico de CEC oral, no qual observou-se redução de 99,6% no volume dos tumores primários e de 80,8% na disseminação metastática para linfonodos cervicais. Em conjunto, estes resultados podem servir de base para futuros estudos clínicos. O modelo PDTX manteve as características histopatológicas dos respectivos pacientes doadores, mostrando-se uma ferramenta em potencial para previsão da resposta dos pacientes a agentes quimioterápicos.

REFERÊNCIAS*

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.

Alam H, Bhate AV, Gangadaran P, Sawant SS, Salot S, Sehgal L, et al. Fascin overexpression promotes neoplastic progression in oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2012 Jan 20; 12 - 32.

Almeida LY. Estudo dos efeitos do inibidor da ácido graxo sintase Orlistat associado a 5-fluorouracil, cisplatina e Paclitaxel em carcinoma espinocelular oral: estudo em Linhagem celular e em modelo ortotópico (Tese). Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, 2015.

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

Bais MV, Kukuruzinska M, Trackman PC. Orthotopic non-metastatic and metastatic oral cancer mouse models. *Oral Oncol.* 2015 May; 51(5): 476 - 82.

Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2005.

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

Bastos DC, Paupert J, Maillard C, Seguin F, Carvalho MA, Agostini M, et al. Effects of fatty acid synthase inhibitors on lymphatic vessels: an in vitro and in vivo study in a melanoma model. *Lab Invest.* 2017 Feb; 97(2): 194 - 206.

*De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Brink J, Ludtke ST, Yang Chao-Yuh, Gu Zei-Wei, Wakil SJ, Chiu W. Quaternary structure of human fatty acid synthase by electron cryomicroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99 (1): 138 - 43.

Brusselmans K, De Schrijver E, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV. Epigallocatechin-3-gallate is a potent natural inhibitor of fatty acid synthase in intact cells and selectively induces apoptosis in prostate cancer cells. *Int J Cancer*. 2003 Oct 10; 106 (6): 856 - 862.

Carvalho MA, Zecchin KG, Seguin F, Bastos DC, Agostini M, Rangel AL, *et al*. Fatty acid synthase inhibition with Orlistat promotes apoptosis and reduces cell growth and lymph node metastasis in a mouse melanoma model. *Int J Cancer*. 2008 Dec 1; 123 (11): 2557 - 2565.

Cassidy JW, Caldas C, Bruna A. Maintaining Tumor Heterogeneity in Patient-Derived Tumor Xenografts. *Cancer Res*. 2015 Aug 1;75(15): 2963 - 8.

Chabner BA, Roberts TG Jr. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer*. 2005 Jan; 5 (1): 65 - 72.

Chen J, Zhou J, Lu J, Xiong H, Shi X, Gong L. Significance of CD44 expression in head and neck cancer: a systemic review and meta-analysis. *BMC Cancer* 2014; 14(1): 15.

Choi YH, Yoo YH. Taxol-induced growth arrest and apoptosis is associated with the upregulation of the Cdk inhibitor, p21WAF1/CIP1, in human breast cancer cells. *Oncol Rep*. 2012 Dec; 28(6): 2163 - 69.

Chou TC, Martin N. CompuSyn for drug combinations: PC Software and User's Guide: a computer program for quantitation of synergism and antagonism in drug combinations, and the determination of IC50 and ED50 and LD50 values. Paramus (NJ): Combo-Syn; 2005, (Web link: <http://www.combosyn.com/> for video demonstration).

Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships – the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 1984; 2: 27 - 55.

Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res.* 2010 Jan 15; 70 (2): 440 - 46.

Curado MP, Johnson NW, Kerr AR, Silva DRM, Lanfranchis H, Pereira DL, et al. Oral and oropharynx cancer in South America: Incidence, mortality trends and gaps in public databases as presented to the Global Oral Cancer Forum. *Translational Research in Oral Oncology.* (1): 1 - 7.

Daley T, Darling M. Nonsquamous cell malignant tumours of the oral cavity: an overview. *J Can Dent Assoc.* 2003 Oct; 69 (9): 577 - 82.

