



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

FLORENCE JUANA MARIA CUADRA ZELAYA

**EFEITOS DO PACLITAXEL, CISPLATINA E INIBIDORES DA ENZIMA ÁCIDO
GRAXO SINTASE NA EXPRESSÃO DE MARCADORES ASSOCIADOS ÀS CÉLULAS-
TRONCO DO CÂNCER E ISOLAMENTO DE SUBPOPULAÇÕES EM LINHAGENS
CELULARES DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL**

Piracicaba

2019

FLORENCE JUANA MARIA CUADRA ZELAYA

**EFEITOS DO PACLITAXEL, CISPLATINA E INIBIDORES DA ENZIMA ÁCIDO
GRAXO SINTASE NA EXPRESSÃO DE MARCADORES ASSOCIADOS ÀS CÉLULAS-
TRONCO DO CÂNCER E ISOLAMENTO DE SUBPOPULAÇÕES EM LINHAGENS
CELULARES DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL**

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 PELA ALUNA FLORENCE JUANA
MARIA CUADRA ZELAYA, E ORIENTADA PELO
PROF. DR. EDGARD GRANER.

Piracicaba

2019

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

C891e Cuadra Zelaya, Florence Juana Maria, 1977-
Efeitos do paclitaxel, cisplatina e inibidores da enzima ácido graxo sintase na expressão de marcadores associados às células-tronco do câncer e isolamento de subpopulações em linhagens celulares de carcinoma de células escamosas oral / Florence Juana Maria Cuadra Zelaya. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Edgard Graner.

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

1. Células-tronco neoplásicas. 2. Citometria de fluxo. 3. Carcinoma de células escamosas oral. 4. Receptores de hialuronatos. 5. Molécula de adesão da célula epitelial. I. Graner, Edgard, 1968-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effects of paclitaxel, cysplatin and fatty acid synthase inhibitors on expression of markers associated with cancer stem cells and isolation of subpopulations in oral squamous cell carcinoma cell lines

Palavras-chave em inglês:

Neoplastic stem cells

Flow cytometry

Oral squamous cell carcinoma

Hyaluronan receptors

Epithelial cell adhesion molecule

Área de concentração: Patologia

Titulação: Doutora em Estomatopatologia

Banca examinadora:

Edgard Graner [Orientador]

Débora Campanella Bastos

Carine Ervolino de Oliveira

Luciana Yamamoto de Almeida

Mauricio da Rocha Dourado

Data de defesa: 27-11-2019

Programa de Pós-Graduação: Estomatopatologia

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-1827-3034>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3051121138437249>



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 27 de Novembro de 2019, considerou a candidata FLORENCE JUANA MARIA CUADRA ZELAYA aprovada.

PROF. DR. EDGARD GRANER

PROF^a. DR^a. CARINE ERVOLINO DE OLIVEIRA

PROF^a. DR^a. LUCIANA YAMAMOTO DE ALMEIDA

PROF^a. DR^a. DÉBORA CAMPANELLA BASTOS

PROF. DR. MAURICIO DA ROCHA DOURADO

A Ata da defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, a minha família, minha mãe, **Norma Zelaya de Cuadra**, a minhas irmãs, **Tania Ethel Cuadra Zelaya** e **Carmen Dinora Cuadra Zelaya** e à memória de meu pai, **Juan Agustín Cuadra**, pelos ensinamentos de vida, pela força e apoio transmitida para sair adiante das adversidades, e ao amor imensurável que vai além do tempo e a distância.

AGRADECIMENTOS

À **Facultad de Odontología de la Universidad de El Salvador (FOUES)**, e a todos os que formam parte dela, pela contribuição e confiança depositada em mim.

O presente trabalho foi realizado com apoio do **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pelo período do 04/2017 ao 07/2017 Processo 141536/2017-9, e da **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, processo nº 2014/20832-3.

À **Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (FOP-UNICAMP)**, na pessoa do seu diretor **Prof. Dr. Francisco Haiter Neto**.

À Coordenadoria de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba na pessoa da **Profa. Dra. Karina Gonzales Silvério Ruiz** e ao Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia na pessoa de seu coordenador **Prof. Dr. Márcio Ajudarte Lopes**.

Aos Profs. Drs. **Alan Roger dos Santos Silva, Edgard Graner, Jacks Jorge Júnior, Márcio Ajudarte Lopes, Oslei Paes de Almeida, Pablo Agustín Vargas, Ricardo Della Coletta**, por todas as oportunidades de participar em cada uma das atividades acadêmicas desenvolvidas pelo Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia.

Ao **Profs. Drs. Edgard Graner e Ricardo Della Colleta**, por demonstrar-me como um professor pode ensinar a fazer pesquisa, de duas formas tão diferentes e complementares no mesmo tempo, por deixar-me formar parte de seu grupo de pesquisa, ao qual me senti muito orgulhosa de pertencer, e de aprender com pessoas conhecedoras de seu trabalho. **Prof. Edgard**, por ensinar-me a analisar e interpretar resultados, a escrever de uma forma muito simple, pela paciência, deixando-me errar sabendo que isso é parte fundamental para minha evolução e pelas chamadas de atenção nos momentos devidos.

Ao **Laboratório de Citometria de Fluxo da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP/HC/FMRP/USP)**, em especial à pesquisadora técnica **Patricia Vianna Bonini Palma**, pelo apoio importante no desenvolvimento deste trabalho.

A **todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Piracicaba**, com especial menção a **Ana Paula Carone**, porque ela representa eficiência e compromisso, porque suas atividades, e a de **todos os que conformamos a comunidade universitária**, são vitais para o bom funcionamento e sucesso de uma das melhores faculdades de odontologia.

Aos amigos, que começaram sendo colegas de laboratório ou de programa, **Alicia, Andreia, Aninha, Carine, Celeste, Debora, Iara, Isadora, Leonardo, Luciana, Marisol, Mauricio, Paola, Rebeca e Renato**, pela troca de experiências, cumprimento das funções laboratoriais, momentos de descontração, gentilezas, colaborações e amizade, cada um de vocês me apoiaram em momentos tão importantes fora e dentro do laboratório, que permaneceram inesquecíveis na minha vida. Todos sendo tão diferentes, conseguimos sobrelevar essas diferenças, formar um equipo e trabalhar juntos. Muito obrigada.

Aos **colegas da pós-graduação do Programa de Estomatopatologia e de outros programas**, que estão e aos que foram embora nestes últimos cinco anos, pelo compartilhamento de conhecimentos e agradáveis momentos de convivência.

A **todos que estiveram e estarão no laboratório**, que sem o trabalho de todos, a continuidade não seria possível.

Aos **amigos sempre presentes mesmo na distância**, pela amizade, preocupação, torcida, por estar ali, nos meus acertos como nos meus erros.

Aos **amigos de uma geração diferente**, que me fazem sentir parte deles, apoiando-me sempre.

Aos **meus familiares** pelo afeto e carinho de sempre.

RESUMO

Recentes evidências indicam que as células tronco do câncer (CTC) tenham papel importante nas recorrências loco-regionais e metástases à distância de diversas neoplasias malignas, incluindo o carcinoma de células escamosas oral (CCEO). Uma característica importante das CTC consiste na resistência a agentes quimioterápicos, que pode contribuir para a permanência de células residuais após o tratamento. A enzima ácido graxo sintase (FASN) tem sido descrita como uma oncoproteína metabólica, tendo sua expressão aumentada em neoplasias malignas originárias de diferentes tecidos. Sua expressão está também aumentada no CCEO e estudos *in vivo* mostraram que sua inibição com orlistat (ORL) diminui o volume de tumores ortotópicos de língua e reduz o número de metástases cervicais. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a imunexpressão de marcadores de superfície associados a CTC (CD44, CD326, CD133 e CD271) nas linhagens celulares derivadas de CCEO SCC-9 ZsG e LN-1A tratadas com paclitaxel (PTX), cisplatina (CIS) e com os inibidores de FASN ORL e TVB-3166, bem como isolar suas subpopulações por meio da imunexpressão de CD44 e CD326. Para isto, as células foram tratadas com CIS, ORL e TVB-3166 em suas respectivas IC₅₀ e com PTX a 1 µM e 50 µM. Os estudos de citometria de fluxo revelaram os fenótipos CD44⁺/CD326⁺ e CD44⁻/CD326⁺ em ambas as linhagens tratadas ou não com as drogas estudadas. PTX diminuiu a expressão de CD44⁺ e a população CD44⁺/CD326⁺ e aumentou a população CD44⁻/CD326⁺ nas duas linhagens celulares. CIS aumentou a expressão de CD44 e CD326 nas células SCC-9 ZsG e LN-1A. De modo geral, ORL e TVB-3166 não modificaram significativamente os fenótipos celulares, a não ser pela diminuição da expressão de CD44 na população com baixa expressão desta proteína e da expressão de CD326 na linhagem LN-1A. Para o isolamento de subpopulações, células SCC-9 ZsG e LN-1A foram marcadas com anticorpos contra CD44 e CD326 e, por meio de citometria de fluxo, subpopulações identificadas, separadas e avaliadas quanto a morfologia e expressão de proteínas de transição epitélio-mesenquimal (TEM), por meio de western blotting. Foram isolados seis fenótipos a partir da linhagem SCC-9 ZsG, dos quais destacam-se CD44^{Low}/CD326⁺ e CD44⁻/CD326⁺, com características epiteliais e alta produção de e-caderina, e CD44⁺/CD326⁻ e CD44⁺/CD326^{Low}, com alta produção de slug, vimentina e n-caderina. A partir da linhagem LN-1A foram isolados 7 fenótipos, com destaque para CD44^{Low}/CD326⁺ e CD44⁻/CD326⁺, de aspecto epitelial e produtores de e-caderina e CD44⁺/CD326⁻ e CD44⁺/CD326^{Low}, com alta expressão de slug, vimentina e n-caderina. Células CD44^{High}/CD326⁻, com aspecto mesenquimal e alta produção

de vimentina, n-caderina e slug, foram isoladas somente da linhagem LN-1A. Estes resultados mostram que PTX e CIS modificam o padrão de expressão de CD44 e CD326 nas células SCC-9 ZsG e LN-1A e que subpopulações com maior expressão de CD44 e ausência ou baixa expressão de CD326 apresentam características mesenquimais associadas a TEM, enquanto células com maior expressão a CD326 e com ausência ou baixa expressão de CD44 têm características epiteliais.

Palavras Chave: Células tronco associadas ao câncer. Receptores de hialuronatos. Molécula de adesão da célula epitelial. Citometria de fluxo. Carcinoma de células escamosas oral.

ABSTRACT

Recent evidences indicate that cancer stem cells (CSC) have a central role in tumor recurrence and metastasis in several types of human malignancies, including oral squamous cell carcinoma (OSCC). An important feature of CSC is the resistance to chemotherapy, which may contribute the presence of residual cancer cells following the treatment. Fatty acid synthase (FASN) has been described as a metabolic oncoprotein overexpressed in malignancies derived from several tissues. Its expression is increased in OSCC and *in vivo* studies have shown that its inhibition with orlistat (ORL) decreases the volume of tongue orthotopic tumors as well as the number of cervical lymph node metastases. The aim of the present study is to evaluate the immunoexpression of CSC surface markers (CD44, CD326, CD133, and CD271) in the OSCC cell lines SCC-9 ZsG and LN-1A treated with paclitaxel (PTX), cisplatin (CIS), as well as the FASN inhibitors ORL and TVB-3166. Also, this study aims to isolate subpopulations according to the expression of CD44 and CD326 from the same cell lines. Cells were treated CIS, ORL and TVB-3166 in their respective IC₅₀ and with PTX at 1 μM and 50 μM. Flow cytometry experiments showed that CD44⁺/CD326⁻ and CD44⁻/CD326⁺ populations are present in both cell lines treated or not with the studied drugs. PTX decreases CD44⁺ expression and the size of CD44⁺/CD326⁺ population as well as increases CD44⁻/CD326⁺ population in both cell lines. In contrast, CIS increases the expression of CD44 and CD326 in SCC-9 ZsG and LN-1A cells. ORL and TVB-3166 did not significantly modified cell phenotypes except by a decrease of CD44 expression in cells with low expression of this marker and of CD326 in LN-1A cells. Cell sorting was performed after labeling of SCC-9 ZsG and LN-1A cells with antibodies against CD44 and CD326 and each phenotype had the morphology and production of epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers were evaluated. Six different phenotypes were isolated from SCC-9 ZsG cells, with emphasis to CD44^{Low}/CD326⁺ and CD44⁻/CD326⁺, with epithelial aspect and high producers of e-cadherin, and CD44⁺/CD326⁻ and CD44⁺/CD326^{Low} with high expression of slug, vimentin and n-cadherin. From LN-1A cells seven phenotypes were isolated, with emphasis to CD44^{Low}/CD326⁺ and CD44⁻/CD326⁺ with epithelial morphology and high e-cadherin production as well as CD44⁺/CD326⁻ and CD44⁺/CD326^{Low} with high expression of slug, vimentin and n-cadherin. A group of cells CD44^{High}/CD326⁻ with mesenchymal phenotype and high producers of vimentin, n-cadherin and slug was found in LN-1A cells only. Taken together our results show that PTX and CIS change CD44 e CD326 pattern of expression in SCC-9 ZsG and LN-1A cells and that subpopulations with high CD44 expression and absent or low CD326 expression have mesenchymal characteristics associated

with EMT whereas subpopulations with high CD326 expression and absent or low CD44 expression have epithelial characteristics.

Keywords: Cancer stem cells. Hyaluronan receptors. Epithelial Cell Adhesion Molecule. Flow cytometry. Oral squamous cell carcinoma

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AACR – *American Association for Cancer Reserch* - Associação Americana para Pesquisa do Câncer

ABC – *ATP-Binding Cassette* - Transportadores cassetes ligados a ATP

AKT - Proteína cinasa B ou também conhecida como PKB

ALDH - Aldeído desidrogenase

APC - *Allophycocyanin* - Aloficocianina

BSA- *Bovin Serum Albumin* - Albumina sérica bovina

CCE – Carcinoma de células escamosas

CCEO - Carcinoma de células escamosas oral

CD - Cluster de diferenciação

CDKN2A - *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A*

CIS - Cisplatina

CTC - Células tronco associada ao câncer

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

DMSO – Di-metilsulfóxido

EGFR- *Epidermal Growth Factor Receptor*- Receptor do fator de crescimento epidérmico

EPCAM - *Epithelial Cell Adhesion Molecule*- Molécula de adesão das células epiteliais

ERBB2 - Erythroblastosis oncogene B também conhecido como HER/2 "human epidermal growth factor receptor 2"

ESA - *Epithelial specific antigen* - Antígeno epitelial específico

FASN- *Fatty Acid Synthase* - ácido graxo sintase

FGFR1 - *Fibroblast Growth Factor Receptor 1* - Receptor 1 do fator de crescimento fibroblástico

HPV- *Human Papillomavirus* - Virus do papiloma humano

IMF- Intensidade media de fluorescência

IgG- Imunoglobulina G

kDa - Kilodaltons

LN - Linfonodo

MEC - Matriz extracelular

MMP-MT1- Metaloproteinases da matriz de membrana tipo 1

NGF - *Neural Growth Factor* - Fator de crescimento neural

ORL - Orlistat

PBS - *phosphate buffered saline* - Solução salina tamponada com fosfato

PE - *Phycoerythrin*- Ficoeritrina

PerCP - *Peridinin Chlorophyll* - Piridina de clorofila

PTEN - *Phosphatase and tensin homolog*

PTX - Paclitaxel

SCC - *Squamous Cell Carcinoma* - Carcinoma de células escamosas

STAT-3 - *Signal transducers and activators of transcription*

TEM- Transição epitélio mesemquima

TME- Transição mesemquima epitélio

Wnt - *Wingless-related integration site* - Local de integração relacionado com Wingless

ZsG - ZsGreen

μL - Microlitros

μM - Micromolar

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 17 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA | 19 |
| 2.1. Carcinomas de células escamosas oral (CCEO)..... | 19 |
| 2.2. Células-tronco associadas ao câncer (<i>Cancer Stem Cells</i> -CTC) | 22 |
| 2.2.1. Antígenos de superfície celular para a identificação de CTC..... | 24 |
| 2.2.2. CD44..... | 25 |
| 2.2.3. CD326 ou EpCAM..... | 27 |
| 2.2.4. CD133..... | 28 |
| 2.2.5. CD271..... | 29 |
| 2.2.6. Linhagem celular SCC-9 e marcadores de superfície para CTC..... | 30 |
| 2.3. Quimioterapia em CCEO..... | 31 |
| 2.3.1. Paclitaxel (PTX)..... | 31 |
| 2.3.2. Cisplatina (CIS)..... | 34 |
| 2.4. Ácido graxo sintase (<i>Fatty Acid Synthase</i> - FASN) | 36 |
| 2.4.1. Inibidores farmacológicos de FASN..... | 39 |
| 2.4.2. Orlistat (ORL) | 39 |
| 2.4.3. TVB – 3166..... | 40 |
| 3. PROPOSIÇÃO | 42 |
| 3.1. Proposição gerais..... | 42 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 43 |
| 4.1. Cultura celular..... | 43 |
| 4.2. Preparo das soluções ORL, TVB-3166, CIS e PTX..... | 44 |
| 4.3. Análise de viabilidade celular por MTT e cálculo do IC ₅₀ | 45 |
| 4.4. Imunofenotipagem nas linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A tratadas com ORL, | 45 |
| TVB-3166, CIS e PTX | |
| 4.4.1. Desenho experimental..... | 45 |
| 4.4.2. Imunofenotipagem..... | 48 |
| 4.5. <i>Cell sorting</i> das linhagens celulares SCC-9 ZsG e LN-1A com os marcadores CD44/CD326..... | 49 |
| 4.6. Experimentos de western blotting..... | 52 |
| 4.7. Análise dos resultados..... | 53 |
| 5. RESULTADOS | 54 |

| | |
|---|------------|
| 5.1. Efeito do PTX sobre a viabilidade das células SCC-9 ZsG e LN-1A..... | 54 |
| e cálculo do IC ₅₀ | |
| 5.2. Efeito de CIS sobre a viabilidade das células SCC-9 ZsG e LN-1A | 56 |
| e cálculo do IC ₅₀ | |
| 5.3. Imunofenotipagem das células SCC-9 ZsG e LN-1A tratadas com PTX, | 58 |
| CIS, TVB-3166 e ORL | |
| 5.3.1. Análise da imunexpressão de CD44 e CD326 após o tratamento com PTX..... | 58 |
| nas linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A | |
| 5.3.2. Análise da imunexpressão de CD44 e CD326 após o tratamento com CIS..... | 61 |
| nas linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A | |
| 5.3.3. Análise da imunexpressão de CD44 e CD326 após o tratamento com TVB-3166..... | 63 |
| nas linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A | |
| 5.3.4. Análise da imunexpressão de CD44 e CD326 após o tratamento com ORL..... | 65 |
| nas linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A | |
| 5.4. Fenotipos celulares isolados a partir da marcação para CD44 e CD326..... | 67 |
| nas linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A | |
| 5.4.1. Isolamento de subpopulações celulares a partir da linhagem SCC-9 ZsG..... | 67 |
| 5.4.2. Isolamento de subpopulações celulares a partir da linhagem LN-1A..... | 70 |
| 5.5. Produção de FASN e de proteínas associadas a TEM nos diferentes fenótipos..... | 72 |
| celulares isolados das linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A | |
| 5.5.1. Linhagem SCC-9 ZsG..... | 72 |
| 5.5.2. Linhagem LN-1A..... | 74 |
| 6. DISCUSSÃO | 76 |
| 7. CONCLUSÃO..... | 85 |
| REFERÊNCIAS..... | 86 |
| APÊNDICE 1. Imunexpressão de CD44 e CD133 nas linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A..... | 99 |
| expostas ao PTX | |
| APÊNDICE 2. Imunexpressão de CD44 e CD133 nas linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A..... | 100 |
| expostas a CIS | |
| APÊNDICE 3. Imunexpressão de CD44 e CD133 nas linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A..... | 101 |
| expostas ao inibidor de FASN TVB-3166 | |
| APÊNDICE 4. Imunexpressão de CD44 e CD133 nas linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A..... | 102 |
| expostas ao inibidor de FASN ORL | |

| | |
|--|-----|
| APÊNDICE 5. Imunoexpressão de CD44 e CD271 nas linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A.103 expostas a PTX | |
| APÊNDICE 6. Imunoexpressão de CD44 e CD271 nas linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A.104 expostas a CIS | |
| APÊNDICE 7. Imunoexpressão de CD44 e CD271 nas linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A.105 expostas ao inibidor de FASN TVB-3166 | |
| APÊNDICE 8. Imunoexpressão de CD44 e CD271 nas linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A.106 expostas ao inibidor de FASN ORL | |
| ANEXO 1. Verificação de originalidade e prevenção de plágio..... | 107 |

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas oral (CCEO) é considerado uma malignidade de prognóstico ruim, com uma taxa de sobrevida em 5 anos de 50% (Warnakulasuriya, 2009). O estadiamento clínico no momento diagnóstico do CCEO é um fator significativo no prognóstico e curso da doença. No Brasil, a maioria dos casos de CCEO são diagnosticados em estágios avançados, o que prejudica o tratamento e explica, pelo menos em parte, as altas taxas de mortalidade (Curado et al., 2016; INCA, 2017).

A modalidade de tratamento do CCEO é geralmente determinada pelo estágio da doença, com o tratamento cirúrgico permanecendo como base nos estágios iniciais. Para os pacientes com CCEO em estadiamento avançado, que apresentam metástases linfonodais ou disseminação extracapsular, recomenda-se radioterapia pós-operatória ou quimiorradioterapia (Pfister et al., 2014). No entanto, os efeitos colaterais e a resistência às drogas ainda representam um obstáculo na terapia contra o câncer. Neste contexto, diversos quimioterápicos, especialmente cisplatina e paclitaxel, estão relacionados a quimioressistência e, por isto, novas tecnologias e protocolos quimioterápicos estão sendo desenvolvidos para melhorar a resposta ao tratamento.

A enzima ácido graxo sintase (FASN) é responsável pela síntese de ácidos graxos saturados de cadeia longa e sua alta expressão em diversas neoplasias malignas tem sido correlacionada com agressividade tumoral, resistência a quimioterápicos e reduzida sobrevida de pacientes, o que a torna um potencial alvo terapêutico. Diversos inibidores de FASN foram desenvolvidos e seus efeitos avaliados em estudos pré-clínicos, os quais mostraram importante efeito antitumoral. No entanto, a maioria destes inibidores apresentam limitações farmacológicas, o que dificulta a sua utilização em ensaios clínicos (Flavin et al, 2010). Nosso grupo de pesquisa já demonstrou a eficácia do orlistat (ORL) em diferentes linhagens celulares e modelos animais de CCEO e melanoma, porém este composto apresenta baixa solubilidade e seletividade (Agostini et al., 2014; Bastos et al., 2017). Entretanto, uma nova geração de inibidores de FASN está em desenvolvimento e inclui a família TVB, como o TVB-3166, aparentemente mais potentes e seletivos. Vale ressaltar que o TVB-2640 está sendo testado em estudo clínico fase 2, apresentando boas propriedades farmacológicas e perfil de tolerabilidade favorável, com mínimos efeitos adversos e toxicidade (Menendez e Lupu, 2017).

A quimiorresistência é um grande problema no tratamento de pacientes com câncer, pois as células tornam-se resistentes às drogas utilizadas no tratamento, o que consequentemente limita sua eficiência á associada a tumores que se tornam mais agressivas e metastáticas.

Estudos têm descrito que a quimiorresistência é capaz de induzir a heterogeneidade tumoral, tanto de células normais como neoplásicas, , reduzindo os efeitos da terapia e contribuindo para a falha do tratamento e progressão da doença (Luqmani, 2005; Trédan et al., 2007).

A uma subpopulação de células malignas conhecidas como células-tronco do câncer (CTC) tem sido atribuída a responsabilidade pela quimiorresistência e recidiva do câncer, pois esta apresenta a capacidade de autorrenovação e diferenciação em linhagens heterogêneas de células malignas em resposta a agentes quimioterápicos. As CTC também são capazes de induzir a parada do ciclo celular, que por sua vez as tornam resistentes à quimioterapia e radioterapia. Embora a terapia do câncer afete a maior parte das células tumorais em proliferação, um subconjunto de CTC remanescentes pode sobreviver e provocar a recidiva devido a suas características de maior invasividade e quimiorresistência.

No presente estudo, investigamos a imunexpressão de marcadores de superfície de CTC nas linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A tratadas com PTX, CIS, ORL e TVB-3166, assim como realizamos o isolamento e caracterizamos diferentes fenótipos celulares de acordo com a imunexpressão de CD44 e CD326.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carcinoma de células escamosas oral (CCEO)

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estabelece que o CCEO é a principal malignidade da mucosa de revestimento da cavidade bucal e da língua móvel, representando mais do 90% dos tumores que acometem esta região (El-Naggar et al., 2017). A GLOBOCAN (Ferlay et al., 2018) reportou que para o ano 2018, foram estimados a nível mundial e sem distinção de sexo e idade, que o câncer de lábio e da cavidade bucal representaria uma incidência 354.864 novos casos e 177.384 mortes. No Brasil, especificamente o CCEO, segundo dados descritos da estimativa para 2018 da incidência de câncer no país (INCA, 2017), foram estimados 11.200 novos casos em homens e 3.500 em mulheres para cada ano do biênio 2018-2019, com um risco de 10,86 novos casos a cada 100 mil homens e de 3,28 novos casos para cada 100 mil mulheres. Estes números colocam o CCEO na quinta posição de todas as neoplasias para o sexo masculino e na décima segunda posição para o sexo feminino.

A transformação maligna das células epiteliais que revestem a cavidade bucal está associado principalmente ao consumo excessivo de tabaco (fumado ou mastigado), noz de betel e bebidas alcólicas (Muwonge et al., 2008; Cogliano et al., 2011; Chi et al., 2015). No entanto, a suscetibilidade a estes fatores de risco pode ser modificada por hábitos de higiene bucal e deficiências no consumo de frutas e vegetais frescos (Gupta et al., 2017). O CCEO no lábio e orofaringe estão associados a radiação solar e a infecções pelo vírus da família HPV (Papiloma Vírus Humano), respectivamente, além da imunossupressão, causada por transplantes ou pela síndrome da imunodeficiência adquirida, que também é considerada fator de risco para o CCEO (Cogliano et al., 2011; Chi et al., 2015; Gillison et al., 2015).

A maioria dos casos de CCEO ocorre em pacientes entre os 50-70 anos de idade concomitante a uso prolongado de tabaco e álcool (El-Naggar et al., 2017). No entanto, nos últimos anos, tem sido descrito em diversos estudos um aumento da doença em adultos jovens, com menos de 40-45 anos, sugerindo que fatores etiológicos genéticos ou virais podem diferir entre os pacientes jovens e mais velhos (Llewellyn et al., 2004; Zhang et al., 2017; dos Santos Costa et al., 2018). O CCEO pode afetar qualquer sítio anatômico da cavidade bucal, sendo a língua, o assoalho de boca e a gengiva as localizações mais frequentemente afetadas (Marocchio et al., 2010; Troeltzsch et al., 2014; El-Naggar et al., 2017)

Desordens bucais potencialmente malignos são condições que precedem o aparecimento de neoplasias invasivas e se apresentam de forma muito variada. Alguns deles são lesões

solitárias, enquanto outras, referidas como condições, são multifocais ou generalizadas na cavidade bucal. Na prática clínica, a leucoplasia é o desordem bucal potencialmente maligno mais comum (Warnakulasuriya, 2018). Assim como os desordens potencialmente malignos, a apresentação clínica do CCEO é muito variada, a qual pode variar de uma leucoplasia, eritroplasia ou lesão mista com as duas características, ou crescimentos nodulares com ulceração central e bordas elevadas (Bagan et al., 2010). A nível histopatológico, os CCEO são moderadamente ou bem diferenciados e caracterizados pela presença de ninhos, cordões ou ilhas de células com pontes intercelulares e núcleos arredondados, as quais podem apresentar pleomorfismo tanto nuclear como celular, que destroem a membrana basal e invadem o tecido conjuntivo subjacente, especialmente nos CCEO de língua.

O CCEO é uma neoplasia maligna localmente agressiva com propensão a metástases linfonodais precoces. Atualmente, os fatores prognósticos mais significativos são tamanho do tumor primário, presença de envolvimento linfonodal e de metástases a distância (El-Naggar et al., 2017). O CCE de língua em estágio precoce (T1-T2N0M0) apresenta maior índice de mortalidade do que CCEO no mesmo estágio, porém em outras localizações de cavidade bucal. Estudos prévios apontam que o CCE de língua apresenta natureza altamente agressiva, embora os fatores moleculares envolvidos neste processo ainda sejam desconhecidos (Rusthoven et al., 2008). Recentemente, vários trabalhos baseados em achados histopatológicos e clínicos tem sido desenvolvidos para auxiliar ao sistema TNM, avaliando aspectos como profundidade de invasão e *budding* tumoral ou densidade linfonodal, tendo-se em vista a identificação dos casos mais agressivos ou de pior prognóstico com o objetivo de realizar um plano de tratamento mais individualizado e melhor a sobrevida dos pacientes (Patel et al., 2013; Almangush et al., 2015).

Em relação ao estadiamento tumoral, Curado et al. (2016) mostraram que o diagnóstico do CCEO e do CCE de orofaringe é realizado na maioria dos casos em estádios mais avançados (51% e 62%, respectivamente), o que prejudica o tratamento, torna a cura improvável e explica as altas taxas de mortalidade e sobrevida em cinco anos em torno de 50% para o CCEO e de orofaringe (Warnakulasuriya, 2009). Este mesmo estudo mostrou que, nos últimos anos, as tendências de mortalidade, estão diminuindo cerca de 2,5% na América do Sul, embora em algumas regiões como no Brasil e no Peru ainda haja um aumento entre as mulheres.

O estadiamento do CCEO e sua localização são os principais parâmetros que determinam o seu tratamento. A recomendação para estádios iniciais é a cirurgia ou radioterapia (Pfister et al., 2014). Nos últimos anos, com avanços significativos nas técnicas reconstrutivas e subseqüentes melhorias nos resultados funcionais, a ressecção cirúrgica tornou-se a modalidade de tratamento preferencial para malignidades ressecáveis da cavidade oral (Namin

et al., 2016). No entanto, a maioria dos pacientes apresenta a doença em estádios avançados no momento do diagnóstico, quando a recomendação de rotina para o tratamento é o gerenciamento cirúrgico do tumor primário e das metástases regionais, seguido de pós-operatório com radioterapia e/ou quimiorradioterapia. O CCE de cabeça e pescoço irressecável locoregional avançado possui um prognóstico desfavorável e as opções de tratamento mais eficazes geralmente apresentam toxicidade elevada e morbidade significativa. A quimiorradioterapia simultânea a base de cisplatina continua sendo uma das opções mais suportadas para o gerenciamento da doença avançada ou para pacientes que não podem se submeter à cirurgia. As drogas mais utilizadas para os CCE de cabeça e pescoço, incluindo os CCEO, são os agentes platínicos (cisplatina e carboplatina), taxanos (PTX e docetaxel), drogas antimetabólicas (5-fluorouracil e metotrexato) e a terapia-alvo contra EGFR (cetuximab), de maneira isolada ou combinada (revisado por Pfister et al., 2014; Fulcher et al., 2018).

Do ponto de vista molecular, o desenvolvimento e a progressão do CCEO é complexo e resultado de múltiplas alterações cumulativas (genéticas e epigenéticas) em processos celulares críticos. Dentre elas pode-se destacar a mutação e superexpressão do p53 e hipermetilação de *human mutL homolog 1 (MLH1)* e *O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)*, ocasionando dano ao DNA. A superexpressão de EGFR, ciclina D1, STAT3, NF- κ B, diminuição na regulação de p27 e mutações em *EGFR*, *HRAS* e *PI3KCA*, além de hipermetilação dos genes que codificam o inibidor de quinase dependente de ciclina 2A (*p16*) e a proteína quinase associada à morte (*DAPK*), afetando o processo de proliferação celular. Além das alterações acima citadas, a regulação positiva de Bcl-2 induz a perda de regulação da apoptose, mutações em notch homólogo 1 (*NOTCH1*), associado à translocação e maior expressão de VEGF e COX-2 induzem a angiogênese. Por fim, o processo de invasão celular parece ser governado pela superexpressão de COX-2 e MMPs e pela hipermetilação e consequente regulação negativa do gene que codifica caderina 1 (*CDH1*), dentre outros genes (D'Souza e Saranath, 2017).

2.2 Células-tronco associadas ao câncer (*Cancer Stem Cells* - CTC)

Os tumores são heterogêneos devido a evolução clonal, diferenças microambientais e organização hierárquica, como resultado da diferenciação de células não tumorigênicas em células tumorigênicas (Shackleton et al., 2009; Meacham e Morrison, 2013). A literatura científica aceita hoje que as células que iniciam as neoplasias malignas são as chamadas células-tronco do câncer (CTC), definidas como uma subpopulação de células tumorais com capacidade de auto renovação e diferenciação, responsabilizadas pelos processos de iniciação, progressão, metástase e recorrência (Reya et al., 2001; Clarke et al., 2006; Jordan et al., 2006; Dalerba et al., 2007a). As primeiras evidências da existência das CTC foram fornecidas por Stevens (1959), que atribuiu a origem do teratoma a células-tronco. Na década dos 90, Lapidot et al. (1994) e Bonnet e Dick, (1997) aplicaram marcadores específicos para células-tronco para purificar uma população iniciadora de tumor na leucemia mielóide aguda. Atualmente, a presença de CTC também tem sido claramente demonstrada em diversos tumores sólidos (revisado em Visvader e Lindeman, 2008).

As CTC apresentam várias propriedades peculiares, como a de autorrenovação, que permite sua renovação indefinida em estado indiferenciado e a de divisão assimétrica, responsável por dar origem a células filhas diferenciadas que compõem a maior parte do tumor e que possuem potencial proliferativo limitado (células do “*bulk*” tumoral). Tais propriedades tem reflexo importante para a terapia do câncer, pois a contribuição das células filhas para o sustento a longo prazo do tumor parece ser insignificante (Clevers, 2011). De modo geral, apenas as CTC são capazes de iniciar tumores, uma vez que são as únicas com capacidade de autorrenovação e replicação ilimitada (Tirino et al., 2013). Além disto, as CTC são resistentes a danos eletromagnéticos e químicos, principalmente devido a sua baixa frequência de replicação, maior ativação de mecanismos de reparo do DNA (resultando em uma menor taxa apoptótica), sistema de efluxo de drogas ativas e aumento das defesas contra espécies reativas de oxigênio (Lou e Dean, 2007; Chen et al., 2013; Kaiser, 2015; Skvortsov et al., 2015; Lee et al., 2017).

O modelo de CTC, também conhecido como modelo hierárquico, propõe que os tumores estão organizados de tal forma que as CTC estão situadas no ápice da hierarquia (Bonnet e Dick, 1997) e são responsáveis pela manutenção das células em um tumor (Ito et al., 2012). Anteriormente, assumia-se que cada uma das células dentro de um tumor podia obter propriedades tumorigênicas, por meio do acúmulo progressivo de mutações vantajosas, ou seja, os tumores eram iniciados e se desenvolviam de forma estocástica ou clonal (Nowell, 1976). O modelo hierárquico tem recebido ampla aceitação pois fornece uma explicação para a

resistência terapêutica, tanto à radiação como à quimioterapia, assim como para as recidivas. Sugere-se que os dois modelos (hierárquico e estocástico) devem ser combinados para descrever o desenvolvimento tumoral, pelo fato das próprias CTC sofrerem evolução clonal devido ao estresse, como por exemplo, falta de nutrientes, hipóxia, pressão terapêutica, dentre outros (Kreso e Dick, 2014). Como resultado, segundo estes mesmos autores, diferentes populações de CTC podem coexistir em no mesmo tumor e sua competição alimentar a progressão tumoral e a resistência à terapia. Um estudo desenvolvido por Wang et al. (2014), mostrou que as células malignas dentro de um tumor (não CTC) podem obter propriedades de células-tronco e transitar de não CTC para CTC "induzidas". Esta plasticidade celular experimentalmente observada pode ser a explicação para a heterogeneidade do tumor, sendo este um fator que impede a resposta adequada à terapia. Embora a existência de CTC tenha sido bem estabelecida para neoplasias malignas específicas, este modelo não parece ser responsável pela heterogeneidade de todos os tumores (Shackleton et al., 2009; Meacham e Morrison, 2013). Vários estudos de glioblastoma (Wang et al., 2008a; Chen et al., 2010; Brescia et al., 2013; Brown et al., 2017) mostraram que as células positivas para marcadores de CTC podem ser derivadas da fração negativa e recuperar a heterogeneidade inicial, apoiando forte plasticidade tumoral na recriação de heterogeneidade fenotípica intra-tumoral. Isto sugere que o microambiente participa como parte importante na plasticidade e da conformação do fenótipo em direção à heterogeneidade tanto espacial como temporal (Cabrera et al., 2015; Enderling, 2015; Gupta et al., 2019). Dirkse et al. (2019) demonstraram, que a heterogeneidade fenotípica decorre de transições de estado reversíveis não hierárquicas, instruídas pelo microambiente e previsíveis por modelagem matemática. Embora as propriedades funcionais das células-tronco sejam semelhantes *in vitro*, a reconstituição acelerada da heterogeneidade fornece uma vantagem de crescimento *in vivo*, sugerindo que o potencial tumorigênico está ligado à plasticidade intrínseca ao invés da multipotência das CTC.

Os métodos utilizados para a análise de células-tronco adultas, incluindo a formação de esferoides, ensaio de expressão de antígenos de superfície celular, ensaio de iniciação tumoral *in vivo* (juntamente com o ensaio de diluição limitada), assim como a atividade da enzima aldeído desidrogenase (ALDH1) são empregados para avaliação das CTC. Destes, o ensaio de iniciação tumoral, que envolve xenotransplante de células tumorais em camundongos imunodeficientes (com base em marcadores específicos da superfície celular) é considerado o “padrão ouro” para definir CTC (O’Brien et al., 2007; Quintana et al., 2008).

2.2.1 Antígenos de superfície celular para a identificação de CTC

A expressão de antígenos de superfície vem sendo realizada em espécimes oriundas de pacientes e em linhagens celulares de neoplasias malignas hematopoiéticas, como o mieloma múltiplo (Huff et al., 2008), ou sólidas, como câncer de mama, cérebro, colorretal, pancreático (revisado por Visvader e Lindeman, 2008). Nos últimos anos, tem se dado maior ênfase no campo da CTC para o uso de amostras provenientes de tumores ou xenoinxertos de passagem precoce ao invés das células tumorais cultivadas (Al-Hajj et al., 2003; Dalerba et al., 2007b; Prince et al., 2007). As linhagens celulares que foram propagadas em condições de cultura *in vitro* a longo prazo sofrem pressões de seleção e/ou dominância clonal que produzem populações celulares relativamente homogêneas (Hughes et al., 2007; Fredebohm et al., 2012). Dada essa homogeneidade, linhas celulares estabelecidas não são representativas de tumores em pacientes, mas ainda estão sendo usadas em estudos de CTC que raramente conseguem recapitular a heterogeneidade celular e a hierarquia tumoral de tumores humanos (Yeung et al., 2010; Wang et al., 2015).

Para identificar as CTC, populações celulares são incubadas com anticorpos conjugados a fluoróforos, individualmente ou geralmente em combinações duplas ou triplas, contra antígenos associados às CTC e análise por meio de citometria de fluxo. Entre os marcadores mais utilizados estão CD133, CD44, CD24, CD90, CD117, CD34 e CD20, dentre outros (Routray e Mohanty, 2014), que já foram utilizados em trabalhos com câncer de mama, cérebro, próstata, pulmão, colón, pâncreas, fígado e melanoma (Al-Hajj et al., 2003; Singh et al., 2004; Miki et al., 2007; MacDonagh et al., 2016; Parmiani, 2016). Os marcadores mais comumente utilizados para a identificação e isolamento de CTC em neoplasias malignas sólidas, especificamente de origem epitelial, são moléculas de adesão celular, envolvidas nas interações célula-célula ou célula-matriz, assim como dos processos de migração, diferenciação, sinalização celular e transcrição gênica (revisado por Goodison et al., 1999). Em CCE de cabeça e pescoço, CD44 é um dos marcadores mais comumente utilizados para a localização e enriquecimento de populações celulares com CTC, embora outras proteínas também sejam empregadas para esta finalidade, incluindo as proteínas de superfície CD133, CD98, CD166, CD10, CD271, integrinas e c-met (Peitzsch et al., 2019). A especificidade do enriquecimento de CTC com antígenos de superfície pode ser aprimorada usando-se dois ou mais destes ao mesmo tempo. Em CCE de cabeça e pescoço, células duplamente positivas apresentam maior tumorigenicidade *in vivo* e resistência ao tratamento do que células positivas para apenas um marcador (Han et al., 2014; Keysar et al., 2017; Wang et al., 2017).

2.2.2 CD44

CD44 é uma glicoproteína transmembrana envolvida na adesão celular e codificada por um gene mapeado no *locus* cromossômico 11p13 (Goodfellow et al., 1982). CD44 interage com proteínas da matriz extracelular (MEC), tendo como seu principal ligante o hialuronato, um polissacarídeo extracelular abundantemente encontrado na MEC de mamíferos. Além deste, há outros ligantes de CD44, como osteopontina, serglicina, colágenos tipo I e IV, fibronectina e laminina. O gene que codifica o CD44 é composto por dois grupos de éxons, o primeiro que compreende os éxons 1 a 5 e 16 a 20 e formam um transcrito que codifica a forma *standard* ubiquamente expressa de CD44, e o segundo, que compreende os éxons variáveis 6 a 15 (também conhecidos como v1-10), que podem ser alternativamente expressos e incluídos dentro dos éxons *standard* em um sítio de inserção localizado entre os éxons 5 e 16. Moléculas que contêm os éxons variáveis são designadas CD44v e, em teoria, o *splicing* alternativo permite a geração de mais de 1000 diferentes variantes de CD44 (Screaton et al., 1992). As isoformas variáveis de CD44 possuem os mesmos domínios intracelulares e transmembrânicos, variando apenas a estrutura do domínio extracelular, que por fim determina as suas diferentes funções. A proteína CD44 codificada pelos éxons invariáveis é denominada de CD44 *standard* (ou CD44), sendo mais abundante quando comparada a outras formas variáveis desta proteína. CD44 contém 363 aminoácidos, com massa molecular aproximada de 37 kDa e três regiões distintas, uma de 72 aminoácidos correspondente ao domínio intracitoplasmático C-terminal, um domínio transmembrânico de 21 aminoácidos e um domínio extracelular de 270 aminoácidos (Goodison et al., 1999).

A identificação das CTC por meio de CD44, isoladamente ou em conjunto com outros marcadores, tem sido amplamente utilizada em cânceres de mama, próstata, cólon e pâncreas, assim como o CCEO (Al-Hajj et al., 2003; Collins et al., 2005; Dalerba et al., 2007b; Li et al., 2007; Prince et al., 2007). O câncer de mama foi a primeira neoplasia sólida na qual foram identificadas e isoladas CTC por meio dos marcadores CD44 e CD24, sendo a população $CD44^+/CD24^-$ de alta tumorigenicidade (Al-Hajj et al., 2003). No CCE de cabeça e pescoço, foi realizada também a identificação de CTC com base na expressão de CD44 (Prince et al., 2007). No entanto, Mack e Gires (2008) demonstraram por imuno-histoquímica que, tanto a mucosa oral normal quanto lesões pré-malignas e malignas da boca são positivas para CD44 e CD44v6. Estes mesmos autores sugeriram a expressão destes marcadores não é capaz de distinguir células epiteliais benignas e malignas em cavidade bucal.

Biddle et al. (2013) demonstraram que as CTC com fenótipo epitelial expressam predominantemente as formas variáveis de CD44 e que as CTC que sofreram transição epitélio-

mesenquimal (TEM) diminuem a expressão das isoformas variáveis e aumentam a da forma *standard* de CD44. De forma similar, Brown et al. (2011) mostraram que a expressão de CD44 é aumentada em tumores de mama de alto grau, o que correlacionou-se com o aumento de n-caderina e sugere que CD44 *standard* contribui para a progressão da TEM. No trabalho realizado por Ghuwalewala et al. (2016), com diferentes linhagens celulares derivadas de CCEO, células CD44^{high}CD24^{low} apresentaram maior expressão de proteínas associadas a TEM, assim como revelaram maior capacidade de invasão e migração.

A elevada expressão de CD44 na região central do tumor e nas metástases linfonodais representa um fator prognóstico independente para a sobrevida global desfavorável em pacientes com CCEO avançado. Neste estudo, os autores mostraram que a média de sobrevida global dos pacientes com tumores CD44^{low} foi de 45,3 meses enquanto os pacientes com lesões CD44^{High} tiveram apenas 18,6 meses de sobrevida global (Boxberg et al., 2018). Em pacientes com CCE de cabeça e pescoço, CD44 foi proposto como um biomarcador de valor prognóstico, em particular nos carcinomas hipofaríngeos e laríngeos, que mostraram prognóstico desfavorável com a alta expressão de CD44, o que não foi confirmado em CCEO (Kokko et al., 2011; Trapasso e Allegra, 2012; Chen et al., 2014). Boxberg et al. (2018) sugeriram que os resultados conflitantes podem ser consequência de variações no número de pacientes analisados e refletir a importância da localização imuno-histoquímica de CD44 no tecido tumoral, pois a expressão do CD44 no centro do tumor tem valor prognóstico, enquanto no fronte invasivo isto não ocorre.

Por fim, Ma et al. (2018) demonstraram que a alta expressão de caderina 6 (*CDH 6*), caderina11 (*CDH 11*) e CD44 em células de CCEO foi significativamente associada a uma maior propensão a desenvolver metástases linfonodais e maior agressividade tumoral e menor taxa de sobrevida livre de doença. Estes autores também encontraram uma associação positiva entre a expressão das proteínas CD44, caderina 6 e caderina 11 em pacientes com CCEO, sugerindo que a combinação destes marcadores pode melhorar a precisão da avaliação prognóstica.

2.2.3 CD326 ou EpCAM

CD326 ou molécula de adesão da célula epitelial (EpCAM) é uma glicoproteína da superfície celular de aproximadamente 40 kDa, sendo também conhecida como 17-1A, HEA125, MK-1, GA733-2, EGP-2, EGP34, KSA, TROP-1, ESA e KS1/4, dentre outras denominações. Isto pelo fato da proteína ter sido descoberta em vários laboratórios de forma independente como um antígeno associado a vários tipos tumores altamente imunogênicos, como o câncer de mama, pulmão, pele, estômago, dentre outros. A cada descoberta, o antígeno recebeu o nome do respectivo anticorpo monoclonal que o reconhecia. Por fim, após a clonagem do gene *EPCAM* e análises de homologia, foi reconhecido de que tratava-se da mesma molécula (revisado por Schnell et al., 2013).

CD326 é uma proteína de membrana tipo I com 314 aminoácidos, dos quais apenas 26 estão voltados para o citoplasma e, o domínio extracelular, contém dois domínios do tipo fator de crescimento epidérmico (EGF) (revisado por Baeuerle e Gires, 2007). Segundo os mesmos autores, a segunda repetição do domínio tipo EGF é de fato um domínio de repetição de tireoglobulina (TY), cuja função biológica é inibir as catepsinas, uma família de cisteína proteases frequentemente produzidas por células tumorais e envolvidas no processo metastático. Em tecidos normais, altos níveis de CD326 associam-se com proliferação durante a morfogênese (Cirulli et al., 1998), regeneração tecidual (de Boer et al., 1999; Trzpis et al., 2007) e manutenção de células tronco (Sundberg et al., 2009).

Biddle et al. (2011) identificaram duas subpopulações distintas de CTC em CCEO, a $CD44^+/CD326^{High}$, que é epitelial e proliferativa, e a $CD44^{High}CD326^{Low/-}$, que sofre TEM, é migratória e metastática. Subpopulações de CTC equivalentes também já foram identificadas no câncer da mama (Sarrio et al., 2012; Liu et al., 2014). Relata-se a existência de uma hierarquia de plasticidade dentro da subpopulação de CTC que sofrem TEM, de forma que apenas um subconjunto dela pode passar pela TEM e readquirir posteriormente o fenótipo epitelial (Biddle et al., 2011).

A elevada expressão de CD326 parece favorecer a progressão de tumores de natureza epitelial e estar associada ao pobre prognóstico para o paciente. Em câncer de próstata, altos níveis deste marcador estão associados com incidência de metástases, quimio e radioresistência pela via de PI3K/Akt/mTOR (Ni et al., 2013). De modo similar, Wang et al. (2013), por meio de imuno-histoquímica e correlação de dados clinico-patológicos de 601 casos de câncer gástrico, demonstraram que, a alta expressão de CD326 correlacionaram-se com idade, localização e tamanho dos tumores, profundidade de invasão, invasão linfática e metástases distantes, estadiamento patológico dos linfonodos regionais, estadiamento TNM e prognóstico.

A taxa cumulativa de sobrevida em 5 anos dos pacientes com alta expressão de EpCAM foi significativamente menor do que nos pacientes com baixa expressão, demonstrando que a expressão desta proteína no câncer gástrico está significativamente associada a metástases linfonodais e à distância e pior prognóstico.

Estudo desenvolvido por Sen e Carnelio (2016) avaliou 60 casos de CCEO e o perfil de expressão do CD326 foi correlacionado com parâmetros clínico-patológicos, como sexo, hábitos, tamanho do tumor, local, linfonodo regional, metástases à distância, estadiamento clínico, grau histológico, recorrência local e sobrevida do paciente. Cinquenta e um casos demonstraram expressão positiva e, destes, 11 apresentaram positividade muito alta para este marcador. A maior expressão de CD326 foi associada significativamente ao tamanho do tumor primário, grau histológico, recorrência local do tumor e sobrevida do paciente, sugerindo EpCAM como potencial biomarcador de prognóstico que poderia ser usado para identificar pacientes com alto risco e prever o prognóstico do paciente.

2.2.4 CD133

CD133 humano (também conhecido como AC133 ou prominina-1) é uma proteína de 865 aminoácidos, codificada pelo gene *PROM1*, localizado no cromossomo 4p15. Esta proteína contém cinco domínios transmembrânicos e dois grandes domínios extracelulares que podem ser glicosilados. CD133 possui massa molecular de 97 kDa que, quando glicosilada, apresenta massa molecular de 120 kDa (Miraglia et al., 1997a; Weigmann et al., 1997; Wu e Wu, 2009). CD133 está localizada em protuberâncias de membrana citoplasmática de vários tipos de células e, nas células epiteliais, é concentrada em microvilosidades. Esta proteína é considerada como marcador para células-tronco em diversos tecidos e também usada para identificar CTC de tumores hepáticos, pulmonares e melanoma (Wu e Wu, 2009). Ele foi inicialmente identificada como marcador de superfície para células tronco hematopoiéticas CD34⁺ (Miraglia et al., 1997b), assim como para células-tronco nervosas, de próstata e de rins (revisado por Wu & Wu 2009). Atualmente, este marcador tem sido utilizado na identificação de CTC em neoplasias malignas de cólon (Ricci-Vitiani et al., 2007), cérebro (Fan et al., 2010) e cabeça e pescoço (Zhou et al., 2007). As células CD133 positivas isoladas de tumores de cabeça e pescoço possuem uma considerável capacidade de autorrenovação, proliferação e diferenciação *in vitro* (Zhou et al., 2007). Chiou et al. (2008) foram os primeiros pesquisadores a avaliar CD133 como marcador de superfície em linhagens de CCEO, demonstrando que a expressão

deste marcador encontra-se aumentada em cerca de 60% daquelas células submetidas a ensaios de formação de esferóides ou culturas primárias de CCEO em meio de cultura livre de soro.

Felthaus et al. (2011) estudaram os níveis de expressão de CD133 por PCR e citometria de fluxo em linhagens celulares de CCEO com diversos graus de diferenciação (PCI-4A, PCI-8, PCI-9A e PCI-13). Apesar dos níveis de expressão gênica do CD133 terem sido relativamente altos em todas as linhagens, apenas a linhagem pobremente diferenciada PCI-13 foi positiva para CD133 em citometria de fluxo. As mesmas linhagens foram submetidas a ensaios de formação de esferas, porém apenas a linhagem PCI-13 foi capaz de formar as estruturas na ausência de FBS, indicando que esta linhagem pode possuir CTC. No mesmo trabalho, foi demonstrado também, através imuno-histoquímica em biópsias de CCEO com diferentes graus de diferenciação histológica e biópsias de tecido epitelial bucal normal, que as células CD133 positivas, de ambos tecidos possuem pouca ou nenhuma expressão de Ki-67, indicando o menor índice proliferativo característico das CTC segundo o modelo hierárquico. Zhang et al. (2010), demonstraram que as células CD133⁺ derivadas de linhagens celulares de CCEO possuem maior clonogenicidade, poder de invasão e potencial de tumorigênese *in vivo*, em comparação com as CD133⁻. Estes autores demonstraram também que as CTC CD133⁺ são fortemente resistentes ao tratamento com paclitaxel, tanto *in vivo* como *in vitro*, sugerindo que esta subpopulação pode contribuir para a quimioresistência em CCEO.

2.2.5. CD271

O CD271, também conhecido como receptor do fator de crescimento neural de baixa afinidade (NGF), é um receptor para neurotrofina, membro 16 da superfamília do receptor do fator de necrose tumoral. No sistema nervoso, tem funções críticas na sobrevivência celular, diferenciação e migração de células nervosas. Recentemente, esta molécula foi identificada como um marcador de CTC em melanoma humano (Boiko et al., 2010; Civenni et al., 2011), carcinoma esofágico (Huang et al., 2009) e carcinoma da hipofaringe (Imai et al., 2013). CD271 é expresso tanto por células do epitélio bucal normal como neurônios (Thompson et al., 1989; Nakamura et al., 2007), além de displasias epiteliais bucais e CCEO (Thompson et al., 1989; Nakamura et al., 2007; Kiyosue et al., 2013). É importante ressaltar que a expressão aumentada de CD271 está associada com pior evolução clínica em carcinomas de esôfago, de hipofaringe e CCEO (revisado por Murillo-Sauca et al. 2014). As células do CCEO que expressam CD271 formam um subconjunto de células CD44⁺ (CD44⁺/CD271⁺) que possui maior capacidade de iniciar tumores (Murillo-Sauca et al. 2014). Subpopulações com alta ou baixa expressão de

CD271 foram isoladas a partir linhagem celular CalH3, derivada de CCEO e comparadas quanto a formação de colônias, esferóides e capacidade de formação de tumores *in vivo* (Osman et al. 2015). Neste trabalho, todos os ensaios evidenciaram que as células CD271^{high} apresentam mais propriedades de CTC do que as células CD271^{low}.

2.2.6 Linhagem celular SCC-9 e marcadores de superfície para CTC

SCC-9 (ATCC® CRL-1629™) é uma linhagem celular de CCE de língua obtida de um paciente masculino de 25 anos que é amplamente utilizada em pesquisas *in vitro* e estudos em modelos animais. Sobre CTC nesta linhagem, dois estudos foram desenvolvidos por Zhu et al. (2012) e Yang et al. (2013). O primeiro demonstrou que células SCC-9-S (que superexpressam snail) exibiram alta expressão de CD44 e baixa de CD133. A expressão forçada de snail nas células SCC-9-S provocou também um fenótipo fibroblástico, com diminuição da expressão de marcadores epiteliais como e-caderina e b-catenina e aumento de vimentina, em comparação com as células controle. Além disto, resultou em menor proliferação celular e maiores taxas de formação de colônias, sugerindo indução de TEM e fenótipo de CTC. Resultados similares foram encontrados por Yang et al. em 2013, observando que a superexpressão de MMP-MT1 (proteínase da superfície celular) na linhagem SCC-9 induz a diminuição da expressão de marcadores epiteliais (e-caderina, citoqueratina 18 e β -catenina), aumenta a expressão de marcadores mesenquimais (vimentina e fibronectina) e modifica o fenótipo para fibroblástico. Ao mesmo tempo, as células SCC-9 que superexpressam MMP-MT1 foram as mais positivas para CD44. Tais resultados indicam que MMP-MT1 e snail estão associados a maior expressão de CD44 e indução de TEM nas células SCC-9.

Andrade et al (2017) demonstraram, em modelo ortotópico de CCEO, que as células SCC9 CD44^{high} têm maior capacidade de formar tumores que as células SCC9 CD44^{low}, mesmo quando um número significativamente menor de células SCC9 CD44^{high} é transplantado. A avaliação imuno-histoquímica dos tumores derivados das células SCC9 CD44^{High} mostrou alta expressão de β -catenina, e-caderina e CD44 e expressão baixa (ou não expressão) de Nanog, Bmi-1, snail e slug. Nosso grupo de pesquisa, no trabalho de Cuadra Zelaya (2016, dados ainda não publicados), observou que as linhagens celulares SCC-9 ZsG e LN-1A são altamente positivas para os marcadores de superfície associados a CTC CD44, CD44v6, CD326, CD133 e CD271 e negativas para CD24 e CD44v3, apresentando múltiplas subpopulações celulares derivadas da combinação de diferentes marcadores. Os dados da literatura sobre os marcadores de superfície para identificação de CTC na linhagem SCC-9 ainda são escassos, sendo

fundamental a utilização de múltiplos marcadores em experimentos com condições adequadas de cultura para que populações corretas sejam identificadas.

2.3 Quimioterapia em CCEO

Como descrito anteriormente neste capítulo, mais de 50% dos pacientes diagnosticados com CCEO encontram-se em estágio avançado, com linfonodos regionais envolvidos e alto risco de recorrência local, sendo tratados com cirurgia seguida de radioterapia e/ou quimioterapia. Dependendo do tipo de regime terapêutico, os quimioterápicos podem trazer importantes benefícios aos pacientes, ajudando no controle local da doença e reduzindo as taxas de metástases para sítios distantes. Uma característica importante das CTC é a resistência aos quimioterápicos, que contribui para a permanência de células tumorais residuais após os tratamentos (Chiodi et al., 2011), deste modo, novas terapias que contornem este problema devem ser desenvolvidas e associadas às drogas convencionais.

2.3.1 Paclitaxel (PTX)

Microtúbulos, componentes chave do citoesqueleto, são polímeros proteicos longos, filamentosos e em forma de tubos, essenciais em todas as células eucarióticas. Estas estruturas são cruciais para o desenvolvimento e manutenção do formato celular, transporte de vesículas, mitocôndrias e outros componentes, sinalização e divisão celular. Os microtúbulos são formados pela associação de heterodímeros de α -tubulina e β -tubulina (com $4 \times 5 \times 8$ nm e 100 kDa) dispostos na forma de tubos filamentosos que podem ter muitos micrômetros de comprimento, sendo os principais constituintes dos fusos mitóticos e alvo importante para as drogas anticâncer (Jordan e Wilson, 2004).

O paclitaxel, membro da família dos taxanos, é um alcalóide natural originalmente isolado da árvore *Taxus brevifolia* (figura 1). A atividade antitumoral do paclitaxel foi descoberta na década de 1970 e aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1992 para o tratamento de câncer de ovário, em 1994 para o tratamento do câncer de mama e em 1999 para o câncer de pulmão de grandes células. Além disto, tem sido utilizado e mostrado eficácia em cânceres do trato gastrointestinal, endometrial, cervical, de próstata, cabeça e pescoço, assim como sarcomas, linfomas e leucemias (revisado por Weaver e Bement, 2014).

Schiff et al. (1979) demonstraram que microtúbulos polimerizados na presença de PTX são protegidos da desmontagem, normalmente induzida por tratamento com frio ou cálcio, evitando a mitose em vários tipos de células, tanto em modelos animais quanto em cultura de células (Schiff e Horwitz, 1980; Milas et al., 1995; Orth et al., 2008). A parada mitótica induzida

pelo PTX ocorre devido à ativação do ponto de verificação mitótico, o principal mecanismo de controle do ciclo celular que atua durante a mitose, para impedir a desregulação cromossômica. Os cinetócoros não acoplados, que não estabeleceram conexões estáveis aos microtúbulos, ativam uma cascata de transdução de sinal que atrasa a progressão mitótica, inibindo o complexo ciclossomo promotor da anáfase (Lara-Gonzalez et al., 2012; Foley e Kapoor, 2013). O tratamento com PTX prende as células em mitose devido à presença de cinetócoros não acoplados (Waters et al., 1998). No entanto, Zasadil et al. (2014) demonstraram que os níveis de PTX, em tumores primários de mama, estão abaixo dos necessários para provocar uma parada mitótica sustentada. As células nestas concentrações mais baixas do fármaco passam pela mitose e dividem seus cromossomos em fusos multipolares, resultando em falha de segregação cromossômica e morte celular. De acordo com estes dados de cultura de células, a maioria das células mitóticas nos cânceres primários de mama em humanos contém fusos multipolares após o tratamento com PTX.

O trabalho realizado por Fillmore e Kuperwasser (2008), com várias linhagens de carcinoma de mama, utilizou citometria de fluxo para analisar a expressão de CD44, CD24 e CD326, isolar diferentes fenótipos e realizar o tratamento com PTX e 5-fluorouracil. Seus resultados revelaram que as células CD44⁺/CD24⁻ não são tumorigênicas e que apenas 100 células CD44⁺/CD24^{-baixo}/ESA⁺ conseguem formar tumores, sendo que estas últimas sobrevivem à quimioterapia. Adicionalmente, Aulmann et al. (2010), por meio de imunofluorescência dupla, analisaram os efeitos citotóxicos de epirubicina e ciclofosfamida em 50 biópsias e peças cirúrgicas de pacientes com carcinoma de mama, antes e depois da quimioterapia. Estes autores observaram que antes do tratamento uma média de 4,4% das células tumorais exibiu o fenótipo CD44⁺/CD24⁻. No entanto, após a quimioterapia, a frequência de células CD44⁺/CD24⁻ caiu para 2%. No mesmo estudo, um segundo conjunto de biópsias e peças cirúrgicas de 16 pacientes que no pré-operatório haviam sido tratados com combinações diferentes (doxorrubicina/pemetrexedo/docetaxel ou doxorrubicina/ciclofosfamida/docetaxel) e encontraram resultados semelhantes (8,7% de células CD44⁺/CD24⁻ antes e 1,1% após a quimioterapia). Por fim, Aulmann et al. (2010) também mostraram que pacientes portadores de tumores com altas contagens de células CD44⁺/CD24⁻ desenvolveram mais metástases ósseas.

Yan et al. (2011) trataram as linhagens celulares Du145 (câncer de próstata) e DLD1 (câncer de cólon) com etoposídeo, PTX, estaurosporina e análogos de PTX, o que gerou populações tolerantes a drogas. As células Du145 tolerantes, quando implantadas por via subcutânea ou ortotópica em camundongos NOD/SCID, exibiram reduzida tumorigenicidade,

o mesmo ocorrendo na linhagem DLD1 tolerante. As células Du145 tolerantes apresentaram baixo potencial proliferativo e clonogênico e eram praticamente desprovidas de células CD44⁺. Por outro lado, o *knockdown* de CD44 nas células Du145 inibe a proliferação e a formação de tumores, enquanto a restauração da expressão de CD44 nas células Du145 tolerantes aumenta a proliferação celular e tumorigenicidade. Ainda no mesmo trabalho, células Du145 tolerantes exibiram aumentos e diminuições na expressão de genes associados a CTC, o que levou os autores a sugerir que a exposição crônica a medicamentos gera células tolerantes por mecanismos epigenéticos envolvendo CD44 e a concluir que nem todas estas são necessariamente CTC.

Como o PTX e outros quimioterápicos atingem populações CD44⁺ em diferentes tipos de câncer, novas tecnologias têm sido desenvolvidas. Neste sentido, nanopartículas hidrofílicas de ácido hialurônico (HydroHA) carregadas especificamente com PTX, que são capazes de absorver efetivamente o medicamento altamente hidrofóbico, são citotóxicas para células que expressam CD44 (Saravanakumar et al., 2010). Bushman et al. (2013), por outro lado, desenvolveram método para eliminação seletiva de células malignas com uso de nanoesferas e radioimunoterapia pré-dirigidas. Células CD44 positivas da linhagem celular SUM159 de câncer de mama foram incubadas sequencialmente com anticorpo anti-CD44 biotinilado, streptavidina e nanoesferas biotiniladas que encapsulam PTX. Tal procedimento levou à metade da concentração inibitória máxima de PTX nas células SUM159, concentrações 5 a 10 vezes menores do que a de PTX em nanoesferas não biotiniladas ou a droga livre.

Figura 1: Imagem representativa da estrutura química do PTX, com os grupos funcionais éter, éster, cetona, álcool, amida, anéis aromáticos e cicloexanos.