Damaraju VL, Bouffard DY, Wong CKW, Clarke ML, Mackey JR, Leblond L, et al. Synergistic activity of troxacitabine (Troxyatl™) and gemcitabine in pancreatic cancer. *BMC Cancer.* 2007; 7: 121.

Das GC, Holiday D, Gallardo R, Haas C. Taxol-induced cell cycle arrest and apoptosis: dose-response relationship in lung cancer cells of different wild-type p53 status and under isogenic condition. *Cancer Lett.* 2001 Apr 26;165(2):147- 53.

De Schrijver E, Brusselmans K, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV. RNA interference-mediated silencing of the fatty acid synthase gene attenuates growth and induces morphological changes and apoptosis of LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Research* 2003; 63 (13): 3799 - 3804.

De Craene B, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer.* 2013 Feb;13(2):97-110.

Dowling S, Cox J, Cenedella RJ. Inhibition of fatty acid synthase by Orlistat accelerates gastric tumor cell apoptosis in culture and increases survival rates in gastric tumor bearing mice in vivo. *Lipids.* 2009 Jun; 44 (6): 489 - 498.

Feller L, Lemmer J. New 'second primary' cancers. *SADJ.* 2012 May;67(4): 175 - 78.

Ferlini C, Raspaglio G, Mozzetti S, Distefano M, Filippetti F, Martinelli E, et al. Bcl-2 down-regulation is a novel mechanism of paclitaxel resistance. *Mol Pharmacol.* 2003 Jul; 64 (1): 51 - 58.

Fichtner I, Slisow W, Gill J, Becker M, Elbe B, Hillebrand T, et al. Anticancer drug response and expression of molecular markers in early-passage xenotransplanted colon carcinomas. *Eur J Cancer*. 2004 Jan;40(2): 298 - 307.

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

Frankel A, Buckman R, Kerbel RS. Abrogation of taxol-induced G2-M arrest and apoptosis in human ovarian cancer cells grown as multicellular tumor spheroids. *Cancer Res*. 1997 Jun 15;57(12): 2388 - 93.

Fury MG, Pfister DG. Current recommendations for systemic therapy of recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. 2011 Jun; 9 (6): 681- 89.

Gabrielson EW, Pinn ML, Testa JR, Kuhajda FP. Increased fatty acid synthase is a therapeutic target in mesothelioma. *Clin Cancer Res* 2001; 7 (1): 153 - 157.

Graner E, Tang D, Rossi S, Baron A, Migita T, Weinstein LJ, et al. The isopeptidase USP2a regulates the stability of fatty acid synthase in prostate cancer. *Cancer Cell*. 2004; 5: 2536 - 41.

Grau JJ, Caballero M, Verger E, Monzó M, Blanch JL. Weekly paclitaxel for platin-resistant stage IV head and neck cancer patients. *Acta Otolaryngol*. 2009 Nov;129(11): 1294 - 99.

Guerciolini R. Mode of action of Orlistat. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1997; 21 (3): 12 - 23.

Haase D, Schmidl S, Ewald C, Kalff R, Huebner C, Firsching R, Keilhoff G, Evert M, Paulus W, Gutmann DH, Lal A, Mawrin C. Fatty acid synthase as a novel target for meningioma therapy. *Neuro Oncol*. 2010; 12(8): 844 - 54.

Havry V, Makinen LK, Atula T, Sariola H, Makitie A, Leivo I, et al. Bmi-1 expression predicts prognosis in squamous cell carcinoma of the tongue. *Br J Cancer*. 2010 Mar 2;102 (5): 892 - 97.

Hennequin C, Quero L, Favaudon V. Biological basis of chemo-radiotherapy associations. *Bull Cancer*. 2009 Mar; 96 (3): 329 - 36.

Heuer TS, Ventura R, Mordec K, Lai J, Fridlib M, Buckley D, et al. FASN Inhibition and Taxane Treatment Combine to Enhance Anti-tumor Efficacy in Diverse Xenograft Tumor Models through Disruption of Tubulin Palmitoylation and Microtubule Organization and FASN Inhibition-Mediated Effects on Oncogenic Signaling and Gene Expression. *EBioMedicine*. 2017 Feb; 16: 51 - 62.

Ho TS, Ho YP, Wong WY, Chi-Ming Chiu L, Wong YS, Eng-Choon Ooi V. Fatty acid synthase inhibitors cerulenin and C75 retard growth and induce caspasedependent apoptosis in human melanoma A-375 cells. *Biomed Pharmacother*. 2007; 61(9): 578 - 87.

Horiguchi A, Asano T, Asano T, Ito K, Sumitomo M, Hayakawa M. Pharmacological inhibitor of fatty acid synthase suppresses growth and invasiveness of renal cancer cells. *J Urol*. 2008; 180(2): 729 - 36.

Hsu YC, Liou YM. The anti-cancer effects of (-) epigallocatechin-3-gallate on the signaling pathways associated with membrane receptors in MCF-7 cells. *J Cell Physiol*. 2011 Oct; 226 (10): 2721 - 30.

Huang GC, Liu SY, Lin MH, Kuo YY, Liu YC. The synergistic cytotoxicity of in tumor cell lines. *Cancer Res*. 1998; 58(20): 4611 - 15.

Instituto Nacional de Câncer - INCA. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil, [acesso 2017 Jan 21]. Disponível em URL: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016>.

Jones SF, Infante JR. Molecular Pathways: Fatty Acid Synthase. *Clin Cancer Res*. 2015 Dec 15;21(24): 5434 - 38.

Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer*. 2004 Apr;4(4): 253 - 65.

Khanna C, Rosenberg M, Vail DM. A Review of Paclitaxel and Novel Formulations Including Those Suitable for Use in Dogs. *J Vet Intern Med.* 2015 Jul-Aug;29(4):1006-12.

Kim S. Animal Models of Cancer in the Head and Neck Region. *Clin Exp Otorhinolaryngol.* 2009 Jun; 2(2): 55 - 60.

Knowles LM, Axelrod F, Browne CD, Smith JW. A fatty acid synthase blockade induces tumor cell-cycle arrest by down-regulating Skp2. *J Biol Chem* 2004; 279 (29): 30540 - 545.

Kridel SJ, Axelrod F, Rosenkrants N, Smith W. Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity. *Cancer Research* 2004; 64: 2070 - 75.

Krontiras H, Roye GD, Beenken SE, Myers RB, Mayo MS, Peters GE et al. Fatty acid synthase expression is increased in neoplastic lesions of the oral tongue. *Head Neck* 1999; 21 (4): 325 - 29.

Kuemmerle NB, Rysman E, Lombardo PS, Flanagan AJ, Lipe BC, Wells WA et al. Lipoprotein lipase links dietary fat to solid tumor cell proliferation. *Mol Cancer Ther.* 2011 March; 10 (3): 427 - 36.

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.

Kumar-Sinha C, Ignatoski KW, Lippman ME, Either SP, Chinnaiyan AM. Transcriptome analysis of HER2 reveals a molecular connection to fatty acid synthesis. *Cancer Research* 2003; 63 (1): 132 - 39.

Lee WS, Kim HY, Seok JY, Jang HH, Park YH, Kim SY, et al. Genomic profiling of patient-derived colon cancer xenograft models. *Medicine (Baltimore).* 2014 Dec;93(28): e 298.

Li H, Wheeler S, Park Y, Ju Z, Thomas SM, Fichera M, et al. Proteomic Characterization of Head and Neck Cancer Patient-Derived Xenografts. *Mol Cancer Res.* 2016 Mar;14(3): 278 - 86.

Li X, Pei D, Zheng H. Transitions between epithelial and mesenchymal states during cell fate conversions. *Protein Cell*. 2014;5(8): 580 - 91.

Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc*. 2007;2(2): 329 - 33.

Lu SL, Herrington H, Wang XJ. Mouse models for human head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck*. 2006 Oct; 28(10): 945 - 54.

Majchrzak E, Szybiak B, Wegner A, Pienkowski P, Pazdrowski J, Luczewski L, et al. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma in young adults: a review of the literature. *Radiol Oncol*. 2014 Jan 22;48(1): 1-10.

Meena AS, Sharma A, Kumari R, Mohammad N, Singh SV, Bhat MK. Inherent and acquired resistance to paclitaxel in hepatocellular carcinoma: molecular events involved. *PLoS One*. 2013 Apr 16;8(4): e61524.