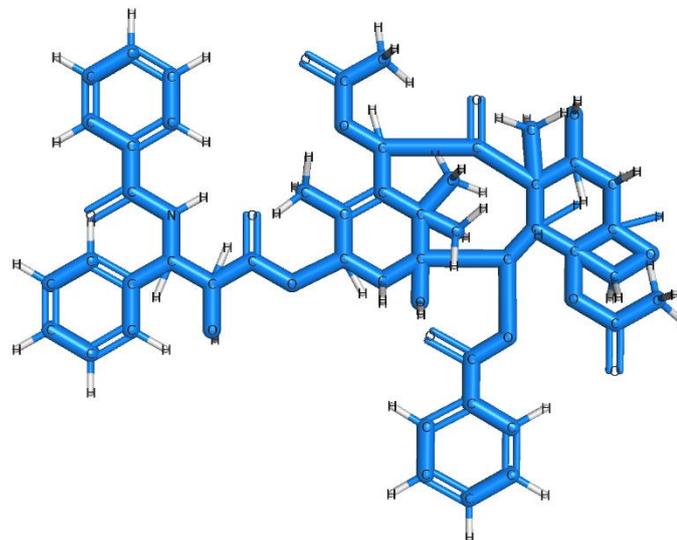


Figura modificada a partir de Gupta et al., 2003.

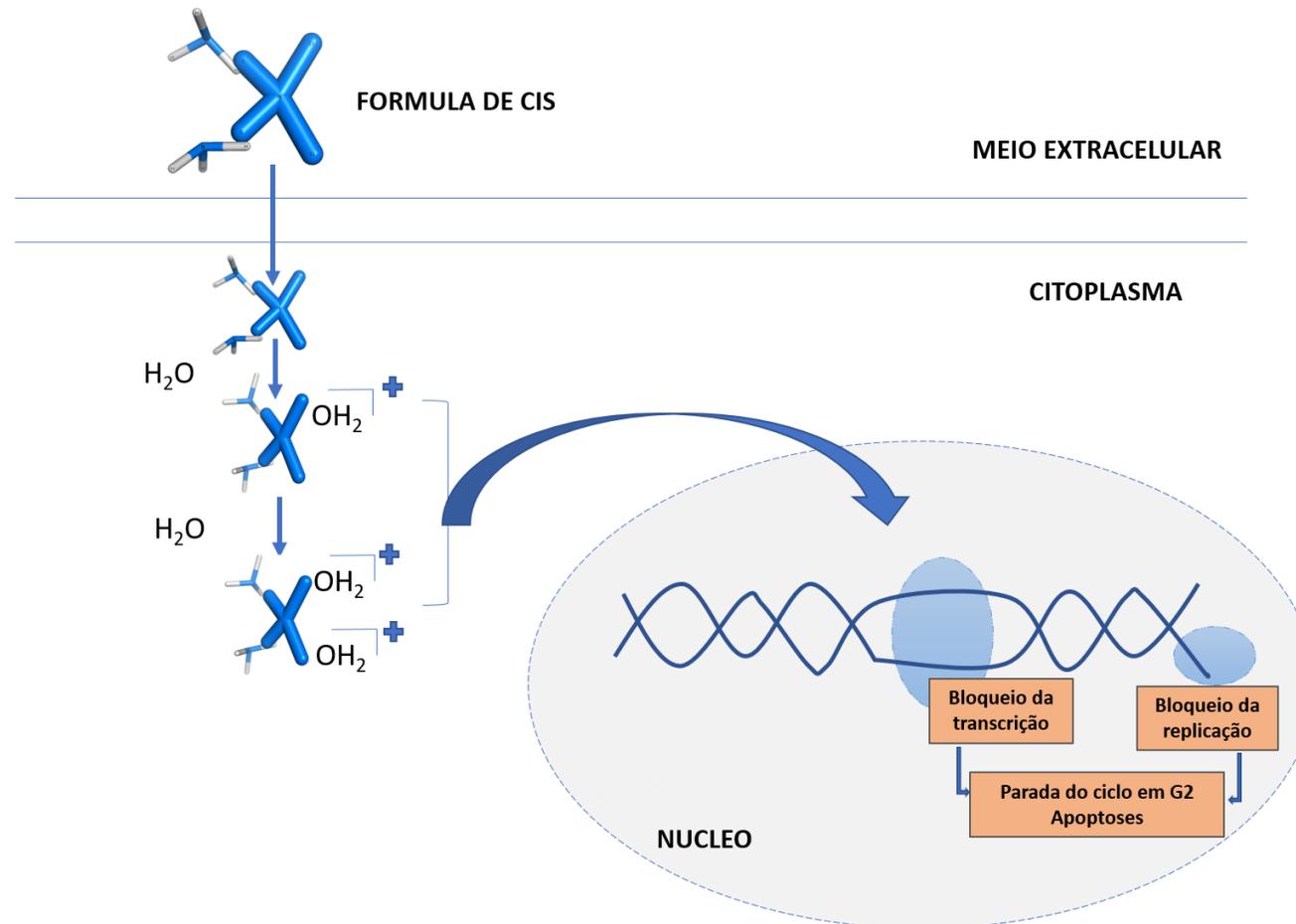
2.3.2 Cisplatina (CIS)

A cis-diaminodicloroplatina, mais conhecida como cisplatina ou CDDP, é um composto à base de platina, que exerce atividade antineoplásica. A CIS foi sintetizada pela primeira vez por Peyrone em 1844 e sua estrutura química foi elucidada por Alfred Werner em 1893 (figura 2). A atividade antitumoral deste composto foi descoberta por Rosenberg et al. em 1969 e aprovada em 1978 pela FDA para o tratamento de câncer de testículo, ovário e bexiga. Apresenta atividade antitumoral contra um amplo espectro de neoplasias sólidas, incluindo câncer de testículo, bexiga, ovário, colo retal, pulmão e CCE de cabeça e pescoço (Galluzzi et al., 2012; Dasari e Tchounwou, 2014).

O mecanismo de ação da CIS está associado à sua capacidade de formar ligações cruzadas com as bases púricas do DNA, interferindo nos mecanismos de reparo, causando danos ao DNA e induzindo a apoptose. A ação da CIS ocorre logo após sua entrada nas células, onde a concentração de cloreto é menor (~ 4mM) do que no sangue circulante (~ 100mM), momento em que perde seus cloretos que são substituídos por água, tornando-a então reativa com sítios nucleofílicos e capaz de formar os adutos em proteínas, RNA e DNA. Isto resulta em inibição da replicação do DNA (ligação da platina ao DNA), da transcrição do RNA e também parada do ciclo celular na fase G2 e/ou em morte por apoptose (Kartalou e Essigmann, 2001, figura 2). Como as células tumorais podem apresentar deficiências no processo de reparo do DNA, estas são mais sensíveis à CIS (revisado por Kartalou e Essigmann, 2001).

Embora a CIS seja amplamente utilizada no tratamento de diferentes tipos de neoplasias malignas, sua administração está associada a importantes limitações intrínsecas ou extrínsecas, como toxicidade e resistência. Efeitos colaterais como leucopenia, neutropenia, anemia, trombocitopenia, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, vômitos, diarreia, náusea, fadiga e ototoxicidade (Rabik e Dolan, 2007; Petrelli et al., 2016). Apesar de ter uma taxa de resposta consistente inicial, o tratamento com CIS geralmente resulta no desenvolvimento de quimiorresistência, o que leva à falha terapêutica. Pesquisas realizadas nos últimos anos descreveram vários mecanismos envolvidos na resistência à CIS: (1) resistência pré-alvo, que envolve etapas que precedem a ligação da cisplatina ao DNA, (2) resistência no alvo, que se relacionam diretamente aos adutos de DNA-CIS, (3) resistência pós-alvo, eventos celulares que ocorrem após a ligação com o DNA e que resultam de defeitos nas vias de sinalização, como inativação da proteína supressora tumoral p53 e problemas com a própria maquinaria de execução de morte celular, e (4) resistência fora do alvo, afetando circuitos moleculares que não apresentam ligações óbvias com sinais induzidos pela CIS (Galluzzi et al., 2012)

Figura 2: Imagem representativa da estrutura química da CIS e seu mecanismo de ação. CIS é uma molécula inorgânica constituída por um átomo central de platina ligado a dois átomos de cloro e dois grupos amônia. Esta droga se liga covalentemente às bases púricas do DNA, levando à formação de adutos intra e intercadeias e inibição da replicação do DNA, da transcrição do RNA, parada do ciclo celular na fase G2 e/ou apoptose.



Modificado a partir de Kartolou e Esigmann, 2001.

Abubaker et al. (2013), usando duas linhagens celulares distintas derivadas câncer de ovário (OVCA 433, e HEY), demonstraram enriquecimento de uma população com alta expressão de marcadores CTC (proteína e mRNA) em resposta à CIS e outros quimioterápicos. Os resultados destes achados *in vitro* foram confirmados por modelos de xenoinxerto em camundongos, nos quais o transplante intraperitoneal de células HEY resistentes a CIS ou PTX produz tumores significativamente maiores em comparação com células controle. Além disto, estudos imuno-histoquímicos realizados nos tumores de camundongo descritos acima mostraram mais positividade para Ki67, CA-125, e-caderina e marcadores de CTC, como Oct4 e CD117, em comparação com camundongos injetados com células controle. Tais resultados indicam que o tratamento pode deixar células residuais que são enriquecidas com características de CTC, resultando em um potencial metastático aumentado.

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

Há vários anos atrás, foi demonstrado que os tecidos tumorais requerem um aumento no metabolismo lipídico para acomodar a crescente necessidade de síntese de membranas, armazenamento de energia e funções de sinalização celular (Medes et al., 1953; Santos e Schulze, 2012). Este processo está ligado funcionalmente à via glicolítica e ao incremento da síntese de ácidos graxos (AG), considerado uma característica da biologia das células tumorais (Kuhajda, 2000).

FASN é a enzima metabólica responsável pela biossíntese endógena de AG saturados de cadeia longa, que são críticos para o metabolismo energético e componentes fundamentais dos lipídios da membrana celular. Curiosamente, a biossíntese *de novo* de AG pela FASN não é a principal maneira dos tecidos dos mamíferos adultos atenderem às suas necessidades lipídicas, ao contrário, AG livres e lipoproteínas são obtidos da dieta através da circulação sanguínea. Por outro lado, o *knockout* de FASN em linhagens germinativas não é tolerado em embriões, pois provoca a morte destes antes da implantação. Camundongos haplóides FASN^{+/-} apresentam perda de 70% dos seus embriões, não podendo sustentar o desenvolvimento embrionário (Chirala et al., 2003). No entanto, tecidos adultos têm pouca expressão de FASN, com a exceção da glândula mamária durante a lactação e o endométrio em sua fase proliferativa (Pizer et al., 1997; Maningat et al., 2009). Modelos experimentais realizados em camundongos adultos mostraram que FASN pode ser excluída de muitos tecidos, em condições normais, sem significativa consequência ou sequelas (Chakravarthy et al., 2005).

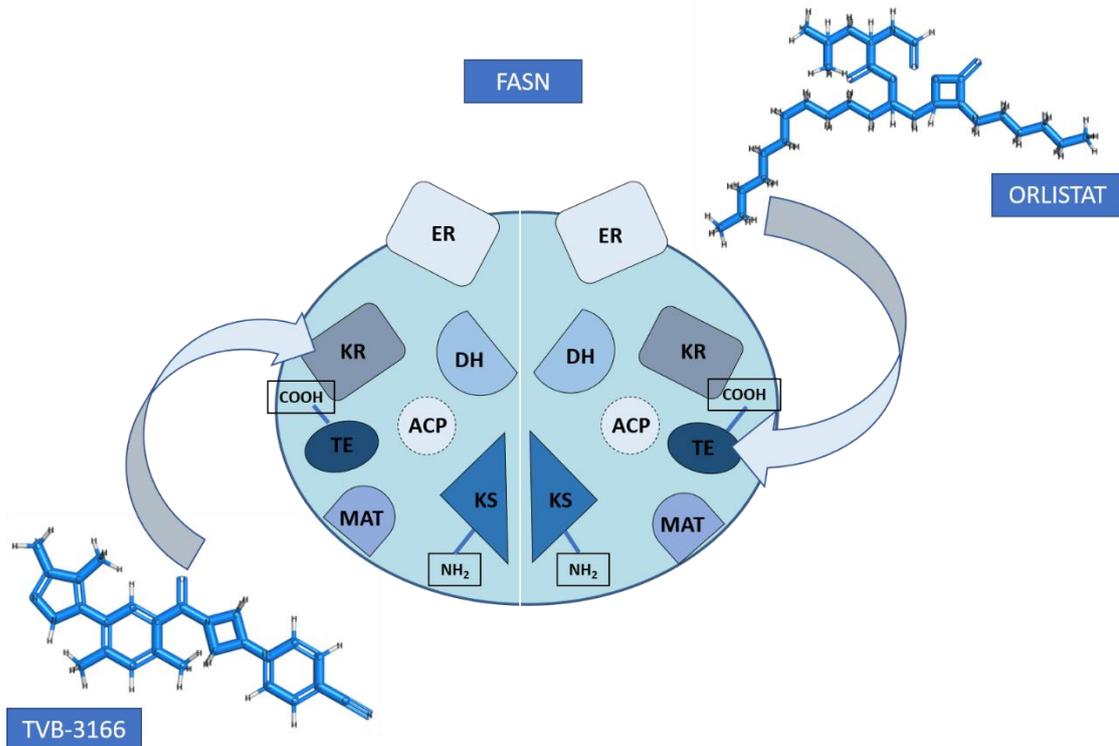
Na década de 1980 foi estabelecido que a síntese *de novo* de AG pode representar mais de 90% do triacilglicerol nas células tumorais, independentemente dos níveis lipídicos

circulantes (Ookhtens et al., 1984). A primeira associação da expressão do FASN com o câncer foi feita em tumores de mama, no ano de 1994, quando foi denominada de antígeno OA-519 (Kuhajda et al., 1994). A partir desta observação inicial, a expressão elevada de FASN foi detectada em vários tipos de tumores, incluindo os de pâncreas, colorretais, de ovário, mama, próstata, CCEO, melanomas, linfomas não-Hodgkin, mieloma múltiplo, dentre outros (Alo et al., 1996, 2007; Krontiras et al., 1999; Innocenzi et al., 2003; Di Vizio et al., 2008; Wang et al., 2008b; Witkiewicz et al., 2008; Uddin et al., 2010; Cai et al., 2015). Em vários destes trabalhos, níveis mais altos de FASN correlacionam-se com o estadiamento avançado da doença e pior prognóstico.

As células malignas consomem abundantemente glicose, produzindo piruvato (Szutowicz et al., 1979). O piruvato, por sua vez, entra no ciclo de Krebs, nas mitocôndrias, para gerar ATP. Um dos subprodutos do ciclo de Krebs é acetil-coenzima A (CoA), que junto com o malonil-CoA são substratos de FASN, que na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) como cofator, produz o palmitato (AG de 16 carbonos) (Kuhajda, 2000; Menendez e Lupu, 2007; Flavin et al., 2010). O palmitato pode então ser conjugado a proteínas ou convertido em outros AG e lipídios complexos durante a síntese de estruturas de membrana, microdomínios lipídicos, modificações de proteínas e localização e sinalização de receptores de vias oncogênicas, como PI3K/AKT/mTOR. Adicionalmente, FASN desempenha um papel importante na homeostase energética, convertendo o excesso de carbono em AG para o armazenamento, fornecendo energia via β -oxidação quando necessário (Kuhajda, 2000).

A estrutura cristalina e os sítios catalíticos de FASN já foram descritos (Maier et al., 2008) e, em mamíferos, FASN é um polipeptídeo multifuncional constituído por duas cadeias idênticas. Como mostrado na figura 3, cada cadeia é composta por sete domínios catalíticos, que incluem uma proteína transportadora de acil ou ACP (*acyl carrier protein*). Esses domínios (em ordem linear a partir da extremidade carboxi-terminal) são: tioesterase, ACP, β -cetoacil redutase, enoil redutase, β -hidroxiacil desidrase, acetil/malonil-CoA e β -cetoacil-sintase (Maier et al., 2008). Embora cada monômero de FASN contenha todos os sítios necessários para a síntese de palmitato, somente a forma dimérica da enzima é funcional.

Figura 3. Representação do complexo enzimático da ácido graxo sintase (FASN). Homodímero formado por duas cadeias polipeptídicas multifuncionais, contendo sete sítios catalíticos em cada cadeia: tioesterase, ACP, β -cetoacil redutase, enoil redutase, β -hidroxiacil desidratase, acetil/malonil-CoA e β -cetoacil-sintase. Os inibidores de FASN, ORL e TVB-3166, atuam sobre os sítios catalíticos TE e KR, respectivamente.



Modificado a partir de Menendez e Lupu 2007 e 2017.

A inibição da FASN resulta na morte de células neoplásicas por vários mecanismos, incluindo alterações da síntese das membranas, modificação de proteínas e interações com outras vias de sinalização oncogênica (Fiorentino et al., 2008; Chen et al., 2012; Benjamin et al., 2015; Ventura et al., 2015). No entanto, Kuemmerle et al. (2011) sugerem que, além da lipogênese *de novo*, as células malignas podem usar a enzima lipoproteína lipase e a expressão de CD36 (canal de captação extracelular de AG) para adquirir AG da circulação por lipólise, o que pode estimular o crescimento tumoral. Em 2017, Pascual e colaboradores demonstraram que uma dieta rica em lípidos aumenta o potencial metastático de células que expressam altos níveis CD36 (a partir de células CD44^{high}) e que o bloqueio deste receptor com anticorpos neutralizantes inibe quase completamente as metástases em modelo ortotópico de CCEO, sem efeitos adversos. A partir destes dados, verificou-se que não somente FASN, mas todas as principais enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos e sua internalização pelas células são alvos potenciais para a intervenção antineoplásica (Swinnen et al., 2006).

2.4.1. Inibidores farmacológicos de FASN

Existem diversos inibidores de FASN, alguns ainda em desenvolvimento e testes pré-clínicos e clínicos. Os inibidores da FASN mais antigos, como cerulenina, orlistat, C75, C93 e GSK837149A, demonstram atividade antitumoral em estudos pré-clínicos realizados com diferentes linhagens celulares e modelos de xenoenxertos. No entanto, nenhum destes compostos foi testado clinicamente em pacientes devido a limitações conferidas por suas propriedades farmacológicas ou efeitos colaterais que limitariam sua utilização clínica (revisado por Flavin et al., 2010 e Angeles e Hudkins, 2016). Uma nova geração de moléculas como GSK2194069, JNJ54302833, IPI-9119, Fasnall e TVB-3166 está sendo extensivamente estudada *in vitro* (Brophy et al., 2013; Hardwicke et al., 2014; Ventura et al., 2015; Alwarawrah et al., 2016; Lu et al., 2018). Por outro lado, TVB-2640 é o primeiro inibidor de FASN testado clinicamente, em pacientes com tumores sólidos avançados, incluindo os cânceres de mama, pulmão, cólon e astrocitoma. Os resultados preliminares do primeiro ensaio de escalonamento de dose em seres humanos demonstraram toxicidade cutânea (incluindo descamação e eritrodisestesia palmar-plantar) e toxicidades oftalmológicas (incluindo edema da córnea, queratite e irite) nas doses orais contínuas mais altas, reversíveis com a descontinuidade do medicamento. Em geral, o TVB-2640 mostra um perfil favorável de tolerabilidade, sem eventos adversos gastrointestinais, hematológicos, séricos e eletrocardiográficos (Hardwicke et al., 2014; Jones e Infante, 2015; Angeles e Hudkins, 2016; Menendez e Lupu, 2017).

2.4.2 Orlistat (ORL)

ORL (tetrahidrolipstatina), uma forma reduzida do produto natural lipstatina, foi descrito em 1987 como potente e seletivo inibidor da lipase pancreática *in vitro* (Hogan et al., 1987), sendo e aprovado pela FDA para o tratamento da obesidade por inibir de maneira irreversível as lipases gástricas e pancreáticas e desta forma bloquear a absorção dos ácidos graxos da dieta (Guerciolini, 1997). Kridel et al., em 2004, descobriram que ORL é também um inibidor irreversível de FASN, por meio do seu domínio tioesterase (TE) (figura 3). Além disso, estes mesmos autores mostraram que ORL tem efeitos antitumorais potentes *in vitro* e *in vivo* com a linhagem celular de câncer de próstata PC3.

Nosso grupo de pesquisa tem mostrado a participação de FASN no comportamento clínico e no processo metastático dos CCEO. Por meio de reações imuno-histoquímicas, foi demonstrado que a produção de FASN é maior no CCEO do que no epitélio adjacente morfológicamente normal e, em contraste com outras malignidades, a maior positividade para FASN ocorre nos CCEO bem diferenciados (Silva et al., 2004). Estes achados podem ser

compreendidos com base em experimentos realizados em nosso laboratório demonstrando que a expressão de FASN é estimulada durante a diferenciação dos queratinócitos bucais (Silva et al., 2008a), por isso áreas de queratinização dos CCEO são mais positivas para FASN do que as regiões pobremente diferenciadas. O papel essencial de FASN na proliferação de células derivadas de CCEO humanos foi demonstrado em trabalho realizado por Agostini et al., 2004. A positividade para FASN em CCE de língua está associada com características microscópicas que determinam progressão da doença e seu prognóstico (Silva et al., 2008b). Um achado importante foi que ORL diminui o tamanho e o índice de proliferação de tumores provocados pela inoculação ortotópica de células metastáticas SCC-9 ZsG LN-1 nas línguas de camundongos imunossuprimidos (Agostini et al., 2014). Além disto, estes mesmos autores mostraram que ORL reduz o número de metástases linfonodais em 43%, sugerindo que FASN é um alvo terapêutico para o tratamento de CCE de língua.

Embora tenha demonstrado atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*, o ORL possui importantes limitações farmacológicas, como baixa solubilidade e estabilidade, reduzida absorção pela via oral e falta de seletividade, além de efeitos colaterais que restringem sua aplicação em pacientes (Kridel et al., 2007; Flavin et al., 2010).

2.4.3 TVB-3166

TVB-3166 é um composto de baixo peso molecular à base de imidazopiridina com solubilidade melhorada, atuando como inibidor potente, seletivo e reversível da FASN através da inibição do sítio β -cetoacil redutase (figura 3). Este composto foi desenvolvido em 2013 pela empresa 3-V Biosciences (Oslob et al., 2013; Ventura et al., 2015), tendo como base o trabalho desenvolvido por Yang et al (2008) demonstrando que FASN tem sua expressão aumentada durante a infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) e que a redução dos níveis de FASN com siRNA diminui a replicação viral. TVB-3166 também demonstra atividade antiviral contra o HCV tanto *in vitro* como *in vivo*, reduz significativamente a progênie do vírus sincicial respiratório e possui atividade de amplo espectro contra outros vírus respiratórios (Oslob et al., 2013; Ohol et al., 2015).

Ventura et.al. (2015) demonstraram que a inibição seletiva e potente de FASN com TVB-3166 leva à morte seletiva de células tumorais, sem efeito significativo nas células normais, e inibe o crescimento de xenoinxertos em doses bem toleradas. Estes autores demonstraram ainda que diversos mecanismos de ação podem operar em tipos específicos de tumores para provocar apoptose das células tumorais, como o remodelamento das membranas celulares e alterações nas proteínas associadas aos *rafts* lipídicos, o que inibe a transdução de

sinal por meio das vias PI3K-AKT-mTOR e β -catenina e reduz a expressão de c-Myc. É importante ressaltar ainda que a inibição da sinalização das vias PI3K-AKT-mTOR e β -catenina não foi observada em células MRC5, derivadas de fibroblastos pulmonares, demonstrando assim a dependência de FASN nas células tumorais para a regulação da proliferação e sobrevivência. De acordo com estes achados, nosso grupo de pesquisa demonstrou que o TVB-3166 apresenta propriedades antitumorais em células derivadas de CCEO, reduzindo a tanto a proliferação como a viabilidade celular, promovendo parada no ciclo celular e apoptose, assim como aumentando a adesão das células SCC-9 ZsG e sua versão metastática LN-1A (Aquino, 2019 dados ainda não publicados).

Heuer et al. (2017), mostraram que a inibição de FASN com TVB-3166 ou TVB-3664 reduz significativamente a palmitoilação da tubulina, desorganizando os microtúbulos nas células tumorais. Além disto, demonstraram que inibição da FASN combinada ao tratamento com taxanos potencializa a inibição do crescimento de células tumorais *in vitro*, em comparação com o tratamento com estes agentes de forma isolada. Em modelos de xenoinxertos derivados de pacientes (PDX) de tumores de ovário, próstata e pâncreas, a combinação da inibição de FASN com PTX ou docetaxel demonstrou atividade antitumoral significativamente aumentada, com regressão tumoral em três dos seis experimentos realizados. Em conjunto, estes resultados apoiam fortemente a investigação da inibição combinada de FASN e o tratamento com taxanos como uma terapia para uma variedade de cânceres humanos. Resultados similares foram observados no estudo de Zaytseva et al. (2018), em células de carcinoma colorretal e em modelo PDX com diferentes inibidores de FASN da família TVB, demonstrando que estes diminuem a ativação das vias oncogênicas Akt e Erk1/2, assim como alteram significativamente a composição lipídica dos tumores.

Nosso grupo de pesquisa (Aquino, 2019 dados ainda não publicados), demonstrou que TVB-3166 reduz a viabilidade celular de maneira progressiva na linhagem celular SCC-9 ZsG e na linhagem metastática LN-1A, acumula as células na fase G0/G1, reduz o número de células na fase S e aumenta as taxas de apoptose e necrose. Neste trabalho, a proliferação e a migração celular foram reduzidas nas células SCC-9 ZsG em todos os períodos avaliados, entretanto na linhagem metastática LN-1A, a redução da proliferação também ocorreu em todos os períodos avaliados, ao contrário da migração, que foi discretamente reduzida somente após os períodos de 6 a 12 horas. Estes resultados são promissores e servem como base para novos ensaios *in vivo* visando avaliar o potencial de aplicação clínica desta droga em CCEO.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Proposições gerais

- 3.1.1** Avaliar a imunexpressão de marcadores de superfície associados a células tronco do câncer (CTC) nas linhagens SCC-9 ZsGreen e SCC-9 ZsGreen LN-1A tratadas ou não com cisplatina, paclitaxel, TVB-3166 e orlistat.
- 3.1.2** Isolar e avaliar os diferentes fenótipos celulares de acordo com a imunexpressão de CD44 e CD326, a partir das linhagens SCC-9 ZsGreen e SCC-9 ZsGreen LN-1A.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultura de Células

As linhagens celulares SCC-9, SCC-9 ZsGreen (SCC-9 ZsG) e SCC-9 ZsGreen LN-1A (LN-1A) foram utilizadas nesta pesquisa. A linhagem SCC-9 ZsG (Agostini et al., 2014) foi obtida pela transdução com o vector retroviral pLNCX2 (Clontech) contendo a sequência que codifica proteína ZsGreen nas células SCC-9, esta última adquirida da *American Type Culture Collection* (ATCC, E.U.A.). De acordo com as informações obtidas no catálogo da ATCC, as células SCC-9 foram estabelecidas a partir de um carcinoma de células escamosas (CCE) primário de língua de um paciente do gênero masculino, com 25 anos de idade. A linhagem metastática de CCE oral humano LN-1A foi criada em nosso laboratório por meio de seleção *in vivo* a partir de células SCC-9 ZsGreen (Moreira, 2017)

As linhagens celulares acima descritas foram semeadas em frascos plásticos de 75 cm² (Corning) em 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) na diluição de 1:100 a 37°C em atmosfera contendo 95% de umidade e 5% de CO₂. As células foram cultivadas até cerca de 70% de confluência, quando o meio de cultura era removido e estas lavadas com 10 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS 1X, pH 7,4). Para soltá-las dos frascos de cultura, realizou-se incubações com 2 mL de tripsina a 2%, por um período máximo de 5 min, e o desprendimento total das células da superfície de cultura foi acompanhado por observação em microscópio de contraste de fase invertido (Nikon Eclipse TI). A ação da tripsina foi interrompida pela adição de 8 mL de meio de cultura suplementado com 10% de SFB. A suspensão de células foi transferida para tubos cônicos de plástico de 15 mL (Corning, E.U.A.) e centrifugadas a 900 xg por 3min, o sobrenadante descartado, o *pellet* ressuspendido em 5mL de meio de cultura suplementado com 10% de SFB e as células replaqueadas em novos frascos de cultura. O meio de cultura foi trocado em intervalos de 48 horas. Visando manter o estoque congelado em nitrogênio líquido e trabalhar sempre com as células em passagens semelhantes, congelamos várias amostras das linhagens celulares estudadas antes da realização dos experimentos. Para isto, depois de ressuspendidas em solução contendo 10% de di-metil sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, E.U.A.) e 90% de SFB, as células foram congeladas em nitrogênio líquido. Para o descongelamento, os criotubos (Nunctm, Denmark) foram colocados em banho de água a 37°C e as células rapidamente transferidas para tubos de 15mL contendo 9 mL de meio suplementado e então centrifugadas. Os *pellets* foram

ressuspendidos em 10 mL de meio de cultura e cerca de 10 µL da suspensão de células foram usados para contagem com a utilização de câmara de Neubauer e posterior realização dos experimentos.

Além dos procedimentos descritos no parágrafo anterior, testes periódicos para a manutenção das culturas livres de *Mycoplasma* spp. e a não utilização de subcultivos prolongados, além da organização do trabalho por linhagem, foram também condutas seguidas com objetivo de assegurar a esterilidade, estabilidade fenotípica e genotípica, assim como a correta identificação das linhagens celulares; garantindo a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados.

4.2 Preparo das soluções de ORL, TVB-3166, CIS e PTX

Para os experimentos de imunofenotipagem para marcadores de superfície associados a CTC nas linhagens celulares SCC-9 ZsG e LN-1A foram previamente submetidas a ação das drogas ORL, TVB-3166, CIS e PTX (descrito no item 4.4). Todas as soluções foram preparadas em condições estéreis dentro da cabine de fluxo laminar. CIS e ORL foram filtrados com filtros de 0,22µm.

ORL (Neoquímica, Brasil) foi extraído de acordo com o protocolo de Knowles et al. (2004), o conteúdo de uma cápsula dissolvido em 1 mL de etanol (ETOH) absoluto (Merck, Alemanha) seguido de agitação suave por 30 min a temperatura ambiente e agitação em vórtex a cada 10 min para homogeneizar a solução. Após 30 min de agitação, a solução foi centrifugada a 12.000 xg por 5 min a 4°C e o sobrenadante (250 mM de ORL) coletado, filtrado e mantido a -80°C até o momento do uso. Com TVB-3166 (Sigma-Aldrich; SML1694-5mg) foi feita uma solução em DMSO com a concentração final de 50mM e separada em alíquotas, que foram armazenadas a -20 °C e protegidas da luz.

CIS (Sigma-Aldrich; P4324-25 mg) foi dissolvida em solução de NaCl a 0,9% para uma concentração final de 5 mM, mantida em agitação por 30 min, filtrada e estocada em alíquotas a -20 °C e protegidas da luz. Por fim, PTX (Sigma-Aldrich; T7191-5 mg) foi dissolvido em DMSO para obtenção de soluções nas concentrações finais de 10 e 50mM, alíquotada e armazenadas a -20°C. também protegidas da luz.

As células controle receberam volume de DMSO, ETOH ou NaCl equivalente ao das células que receberam tratamento.

4.3 Análise da viabilidade celular por MTT e cálculo da IC₅₀

O ensaio de MTT (Sigma Aldrich), {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil tetrazolium]}, foi o teste colorimétrico utilizado para avaliar a viabilidade celular após os tratamentos com CIS e paclitaxel. O MTT evidencia a atividade da desidrogenase mitocondrial em células metabolicamente viáveis pela mensuração da formação de cristais de formazan, a partir da clivagem do sal de tetrazólio. Para isto, as células SCC-9 ZsG e LN-1A foram semeadas em placas de 24 poços a uma densidade de $3,5 \times 10^4$ células, em 500 μ L de meio DMEM/F-12 suplementado com 10% de SFB. Após 24 horas, o meio foi substituído por DMEM/F-12 livre de SFB, incubando-se as células por mais 24 horas para promover a sincronização do ciclo celular. O meio foi então substituído por meio novo contendo concentrações crescentes de CIS e PTX na presença de 10% de SFB. Após 48 horas de tratamento, as células foram incubadas a 37 °C com 0,25 mg/mL de MTT diluído em meio DMEM/F-12 com 10% SFB por 4 horas adicionais. Em seguida, o meio foi removido e os cristais de formazan presentes nos poços foram solubilizados com 500 μ L de ETOH. As soluções foram então homogeneizadas 400 μ L de cada condição experimental transferidos para 4 poços (100 μ L /poço) de uma placa de 96 poços e as absorbâncias medidas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 595 nm, corrigidos para 655 nm (iMark™ *Microplate Absorbance Reader*, BioRad). A viabilidade celular foi então expressa em porcentagens em relação aos controles, todas as concentrações testadas em duplicatas e os experimentos repetidos no mínimo três vezes para cada linhagem celular estudada.