Mendelsohn AH, Lai CK, Shintaku IP, Fishbein MC, Brugman K, Elashoff DA, et al. Sanil as novel marker for regional metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Otolaryngol*. 2012 Jan-Feb; 33(1): 6 -13.

Menendez JA, Oza BP, Atlas E, Verma VA, Mehmi I, Lupu R. Inhibition of tumor-associated fatty acid synthase activity antagonizes estradiol- and tamoxifen-induced agonist transactivation of estrogen receptor (ER) in human endometrial adenocarcinoma cells. *Oncogene*. 2004a Jun 17; 23 (28): 4945 - 58.

Menendez JA, Colomer R, Lupu R. Inhibition of tumor-associated fatty acid synthase activity enhances vinorelbine (Navelbine)-induced cytotoxicity and apoptotic cell death in human breast cancer cells. *Oncol Rep* 2004b; 12:411- 22.

Menendez JA, Lupu R, Colomer R. Inhibition of tumor-associated fatty acid synthase hyperactivity induces synergistic chemosensitization of HER -2/ neu - overexpressing human breast cancer cells to docetaxel (taxotere). *Breast Cancer Res Treat*. 2004c Mar; 84(2): 183 - 95.

Menendez JA, Vellon L, Colomer R, et al. Pharmacological and small interference RNA-mediated inhibition of breast cancer-associated fatty acid synthase (oncogenic

antigen-519) synergistically enhances Taxol (paclitaxel)-induced cytotoxicity. *Int J Cancer*. 2005 May 20;115(1):19 - 35.

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

Mognetti B, Di Carlo F, Berta GN. Animal models in oral cancer research. *Oral Oncol*. 2006 May;42(5): 448 - 60.

Moore SR, Johnson NW, Pierce AM, Wilson DF. The epidemiology of tongue cancer: a review of global incidence. *Oral Dis*. 2000 Mar; 6(2): 75 - 84.

Moreira FS. Estudo dos efeitos da terapia combinada orlistat / cisplatina / 5-fluorouracil / paclitaxel em linhagem metastática de carcinoma espinocelular de língua (Dissertação). Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, 2014.

Murata S, Yanagisawa K, Fukunaga K, Oda T, Kobayashi A, Sasaki R, et al. Fatty acid synthase inhibitor cerulenin suppresses liver metastasis of colon cancer in mice. *Cancer Sci*. 2010 Aug; 101 (8): 1861 - 65.

Natarajan J, Chadrashekar C, Radhakrishnan R. Critical biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in the head and neck cancers. *J Cancer Res Ther*. 2014 Jul-Sep; 10(3): 512 - 518.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia oral e maxilofacial*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009.

Nguyen LV, Vanner R, Dirks P, Eaves CJ. Cancer stem cells: an evolving concept. *Nat Rev Cancer*. 2012 Jan 12;12(2):133 - 43.

Nijkamp MM, Span PN, Hoogsteen IJ, van der Kogel AJ, Kaanders JH, Bussink J. Expression of E-cadherin and vimentin correlates with metastasis formation in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Radiother Oncol*. 2011 Jun;99(3): 344 - 48.

Noguti J, Moura CFG, Jesus GPP, Silva VHP, Hossaka TA, Oshima TA, et al. Metastasis from oral cancer. *Cancer Genomics and Proteomics*. 2012; 9: 329-36.

Opitz OG, Harada H, Suliman Y, Rhoades B, Sharpless NE, Kent R, et al. A mouse model of human oral-esophageal cancer. *J Clin Invest*. 2002 Sep;110(6): 761 - 69.

Peng S, Creighton CJ, Zhang Y, Sen B, Mazumdar T, Myers JN, et al. Tumor grafts derived from patients with head and neck squamous carcinoma authentically maintain the molecular and histologic characteristics of human cancers. *J Transl Med*. 2013 Aug 27;11:198.

Pizer ES, Jackisch C, Wood FD, Pasternack GR, Davidson NE, Kuhajda FP. Inhibition of fatty acid synthesis induces programmed cell death in human breast cancer cells. *Cancer Res*. 1996; 56(12): 2745 - 47.

Pizer ES, Chrest FJ, DiGiuseppe JA, Han WF. Pharmacological inhibitors of mammalian fatty acid synthase suppress DNA replication and induce apoptosis in tumor cell lines. *Cancer Res*. 1998; 58(20): 4611- 15.

Pizer ES, Thupari J, Han WF, Pinn ML, Chrest FJ, Frehywot GL, et al. Malonylcoenzyme-A is a potential mediator of cytotoxicity induced by fatty-acid synthase inhibition in human breast cancer cells and xenografts. *Cancer Res*. 2000 Jan 15; 60 (2): 213 - 18.

Pontes HA, Paiva HB, de Freitas Silva BS, Fonseca FP, da Silva FB, Pontes FS, et al. Oral candidiasis mimicking na oral squamous cell carcinoma: report of a case. *Gerodontology*. 2012; 29 (1): 70 - 74.

Pyo SW, Hashimoto M, Kim YS, Kim CH, Lee SH, Johnson KR, et al. Expression of E-cadherin, P-cadherin and N-cadherin in oral squamous cell carcinoma: correlation with the clinicopathologic features and patient outcome. *J Craniomaxillofac Surg*. 2007 Jan; 35 (1):1 - 9.

Raghow R, Yellaturu C, Deng X, Park EA, Elam MB. SREBPs: the crossroads of physiological and pathological lipid homeostasis. *Trends Endocrinol Metab*. 2008 Mar;19(2): 65 - 73.

Regezi JA, Sciubba JJ, Jordan RCK. *Patologia oral*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.

Rowinsky EK, Donehower RC. Paclitaxel (taxol). *N Engl J Med*. 1995 Apr 13;332(15):1004 - 14.

Rubio-Viqueira B, Hidalgo M. Direct in vivo xenograft tumor model for predicting chemotherapeutic drug response in cancer patients. *Clin Pharmacol Ther*. 2009 Feb;85(2): 217 - 21.

Ruggeri BA, Camp F, Miknyoczki S. Animal models of disease: pre-clinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery. *Biochem Pharmacol*. 2014 Jan 1;87(1): 150 - 61.

Rysman E, Brusselmans K, Scheys K, Timmermans L, Derua R, Munck S, et al. De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation. *Cancer Res*. 2010 Oct 5;70(20): 8117 - 26.

Sano D, Myers JN. Metastasis of squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Cancer Metastasis Rev*. 2007 Dec; 26 (3-4): 645 - 62.

Santos-Silva AR, Ribeiro AC, Soubhia AM, Miyahara GI, Carlos R, Speight PM, et al. High incidences of DNA ploidy abnormalities in tongue squamous cell carcinoma of young patients: an international collaborative study. *Histopathology* 2011; 58: 1127 - 35.

Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncol*. 2009 Apr-May; 45 (4-5): 301 - 8.

Scully C, Petti S. Overview of cancer for the healthcare team: aetiopathogenesis and early diagnosis. *Oral Oncol*. 2010 Jun; 46 (6): 402 - 6.

Seguin F, Carvalho MA, Bastos DC, Agostini M, Zecchin KG, Alvarez-Flores MP, et al. The fatty acid synthase inhibitor orlistat reduces experimental metastases and angiogenesis in B16-F10 melanomas. *Br J Cancer*. 2012 Sep 4; 107 (6): 977 - 87.

Seshadri M, Merzianu M, Tang H, Rigual NR, Sullivan M, Loree TR, et al. Establishment and characterization of patient tumor-derived head and neck squamous cell carcinoma xenografts. *Cancer Biol Ther*. 2009 Dec; 8 (23): 2275 - 83.

Shu CH, Yang WK, Shih YL, Kuo ML, Huang TS. Cell cycle G2/M arrest and activation of cyclin-dependent kinases associated with low-dose paclitaxel-induced sub-G1 apoptosis. *Apoptosis*. 1997;2(5): 463 - 70.

Shultz LD, Goodwin N, Ishikawa F, Hosur V, Lyons BL, Greiner DL. Human cancer growth and therapy in immunodeficient mouse models. *Cold Spring Harb Protoc*. 2014 Jul 1;2014(7): 694 - 708.