A metade da concentração inibitória (IC₅₀) foi calculada por meio do software CompuSyn (Chou TC e Martin N, 2005) para a realização dos experimentos apresentados neste trabalho. Todos os ensaios de imunofenotipagem das linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A foram utilizadas a IC₅₀ e sua metade. TVB-3166 e ORL foram utilizados nas concentrações descritas nos trabalhos desenvolvidos em nosso laboratório (Moreira, 2017; Aquino, 2019).

4.4 Imunofenotipagem nas linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A tratadas com ORL, TVB-3166, CIS ou PTX

4.4.1 Desenho experimental

A expressão de marcadores de CTC nas linhagens celulares SCC-9 ZsG e LN-1A tratadas com TVB-3166, ORL, CIS ou PTX foi realizada por meio de ensaios de imunofenotipagem pela técnica de imunofluorescência direta em citômetro de fluxo, em experimentos desenhados para serem executados ao longo de 5 dias (figura 4). No primeiro dia, as linhagens celulares SCC-9 ZsG e LN-1A foram cultivadas em 5 frascos T75 cm² (Sarstedt)

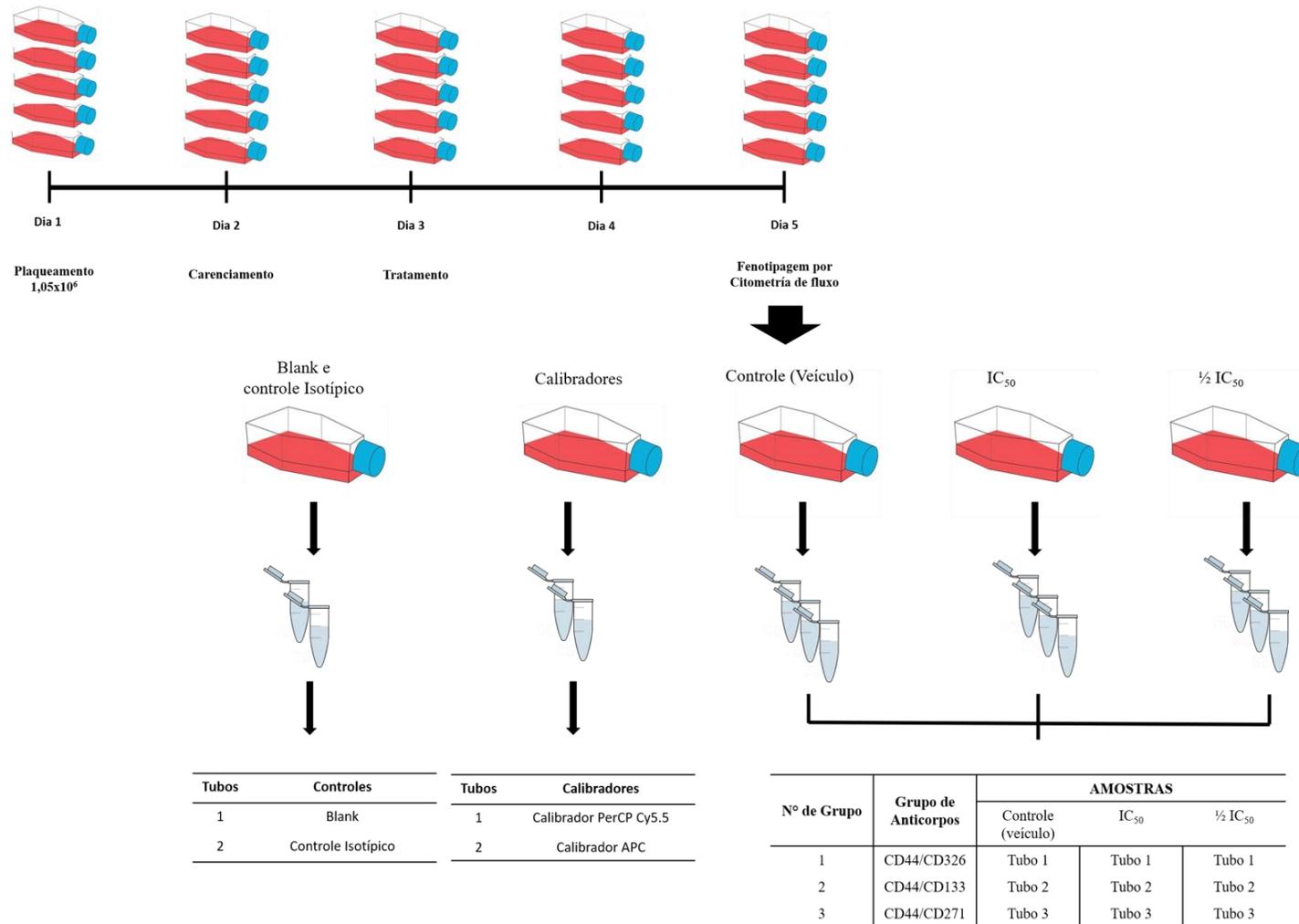
em densidade inicial de $1,05 \times 10^6$ por frasco em 10 mL de meio DMEM/F12 contendo 10% de SFB. Cada um dos frascos garrafa foi utilizado para as seguintes condições: calibradores, controles (veículos), IC₅₀ e ½ IC₅₀ (tabela 1).

Tabela 1. Condições experimentais associadas a cada frasco de cultura.

| Frasco | Condição | Especificação |
|--------|--|--|
| | Blank | Células SCC-9ZsG ou LN-1A não marcadas, nem sometidas a nenhum tratamento. |
| 1 | Controle Isotípico (controle inespecífico) | Mouse IgG2b,k PerCP Cy5.5 Mouse IgG1 APC |
| 2 | Calibradores (Controle para ajuste dos “gates” de marcação positiva) | Calibrador 1: CD44 PercP Cy 5.5 Calibrador 2: CD326 APC |
| 3 | Grupo-controle | células tratadas com o veículo da droga |
| 4 | IC ₅₀ | Células SCC-9ZsG ou LN-1A sometidas a IC50 do tratamento em estudo |
| 5 | Metade do IC ₅₀ | Células SCC-9ZsG ou LN-1A sometidas a metade do IC50 do tratamento em estudo |

No segundo dia, após 24 horas do plaqueamento, as células foram carenciadas de SFB. No terceiro dia, 24 horas após o carenciamento, as células foram tratadas com TVB-3166, ORL, CIS ou PTX, cada droga de forma individual em experimento diferentes, nas doses correspondentes à IC₅₀ ou sua metade em 7mL de DMEMF/12 contendo 10% de SFB (2% de SFB nos experimentos com TVB-3166). As células controle foram tratadas com os veículos correspondentes a cada droga. No quinto e último dia (48 horas após o início do tratamento), foi realizada a marcação com diferentes anticorpos para o experimento de imunofenotipagem. Dois experimentos independentes foram realizados para cada um dos grupos de anticorpos em ambas linhagens analisadas (SCC-9 ZsG e LN-1A).

Figura 4. Desenho experimental para imunofenotipagem das linhagens celulares SCC-9 ZsG e LN-1A, após tratamento com ORL, TVB-3166, CIS ou PTX.



4.4.2 Imunofenotipagem

O meio de cultura de cada um dos frascos foi cuidadosamente retirado, as células lavadas com PBS e descoladas com 5 mL de Accutase (*Cell Detachment Solution*, BD) durante 8 a 10 min. Em seguida, a ação enzimática foi inativada pela adição de 8mL de DMEM/F12 contendo 10% de SFB, a suspensão centrifugada a 900 xg por 3 min e o *pellet* foi ressuscitado em 3 mL ou 4 mL de PBS, dependendo a cada condição. Antes das imunomarcações, foi realizado um bloqueio de ligações inespecíficas com 500 µL de PBS contendo 1% de BSA por 30 min, seguido de nova centrifugação a 900 xg e lavagem em PBS. A dupla marcação com anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos foi realizada por 30 min no escuro (figura 4). Após as incubações com os anticorpos, as células foram novamente centrifugadas, lavadas duas vezes com PBS e, finalmente, ressuscitadas em 200 µL de PBS para a leitura no citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences). Este aparelho é equipado com dois lasers (argônio - 488 nm - e laser de diodo vermelho - 635nm, detectores de dispersão para tamanho (FSC - *forward scatter*) e de complexidade interna (SSC- *side scatter*) e detectores de emissão de fluorescência FL1, FL2 e FL3 (para o laser de 488 nm) e FL4 (para o laser de 635 nm). Um total de 10.000 eventos foi avaliado por grupo e consideradas marcações positivas somente as células que exibiram fluorescência maior que a *baseline*. Os resultados obtidos foram analisados com o auxílio do software Cell Quest Pro (BD Biosciences) na forma linear para o parâmetro de dispersão e logarítmica para o parâmetro fluorescência.

Quatro anticorpos monoclonais (CD44, CD326, CD133 e CD271) conjugados com 2 diferentes fluorocromos (PerCP Cy 5.5 e APC) foram utilizados para as duplas marcações, separadas em 3 diferentes grupos (figura 4). Apesar do citômetro de fluxo aqui utilizado possuir 4 canais para leitura, pudemos usar apenas os canais FL2, FL3 e FL4, pois as células estudadas expressam a proteína fluorescente ZsGreen, detectada no canal FL1. Os anticorpos foram agrupados em CD44/CD326, CD44/CD133 e CD44/CD271, lidos nos canais FL3 e FL4. Além disto, para todas as reações foram utilizados controles isotípicos com o intuito de eliminar a fluorescência de possíveis ligações inespecíficas entre a porção invariável do anticorpo e as células estudadas (tabela 2). O controle isotípico IgG_{2b} foi utilizado com o fluorocromo PerCP-Cy 5.5 para os anticorpos contra CD44 e o controle isotípico IgG₁ foi utilizado para o fluorocromo APC para os anticorpos que detectam CD326, CD133 e CD271. CD44 foi constante nos três grupos de anticorpos por ser o marcador de CTC mais amplamente avaliado na literatura e devido a relatos da positividade para esta proteína em células SCC-9 (Zhu et al., 2012; Yang et al., 2013) . Por fim, selecionamos estes anticorpos conjugados ao fluorocromo

PerCP-Cy 5.5 pelo fato deste último apresentar a menor fluorescência dentre aqueles que podem ser detectados em nosso citômetro de fluxo, minimizando sobreposições na leitura.

Adicionalmente, foram utilizados anticorpos calibradores para os canais responsáveis para a detecção dos fluoróforos PercP-Cy 5.5 e APC (CD44 e CD326) devido a uma possível sobreposição dos comprimentos de onda, evitando-se assim interpretações errôneas. Os anticorpos utilizados como “calibradores” para as reações estão listados na tabela 1.

Tabela 2. Anticorpos utilizados nos experimentos de imunofenotipagem e *cell sorting* das linhagens celulares SCC-9 ZsG e LN-1A.

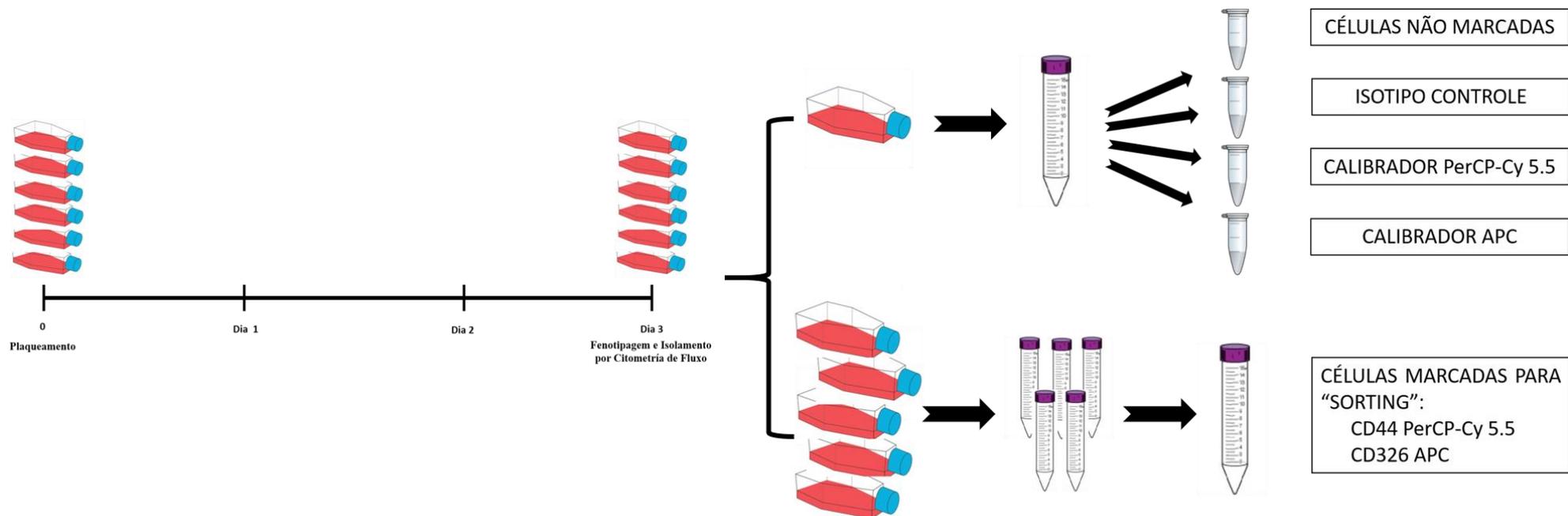
| Anticorpo | Fluoróforo | Clone | Marca | Localização do antígeno |
|--------------------------|--------------|--------------|-----------------|-------------------------|
| AntiCD44 | PerCP Cy 5.5 | G44-26 (C26) | BD Pharmingen | superfície celular |
| Anti CD133/1 | APC | AC133 | Miltenyi Biotec | superfície celular |
| Anti CD271 | APC | ME20.4-1.H4 | Miltenyi Biotec | superfície celular |
| Anti CD326 | APC | HEA-125 | Miltenyi Biotec | superfície celular |
| Isotipo IgG2b | Percp Cy5.5 | 27-35 | BD Pharmingen | não específico |
| Isotipo IgG ₁ | APC | 11711 | R&D Systems | não específico |

4.5 *Cell Sorting* das linhagens celulares SCC-9 ZsG e LN-1A com os marcadores CD44/CD326

Para o *cell sorting* das linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A (figura 5), foram semeados 6 frascos de 75 cm² a uma densidade entre 5 e 8x10⁵ células por frasco em 10mL de DMEMF/12 com 10% de SFB e 0,2% MycoZap Prophylactic (Lonza). Após três dias do plaqueamento, com uma confluência de 60-80%, as células foram descoladas com 3mL de Accutase durante 12 min. Em seguida, a ação enzimática foi inativada pela adição de 9mL de DMEM/F12 contendo 10% de SFB e 0,2% de MycoZapTM Prophylactic, a suspensão centrifugada a 900 xg por 3 min e o *pellet* obtido de todas os frascos resuspendido em 10mL de PBS. Antes das imunomarcações, foi realizado bloqueio de ligações inespecíficas com 10 mL de PBS com 1% de BSA por 30 min, seguido de nova centrifugação a 900 xg e lavagem em PBS. A dupla marcação com anticorpos monoclonais (CD44 e CD326) foi realizada por 30 min sob proteção da luz e a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS e as separações celulares de cada linhagem estudada foram realizadas no citômetro de fluxo FACSAriaTM Fusion (BD Biosciences) do Laboratório de Citometria de Fluxo da Fundação

Hemocentro de Ribeirão Preto (**FUNDHERP/HC/FMRP/USP**) com auxílio do software FACSDiva 8.0.1 (BD Biosciences). Os fenótipos isolados foram coletados em frascos de 25 cm² em 5mL de DMEM/F12 contendo 10% SFB e 0,2% de *Mycozap Prophylactic*, foram expandidos e congelados para serem utilizados nos experimentos subsequentes.

Figura 5. Desenho do experimento para imunofenotipagem e *cell sorting* a partir das linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A.



4.6 Experimentos de western blotting

A quantidade da proteína FASN e de proteínas associadas ao processo de TEM como e-caderina, vimentina, n-caderina e slug foi avaliada nos diferentes fenótipos celulares isolados a partir das linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A. As células (8×10^5) foram semeadas em frascos de 75 cm² em DMEM/F12 com 10% de SFB e após 24 horas do plaqueamento, o meio foi substituído por DMEM/F12 livre de SFB. Passadas outras 24 horas de careciamento, o meio foi trocado novamente por DMEM/F12 com 10% de SFB, e 48 horas depois as células de cada um dos fenótipos cultivados foram tripsinizadas e os *pellets* celulares coletados em PBS. As proteínas foram extraídas em 70 µL de tampão de lise, constituído por RNeasy lysis buffer e de inibidores de protease 7x concentrado (*Complete Mini Cocktail*, Roche Diagnostics – Mannheim, Alemanha) em uma proporção de 8.5:1.5 respectivamente, por meio de dissociação e homogeneização por pipetagem dos *pellets* neste tampão, mantidos no gelo por 30 min e agitados a cada 10 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12,000 xg por 15 min a 4°C e os sobrenadantes coletados. Todos os extratos proteicos foram imediatamente transferidos para freezer a -80°C, onde foram mantidos até o momento do uso. A concentração de proteína total de cada extrato obtido foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando-se o reagente de Bradford (Bio-Rad, EUA) em um espectrofotômetro Spectronic Unicam Genesys 10uv ajustado para 595 nm.

. Quarenta microgramas de cada um dos 13 extratos proteicos obtidos (6 da linhagem SCC-9 Zsg e 7 da linhagem LN-1A) foram misturados com tampão de amostra redutor concentrado quatro vezes contendo 20% do volume total de ditioneitol (DTT, Sigma), fervidos por 5 min e separados por eletroforese em géis de poliacrilamida-SDS a 8% e 10%. Em seguida, as proteínas foram transferidas membranas de nitrocelulose (Hybond, GE Healthcare, EUA.) e coradas com Ponceau S (Sigma) para verificar a eficácia da transferência. As membranas de nitrocelulose de cada uma das linhagens foram cortadas de acordo com o peso molecular das proteínas avaliadas, lavadas em solução contendo 20 mM de Tris-HCl (pH 7,6), 150 mM de NaCl e 1% de Tween 20 (TBST) durante 15 min. e bloqueadas em solução contendo 5% de leite em pó desnatado (Nestlé, Brasil) dissolvido em TBST por uma hora a temperatura ambiente. Os anticorpos primários (tabela 3), diluídos em TBST com 5% de leite em pó desnatado ou 5% de BSA foram incubados “overnight”, sob agitação constante e a 4°C.

Depois da incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas 4 vezes com TBST por 15 min e posteriormente incubadas por uma hora com os respectivos anticorpos secundários, conjugados com peroxidase ou com fluorocromo. Após nova sequência de lavagens em TBST as reações feitas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase

foram reveladas por meio de quimioluminescência (*SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate*, Thermo Scientific, E.U.A.) e as imagens obtidas no equipamento Alliance 4.7 (Uvitec, Cambridge, Inglaterra). As bandas das proteínas avaliadas foram submetidas a análises de densitometria e seus valores normalizados pelo valor da leitura das bandas de β -Actina, com auxílio do programa ImageJ.

Tabela 3. Anticorpos utilizados nas reações de western blotting com extratos proteicos obtidos dos diferentes fenótipos nas linhagens SCC-9ZsG e LN1A.

| Anticorpo | Peso molecular | Diluição | Anticorpo secundário | Marca | Catálogo |
|-----------------|----------------|----------|----------------------|----------------|----------|
| FASN | 265 kDa | 1:3000 | Mouse | BD Biosciences | 610963 |
| ZEB-1 | 200 kDa | 1:1000 | Rabbit | Cell Signaling | D80D3 |
| N - caderina | 140 kDa | 1:1000 | Rabbit | Cell Signaling | D4R1H |
| E- caderina | 135 kDa | 1:1000 | Rabbit | Cell Signaling | 24E10 |
| Vimentina | 57 kDa | 1:1000 | Rabbit | Cell Signaling | D21H3 |
| β -actina | 42 kDa | 1:10000 | Mouse | Sigma | A1978 |
| Slug | 30 kDa | 1:1000 | Rabbit | Cell Signaling | C19G7 |

4.7 Análise dos resultados

Os resultados do presente trabalho foram apresentados como gráficos de colunas e de tendência, geralmente com média \pm desvio padrão. Os resultados de MTT para PTX e cisplatina, foram realizados em três experimentos independentes. O teste de análise de variância (ANOVA) *One Way* foi utilizado e quando se encontrou diferença entre os grupos utilizamos o teste de comparações múltiplas de Dunnet. Nos experimentos de imunofenotipagem, foram realizados dois experimentos independentes e os resultados analisados estatisticamente por meio de análise de variância ANOVA *One Way*. O nível de significância estabelecido foi de 5% ($p < 0,05$). A avaliação dos resultados das proteínas associadas a TEM e FASN foram feitas por densitometria e normalizada com a proteína β -actina. Todos os dados foram analisados com auxílio do programa GraphPad Prism, versão 5.0 e para o cálculo das IC₅₀ por meio do programa CompuSyn (Chou TC e Martin N, 2005).

5 RESULTADOS

5.1 Efeito do PTX sobre a viabilidade das células SCC-9 ZsG e LN-1A e cálculo da IC₅₀

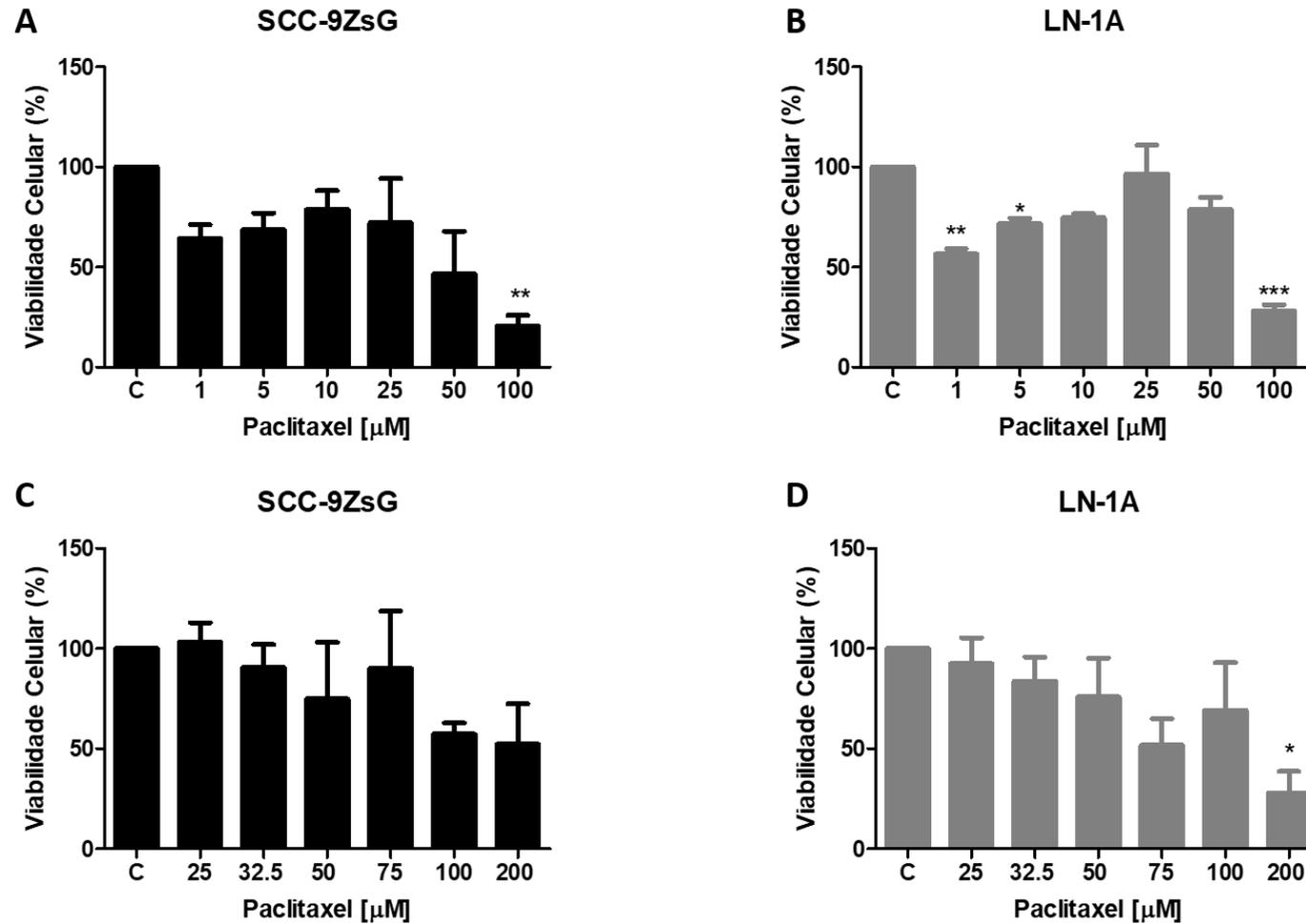
O efeito de PTX sobre a viabilidade das linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A foi avaliado pelo ensaio de MTT após 48 horas de tratamento com doses crescentes da droga em concentrações consideradas baixas (1, 5, 10, 25, 50 e 100 μM) ou altas (25, 32,5, 50, 75, 100 e 200 μM), em DMEM/F12 contendo 10% de SFB.

Nos experimentos realizados com concentrações baixas da droga, observou-se que as linhagens celulares SCC-9ZsG e LN-1A apresentaram redução da viabilidade celular aproximada de 40% na concentração de 1 μM em relação às células controle. Nas concentrações de 5, 10 e 25 μM , as células de ambas as linhagens sobreviveram e, aparentemente, multiplicaram-se. Finalmente, nas concentrações de 50 e 100 μM , a viabilidade celular ficou abaixo de 50% (figura 6A e 6B).

Nos experimentos realizados com a série de concentrações mais altas de PTX, com 25 μM não ocorreram modificações na viabilidade celular em relação aos controles, em ambas as linhagens celulares avaliadas. Nas concentrações de 32,5 e 50 μM , para a linhagem SCC-9ZsG, e de até 75 μM , para a LN1-A, constatou-se uma diminuição na viabilidade celular de cerca de 10 a 15%. Nas concentrações de 75 μM para SCC-9ZsG e de 100 μM para LN-1A, as células mostraram viabilidades semelhantes às dos controles. Já com a concentração de 100 μM , houve diminuição da viabilidade celular das SCC-9 ZsG e com 200 μM , somente a linhagem LN-1A mostrou redução da viabilidade para menos do que 50% (figura 6C y 6D).

Como relatado nos experimentos acima, o padrão de resposta das células SCC-9ZsG e LN-1A ao PTX não produziu uma curva de dose-resposta regular, não sendo possível determinar os seus valores de IC₅₀. Foram escolhidas, portanto, as concentrações de 1 e 50 μM de PTX para os experimentos de imunofenotipagem, considerando que nelas, a viabilidade está relativamente próxima a 50%.

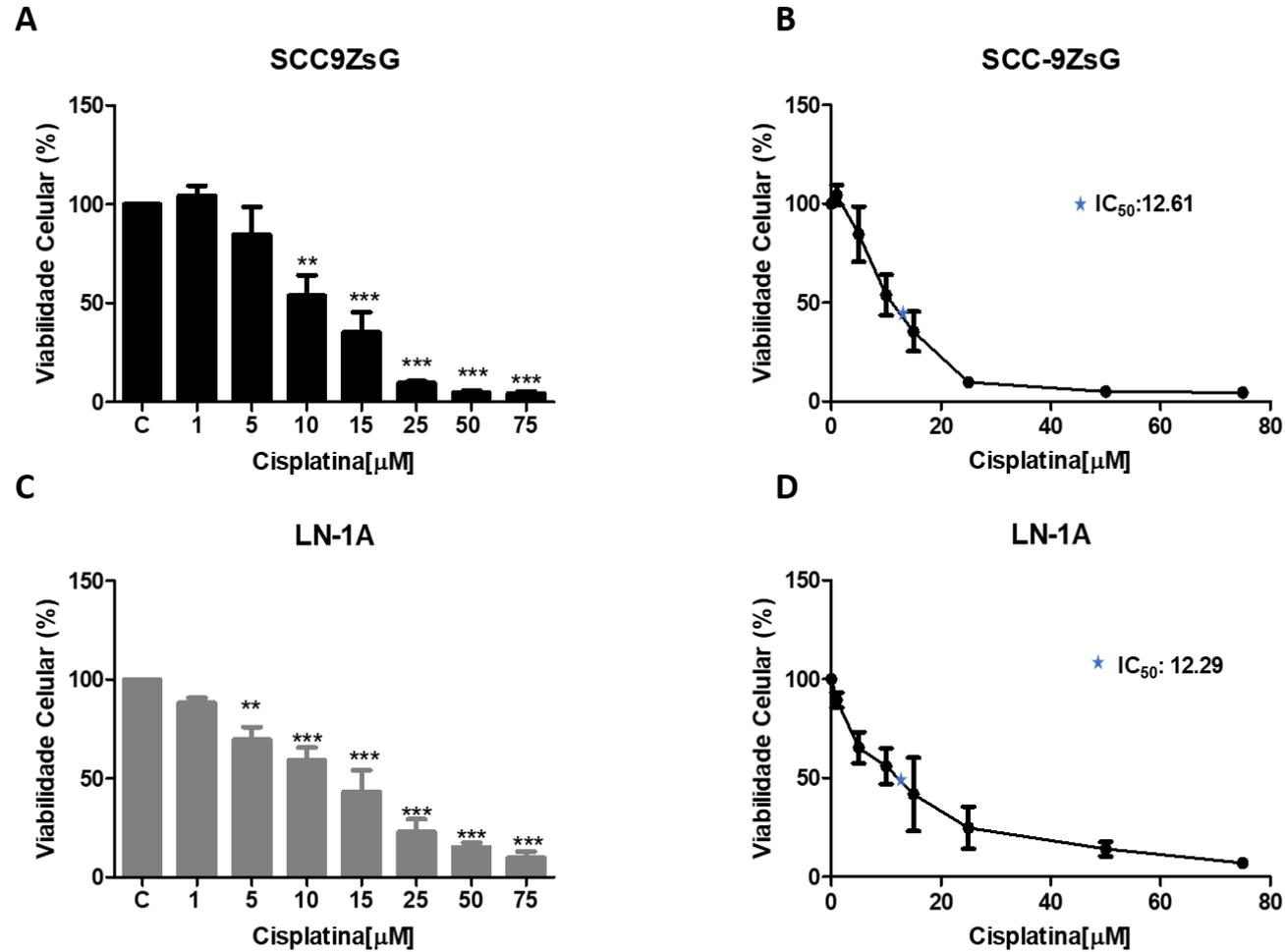
Figura 6. Efeitos do PTX sobre a viabilidade celular nas linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A. PTX não provoca redução na viabilidade das células SCC-9 ZsG e LN-1A de forma dose-dependente. As células SCC-9 ZsG e LN-1A foram tratadas com doses crescentes de Paclitaxel, sendo em A e B baixas e C e D altas, por 48 horas, e a viabilidade determinada pelo método de MTT. Os gráficos representam a média de três experimentos independentes. C: controle; * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$. Anova *One way* com teste de Dunnet.



5.2 Efeito de CIS sobre a viabilidade das células SCC-9 ZsG e LN-1A e cálculo da IC₅₀

O efeito de CIS sobre a viabilidade das linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A foi avaliado pelo ensaio de MTT após 48 horas de tratamento com doses crescentes da droga (1, 5, 10, 15, 25, 50 e 75 μM), diluída em DMEM/F12 contendo 10% de SFB. Neste ensaio, observou-se uma redução da viabilidade celular proporcional ao aumento da dose de cisplatina, em relação aos controles, em ambas as linhagens celulares estudadas. O cálculo da IC₅₀ foi realizado a partir dos valores gerados pelas absorbâncias dos três ensaios independentes realizados para cada uma das linhagens com o auxílio do programa CompuSyn. A IC₅₀ de 12,61 μM foi obtida para as células SCC-9 ZsG (gráficos A e B da figura 7) e a IC₅₀ de 12,29 μM para as LN-1A (gráficos C e D da figura 7). A partir destes resultados, estabeleceu-se o valor de 12 μM e o de 6 μM (metade da IC₅₀) para a realização dos experimentos de imunofenotipagem com ambas as linhagens.