Silva SD, Agostini M, Nishimoto IN, Coletta RD, Alves FA; Lopes MA. Expression of fatty acid synthase, ErbB2 and Ki-67 in head and neck squamous cell carcinoma. A clinicopathological study. *Oral Oncology*. 2004; 40: 688 - 96.

Silva SD, Cunha IW, Rangel AL, Jorge J, Zecchin KG, Agostini M, et al. Differential expression of fatty acid synthase (FAS) and ErbB2 in nonmalignant and malignant oral keratinocytes. *Virchows Arch*. 2008a Jul; 453 (1): 57- 67.

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* 2008b; 14:376 - 82.

Sinevici N, O'sullivan J. Oral cancer: Deregulated molecular events and their use as biomarkers. *Oral Oncol*. 2016 Oct;61: 12 - 8.

Smith A, Teknos TN, Pan Q. Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*. 2013, 49: 287 - 292.

Smith S, Witkowski A, Joshi AK. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. *Review Progress in lipid Research*. 2003; 42: 289 - 317.

Supsavhad W, Dirksen WP, Martin CK, Rosol TJ. Animal models of head and neck squamous cell carcinoma. *Vet J*. 2016 Apr; 210: 7 - 16.

Tahara M, Minami H, Hasegawa Y, Tomita K, Watanabe A, Nibu K, et al. Weekly paclitaxel in patients with recurrent or metastatic head and neck cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011 Sep; 68(3): 769 - 76.

Takahashi N, Li W, Banerjee D, Guan Y, Wada-Takahashi Y, Brennan MF, et al. Sequence-dependent synergistic cytotoxicity of ecteinascidin-743 and paclitaxel in human breast cancer cell lines in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 2002 Dec 1; 62(23): 6909 - 15.

Tentler JJ, Tan AC, Weekes CD, Jimeno A, Leong S, Pitts TM, et al. Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nat Rev Clin Oncol.* 2012 Apr 17;9 (6): 338 - 50.

Uddin S, Hussain AR, Ahmed M, Abubaker J, Al-Sanea N, Abduljabbar A, et al. High prevalence of fatty acid synthase expression in colorectal cancers in Middle Eastern patients and its potential role as a therapeutic target. *Am J Gastroenterol.* 2009; 104(7):1790 - 801.

Uddin S, Jehan Z, Ahmed M, Alyan A, Al-Dayel F, Hussain A, et al. Overexpression of fatty acid synthase in Middle Eastern epithelial ovarian carcinoma activates AKT and its inhibition potentiates cisplatin-induced apoptosis. *Mol Med.* 2011;17(7-8): 635 - 45.

Uddin S, Siraj AK, Al-Rasheed M, Ahmed M, Bu R, Myers JN, Al-Nuaim A, Al-Sobhi S, Al-Dayel F, Bavi P, Hussain AR, Al-Kuraya KS. Fatty acid synthase and AKT pathway signaling in a subset of papillary thyroid cancers. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93(10): 4088 - 97.

Van Dijk BA, Brands MT, Geurts SM, Merks MA, Roodenburg JL. Trends in oral cavity cancer incidence, mortality, survival and treatment in the Netherlands. *Int J Cancer.* 2016 Aug 1;139(3): 574 - 83.

Vargas-Ferreira F, Nedel F, Etges A, Gomes AP, Furuse C, Tarquinio SB. Etiologic factors associated with oral squamous cell carcinoma in non-smokers and non-alcoholic drinkers: a brief approach. *Braz Dent J.* 2012; 23 (5): 586 - 90.

Wang HQ, Altomare DA, Skele KL, Poulidakos PI, Kuhajda FP, Di Cristofano A, Testa JR. Positive feedback regulation between AKT activation and fatty acid synthase expression in ovarian carcinoma cells. *Oncogene*. 2005; 24(22): 3574 - 82.

Warmoes M, Jaspers JE, Xu G, Sampadi BK, Pham TV, Knol JC, et al. Proteomics of genetically engineered mouse mammary tumors identifies fatty acid metabolism members as potential predictive markers for cisplatin resistance. *Mol Cell Proteomics*. 2013 May;12(5): 1319 - 34.

Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology*. 2009; 45: 309 - 16.

Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y. Cadherin switching. *J Cell Sci* 2008; 121:727 - 35.

Williams SA, Anderson WC, Santaguida MT, Dylla SJ. Patient-derived xenografts, the cancer stem cell paradigm, and cancer pathobiology in the 21st century. *Lab Invest*. 2013 Sep; 93 (9): 970 - 82.

Yang X, Uziely B, Groshen S, Lukas J, Israel V, Russell C, et al. MDR1 gene expression in primary and advanced breast cancer. *Lab Invest*. 1999 Mar; 79 (3): 271 - 80.

Yue QX, Liu X, Guo DA. Microtubule-binding natural products for cancer therapy. *Planta Med*. 2010 Aug;76(11):1037 - 43.

Zecchin KG, Rossato FA, Raposo HF, Melo DR, Alberici LC, Oliveira HC, et al. Inhibition of fatty acid synthase in melanoma cells activates the intrinsic pathway of apoptosis. *Lab Invest*. 2011 Feb; 91 (2): 232 - 40.

Zembruski NC, Stache V, Haefeli WE, Weiss J. 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. *Anal Biochem*. 2012 Oct 1;429(1): 79 - 81.

Zhao L, Wientjes MG, Au JL. Evaluation of combination chemotherapy: integration of nonlinear regression, curve shift, isobologram, and combination index analyses. *Clin Cancer Res*. 2004 Dec 1; 10 (23): 7994 - 8004.

Zhou W, Simpson PJ, McFadden JM, Townsend CA, Medghalchi SM, Vadlamudi A, *et al.* Fatty acid synthase inhibition triggers apoptosis during S phase in human cancer cells. *Cancer Res.* 2003 Nov 1;63(21): 7330 - 37.

Zoli W, Ulivi P, Tesei A, Fabbri F, Rosetti M, Maltoni R, *et al.* Addition of 5-fluorouracil to doxorubicin-paclitaxel sequence increases caspase-dependent apoptosis in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Research* 2005, 7:R681 - R689.

ANEXO 1



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Efeitos da associação do inibidor da ácido graxo sintase orlistat com agentes quimioterápicos: estudo "in vitro" e em modelos ortotópicos de carcinoma espinocelular de língua", CEP/FOP protocolo nº 141/2014, CAAE – 38523414.1.0000.5418, dos pesquisadores **EDGARD GRANER, MÁRCIO AJUDARTE LOPES, LUCIANA YAMAMOTO DE ALMEIDA** e **FERNANDA DOS SANTOS MOREIRA**, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 25/02/2015.

The Ethics Committee in Research of the Piracicaba Dental School, University of Campinas, certify that the project "The association of orlistat with chemotherapeutic agents for the treatment of oral squamous cell carcinoma: an "in vitro" and in vivo study in orthotopic models", register CEP/FOP number 141/2014, CAAE – 38523414.1.0000.5418, of **EDGARD GRANER, MÁRCIO AJUDARTE LOPES, LUCIANA YAMAMOTO DE ALMEIDA** and **FERNANDA DOS SANTOS MOREIRA**, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee on Feb 25, 2015.

Prof. Jacky Jorge Junior

Coordenador
 CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
 Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.

ANEXO 2



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Efência da associação do inibidor de ácido graxo sintase orlistat com agentes quimioterápicos: estudo "in vitro" e em modelos orotópicos de carcinoma epinocelular de língua", protocolo nº 4142-1, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Edgard Graner, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica ou ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais e do DECRETO Nº 6.095, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em 05 de fevereiro de 2016.

Vigência do projeto: 04/2016-12/2017

Espécie/Linhagem: Camundongo isogênico / BALB/c.Cg-Foxn1au/AnNTacUnib

No. de animais: 120

Idade/Peso: 08 semanas / 15g

Sexo: machos

Origem: CEUA/UNICAMP

Espécie/Linhagem: Camundongo isogênico / NOD.CB17-PrkdcscidJUnib

No. de animais: 40

Idade/Peso: 06 semanas / 15g

Sexo: machos

Origem: CEUA/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBIO.

Campinas, 05 de fevereiro de 2016.

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fabiana Alonso
Secretária Executiva