Figura 7. Efeitos de CIS sobre a viabilidade celular nas linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A O tratamento com CIS reduziu a viabilidade das células SCC-9 ZsG e LN-1A de forma gradual, com o aumento da dose do fármaco. SCC-9 ZsG (A) e LN-1A (C) foram tratadas com concentrações crescentes de CIS por 48 horas e a viabilidade determinada pelo método MTT. Os gráficos de tendência obtidos pelo programa Compusyn mostram o valor da IC_{50} para as células SCC-9 ZsG de $12,61\mu M$ (B) e $12,29\mu M$ para LN-1A (D). Os gráficos representam a média de três experimentos independentes. C: controle; ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$. Anova *One way* com teste de Dunnet.



5.3 Imunofenotipagem das células SCC-9 ZsG e LN-1A tratadas com PTX, CIS, TVB-3166 e ORL

As linhagens celulares SCC-9ZsG e LN-1A foram semeadas, carenciadas e tratadas com as drogas aqui estudadas nas suas respectivas IC_{50} e metade da IC_{50} (CIS, TVB-3166 e ORL), ou com 1 e 50 μ M de paclitaxel. As células foram mantidas em cultura por um período de 48 horas, observando-se periodicamente sua morfologia e confluência, antes dos ensaios de imunofenotipagem. Os marcadores CD44 e CD326 foram os escolhidos para as análises deste estudo devido ao fato de apresentarem as maiores modificações tanto na expressão como no tamanho das subpopulações celulares em ambas linhagens celulares com os tratamentos.

5.3.1 Análise da imunoexpressão de CD44 e CD326 após o tratamento com PTX nas linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A

A células sobreviventes, após 48 horas de tratamento com PTX a 1 μ M e 50 μ M, foram coletadas, marcadas com os anticorpos contra as proteínas de superfície CD44 e CD326 e 10.000 eventos analisados no citômetro de fluxo.

As imagens de *dot plots* mostradas na figura 8A mostram que as células SCC-9 ZsG controle são, em sua maioria, duplas positivas para ambos marcadores e que um número reduzido delas apresenta positividade exclusiva para CD326. Nas células tratadas com PTX, a população $CD44^+/CD326^+$ se tornou menor, ao passo que a população positiva somente para CD326 aumentou.

As análises da intensidade média de fluorescência (IMF) realizadas com as células SCC-9 ZsG nos gráficos da figura 8B mostram que houve diminuição significativa da positividade para CD44 no tratamento com 50 μ M de PTX, em relação às células não tratadas. Em contraste, nas células dupla positivas ($CD44^+/CD326^+$), a IMF para CD326 aumentou, assim como na população $CD44^-CD326^+$, em relação às células controle.

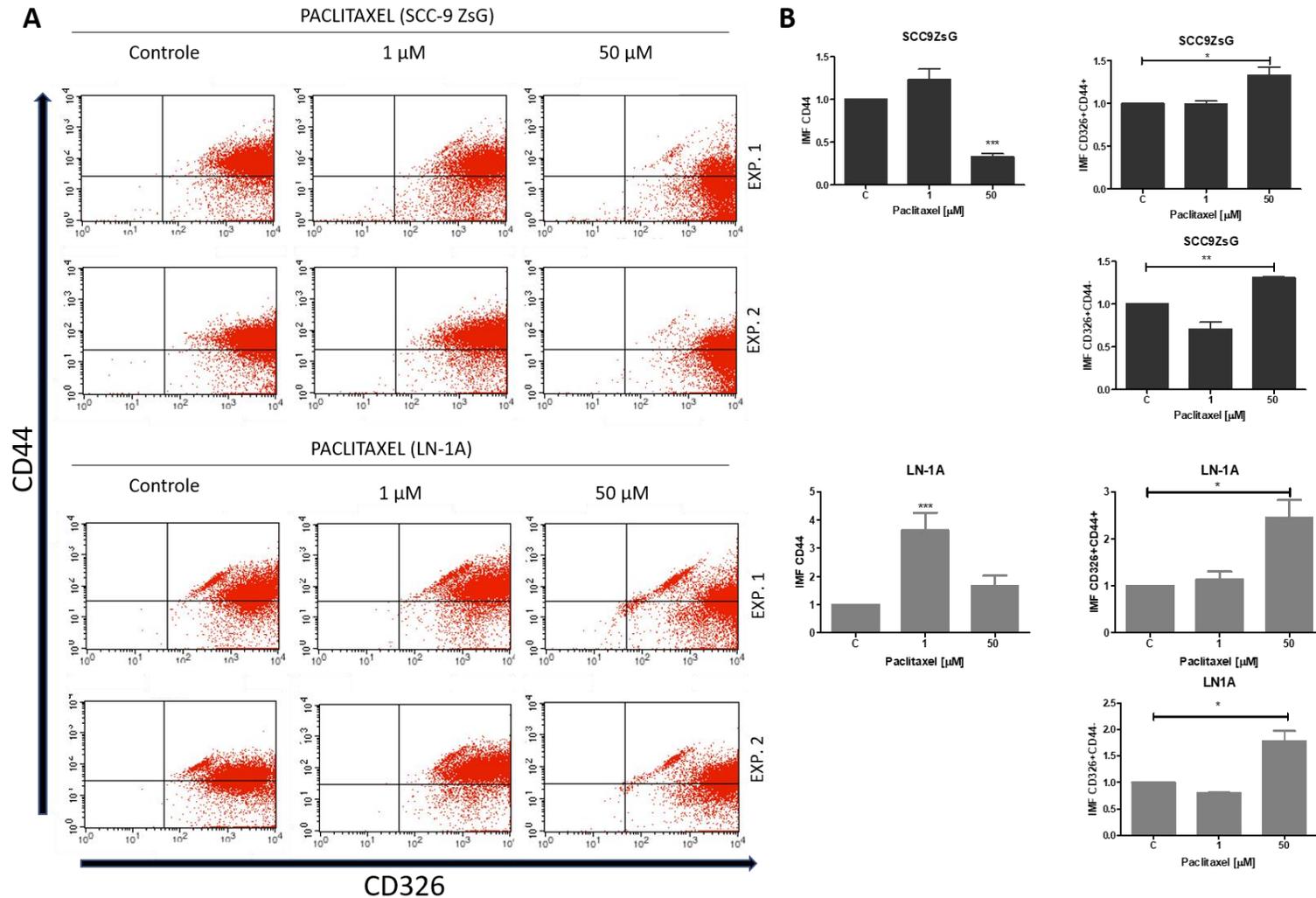
Na linhagem LN-1A, as imagens dos *dot plots* na figura 8A revelam que no tratamento com 1 μ M de PTX a maioria da população é $CD44^+/CD326^+$, ao passo que na concentração de 50 μ M da droga, diminui a população $CD44^+/CD326^+$ e aumenta a população somente $CD326^+$. Um achado interessante foi que, na concentração de 50 μ M, acentuou-se, no quadrante da dupla expressão de CD44/CD326, uma população de células linear, separada da população principal. A partir da posição desta população celular, observa-se que em sua cauda inferior há baixa positividade para CD44/CD326 e que em sua cauda superior estão células com alta expressão de CD44/CD326.

A análise da IMF para CD44 nesta linhagem (figura 8B) mostrou um aumento significativo da expressão nas células tratadas com 1 μ M de paclitaxel, o que não aconteceu na

concentração de 50 μM de PTX. Por outro lado, a IMF para CD326, nas populações $\text{CD44}^+/\text{CD326}^+$ e $\text{CD44}^-/\text{CD326}^+$, aumentou significativamente com o tratamento com 50 μM da droga.

Portanto, a partir dos experimentos acima descritos, pode-se concluir que PTX modifica a expressão de CD44 e CD326, diminui a população dupla positiva ($\text{CD44}^+/\text{CD326}^+$) e aumenta a população $\text{CD44}^-/\text{CD326}^+$ nas duas linhagens estudadas.

Figura 8. (A) Imagens de *dot plot* mostrando a expressão dos marcadores CD44 e CD326 nas linhagens celulares SCC-9 ZsG e LN-1A expostas ao PTX, nas concentrações de 1 ou 50 μM por 48 horas. (B) Análises da IMF para CD44 e CD326 nas mesmas células mostradas em A. Os gráficos de coluna representam a média de dois experimentos independentes. C: controle; * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$. Anova *One way* com teste de Dunnet.



5.3.2 Análise da imunexpressão de CD44 e CD326 após tratamento com CIS nas linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A

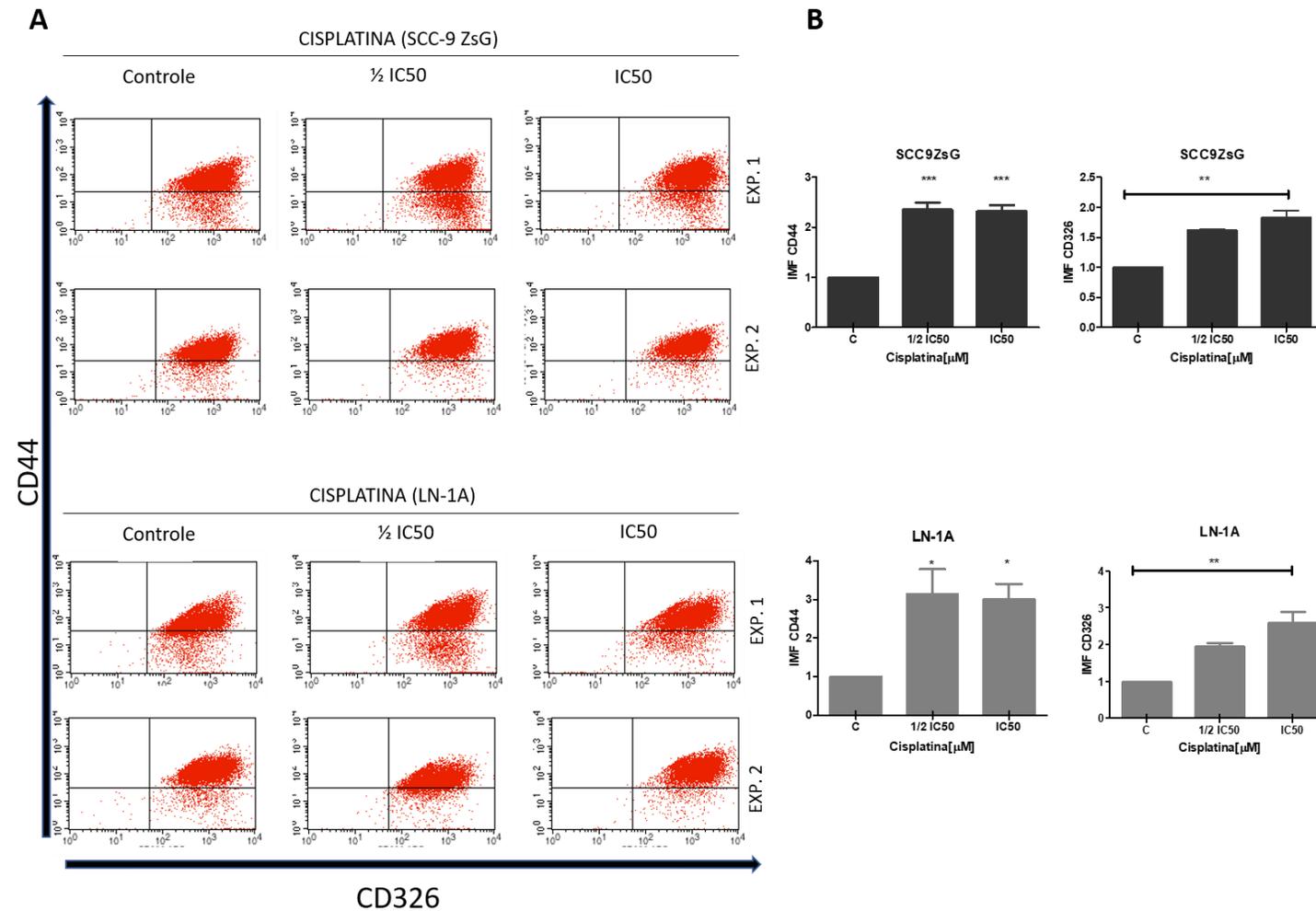
A células sobreviventes, após 48 horas de tratamento com CIS a 12 μM e 6 μM (IC_{50} e sua metade), foram coletadas e marcadas com os anticorpos contra CD44 e CD326 e 10.000 eventos analisados por citometria de fluxo.

Os *dot plots* mostrados na figura 9A evidenciam que, na linhagem SCC-9 ZsG os experimentos 1 e 2 não foram totalmente similares. No primeiro experimento, as células expostas a 6 μM de CIS tiveram aumento da população $\text{CD44}^-/\text{CD326}^+$, o que não foi evidente no experimento 2. A análise dos dois ensaios, revelou aumento gradual da expressão de ambos marcadores nos grupos tratados, em comparação às células controle, o que foi corroborado na análise de IMF exibidos nos gráficos da figura 9B. Observa-se que CD44 é significativamente mais expresso tanto com 6 μM como 12 μM de cisplatina e que, de maneira semelhante, a positividade para CD326 é mais alta com ambas as concentrações da droga.

Na linhagem LN-1A, a figura 9A mostra fenômeno similar ao que ocorreu na linhagem SCC-9 ZsG, ou seja, aumento da população de células $\text{CD44}^-/\text{CD326}^+$ em comparação às células controle, no primeiro experimento. A análise da IMF nestas células (figura 9B) mostra também aumento significativo na positividade para CD44, nas duas concentrações estudadas, ao passo que para CD326 o aumento foi progressivo (figura 9B).

Em resumo, CIS aumenta a expressão de CD44 e CD326 nas linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A.

Figura 9. (A) Imagens de *dot plot* mostrando a expressão dos marcadores CD44 e CD326 nas linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A expostas a CIS em concentrações de 6 μM ($1/2 \text{ IC}_{50}$) e 12 μM (IC_{50}) por 48 horas. (B) Análises da IMF para CD44 e CD326 nas mesmas células mostradas em A. Os gráficos de barra representam a média de dois experimentos independentes. C: controle; * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$. Anova *One way* com teste de Dunnet.



5.3.3 Análise da imunexpressão de CD44 e CD326 após tratamento com TVB-3166 nas linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A

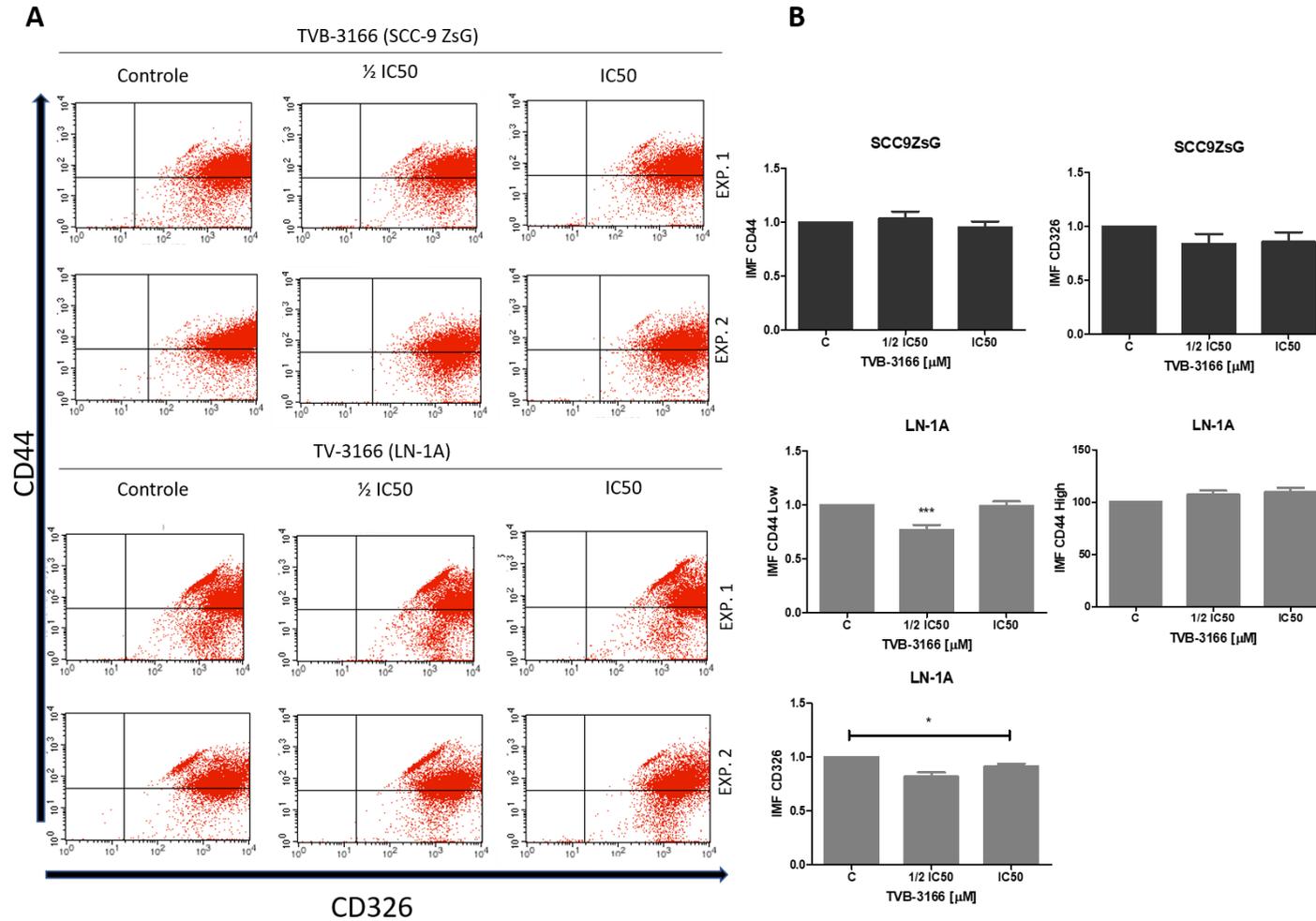
As células que sobreviveram após as 48 horas de tratamento com TVB-3166 a 15 e 30 μM (linhagem SCC-9 ZsG) e 18,5 μM e 37 μM (linhagem LN-1A) foram coletadas, marcadas com os anticorpos contra CD44 e CD326 e 10.000 eventos analisados em citômetro de fluxo.

Os *dot plots* referentes às células SCC-9 ZsG mostrados na figura 10A exibem duas populações, uma delas dupla positiva para CD44/CD326 e a outra CD44⁻/CD326⁺. Nos tratamentos, identificou-se uma discreta diminuição da população com positividade dupla e aumento da população positiva somente para CD326 (principalmente na menor concentração de TVB-3166 do experimento 2). Na análise da IMF para CD44 (figura 10B), não houve diferença de positividade entre as células tratadas e controle, ao passo que CD326 mostrou discreta diminuição, porém não significativa do ponto de vista estatístico, nas duas concentrações testadas (figura 10B).

As células LN-1A (figura 10A) apresentaram características fenotípicas semelhantes às SCC-9ZsG, com populações CD44⁺/CD326⁺ e CD44⁻/CD326⁺ não modificadas pela exposição ao TVB-3166. Com relação à IMF para CD44, observou-se que a linhagem LN-1A (figura 10B) apresentou duas populações, uma com alta e outra com baixa expressão. Nas células com baixa expressão de CD44, esta torna-se significativamente menor na presença de 18,5 μM de TVB-3166, em comparação às células controle. Por outro lado, a população com alta positividade para CD44 não se modificou pelos tratamentos realizados. Por fim, a IMF de CD326 sofreu diminuição significativa pelo TVB-3166 nas duas concentrações estudadas.

Portanto, os estudos acima descritos demonstram que TVB-3166 tem pouco efeito sobre ambas linhagens celulares, tanto nas suas populações CD44⁺/CD326⁺ e CD44⁻/CD326⁺, bem como sobre as IMF de CD44 e CD326.

Figura 10. (A) Imagens de *dot plot* mostrando a expressão de CD44 e CD326 nas linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A expostas a concentrações de 15 e 18,5 μM ($1/2 \text{ IC}_{50}$) ou 30 e 37 μM (IC_{50}) do inibidor de FASN TVB-3166 por 48 horas. (B) IMF de CD44 e CD326 nas mesmas células mostradas em A. Os gráficos de coluna representam a média de dois experimentos independentes. C: controle; * $p < 0,1$, *** $p < 0,0001$. Anova *One way* com teste de Dunnett.



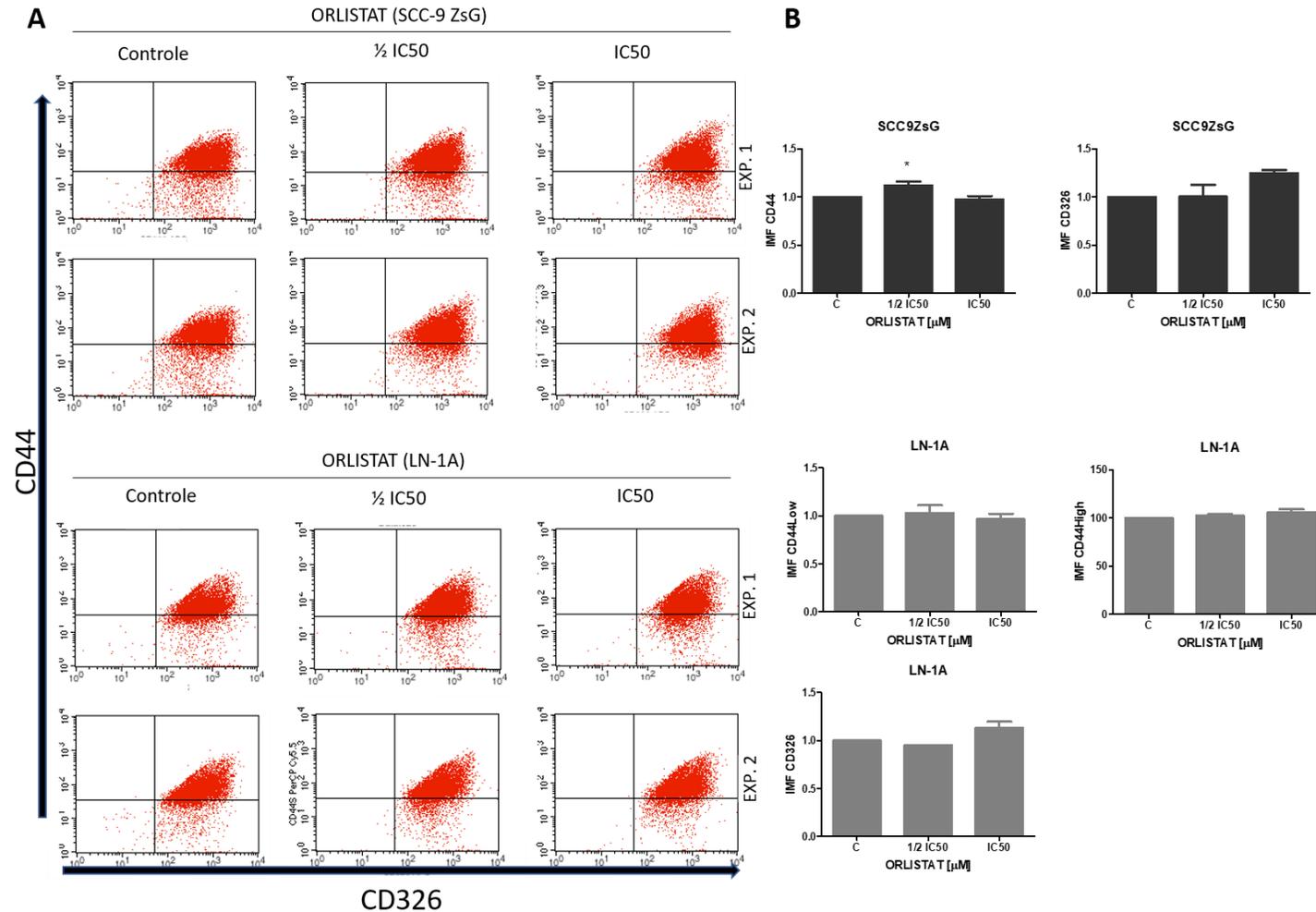
5.3.4 Análise da imunexpressão de CD44 e CD326 após tratamento com ORL nas linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A

As células SCC-9 ZsG e LN-1A, após 48 horas de tratamento com ORL nas concentrações de 140 μ M e 280 μ M, foram coletadas, marcadas com anticorpos contra CD44 e CD326 e 10.000 eventos analisados por citometria de fluxo.

Os *dot plots* da figura 11A representam a dupla marcação para CD44 e CD326 nos dois experimentos realizados com as linhagens celulares SCC-9 ZsG e mostram uma população, em sua grande maioria, dupla positiva CD44⁺/CD326⁺ e outra menor CD44⁻/CD326⁺, que mantiveram-se constantes após os tratamentos com ORL. A IMF de CD44 apresentou aumento discreto, porém significativo do ponto de vista estatístico (figura 11B) nas células tratadas com a metade do IC₅₀ da droga (140 μ M). Por sua vez, a IMF de CD326 também foi levemente aumentada nas células expostas a IC₅₀ (280 μ M) de ORL, porém sem diferença estatisticamente significativa.

As populações celulares da linhagem LN-1A controle (figura 11A) mostraram-se muito semelhantes aquelas encontradas na SCC9-ZsG e também não foram modificadas pelo tratamento com ORL. A figura 11B mostra que a IMF para CD44 e CD326 não foram modificadas após a exposição a de ORL.

Figura 11. (A) Imagens de *dot plot* mostrando a expressão de CD44 e CD326 nas linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A expostas a concentrações de 140 μM ($1/2 \text{ IC}_{50}$) e 280 μM (IC_{50}) de ORL por 48 horas. (B) IMF para CD44 e CD326 nas mesmas células mostradas em A. Os gráficos de coluna representam a média de dois experimentos independentes. C: controle; * $p < 0,01$. Anova *One way* com teste de Dunnet.



5.4 Fenótipos celulares isolados a partir da marcação para CD44 e CD326 nas linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A

As linhagens celulares SCC-9 ZsG e LN-1A, foram semeadas e após três dias em cultura, com confluência aproximada de 60-80%, foram coletadas e submetidas à marcação com os anticorpos contra CD44 e CD326. Após a aquisição de 10.000 eventos em citômetro de fluxo FACS Aria™ Fusion, os distintos fenótipos foram analisados para cada linhagem, com o software FACSDiva 8.0.1, para posterior isolamento.

5.4.1 Isolamento de subpopulações celulares a partir da linhagem SCC-9 ZsG

Como mostrado anteriormente nesta tese, a maior parte das células SCC-9 ZsG (figura 12A) foi dupla positiva para CD44 e CD326. No entanto, foi possível construir seis *gates* para isolar 6 fenótipos com características distintas de marcação. Cada fenótipo isolado foi identificado por letras minúsculas do alfabeto seguindo-se o sentido anti-horário a partir do quadrante de dupla negatividade em direção ao quadrante de positividade exclusiva para CD326 (tabela 4). Desta maneira o fenótipo (a) corresponde às células dupla negativas (CD44⁻/CD326⁻), o fenótipo (b) às células CD44⁺/CD326⁻, o fenótipo (c) às células CD44⁺/CD326^{low}, o fenótipo (d) às células CD44^{High}/CD326^{High}, o fenótipo (e) às células CD44^{low}/CD326^{High} e, por fim, o fenótipo (f) às células CD44⁻/CD326⁺.

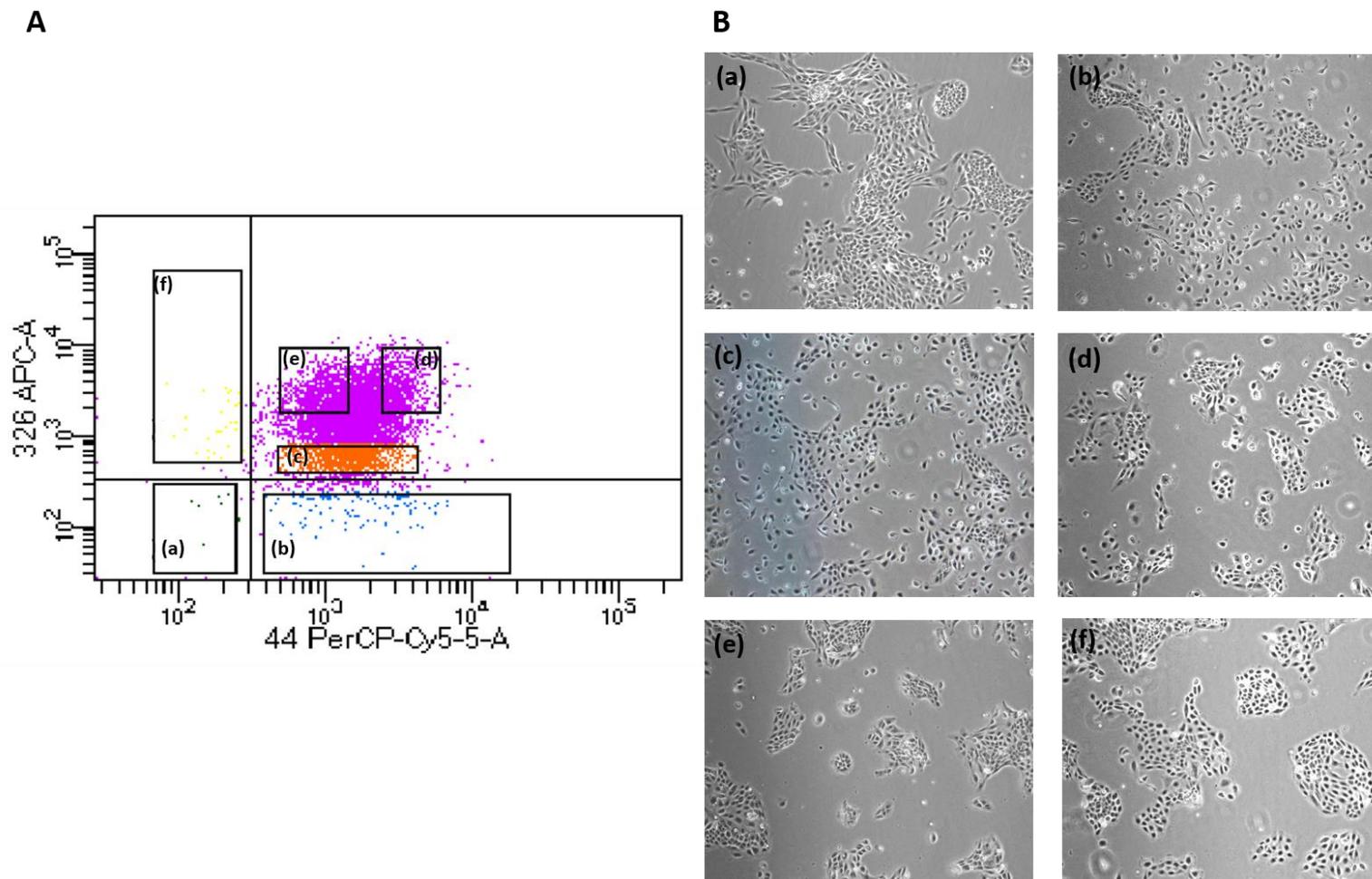
Tabela 4. Fenótipos celulares isolados a partir da linhagem SCC-9 ZsG

| SCC9 ZsGreen P44 | | |
|------------------|------|-------|
| CÓDIGO | CD44 | CD326 |
| (a) | - | - |
| (b) | + | - |
| (c) | + | Low |
| (d) | High | High |
| (e) | Low | High |
| (f) | - | + |

A figura 12B, com imagens de fotomicrografias, ilustra as subpopulações isoladas a partir das células SCC-9 ZsG e seus respectivos aspectos morfológicos em microscopia de contraste de fase. Na população SCC-9 ZsG (a), negativa para CD44 e CD326, observou-se células alongadas ou poligonais, sendo as últimas predominantes. As células SCC-9 ZsG (b), (c) e (d) apresentam três tipos morfológicos celulares, poligonais, alongadas ou fusiformes e arredondadas, sendo que as células poligonais formam ninhos, eventualmente unidos entre si

por células alongadas ou fusiformes. As células arredondadas estão posicionadas de forma isolada entre os ninhos. A principal diferença entre os três fenótipos está na diminuição das células de formato arredondado, mais numerosas no fenótipo (b) e menos observadas no fenótipo (d). As células SCC-9 ZsG (e), com fenótipo CD44^{low}/CD326^{High}, crescem em ninhos de células poligonais na sua porção central com células alongadas na periferia e com menor número de células arredondadas. Por fim, as células SCC-9 ZsG (f), com fenótipo CD44⁻/CD326⁺, são caracteristicamente poligonais, formando grandes ninhos com eventuais células alongadas na periferia, sem células isoladas entre os ninhos.

Figura 12. (A) Imagem de *dot plot* da linhagem SCC-9 ZsG após imunomarcagem de CD44 e CD326 e seleção dos 6 *gates* para isolamento dos diferentes fenótipos (subpopulações celulares). (B) Fotomicrografias obtidas em microscopia de contraste de fase de cada um dos fenótipos isolados: (a) CD44⁻/CD326⁻, (b) CD44⁺/CD326⁻, (c) CD44⁺/CD326^{low}, (d) CD44^{High}/CD326^{High}, (e) CD44^{low}/CD326^{High} e (f) CD44⁻/CD326⁺. Aumento original: 40X.



5.4.2 Isolamento de subpopulações celulares a partir da linhagem LN-1A

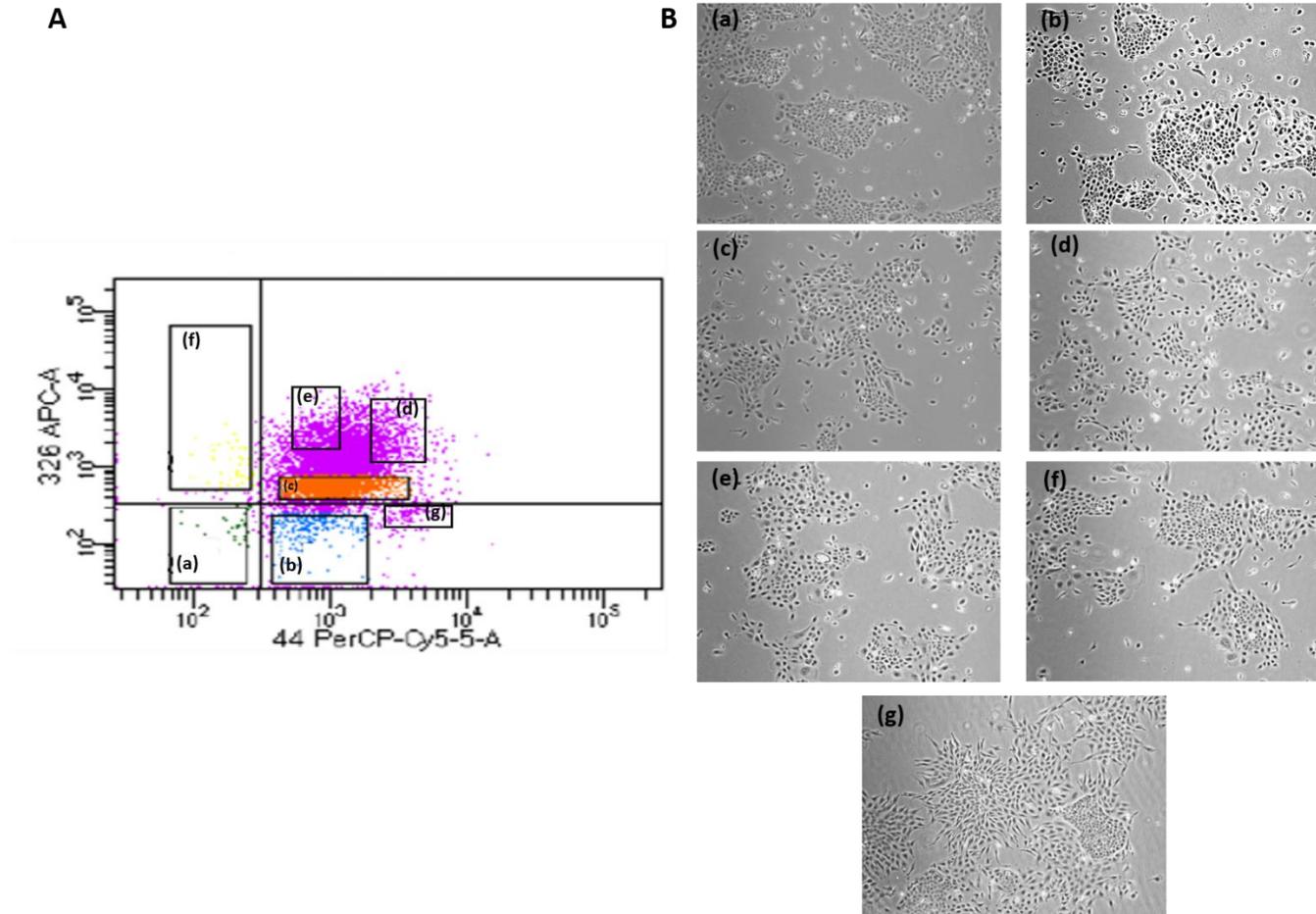
Foi possível construir sete *gates* para isolar fenótipos distintos a partir da linhagem LN-1A. Assim como para as células SCC-9 ZsG, cada fenótipo isolado foi identificado por letras minúsculas seguindo o sentido anti-horário nos quadrantes do gráfico de *dot plot* (figura 13A). O fenótipo (a) corresponde às células CD44⁻/CD326⁻, o fenótipo (b) às células CD44⁺/CD326⁻, o fenótipo (c) às células CD44⁺/CD326^{low}, o fenótipo (d) às células CD44^{High}/CD326^{High}, o fenótipo (e) às células CD44^{low}/CD326^{High}, o fenótipo (f) às células CD44⁻/CD326⁺ e, por fim, o fenótipo (g) contém células CD44^{High}/CD326⁻ que foi encontrado somente na linhagem LN-1A (tabela 5).

Tabela 5. Fenótipos celulares isolados a partir da linhagem metastática LN-1A.

| LN-1A P11 | | |
|-----------|------|-------|
| CÓDIGO | CD44 | CD326 |
| (a) | - | - |
| (b) | + | - |
| (c) | + | Low |
| (d) | High | High |
| (e) | Low | High |
| (f) | - | + |
| (g) | High | - |

A figura 13B ilustra as subpopulações isoladas a partir das células LN-1A e seus respectivos aspectos morfológicos em microscopia de contraste de fase. As células LN-1A (a), com fenótipo CD44⁻/CD326⁻, são poligonais e crescem formando ninhos com eventuais células alongadas em sua periferia. Nos fenótipos LN-1A (b), (c), (d) a maioria das células é poliédrica com eventuais células alongadas ao redor conectando um ninho ao outro, e abundantes células arredondadas ou alongadas com escasso citoplasma, dispersas entre os ninhos melhor observado na fotomicrografia do fenótipo (b). O fenótipo LN-1A (e) e (f), apresentam predomínio de ninhos celulares com tamanhos variáveis, além de algumas células isoladas alongadas e de citoplasma escasso entre os ninhos. Por fim, a população LN-1A (g), CD44^{High}/CD326⁻, é composta, em sua maioria, por células alongadas que se agrupam formando ninhos com células centrais de formato poliédrico e escasso citoplasma.

Figura 13. (A) Imagem de *dot plot* da linhagem LN-1A após imunomarcção de CD44 e CD326, no qual estão representados 7 *gates* delimitando os diferentes fenótipos que foram isolados. (B) Fotomicrografias em contraste de fase das subpopulações isoladas: (a) CD44⁻/CD326⁻, (b) CD44⁺/CD326⁻, (c) CD44⁺/CD326^{low}, (d) CD44^{High}/CD326^{High}, (e) CD44^{low}/CD326^{High}, (f) CD44⁻/CD326⁺ e (g) CD44^{High}/CD326⁻. Aumento original: .40X.



5.5 Produção de FASN e de proteínas associadas a TEM nos diferentes fenótipos celulares isolados das linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A

Após a obtenção dos extratos proteico de cada um dos fenótipos celulares, a expressão proteica de FASN, e-caderina, n-caderina vimentina e slug foram analisadas pela técnica de western blotting. A densitometria foi realizada com o auxílio do programa Image J e os valores foram normalizados pela β -actina.

5.5.1 Linhagem SCC-9 ZsG

A figura 14A mostra que de todos os fenótipos da linhagem SCC-9 ZsG produzem a proteína FASN, sendo discretamente maior nos fenótipos (d) e (f). A análise densitométrica mostra que o extrato proteico do fenotipo (d) conta com mais FASN e o fenotipo (b) menos.

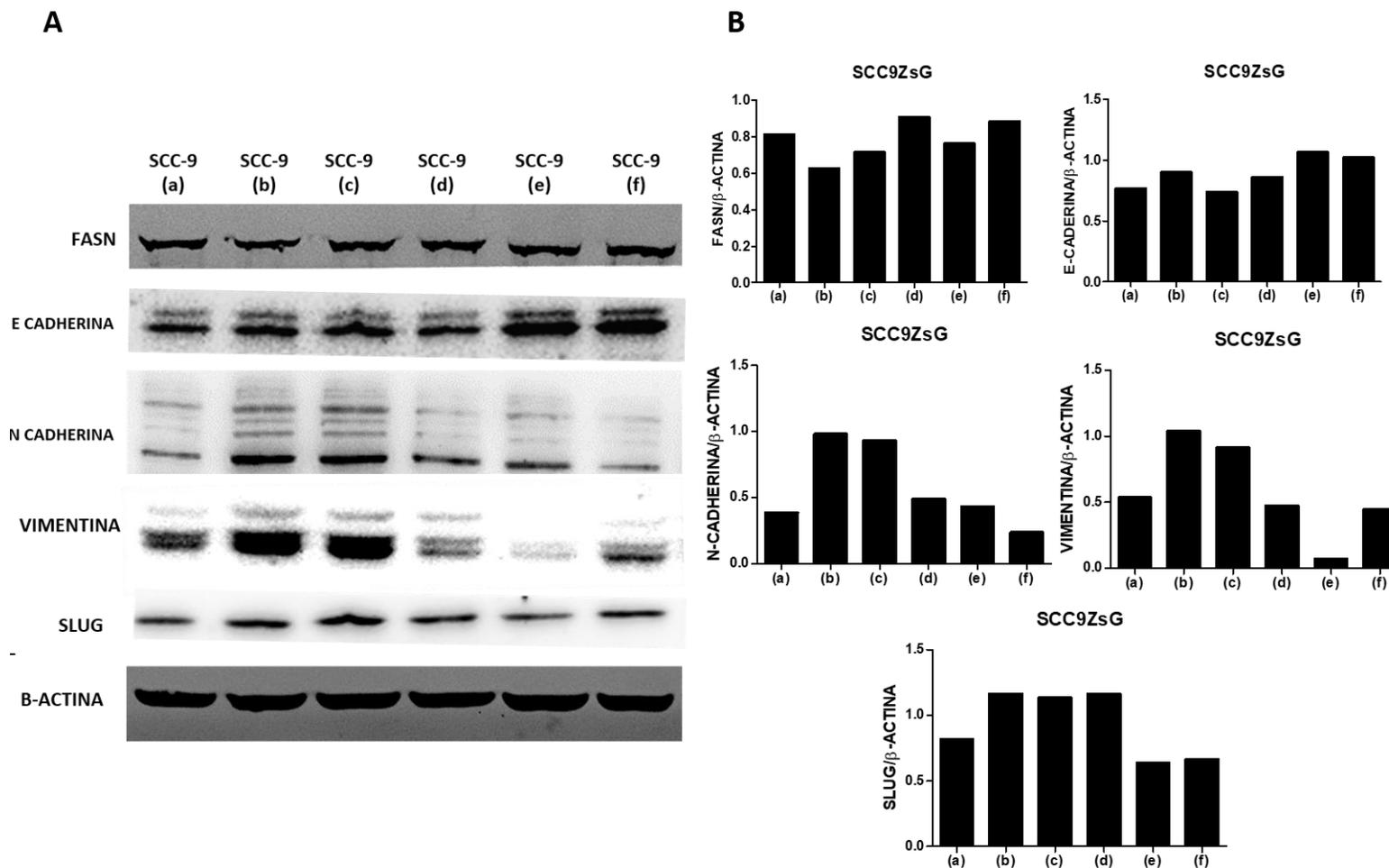
Em relação a proteína e-caderina, a Figura 14A mostra que todos os fenótipos a produzem, na forma de duas bandas, sendo as de menor massa molecular aquelas com maior intensidade. Os fenótipos (e) e (f) da linhagem SCC-9 ZsG apresentaram as bandas mais fortes e o fenotipo (b) as mais fracas. A análises de densitometria (Figura 9B) confirmaram totalmente o resultado, apontando o fenotipo (e) como maior produtor de e-caderina.

Todos os fenótipos produzem n-caderina, caracterizada por múltiplas bandas (desde 140 kDa até 100 kDa). Os fenótipos (b) e (c) da linhagem SCC-9 apresentaram as bandas mais fortes e o fenotipo (f) as de menor intensidade, o que foi confirmado na análise densitométrica (figura 14B).

Vimentina é também produzida pelos 6 fenótipos da linhagem SCC-9 ZsG e representada por até 3 bandas naqueles com maior quantidade da proteína (Figura 14A). Nos fenótipos (b) e (c) as bandas foram mais intensas em comparação com o fenotipo (e), as bandas de menor intensidade dentre os fenótipos estudados. Estes resultados foram confirmados pela análise densitométrica (figura 14B).

Para finalizar, a proteína slug é mais abundante nos fenótipos (b) e (c), que apresentam bandas mais fortes de intensidade similar, ao passo que nos fenótipos (e) e (f) as bandas são as mais fracas. A análise densitométrica mostra o fenotipo (b) como tendo a banda mais intensa e o fenotipo (e) com a mais fraca.

Figura 14. (A) Western blotting para detecção de FASN e proteínas associadas à TEM com proteínas extraídas dos 6 fenótipos isolados a partir da linhagem SCC-9 ZsG. (B) Análise densitométrica das bandas obtidas em A, após normalização pelas bandas de β -actina.



5.5.2 Linhagem LN-1A

Como mostrado na figura 15A, todos os fenótipos obtidos a partir da linhagem LN-1A produzem a proteína FASN, sendo as bandas mais fortes encontrada nos fenótipos (a) e (f) e a de menos intensidade no fenótipo (g), o que foi em seguida confirmado pela análise densitométrica (figura 15B).

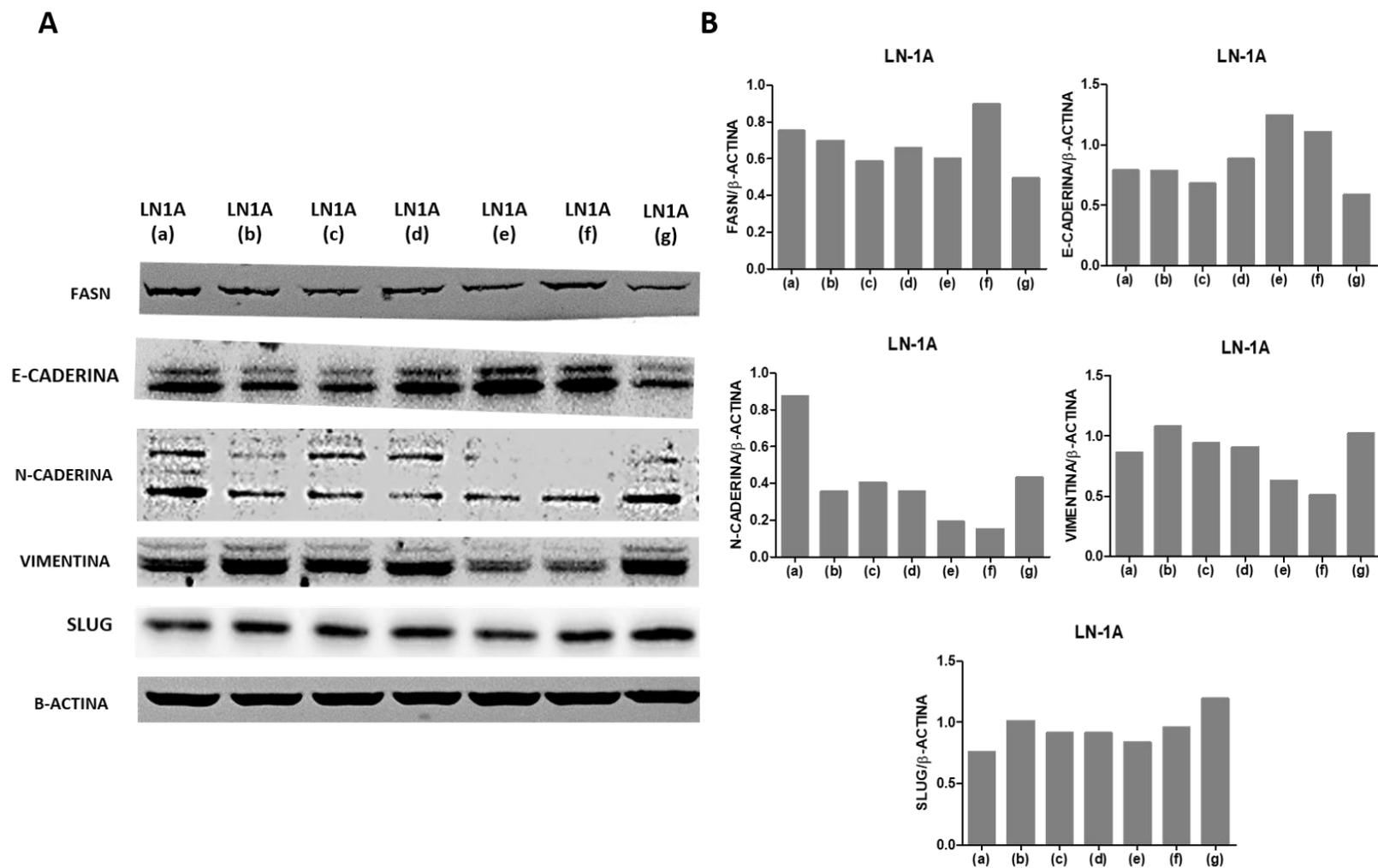
E-caderina, por sua vez, foi representada em todos os fenótipos avaliados como uma banda dupla. Os fenótipos (e) e (f) apresentam as bandas mais intensas em comparação com os demais e o fenótipo (g) exibiu a menor quantidade desta proteína. A figura 15B corresponde a análise da densitometria das bandas de e-caderina.

N-caderina (figura 15A) também foi encontrada nos extratos proteicos dos 7 fenótipos isolados da linhagem metastática LN-1A. Os fenótipos (a) e (g) produzem mais n-caderina que os demais, enquanto (e) e (f) são os aqueles com menor quantidade desta proteína (figura 15A e B).

Com relação à proteína vimentina, os fenótipos (b) e (g) mostram as bandas com maior intensidade e o fenótipo (f) a banda mais fraca, o que foi corroborado na análise densitométrica (figura 15B).

Na figura 15A também pode-se observar que as bandas correspondentes a slug foi de intensidade semelhante em todos os fenótipos estudados, sendo observada a banda menos intensa no fenótipo (a) e a mais intensa no fenótipo (g), o que pôde ser confirmado pela densitometria das bandas correspondentes normalizadas pelas bandas de β -actina (figura 15B).

Figura 15. (A) Western blotting usando proteínas extraídas dos 7 fenótipos isolados a partir da linhagem LN-1A para a detecção de FASN e de proteínas associadas a TEM. (B) Análise densitométrica das bandas observadas em A normalizadas pelas respectivas bandas de β -actina.



6 DISCUSSÃO

Apesar de, nas últimas décadas, avanços importantes na prevenção, detecção e tratamento de uma ampla variedade de tipos de neoplasias malignas sólidas terem sido alcançados, o câncer continua sendo um dos problemas de saúde mais significativos em todo o mundo. A GLOBOCAN (Ferlay, et al. 2018) reportou, a nível mundial para o ano 2018, que o câncer de lábio e da cavidade bucal representaram 354.864 novos casos, com 177.384 mortes. No Brasil, segundo dados descritos na Estimativa 2018 Incidência de Câncer no país (INCA, 2017), o CCEO corresponde ao quarto tumor mais frequente no sexo masculino na região sudeste. O CCEO está associado a índices consideráveis de recorrências precoces e metástases linfonodais, o que faz da sua abordagem terapêutica um desafio, pois é prejudicada por um diagnóstico relativamente tardio quando nem mesmo as mais avançadas técnicas de cirurgia e/ou radio e quimioterapia conseguem evitar altas taxas de morbidade e mortalidade. Na última década, diversos estudos têm indicado que a provável causa para estas falhas no tratamento de diversas neoplasias malignas humanas é a presença das CTC, uma pequena população de células tumorais autorrenováveis e capazes de se diferenciarem em outras células constituintes da massa tumoral. Uma das características das CTC é a resistência a agentes quimioterapêuticos, que pode contribuir para a persistência de células tumorais residuais após o tratamento (Chiodi et al., 2011).

Os primeiros ensaios desta tese foram realizados para se estabelecer a IC50 de PTX e CIS nas linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A, para, em seguida, avaliar seus efeitos sobre a expressão dos marcadores de CTC CD44 e CD326. O PTX não reduziu a viabilidade das duas linhagens estudadas, ao contrário do observado anteriormente por nosso grupo (Almeida, 2015; Moreira, 2017). Alguns mecanismos são conhecidos na resistência das células tumorais ao taxol, entre os quais se incluem: alta expressão da glicoproteína P da membrana, que funciona como uma bomba de efluxo de drogas, alterações na estrutura da tubulina, alterações na afinidade de ligação dos microtúbulos e desregulação do ciclo celular (Gottesman e Pastan, 1993; Panda et al., 1994; Goncalves et al., 2001; Tan et al., 2002; Martello et al., 2003; Lu et al., 2009). No entanto, mecanismos moleculares envolvidos na resistência ao taxol ainda não são totalmente compreendidos.

Em contraste, CIS foi capaz de reduzir a viabilidade celular das linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A de maneira dose-dependente, o que permitiu o cálculo dos valores de IC50 de 12,61 μM e 12,29 μM , respectivamente. Elias et al., em (2015), por meio de ensaios de MTT com a linhagem SCC-9, sendo CIS o controle e a combinação de CIS (dose de 0-200 $\mu\text{g/mL}$) PTX e

5-fluoracil (TPF) as drogas avaliadas por 24 horas, demonstrou que CIS e TPF foram citotóxicas para SCC-9 sem diferença estatística entre elas. Estes mesmos autores mostraram que a CIS induziu um aumento da toxicidade até a concentração de 100 µg / mL, com clara resposta dose-dependente, no entanto, a concentração mais alta, 200 µg / ml, não resultou em uma redução significativa na viabilidade em comparação com 100 µg / mL. Da mesma forma, no estudo de Xu et al. em (2017), no ensaio de viabilidade celular na linhagem SCC-9 com CIS em doses de 0-32µM por 48 horas, demonstrou-se diminuição dose-dependente da viabilidade celular da linhagem SCC-9. Tais resultados são compatíveis com os dados apresentados em nosso trabalho com as linhagens SCC-9ZsG e LN-1A. Jo et al. (2016), demonstraram, com três linhagens de CCEO, redução da viabilidade celular com CIS a partir de valores de IC50 entre 7,9 µg/mL a 8.9 µg/mL. Em contraste, a resistência a CIS tanto “in vitro” como na clínica tem sido muito bem descrita em CCE de cabeça e pescoço e oral (Kato et al., 2000; Yamano et al., 2010), assim como em outros tipos de câncer (Galluzzi et al., 2012).

Em relação aos ensaios de viabilidade celular realizados por nosso grupo de pesquisa, com os inibidores de FASN ORL e TVB-3166 a IC50 encontrada para ORL foi de 280 µM e para o TVB-3166 foram de 30 µM e 37 µM para SCC-9 ZsG e LN-1A, respectivamente (Moreira FS., 2017 e Aquino IG, 2019, dados ainda não publicados).

No presente estudo, a presença de prováveis CTC tanto na linhagem celular SCC-9 ZsG e na sua derivada metastática LN-1A foi avaliada por meio da expressão dos marcadores de superfície CD44, CD326, CD133 e CD271 em citômetro de fluxo. Para isto, as células foram previamente submetidas a tratamentos com PTX, CIS, TVB-3166 e ORL, com o intuito de selecionar e isolar prováveis CTC após exposição a estas drogas.

As linhagens celulares SCC-9 ZsG e LN-1A, como observado em nosso trabalho, são em sua grande maioria positivas tanto para CD44 como para CD326, com uma menor proporção de suas células positivas somente para CD326. No entanto, ao serem submetidas ao tratamento com PTX na concentração de 50 µM, houve redução do número de células duplas positivas para CD44 e CD326 e aumento da quantidade de células que positivas somente para CD326, o que foi mais evidente na linhagem SCC-9 ZsG. Além disto, observou-se que o tratamento com PTX reduziu significativamente a IMF para CD44. De fato, Yan et al. (2011) demonstraram que taxol e etopósido podem atingir diretamente células iniciadoras de tumor CD44+, causando redução da população CD44+ na linhagem celular DU145, derivada de câncer de próstata. Este fenômeno foi anteriormente demonstrado no trabalho de Aulmann et al. no (2010), realizado em biopsias e peças cirúrgicas de câncer de mama por meio de imunofluorescência para CD44 e CD24. Estes autores observaram que a combinação de vários quimioterápicos

(epirubicina/ciclofosfamida, doxorubicina/ciclofosfamida/docetaxel, dentre outras), reduz significativamente a quantidade de células CD44+/CD24-. Embora não tenha sido observada uma associação entre a frequência de células CD44+/CD24- e a resposta à quimioterapia ou sobrevida do paciente, neste mesmo trabalho pacientes com tumores que continham alta contagem de células CD44+/CD24- desenvolveram metástases ósseas com mais frequência. De acordo, já foi sugerido que populações CD44+/CD24- no câncer de mama podem não estar associadas ao resultado clínico e à sobrevida dos pacientes, mas sim favorecer metástases à distância (Abraham et al., 2005).

Como descrito em revisão sobre câncer de mama (Zasadil et al., 2014), os níveis de PTX nos tumores primários estão bem abaixo dos necessários para provocar uma redução mitótica sustentada, motivo pelo qual tem desenvolvidas novas tecnologias, visando melhorar a capacidade de penetração desta droga no tumor, em doses menores, e melhorar sua efetividade. Um exemplo disto são as nanopartículas HydroHA carregadas especificamente com PTX, que são capazes de absorver efetivamente o medicamento altamente hidrofóbico, mostraram citotoxicidade seletiva para células cancerosas que superexpressam o marcador de superfície CD44 (Zasadil et al., 2014). Outros estudos combinaram a tecnologia de nanopartículas biotinizadas com radioimunoterapia prévia, marcando inicialmente as células CD44 positivas para poder fazer em seguida o uso das nanopartículas de PTX biotinizadas direcionadas contra estas células, melhorando assim a eficácia e distribuição do medicamento. (Saravanakumar et al., 2010; Bushman et al., 2013).

Com relação ao aumento do número de células positivas somente para CD326 em ambas linhagens celulares aqui estudadas, que foi acompanhado de aumento significativo da IMF para este marcador, fenômeno semelhante foi observado em três linhagens celulares derivadas de câncer de mama, que mostraram aumento de número de células CD44+/CD24-/CD326+ depois do tratamento com PTX (Fillmore e Kuperwasser, 2008). Os mesmos autores demonstraram em modelo ortotópico, que as células CD44+/CD24-/CD326+ têm propriedades de autorrenovação e que são necessárias apenas 100 células para formação tumoral, em comparação com as 100.000 células CD44+/CD24- necessárias para produzir um tumor. Em outras palavras, a adição do marcador CD326 é suficiente para aumentar a capacidade de formação tumoral (Fillmore e Kuperwasser, 2008).

No presente trabalho, CIS não modificou a distribuição das células das linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A. No entanto, a IMF para CD44 aumentou significativamente em ambas as linhagens em decorrência do tratamento com as duas concentrações de CIS estudadas. De acordo, foi observado por Naik et al. (2018) que células FADU (derivadas de carcinoma de

hipofaringe) resistentes a CIS apresentaram maior expressão de CD44 assim como de outras enzimas associadas à resistência a quimioterápicos, como ABCB1 (glicoproteína P) e ADAM17. Neste mesmo estudo, uma análise retrospectiva da expressão de CD44, ABCB1 e ADAM17 e sua correlação a fatores clínico-patológicos em 60 biopsias de pacientes com CCEO demonstrou que a coexpressão de CD44/ABCB1/ADAM17 correlaciona-se significativamente com tumores pobremente diferenciados. Ghosh et al. (2016) desenvolveram duas linhagens celulares de CCEO resistentes a CIS e, por meio de western blotting, demonstraram que estas tiveram um aumento na produção de marcadores de CTC em comparação com as células parentais. Mais especificamente, estes autores observaram aumento na expressão de CD44, c-Myc, Oct-4, assim como de proteínas associadas a quimioresistência e sobrevivência, como-glicoproteína-P, survivina e β -catenina. É importante também salientar que a expressão de CD44 é consideravelmente mais alta na linhagem celular SCC084/R (proveniente de um CCEO recorrente) do que na linhagem celular SCC131/R, de origem primária, indicando, juntamente com resultados de outros autores, que CD44 está correlacionado com a recorrência local no CCEO e no CCE de cabeça e pescoço (Valiyaveedan, 2015; Sawant et al., 2016).

Nikitakis et al. (2018) descreveram aumento da expressão proteica de vários marcadores associados a CTC, como CD44, ALDH1, ABCG2 e Bmi1, como consequência do tratamento com CIS em diferentes linhagens celulares derivadas de CCEO. No presente trabalho, a IMF para CD326 também foi influenciada pela CIS, que provocou aumento significativo e gradativo da positividade para este marcador tanto na linhagem SCC-9 ZsG como na LN-1A. Aumento da expressão de CD326 foi descrito previamente em células tumorais obtidas da ascite de pacientes com câncer ovário, as quais depois de serem isoladas foram tratadas com CIS a 2,5 μ g/mL, mostraram maior positividade para outros marcadores de CTC, como CD44, CD117 e CD133 (Latifi et al., 2011). Mais recentemente, Sun et al. (2018) descreveram que na linhagem celular OE-19, derivada de adenocarcinoma da junção esôfago-gástrica, após o tratamento com uma combinação de CIS, adriamicina e 5-fluorouracil, exibiu incremento na quantidade de células CD326 positivas. Estes mesmos autores mostraram por meio de western blotting, que as células derivadas de mucosa esofágica benigna ou de mucosa esofágica de Barret (pré-maligna) não produzem a proteína CD326.

Nosso grupo de pesquisa tem estudado há vários anos compostos que inibem a enzima FASN, principalmente ORL. Estes trabalhos demonstraram sua eficácia em linhagens celulares e modelos animais de CCEO e de melanoma pela redução da proliferação, aumento das taxas de apoptose, diminuição da disseminação metastática, além da modulação tanto da angiogênese

como da linfangiogênese (Carvalho et al., 2008; Seguin et al., 2012; Agostini et al., 2014; Almeida LY, 2015; Bastos et al., 2017; Moreira FS, 2017). Também em nosso laboratório, outro estudo identificou CTC com marcadores de superfície por meio de citometria de fluxo, nas linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A (Cuadra Zelaya FJM, 2016) Recentemente, novos e potentes inibidores de FASN têm sido desenvolvidos, como é o caso do fármaco TVB-3166 e seus análogos, com atividade antitumoral em linhagens celulares e modelos animais de diversas neoplasias malignas reforçam as evidências de que a inibição de FASN com esta família de fármacos pode representar uma estratégia futura para o tratamento do câncer (Ohol et al., 2015; Ventura et al., 2015; Heuer et al., 2017; Zaytseva et al., 2018; Jafari et al., 2019; Tao et al., 2019). O TVB-2640, um dos análogos do TVB-3166, está no momento sendo testado em fase clínica em pacientes com tumores sólidos (ClinicalTrials.gov:NCT03179904) em forma de monoterapia ou combinado com outros agentes como PTX, apresentando excelente biodisponibilidade pela via oral e evidências de tolerabilidade clínica satisfatória (O'Farrell, et al. 2015; Dean et al., 2016).

Em nossas mãos, TVB-3166 mostrou efeito antitumoral sobre a linhagem celular SCC-9 ZsG e sua derivada metastática LN-1A, com diminuição da viabilidade celular, acúmulo das células na fase G0/G1 e redução da fase S, retardo da capacidade migratória (apenas nas células SCC-9 ZsG) e aumento da adesão à matriz extracelular (Aquino IG, 2019). As IC50 de TVB-3166 utilizadas no presente estudo foram obtidas durante a pesquisa acima descrita. Os resultados desta tese mostram que as células que sobreviveram ao tratamento com as duas concentrações testadas de TVB-3166, de ambas as linhagens, não tiveram seu perfil modificado em relação às células controle (uma população CD44+/CD326+ e outra CD44-/CD326+). Fato semelhante ocorreu com a IMF para CD44 e CD326 nas células SCC-9 ZsG, que não foram significativamente alteradas pela exposição à droga. Por outro lado, na linhagem LN-1A, observou-se duas populações CD44 positivas, uma com alta e outra com baixa expressão desta molécula de superfície. Nas células com baixa expressão, esta foi significativamente reduzida pelo tratamento com 18,5 µM de TVB-3166, em comparação às células controle, ao contrário da população altamente positiva, que não se modificou pelos tratamentos realizados. Por fim, nesta mesma linhagem, a IMF de CD326 sofreu diminuição significativa pela exposição ao TVB-3166, nas duas concentrações estudadas.

Com relação ao ORL, no presente estudo foi utilizada a IC50 de 280 µM, obtida anteriormente em nosso laboratório no trabalho de Moreira, (2017), para ambas linhagens celulares. Assim como TVB-3166, o ORL não alterou o perfil de positividade das populações existentes nas linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A, em comparação às células controle. No entanto,

a IMF de CD44 apresentou discreto, porém significativo do ponto de vista estatístico, aumento nas células SCC-9 ZsG tratadas com a metade da IC50 desta droga (140 μ M). Da mesma maneira, a IMF de CD326 foi levemente aumentada nas células expostas a IC50 (280 μ M) de ORL, porém sem diferença do ponto de vista estatístico. A IMF para CD44 e CD326 não foram modificadas por ORL na linhagem metastática LN-1A. Zaytseva et al. (2012), demonstraram, em linhagens celulares de câncer colorretal humano, que a inibição das enzimas lipogênicas ATP citrato-liase (ACLY) e FASN provoca diminuição da expressão de CD44, sendo mais pronunciada em células com *knockdown* para FASN do que para ATP citrato liase. Segundo estes mesmos autores, o tratamento da linhagem celular de adenocarcinoma de cólon HT29 com C-75, um inibidor sintético de FASN, também leva a uma diminuição dose-dependente da expressão de CD44, fenômeno similar ao que no presente estudo foi observado na linhagem metastática LN-1A, quando exposta à metade da IC50 de TVB-3166.

Em conjunto, nossos resultados mostram que PTX e CIS provocam mudanças na distribuição das células nas populações CD44+/CD326+ e CD44-/CD326+, assim como uma diminuição significativa da positividade para CD44 e aumento na marcação para CD326. Por outro lado, os inibidores de FASN TVB-3166 e ORL não modificam de maneira evidente os perfis populacionais e as IMF em ambas as linhagens celulares estudadas. O isolamento de populações celulares com diferentes fenótipos na presente pesquisa permitirá a realização de estudos futuros da ação das drogas estudadas sobre subtipos celulares distintos, bem como do comportamento biológico deles em modelos xenográficos e ortotópicos de CCEO.

Em contraste com os experimentos de imunofenotipagem, o ensaio de isolamento das subpopulações mostrou dois fenótipos não observados anteriormente: células dupla negativas tanto para CD44 como para CD326 (CD44-/CD326-) e células positivas somente para CD44 (CD44+/CD326-) nas duas linhagens aqui estudadas, assim como uma população com expressão maior do marcador CD44 (CD44^{High}/CD326-), identificada exclusivamente na linhagem LN-1A. É possível que a presença da proteína ZsG em nossas linhagens celulares, com o subsequente necessidade de ajuste de sobreposição/compensação nos demais canais no citômetro de fluxo FACSCalibur, seja a causa desta diferença. O citômetro de fluxo usado para o isolamento foi o FACS AriaTM Fusion (BD Biosciences), que permite compensação de todos os detectores, no sendo possível isto no FACSCalibur.

Cada uma das subpopulações celulares isoladas das duas linhagens de CCEO estudadas apresentou morfologia e variações na síntese de proteínas características. O fenótipo (b) CD44+/CD326- da linhagem LN-1A apresentou maior quantidade de FASN, vimentina e slug, no entanto, o mesmo fenótipo isolado da SCC-9 ZsG revelou quantidades maiores de n-

caderina, vimentina e slug. As células de ambas linhagens portadoras do fenótipo (b) formam ilhas células fusiformes entremeadas por células poligonais isoladas, que não formam ninhos. Em trabalhos prévios desenvolvidos com células derivadas de tumores e/ou linhagens CCE de cabeça e pescoço (Prince et al., 2007; Okamoto et al., 2009) foi descrito que células positivas exclusivamente para CD44, ou com alta expressão deste, com ou sem associação a outros marcadores de superfície, representam a CTC. No presente estudo também foi observada subpopulação com fenótipo CD44^{High}/CD326⁻, isoladas somente na linhagem metastática LN-1A, com morfologia alongada e formando ilhas em forma de remoinhos. Nos experimentos de western blotting, estas células apresentaram a maior quantidade de n-caderina e slug, a segunda maior quantidade de vimentina e a menor de e-caderina e FASN. Biddle et al. (2011), trabalhando com os marcadores CD44 e CD326, descreveu dois fenótipos muito similares aos aqui encontrados nas linhagens celulares CA1, Met1 e Met, derivadas de CCEO de assoalho de boca e de CCE cutâneo. Especificamente, o fenótipo CD44^{High}/CD326^{low} apresentou morfologia *fibroblast-like*, com alta expressão de RNAs mensageiros para vimentina, baixa expressão de e-caderina e, somente na linhagem Met2, observou-se alta expressão de RNAs mensageiros para snail e twist. O fenótipo CD44^{High}/ESA^{low} é descrito por estes autores como um fenótipo de TEM, sendo também ALDH1 positivo. Portanto, podemos sugerir que o fenótipo (g) de nosso trabalho (CD44^{High}/CD326⁻) também represente um subgrupo da linhagem LN-1A em TEM. Nossos fenótipos com a expressão exclusiva de CD44 associada ao padrão de produção proteica pode também estar associado ao processo de TEM, porém sem aquisição das características morfológicas.

O fenótipo (c), com expressão CD44⁺/CD326^{low}, de ambas linhagens, apresenta células com as características morfológicas muito similares aquelas do fenótipo (b), CD44⁺/CD326⁻. Em relação a produção proteica, o fenótipo (c) de ambas as linhagens celulares apresenta baixa quantidade de FASN, de e-caderina e alta produção de n-caderina, vimentina e slug. Nos resultados da imunofenotipagem na presença de PTX, estas populações aumentaram significativamente a expressão de CD44 e de CD326, que foi gradativo dependendo das doses de PTX e sugere resistência à droga. Biddle et al. (2016), demonstraram com a linhagem celular CA1, derivada de CCEO de assoalho de boca, que as células CD44^{High}/CD326^{low} /CD24⁻ têm características de EMT são resistentes ao PTX. No trabalho de Cuadra Zelaya (2016, dados ainda não publicados), demonstrou-se que tanto a linhagem SCC-9 ZsG como a LN-1A são negativas ou têm baixa expressão de CD24.

As subpopulações com fenótipo CD44^{High}/CD326^{High} (d), tanto da linhagem SCC-9 ZsG como LN-1A, são principalmente poligonais ou poliédricas e formam ninhos com células

alongadas em sua periferia, com um terceiro tipo de células, de menor tamanho, arredondadas e dispersas entre os ninhos celulares. Este fenótipo, na linhagem SCC-9ZsG produz a maior quantidade de FASN em comparação com as outras linhagens, sendo o menor produtor de e-caderina e com quantidade significativa de slug. Já na linhagem LN-1A, este fenótipo apresentou quantidades similares de FASN, e-caderina, vimentina, no entanto, alta quantidade da proteína slug. Biddle et al. (2011) descreveram este mesmo fenótipo ($CD44^{High}/ESA^{High}$) com características morfológicas mais epiteliais e formando ninhos, com alta expressão de RNAs mensageiros para e-caderina. Ao mesmo tempo, estas células foram negativas para ALDH1, fenótipo não associado a TEM.

As células com fenótipo $CD44^{-}/CD326^{+}$ (f) e com fenótipo $CD44^{low}/CD326^{High}$, tanto da linhagem SCC-9 ZsG como LN1-A, são muito similares morfológicamente, apresentando-se poliédricas e formando ilhas. Com relação à produção das proteínas aqui estudadas, são as maiores produtoras de FASN e e-caderina, apresentando as menores quantidades de n-caderina, e vimentina e slug. A população $CD44^{-}/CD326^{+}$ aquela na qual paclitaxel aumentou tanto o tamanho como a expressão da molécula CD326, tanto na linhagem SCC-9 ZsG como na linhagem metastática LN-1A. Este padrão está provavelmente associado a resistência a quimioterapia em nossas linhagens celulares, de acordo com Sun et al. (2018), que evidenciaram aumento da expressão de CD326 com tratamentos quimioterápicos em linhagens de adenocarcinoma esofágico. Não há relatos na literatura de CTC em tumores ou linhagens celulares de CCEO com expressão exclusiva de CD326. No entanto, a superexpressão de CD326 está associada a progressão tumoral e pior prognóstico em câncer gástrico, pancreático e colorretal (Fong et al., 2014; Kim et al., 2016; Dai et al., 2017).

As células duplamente negativas ($CD44^{-}/CD326^{-}$) em ambas linhagens celulares, são populações heterogêneas do ponto de vista morfológico como de produção de proteínas associadas a EMT. É possível especular aqui que o replaqueamento em cultura aderente e expansão destas células provocou a reexpressão de CD44 e CD326, o que explicaria estes achados. Estudos prévios de CTC demonstraram que a ausência de marcação para CD44 não é característica de CTC (Al-Hajj et al., 2003; Prince et al., 2007).

A identificação de CTC a partir da dupla marcação positiva para CD44 e CD326 está descrita também em CCE colorretal (Dalerba et al., 2007; Leng et al., 2018). É importante destacar que a identificação precisa de CTC é complexa e deve ser realizada pela combinação de marcadores e que quimioterápicos podem provocar a perda da expressão de alguns marcadores e/ou aumento da expressão de outros. PTX e CIS modulam significativamente a expressão de $CD44/CD326$, o que não ocorre com as drogas inibidoras de FASN (TVB-3166 e

ORL) aqui estudadas. A combinação CD44/CD326 revelou populações resistentes a quimioterápicos e populações com características TEM. A realização de ensaios funcionais e a inoculação destes fenótipos em modelo animal se fazem necessárias para mostrar quais destes fenótipos estão associados a CTC.

7 CONCLUSÃO

- PTX diminui as populações $CD44^+/CD326^+$, aumenta as populações $CD44^-CD326^+$ e a expressão de CD326, tanto da linhagem SCC-9 ZsG como na linhagem metastática LN-1A.
- Cisplatina não modifica as populações $CD44^+/CD326^+$ e $CD44^-/CD326^+$, mas aumenta progressivamente a expressão de CD44 e CD326, tanto da linhagem SCC-9 ZsG como da linhagem metastática LN-1A.
- ORL e TVB-3166 não modificam as populações $CD44^+/CD326^+$ e $CD44^-/CD326^+$ nas duas linhagens estudadas, porém TVB-3166 diminui a expressão de $CD44^{Low}$ e CD326 na linhagem LN-1A. A $\frac{1}{2}$ da IC_{50} de ORL aumenta a expressão de CD44 na linhagem SCC-9 ZsG.
- As subpopulações com fenótipo (b) ($CD44^+/CD326^-$) e (c) ($CD44^+/CD326^{Low}$), tanto da linhagem SCC-9 ZsG como da linhagem LN-1A, são formadas predominantemente por células isoladas com morfologia fusiforme, alta produção de n-caderina, vimentina e slug e baixa produção de e-caderina.
- As subpopulações com fenótipo (f) ($CD44^-/CD326^+$) e (e) ($CD44^{low}/CD326^{High}$), tanto da linhagem SCC-9 ZsG como da linhagem LN-1A, apresentam morfologia poligonal e aspecto epitelial, com formação de ninhos, alta produção e-caderina, FASN e baixa produção de slug, vimentina e n-caderina.
- A subpopulação com fenótipo (g) ($CD44^{High}/CD326^-$) é exclusiva da linhagem LN-1A e apresenta morfologia fusiforme, com alta produção de n-caderina, vimentina, slug e baixa produção de e-caderina.

REFERÊNCIAS

- Abubaker K, Latifi A, Luwor R, Nazaretian S, Zhu H, Quinn MA, et al. Short-term single treatment of chemotherapy results in the enrichment of ovarian cancer stem cell-like cells leading to an increased tumor burden. *Mol Cancer*. 2013;12(1):1–15.
- 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;13(3):585–95.
- Agostini M, Silva SD, Zecchin KG, Coletta RD, Jorge J, Loda M, et al. Fatty acid synthase is required for the proliferation of human oral squamous carcinoma cells. *Oral Oncol*. agosto de 2004;40(7):728–35.
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(7):3983–8.
- Almangush A, Coletta RD, Bello IO, Bitu C, Keski-Säntti H, Mäkinen LK, et al. A simple novel prognostic model for early stage oral tongue cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2015;44(2):143–50.
- Alo PL, Amini M, Piro F, Pizzuti L, Sebastiani V, Botti C, et al. Immunohistochemical expression and prognostic significance of fatty acid synthase in pancreatic carcinoma. *Anticancer Res*. 2007;27(4B):2523–7.
- Alo PL, Visca P, Marci A, Mangoni A, Botti C, Di Tondo U. Expression of fatty acid synthase (FAS) as a predictor of recurrence in stage I breast carcinoma patients. *Cancer*. 1 de fevereiro de 1996;77(3):474–82.
- Alwarawrah Y, Hughes P, Loisel D, Carlson DA, Darr DB, Jordan JL, et al. Fasnall, a Selective FASN Inhibitor, Shows Potent Anti-tumor Activity in the MMTV-Neu Model of HER2 + Breast Cancer. *Cell Chem Biol*. junho de 2016;23(6):678–88.
- de Andrade NP, Rodrigues MFSD, Rodini CO, Nunes FD. Cancer stem cell, cytokeratins and epithelial to mesenchymal transition markers expression in oral squamous cell carcinoma derived from orthotopic xenotransplantation of CD44^{high} cells. *Pathol Res Pract*. março de 2017;213(3):235–44.
- Angeles TS, Hudkins RL. Recent advances in targeting the fatty acid biosynthetic pathway using fatty acid synthase inhibitors. *Expert Opin Drug Discov*. Taylor & Francis; 2016;11(12):1187–99.
- Aquino I. Efeitos do inibidor da ácido graxo sintase TVB-3166 sobre linhagens celulares derivadas de carcinoma espinocelular oral. 2019.
- Bauerle PA, Gires O. EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *Br J Cancer*. 12 de fevereiro de 2007;96(3):417–23.
- Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y. Oral cancer: clinical features. *Oral Oncol*. junho de 2010;46(6):414–7.
- Benjamin DI, Li DS, Lowe W, Heuer T, Kemble G, Nomura DK. Diacylglycerol Metabolism and Signaling Is a Driving Force Underlying FASN Inhibitor Sensitivity in Cancer Cells. *ACS Chem Biol*. 17 de julho de 2015;10(7):1616–23.

- Biddle A, Gammon L, Fazil B, Mackenzie IC. CD44 Staining of Cancer Stem-Like Cells Is Influenced by Down-Regulation of CD44 Variant Isoforms and Up-Regulation of the Standard CD44 Isoform in the Population of Cells That Have Undergone Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *PLoS One*. 2013;8(2).
- Biddle A, Liang X, Gammon L, Fazil B, Harper LJ, Emich H, et al. Cancer stem cells in squamous cell carcinoma switch between two distinct phenotypes that are preferentially migratory or proliferative. *Cancer Res*. 2011;71(15):5317–26.
- de Boer CJ, van Krieken JH, Janssen-van Rhijn CM, Litvinov S V. Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver. *J Pathol*. junho de 1999;188(2):201–6.
- Boiko AD, Razorenova O V, van de Rijn M, Swetter SM, Johnson DL, Ly DP, et al. Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271. *Nature*. 1 de julho de 2010;466(7302):133–7.
- Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. julho de 1997;3(7):730–7.
- Boxberg M, Götz C, Haidari S, Dorfner C, Jesinghaus M, Drecol E, et al. Immunohistochemical expression of CD44 in oral squamous cell carcinoma in relation to histomorphological parameters and clinicopathological factors. *Histopathology*. outubro de 2018;73(4):559–72.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye. *Anal Biochem*. 1976;72:248–54.
- Brescia P, Ortensi B, Fornasari L, Levi D, Broggi G, Pelicci G. CD133 is essential for glioblastoma stem cell maintenance. *Stem Cells*. maio de 2013;31(5):857–69.
- Brophy E, Conley J, O’Hearn P, Douglas M, Cheung C, Coco J, et al. Abstract 1891: Pharmacological target validation studies of fatty acid synthase in carcinoma using the potent, selective and orally bioavailable inhibitor IPI-9119. *Mol Cell Biol*. American Association for Cancer Research; 2013. p. 1891–1891.
- Brown D V, Filiz G, Daniel PM, Hollande F, Dworkin S, Amiridis S, et al. Expression of CD133 and CD44 in glioblastoma stem cells correlates with cell proliferation, phenotype stability and intra-tumor heterogeneity. *PLoS One*. 2017;12(2):e0172791.
- Brown RL, Reinke LM, Damerow MS, Perez D, Chodosh LA, Yang J, et al. CD44 splice isoform switching in human and mouse epithelium is essential for epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression. *J Clin Invest*. março de 2011;121(3):1064–74.
- Bushman J, Vaughan A, Sheihet L, Zhang Z, Costache M, Kohn J. Functionalized nanospheres for targeted delivery of paclitaxel. *J Control Release*. novembro de 2013;171(3):315–21.
- Cabrera MC, Hollingsworth RE, Hurt EM. Cancer stem cell plasticity and tumor hierarchy. *World J Stem Cells*. 26 de janeiro de 2015;7(1):27–36.
- Cai Y, Wang J, Zhang L, Wu D, Yu D, Tian X, et al. Expressions of fatty acid synthase and HER2 are correlated with poor prognosis of ovarian cancer. *Med Oncol*. janeiro de 2015;32(1):391.
- Chakravarthy M V, Pan Z, Zhu Y, Tordjman K, Schneider JG, Coleman T, et al. “New” hepatic fat activates PPARalpha to maintain glucose, lipid, and cholesterol homeostasis. *Cell Metab*. maio de 2005;1(5):309–22.

- Chen H-W, Chang Y-F, Chuang H-Y, Tai W-T, Hwang J-J. Targeted therapy with fatty acid synthase inhibitors in a human prostate carcinoma LNCaP/tk-luc-bearing animal model. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* setembro de 2012;15(3):260–4.
- 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.* 13 de janeiro de 2014;14:15.
- Chen K, Huang Y, Chen J. Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. *Acta Pharmacol Sin.* junho de 2013;34(6):732–40.
- Chen R, Nishimura MC, Bumbaca SM, Kharbanda S, Forrest WF, Kasman IM, et al. A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. *Cancer Cell.* 13 de abril de 2010;17(4):362–75.
- Chi AC, Day TA, Neville BW. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma--an update. *CA Cancer J Clin.* setembro de 2015;65(5):401–21.
- Chiodi I, Belgiovine C, Donà F, Scovassi AI, Mondello C. Drug Treatment of Cancer Cell Lines: A Way to Select for Cancer Stem Cells? 2011;(1):1111–28.
- Chiou SH, Yu CC, Huang CY, Lin SC, Liu CJ, Tsai TH, et al. Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2008;14(13):4085–95.
- Chirala SS, Chang H, Matzuk M, Abu-Elheiga L, Mao J, Mahon K, et al. Fatty acid synthesis is essential in embryonic development: fatty acid synthase null mutants and most of the heterozygotes die in utero. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 27 de maio de 2003;100(11):6358–63.
- Chou TC and 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*, ComboSyn Inc, Paramus, (NJ). 2005.
- Cirulli V, Crisa L, Beattie GM, Mally MI, Lopez AD, Fannon A, et al. KSA antigen Ep-CAM mediates cell-cell adhesion of pancreatic epithelial cells: morphoregulatory roles in pancreatic islet development. *J Cell Biol.* 23 de março de 1998;140(6):1519–34.
- Civenni G, Walter A, Kobert N, Mihic-Probst D, Zipser M, Belloni B, et al. Human CD271-positive melanoma stem cells associated with metastasis establish tumor heterogeneity and long-term growth. *Cancer Res.* 15 de abril de 2011;71(8):3098–109.
- Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CHM, Jones DL, et al. Cancer stem cells - Perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. *Cancer Res.* 2006;66(19):9339–44.
- Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med.* março de 2011;17(3):313–9.
- Cogliano VJ, Baan R, Straif K, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, et al. Preventable Exposures Associated With Human Cancers. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 21 de dezembro de 2011;103(24):1827–39.
- Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* 1 de dezembro de 2005;65(23):10946–51.
- Cuadra Zelaya FJM. Identificação de células tronco associadas ao câncer (CTCs) nas linhagens celulares SCC-9 ZsGreen e SCC-9 ZsGreen LN-1. 2016.

- Curado MP, Johnson NW, Kerr AR, Silva DRM e, Lanfranchi H, Pereira DL, et al. Oral and oropharynx cancer in South America. *Transl Res Oral Oncol.* 2016;1(901):2057178X1665376.
- D'Souza W, Saranath D. OMICS, Oral Cancer Molecular Landscapes, and Clinical Practice. *Omi A J Integr Biol.* 2017;21(12):689–703.
- Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med.* 2007a;58:267–84.
- Dalerba P, Dylla SJ, Park I-K, Liu R, Wang X, Cho RW, et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 12 de junho de 2007b;104(24):10158–63.
- Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 5 de outubro de 2014;740(6):364–78.
- Dirkse A, Golebiewska A, Buder T, Nazarov P V, Muller A, Poovathingal S, et al. Stem cell-associated heterogeneity in Glioblastoma results from intrinsic tumor plasticity shaped by the microenvironment. *Nat Commun.* 2019;10(1):1787.
- El-Naggar A.K., Chan J.K.C., Grandis J.R., Takata T. SPJ. WHO classification of Head and neck Tumors (4th edition). 4th editio. El-Naggar A.K., Chan J.K.C., Grandis J.R., Takata T. SPJ, organizador. 2017.
- Enderling H. Cancer stem cells: small subpopulation or evolving fraction? *Integr Biol (Camb).* janeiro de 2015;7(1):14–23.
- Fan X, Khaki L, Zhu TS, Soules ME, Talsma CE, Gul N, et al. NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts. *Stem Cells.* janeiro de 2010;28(1):5–16.
- Felthaus O, Ettl T, Gosau M, Driemel O, Brockhoff G, Reck A, et al. Cancer stem cell-like cells from a single cell of oral squamous carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* Elsevier Inc.; 2011;407(1):28–33.
- Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I BF. Lip, oral cavity. *Glob. Cancer Obs. Cancer Today.* Lyon, Fr. Int. Agency Res. Cancer. 2018.
- Fillmore CM, Kuperwasser C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res.* 2008;10(2):R25.
- Fiorentino M, Zadra G, Palescandolo E, Fedele G, Bailey D, Fiore C, et al. Overexpression of fatty acid synthase is associated with palmitoylation of Wnt1 and cytoplasmic stabilization of beta-catenin in prostate cancer. *Lab Invest.* dezembro de 2008;88(12):1340–8.
- Flavin R, Peluso S, Nguyen PL, Loda M. Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer. *Future Oncol.* abril de 2010;6(4):551–62.
- Foley EA, Kapoor TM. Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signalling at the kinetochore. *Nat Rev Mol Cell Biol.* janeiro de 2013;14(1):25–37.
- Fredebohm J, Boettcher M, Eisen C, Gaida MM, Heller A, Keleg S, et al. Establishment and characterization of a highly tumorigenic and cancer stem cell enriched pancreatic cancer cell line as a well defined model system. *PLoS One.* 2012;7(11):e48503.
- Fulcher CD, Haigentz M, Ow TJ. AHNS Series: Do you know your guidelines? Principles of

treatment for locally advanced or unresectable head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2018;40(4):676–86.

Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*. Nature Publishing Group; 2012. p. 1869–83.

Ghuwalewala S, Ghatak D, Das P, Dey S, Sarkar S, Alam N, et al. CD44(high)CD24(low) molecular signature determines the Cancer Stem Cell and EMT phenotype in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Stem Cell Res*. março de 2016;16(2):405–17.

Gillison ML, Chaturvedi AK, Anderson WF, Fakhry C. Epidemiology of Human Papillomavirus–Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Oncol*. 10 de outubro de 2015;33(29):3235–42.

Goodfellow PN, Banting G, Wiles M V, Tunnacliffe A, Parkar M, Solomon E, et al. The gene, MIC4, which controls expression of the antigen defined by monoclonal antibody F10.44.2, is on human chromosome 11. *Eur J Immunol*. agosto de 1982;12(8):659–63.

Goodison S, Urquidi V, Tarin D. CD44 cell adhesion molecules. *Mol Pathol*. 1999;52(4):189–96.

Guercioli R. Mode of action of orlistat. *Int J Obes Relat Metab Disord*. junho de 1997;21 Suppl 3:S12-23.

Gupta B, Bray F, Kumar N, Johnson NW. Associations between oral hygiene habits, diet, tobacco and alcohol and risk of oral cancer: A case–control study from India. *Cancer Epidemiol*. Elsevier; 2017;51(March):7–14.

Gupta PB, Pastushenko I, Skibinski A, Blanpain C, Kuperwasser C. Phenotypic Plasticity: Driver of Cancer Initiation, Progression, and Therapy Resistance. *Cell Stem Cell*. 2019;24(1):65–78.

Han J, Fujisawa T, Husain SR, Puri RK. Identification and characterization of cancer stem cells in human head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 11 de março de 2014;14:173.

Hardwicke MA, Rendina AR, Williams SP, Moore ML, Wang L, Krueger JA, et al. A human fatty acid synthase inhibitor binds β -ketoacyl reductase in the keto-substrate site. *Nat Chem Biol*. setembro de 2014;10(9):774–9.

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 Ex. *EBioMedicine*. 3-V Biosciences; 2017;16:51–62.

Hogan S, Fleury A, Hadvary P, Lengsfeld H, Meier MK, Triscari J, et al. Studies on the antiobesity activity of tetrahydrolipstatin, a potent and selective inhibitor of pancreatic lipase. *Int J Obes*. 1987;11 Suppl 3:35–42.

Huang S-D, Yuan Y, Liu X-H, Gong D-J, Bai C-G, Wang F, et al. Self-renewal and chemotherapy resistance of p75^{NTR} positive cells in esophageal squamous cell carcinomas. *BMC Cancer*. 2009;9:9.

Huff CA, Huff CA, Matsui W, Matsui W. Multiple Myeloma Cancer Stem Cells. *J Clin Oncol*. 2008;26(17):2895–900.

Hughes P, Marshall D, Reid Y, Parkes H, Gelber C. The costs of using unauthenticated, over-

passaged cell lines: how much more data do we need? *Biotechniques*. novembro de 2007;43(5):575, 577–8, 581-2 passim.

Imai T, Tamai K, Oizumi S, Oyama K, Yamaguchi K, Sato I, et al. CD271 defines a stem cell-like population in hypopharyngeal cancer. *PLoS One*. 2013;8(4):e62002.

INCA. Estimativa/2018 – Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância.; 2017.

Innocenzi D, Alò PL, Balzani A, Sebastiani V, Silipo V, La Torre G, et al. Fatty acid synthase expression in melanoma. *J Cutan Pathol*. janeiro de 2003;30(1):23–8.

Ito T, Zimdahl B, Reya T. aSIRting control over cancer stem cells. *Cancer Cell*. 14 de fevereiro de 2012;21(2):140–2.

Jones SF, Infante JR. Molecular Pathways: Fatty Acid Synthase. *Clin Cancer Res*. 15 de dezembro de 2015;21(24):5434–8.

Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. *N Engl J Med*. 21 de setembro de 2006;355(12):1253–61.

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

Kaiser J. The cancer stem cell gamble. *Science*. 16 de janeiro de 2015;347(6219):226–9.

Kartalou M, Essigmann JM. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen*. 2001;478(1–2):23–43.

Keysar SB, Le PN, Miller B, Jackson BC, Eagles JR, Nieto C, et al. Regulation of Head and Neck Squamous Cancer Stem Cells by PI3K and SOX2. *J Natl Cancer Inst*. 2017;109(1).

Kiyosue T, Kawano S, Matsubara R, Goto Y, Hirano M, Jinno T, et al. Immunohistochemical location of the p75 neurotrophin receptor (p75NTR) in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *Int J Clin Oncol*. fevereiro de 2013;18(1):154–63.

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):30540–5.

Kokko L-L, Hurme S, Maula S-M, Alanen K, Grénman R, Kinnunen I, et al. Significance of site-specific prognosis of cancer stem cell marker CD44 in head and neck squamous-cell carcinoma. *Oral Oncol*. junho de 2011;47(6):510–6.

Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell*. Elsevier Inc.; 2014;14(3):275–91.

Kridel SJ, Axelrod F, Rozenkrantz N, Smith JW. Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity. *Cancer Res*. 15 de março de 2004;64(6):2070–5.

Kridel SJ, Lowther WT, Pemble CW. Fatty acid synthase inhibitors: new directions for oncology. *Expert Opin Investig Drugs*. novembro de 2007;16(11):1817–29.

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*. julho de 1999;21(4):325–9.

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*. março de

2011;10(3):427–36.

Kuhajda FP. Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. *Nutrition*. março de 2000;16(3):202–8.

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*. 5 de julho de 1994;91(14):6379–83.

Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 17 de fevereiro de 1994;367(6464):645–8.

Lara-Gonzalez P, Westhorpe FG, Taylor SS. The spindle assembly checkpoint. *Curr Biol*. 20 de novembro de 2012;22(22):R966-80.

Lee SY, Jeong EK, Ju MK, Jeon HM, Kim MY, Kim CH, et al. Induction of metastasis, cancer stem cell phenotype, and oncogenic metabolism in cancer cells by ionizing radiation. *Mol Cancer*. 2017;16(1):10.

Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*. 1 de fevereiro de 2007;67(3):1030–7.

Liu S, Cong Y, Wang D, Sun Y, Deng L, Liu Y, et al. Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts. *Stem cell reports*. 14 de janeiro de 2014;2(1):78–91.

Llewellyn CD, Linklater K, Bell J, Johnson NW, Warnakulasuriya S. An analysis of risk factors for oral cancer in young people: a case-control study. *Oral Oncol*. março de 2004;40(3):304–13.

Lou H, Dean M. Targeted therapy for cancer stem cells: the patched pathway and ABC transporters. *Oncogene*. 26 de fevereiro de 2007;26(9):1357–60.

Lu T, Schubert C, Cummings MD, Bignan G, Connolly PJ, Smans K, et al. Design and synthesis of a series of bioavailable fatty acid synthase (FASN) KR domain inhibitors for cancer therapy. *Bioorg Med Chem Lett*. julho de 2018;28(12):2159–64.

Luqmani YA. Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. *Med Princ Pract*. 2005;14 Suppl 1:35–48.

Ma C, Zhao J-Z, Lin R-T, Zhou L, Chen Y-N, Yu L-J, et al. Combined overexpression of cadherin 6, cadherin 11 and cluster of differentiation 44 is associated with lymph node metastasis and poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Lett*. junho de 2018;15(6):9498–506.

MacDonagh L, Gray SG, Breen E, Cuffe S, Finn SP, O’Byrne KJ, et al. Lung cancer stem cells: The root of resistance. *Cancer Lett*. Elsevier Ireland Ltd; 2016;372(2):147–56.

Mack B, Gires O. CD44s and CD44v6 expression in head and neck epithelia. *PLoS One*. 2008;3(10):e3360.

Maier T, Leibundgut M, Ban N. The crystal structure of a mammalian fatty acid synthase. *Science*. 5 de setembro de 2008;321(5894):1315–22.

Maningat PD, Sen P, Rijnkels M, Sunehag AL, Hadsell DL, Bray M, et al. Gene expression in the human mammary epithelium during lactation: the milk fat globule transcriptome. *Physiol*

Genomics. 3 de março de 2009;37(1):12–22.

Marocchio LS, Lima J, Sperandio FF, Corrêa L, de Sousa SOM. Oral squamous cell carcinoma: an analysis of 1,564 cases showing advances in early detection. *J Oral Sci.* junho de 2010;52(2):267–73.

Meacham CE, Morrison SJ. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature.* 19 de setembro de 2013;501(7467):328–37.

MEDES G, THOMAS A, WEINHOUSE S. Metabolism of neoplastic tissue. IV. A study of lipid synthesis in neoplastic tissue slices in vitro. *Cancer Res.* janeiro de 1953;13(1):27–9.

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

Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase (FASN) as a therapeutic target in breast cancer. *Expert Opin Ther Targets.* Taylor & Francis; 2017;21(11):1001–16.

Miki J, Furusato B, Li H, Gu Y, Takahashi H, Egawa S, et al. Identification of putative stem cell markers, CD133 and CXCR4, in hTERT-immortalized primary nonmalignant and malignant tumor-derived human prostate epithelial cell lines and in prostate cancer specimens. *Cancer Res.* 2007;67(7):3153–61.

Milas L, Hunter NR, Kurdoglu B, Mason KA, Meyn RE, Stephens LC, et al. Kinetics of mitotic arrest and apoptosis in murine mammary and ovarian tumors treated with taxol. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1995;35(4):297–303.

Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, et al. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood.* 15 de dezembro de 1997a;90(12):5013–21.

Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, et al. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood.* 1997b;90(12):5013–21.

Moreira FS. Carcinoma espinocelular oral: efeitos da associação do orlistat com paclitaxel in vitro e em modelo ortotópico e caracterização inicial de enxertos derivados de pacientes. Tese doutorado. 2017;

Murillo-Sauca O, Chung MK, Shin JH, Karamboulas C, Kwok S, Jung YH, et al. CD271 is a functional and targetable marker of tumor-initiating cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2014;5(16):6854–66.

Muwonge R, Ramadas K, Sankila R, Thara S, Thomas G, Vinoda J, et al. Role of tobacco smoking, chewing and alcohol drinking in the risk of oral cancer in Trivandrum, India: a nested case-control design using incident cancer cases. *Oral Oncol.* maio de 2008;44(5):446–54.

Nakamura T, Endo K, Kinoshita S. Identification of human oral keratinocyte stem/progenitor cells by neurotrophin receptor p75 and the role of neurotrophin/p75 signaling. *Stem Cells.* março de 2007;25(3):628–38.

Namin AW, Varvares MA. Functional outcomes of sensate versus insensate free flap reconstruction in oral and oropharyngeal reconstruction: A systematic review. *Head Neck.* 2016;38(11):1717–21.

Ni J, Cozzi P, Hao J, Beretov J, Chang L, Duan W, et al. Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) is associated with prostate cancer metastasis and chemo/radioresistance via the

- PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Int J Biochem Cell Biol.* dezembro de 2013;45(12):2736–48.
- Nowell P. The clonal evolution of Tumor Cell Populations - Nowell - 1976.pdf. *Science* (80-). 1976;194(4260).
- O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature.* 4 de janeiro de 2007;445(7123):106–10.
- Ohol YM, Wang Z, Kemble G, Duke G. Direct inhibition of cellular fatty acid synthase impairs replication of respiratory syncytial virus and other respiratory viruses. *PLoS One.* 2015;10(12):1–20.
- Ookhtens M, Kannan R, Lyon I, Baker N. Liver and adipose tissue contributions to newly formed fatty acids in an ascites tumor. *Am J Physiol.* julho de 1984;247(1 Pt 2):R146-53.
- Orth JD, Tang Y, Shi J, Loy CT, Amendt C, Wilm C, et al. Quantitative live imaging of cancer and normal cells treated with Kinesin-5 inhibitors indicates significant differences in phenotypic responses and cell fate. *Mol Cancer Ther.* novembro de 2008;7(11):3480–9.
- Oslob JD, Johnson RJ, Cai H, Feng SQ, Hu L, Kosaka Y, et al. Imidazopyridine-based fatty acid synthase inhibitors that show anti-HCV activity and in vivo target modulation. *ACS Med Chem Lett.* 10 de janeiro de 2013;4(1):113–7.
- Parmiani G. Melanoma cancer stem cells: Markers and functions. *Cancers (Basel).* 2016;8(3):4–8.
- Pascual G, Avgustinova A, Mejetta S, Martín M, Castellanos A, Attolini CS-O, et al. Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36. *Nature.* 2017;541(7635):41–5.
- Patel SG, Amit M, Yen TC, Liao CT, Chaturvedi P, Agarwal JP, et al. Lymph node density in oral cavity cancer: Results of the International Consortium for Outcomes Research. *Br J Cancer.* 2013;109(8):2087–95.
- Peitzsch C, Nathansen J, Schniewind SI, Schwarz F, Dubrovskaya A. Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma: Identification, characterization and clinical implications. *Cancers (Basel).* 2019;11(5).
- Petrelli F, Barni S, Bregni G, de Braud F, Di Cosimo S. Platinum salts in advanced breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Breast Cancer Res. Treat.* Springer US; 2016. p. 425–37.
- Pfister DG, Spencer S, Brizel DM, Burtness B, Busse PM, Caudell JJ, et al. Head and neck cancers, Version 2.2014. Clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* outubro de 2014;12(10):1454–87.
- Pizer ES, Kurman RJ, Pasternack GR, Kuhajda FP. Expression of fatty acid synthase is closely linked to proliferation and stromal decidualization in cycling endometrium. *Int J Gynecol Pathol.* janeiro de 1997;16(1):45–51.
- Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104(3):973–8.
- Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR, Johnson TM, Morrison SJ. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature.* 4 de dezembro de 2008;456(7222):593–8.

- Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev.* 2007;33(1):9–23.
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem Cells, Cancer, and Cancer Stem Cells. *Nature.* 2001;414(November):105–11.
- Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature.* 4 de janeiro de 2007;445(7123):111–5.
- Rosenberg B, VanCamp L, Trosko JE, Mansour VH. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature.* 26 de abril de 1969;222(5191):385–6.
- Routray S, Mohanty N. Cancer stem cells accountability in progression of head and neck squamous cell carcinoma: the most recent trends! *Mol Biol Int.* Hindawi Publishing Corporation; 2014;2014(Figure 1):375325.
- Rusthoven K, Ballonoff A, Raben D, Chen C. Poor prognosis in patients with stage I and II oral tongue squamous cell carcinoma. *Cancer.* 15 de janeiro de 2008;112(2):345–51.
- dos Santos Costa SF, Brennan PA, Gomez RS, Fregnani ER, Santos-Silva AR, Martins MD, et al. Molecular basis of oral squamous cell carcinoma in young patients: Is it any different from older patients? *J Oral Pathol Med.* julho de 2018;47(6):541–6.
- Santos CR, Schulze A. Lipid metabolism in cancer. *FEBS J.* agosto de 2012;279(15):2610–23.
- Saravanakumar G, Choi KY, Yoon HY, Kim K, Park JH, Kwon IC, et al. Hydrotropic hyaluronic acid conjugates: Synthesis, characterization, and implications as a carrier of paclitaxel. *Int J Pharm.* 15 de julho de 2010;394(1–2):154–61.
- Sarrio D, Franklin CK, Mackay A, Reis-Filho JS, Isacke CM. Epithelial and mesenchymal subpopulations within normal basal breast cell lines exhibit distinct stem cell/progenitor properties. *Stem Cells.* fevereiro de 2012;30(2):292–303.
- Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature.* 22 de fevereiro de 1979;277(5698):665–7.
- Schiff PB, Horwitz SB. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* março de 1980;77(3):1561–5.
- Schnell U, Cirulli V, Giepmans BNG. EpCAM: Structure and function in health and disease. *BBA - Biomembr.* Elsevier B.V.; 2013;1828(8):1989–2001.
- Screaton GR, Bell M V, Jackson DG, Cornelis FB, Gerth U, Bell JI. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(24):12160–4.
- Sen S, Carnelio S. Expression of epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) in oral squamous cell carcinoma. *Histopathology.* maio de 2016;68(6):897–904.
- Shackleton M, Quintana E, Fearon ER, Morrison SJ. Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell.* 4 de setembro de 2009;138(5):822–9.
- Silva SD, Agostini M, Nishimoto IN, Coletta RD, Alves FA, Lopes MA, et al. Expression of fatty acid synthase, ErbB2 and Ki-67 in head and neck squamous cell carcinoma. A clinicopathological study. *Oral Oncol.* agosto de 2004;40(7):688–96.

- Silva SD, Cunha IW, Rangel ALCA, 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.* julho de 2008a;453(1):57–67.
- Silva SD, Perez DE, Nishimoto IN, Alves FA, Pinto CAL, Kowalski LP, et al. Fatty acid synthase expression in squamous cell carcinoma of the tongue: Clinicopathological findings. *Oral Dis.* 2008b;14(4):376–82.
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 2004;432(November):396–401.
- Skvortsov S, Debbage P, Lukas P, Skvortsova I. Crosstalk between DNA repair and cancer stem cell (CSC) associated intracellular pathways. *Semin Cancer Biol.* abril de 2015;31:36–42.
- Stevens LC. Embryology of testicular teratomas in strain 129 mice. *J Natl Cancer Inst.* dezembro de 1959;23:1249–95.
- Sundberg M, Jansson L, Ketolainen J, Pihlajamäki H, Suuronen R, Skottman H, et al. CD marker expression profiles of human embryonic stem cells and their neural derivatives, determined using flow-cytometric analysis, reveal a novel CD marker for exclusion of pluripotent stem cells. *Stem Cell Res.* março de 2009;2(2):113–24.
- Swinnen J V, Brusselmans K, Verhoeven G. Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* julho de 2006;9(4):358–65.
- Szutowicz A, Kwiatkowski J, Angielski S. Lipogenetic and glycolytic enzyme activities in carcinoma and nonmalignant diseases of the human breast. *Br J Cancer.* junho de 1979;39(6):681–7.
- Thompson SJ, Schatteman GC, Gown AM, Bothwell M. A monoclonal antibody against nerve growth factor receptor. Immunohistochemical analysis of normal and neoplastic human tissue. *Am J Clin Pathol.* outubro de 1989;92(4):415–23.
- Tirino V, Desiderio V, Paino F, De Rosa A, Papaccio F, La Noce M, et al. Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization. *FASEB J.* janeiro de 2013;27(1):13–24.
- Trapasso S, Allegra E. Role of CD44 as a marker of cancer stem cells in head and neck cancer. *Biologics.* 2012;6:379–83.
- Trédan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J Natl Cancer Inst.* 3 de outubro de 2007;99(19):1441–54.
- Troeltzsch M, Knösel T, Eichinger C, Probst F, Troeltzsch M, Woodlock T, et al. Clinicopathologic Features of Oral Squamous Cell Carcinoma: Do They Vary in Different Age Groups? *J Oral Maxillofac Surg.* julho de 2014;72(7):1291–300.
- Trzpis M, McLaughlin PMJ, de Leij LMFH, Harmsen MC. Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule. *Am J Pathol.* agosto de 2007;171(2):386–95.
- Uddin S, Hussain AR, Ahmed M, Bu R, Ahmed SO, Ajarim D, et al. Inhibition of fatty acid synthase suppresses c-Met receptor kinase and induces apoptosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Mol Cancer Ther.* maio de 2010;9(5):1244–55.
- Ventura R, Mordec K, Waszczuk J, Wang Z, Lai J, Fridlib M, et al. Inhibition of de novo Palmitate Synthesis by Fatty Acid Synthase Induces Apoptosis in Tumor Cells by Remodeling

Cell Membranes, Inhibiting Signaling Pathways, and Reprogramming Gene Expression. *EBioMedicine*. Elsevier B.V.; 2015;2(8):808–24.

Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(10):755–68.

Di Vizio D, Adam RM, Kim J, Kim R, Sotgia F, Williams T, et al. Caveolin-1 interacts with a lipid raft-associated population of fatty acid synthase. *Cell Cycle*. 15 de julho de 2008;7(14):2257–67.

Wang B, Lee C-W, Witt A, Thakkar A, Ince TA. Heat shock factor 1 induces cancer stem cell phenotype in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat*. agosto de 2015;153(1):57–66.

Wang J, Sakariassen PØ, Tsinkalovsky O, Immervoll H, Bøe SO, Svendsen A, et al. CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *Int J cancer*. 15 de fevereiro de 2008a;122(4):761–8.

Wang J, Wu Y, Gao W, Li F, Bo Y, Zhu M, et al. Identification and characterization of CD133+CD44+ cancer stem cells from human laryngeal squamous cell carcinoma cell lines. *J Cancer*. 2017;8(3):497–506.

Wang W, Quan Y, Fu Q, Liu Y, Liang Y, Wu J, et al. Dynamics between cancer cell subpopulations reveals a model coordinating with both hierarchical and stochastic concepts. *PLoS One*. 2014;9(1):1–9.

Wang W, Zhao X, Wang H, Liang Y. Increased fatty acid synthase as a potential therapeutic target in multiple myeloma. *J Zhejiang Univ Sci B*. junho de 2008b;9(6):441–7.

Wang Y-Y, Li L, Zhao Z-S, Wang Y-X, Ye Z-Y, Tao H-Q. L1 and epithelial cell adhesion molecules associated with gastric cancer progression and prognosis in examination of specimens from 601 patients. *J Exp Clin Cancer Res*. 16 de setembro de 2013;32:66.

Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol*. 2009;45(4–5):309–16.

Warnakulasuriya S. Clinical features and presentation of oral potentially malignant disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. junho de 2018;125(6):582–90.

Waters JC, Chen RH, Murray AW, Salmon ED. Localization of Mad2 to kinetochores depends on microtubule attachment, not tension. *J Cell Biol*. 1 de junho de 1998;141(5):1181–91.

Weaver BA, Bement W. How Taxol / paclitaxel kills cancer cells. 2014;25:2677–81.

Weigmann a, Corbeil D, Hellwig a, Huttner WB. Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(23):12425–30.

Witkiewicz AK, Nguyen KH, Dasgupta A, Kennedy EP, Yeo CJ, Lisanti MP, et al. Co-expression of fatty acid synthase and caveolin-1 in pancreatic ductal adenocarcinoma: implications for tumor progression and clinical outcome. *Cell Cycle*. outubro de 2008;7(19):3021–5.

Wu Y, Wu PY. CD133 as a marker for cancer stem cells: progresses and concerns. *Stem Cells Dev*. 2009;18(8):1127–34.

Yan H, Chen X, Zhang Q, Qin J, Li H, Liu C, et al. Drug-tolerant cancer cells show reduced tumor-initiating capacity: Depletion of CD44 + cells and evidence for epigenetic mechanisms.

PLoS One. 2011;6(9).

Yang C-C, Zhu L-F, Xu X-H, Ning T-Y, Ye J-H, Liu L-K. Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase induces an epithelial to mesenchymal transition and cancer stem cell-like properties in SCC9 cells. *BMC Cancer*. 2013;13:171.

Yang W, Hood BL, Chadwick SL, Liu S, Watkins SC, Luo G, et al. Fatty acid synthase is up-regulated during hepatitis C virus infection and regulates hepatitis C virus entry and production. *Hepatology*. novembro de 2008;48(5):1396–403.

Yeung TM, Gandhi SC, Wilding JL, Muschel R, Bodmer WF. Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 23 de fevereiro de 2010;107(8):3722–7.

Zasadil LM, Andersen KA, Yeum D, Rocque GB, Wilke LG, Tevaarwerk AJ, et al. Cytotoxicity of paclitaxel in breast cancer is due to chromosome missegregation on multipolar spindles. *Sci Transl Med*. 26 de março de 2014;6(229):229ra43.

Zaytseva YY, Rychahou PG, Le AT, Scott TL, Flight RM, Kim JT, et al. Preclinical evaluation of novel fatty acid synthase inhibitors in primary colorectal cancer cells and a patient-derived xenograft model of colorectal cancer. *Oncotarget*. 2018;9(37):24787–800.

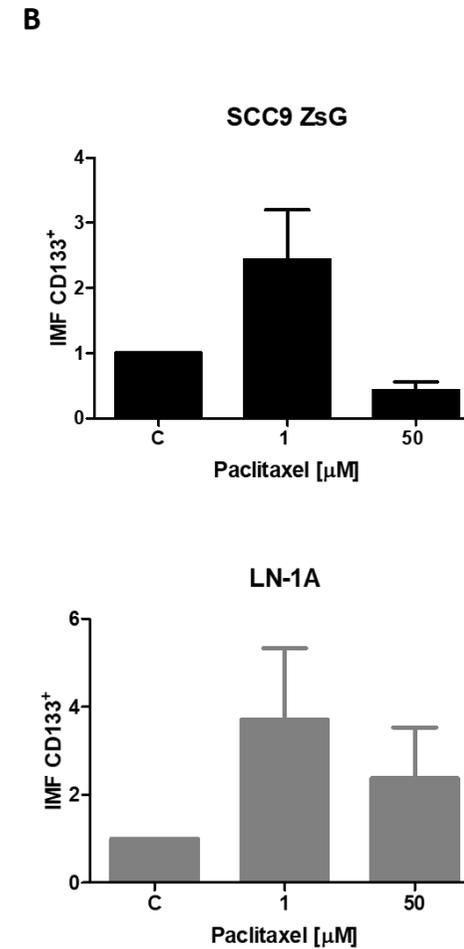
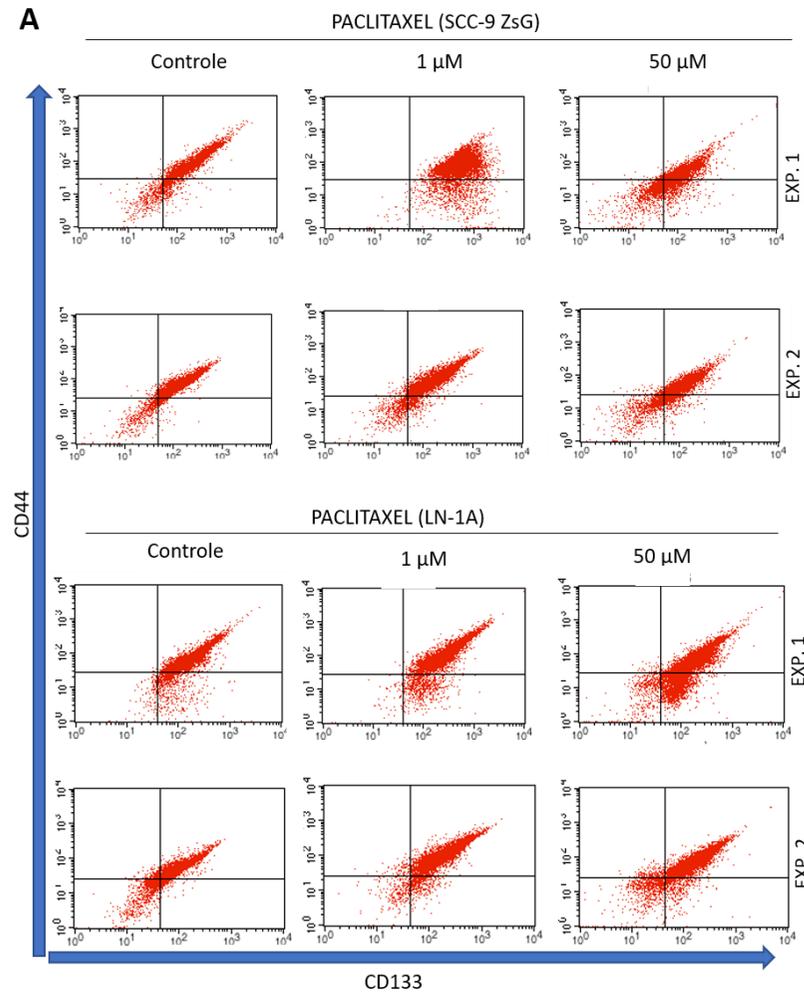
Zhang Q, Shi S, Yen Y, Brown J, Ta JQ, Le AD. A subpopulation of CD133(+) cancer stem-like cells characterized in human oral squamous cell carcinoma confer resistance to chemotherapy. *Cancer Lett*. 28 de março de 2010;289(2):151–60.

Zhang Y-Y, Wang D-C, Su J-Z, Jia L-F, Peng X, Yu G-Y. Clinicopathological characteristics and outcomes of squamous cell carcinoma of the tongue in different age groups. *Head Neck*. 2017;39(11):2276–82.

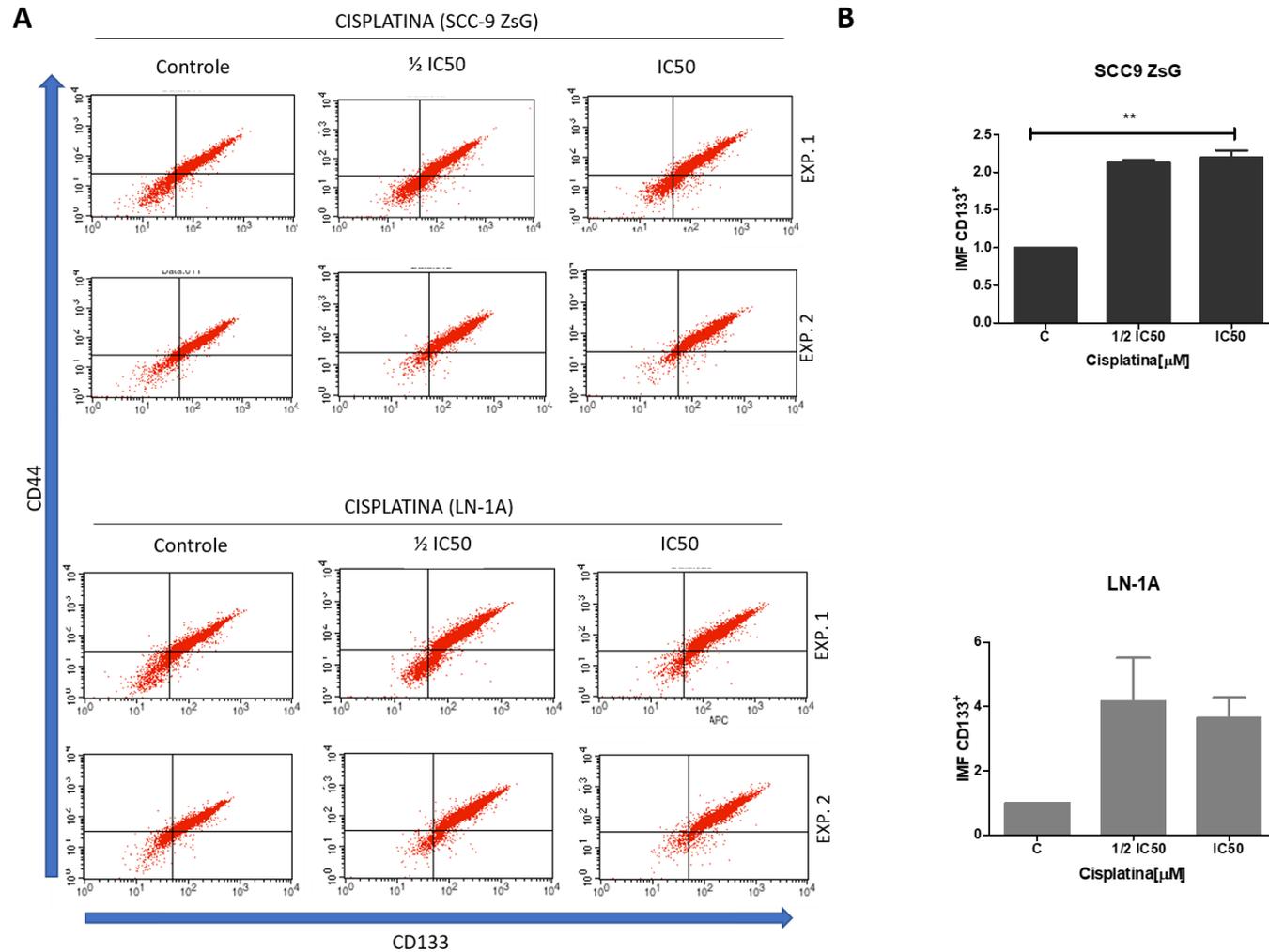
Zhou L, Wei X, Cheng L, Tian J, Jiang JJ. CD133, one of the markers of cancer stem cells in Hep-2 cell line. *Laryngoscope*. 2007;117(3):455–60.

Zhu L-F, Hu Y, Yang C-C, Xu X-H, Ning T-Y, Wang Z-L, et al. Snail overexpression induces an epithelial to mesenchymal transition and cancer stem cell-like properties in SCC9 cells. *Lab Invest*. Nature Publishing Group; maio de 2012;92(5):744–52.

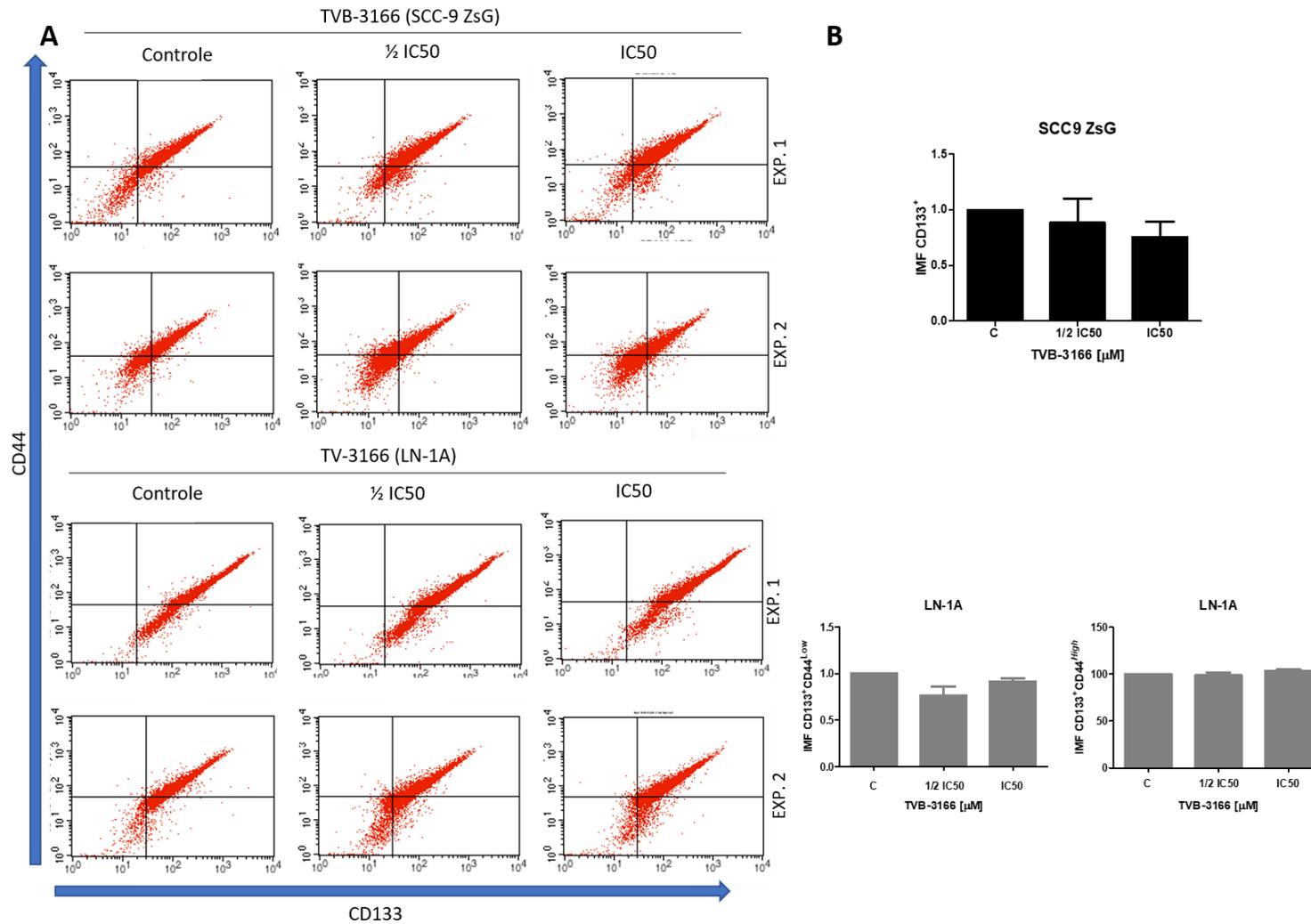
APÊNDICE 1. (A) Imagens de *dot plot* mostrando a expressão dos marcadores CD44 e CD133 nas linhagens celulares SCC-9 ZsG e LN-1A expostas ao PTX, nas concentrações de 1 ou 50 μM por 48 horas. (B) Análises da IMF para CD133 nas mesmas células mostradas em A. Os gráficos de coluna representam a média de dois experimentos independentes. * $p < 0,1$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Anova *One way* com teste de Dunnet.



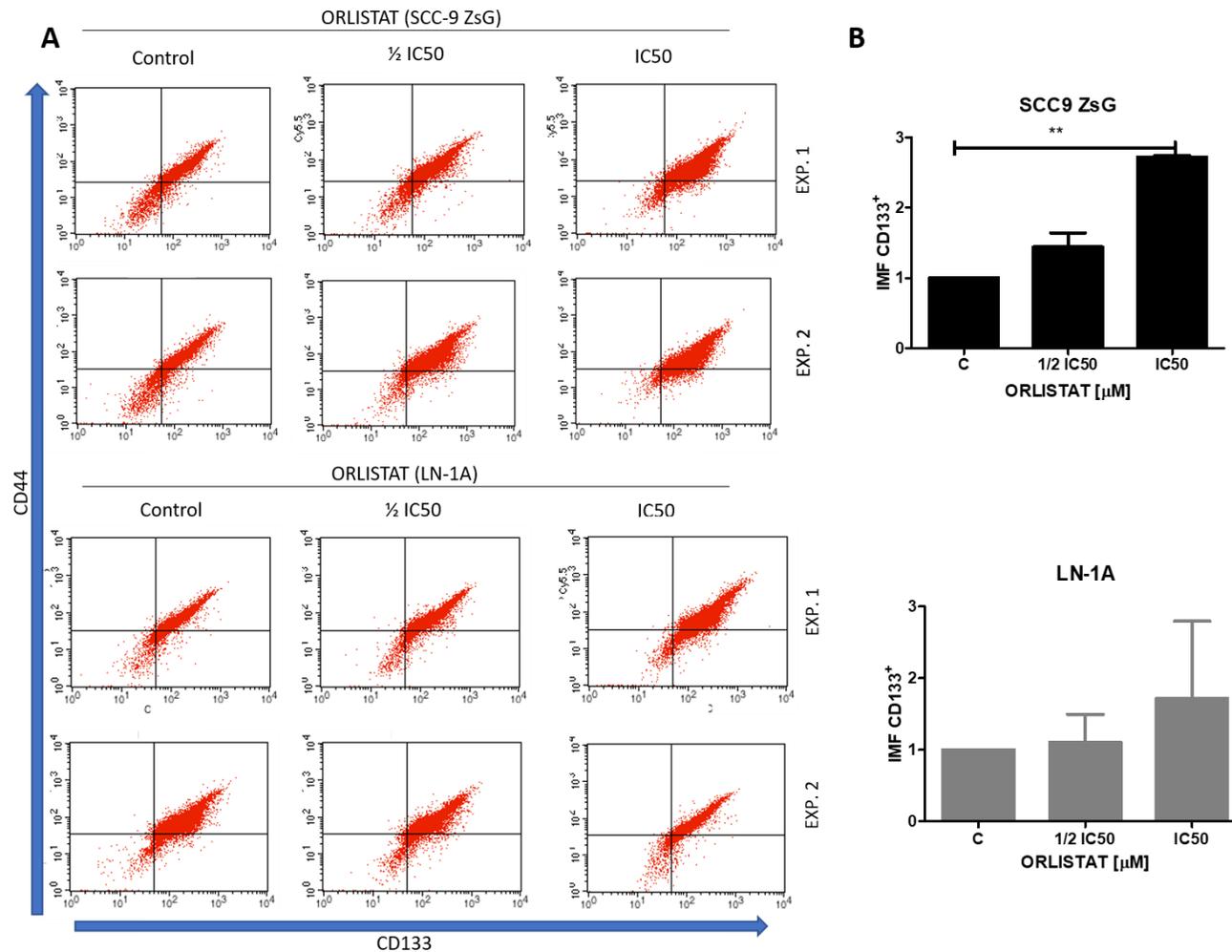
APÊNDICE 2. (A) Imagens de *dot plot* mostrando a expressão dos marcadores CD44 e CD133 nas linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A expostas a CIS em concentrações de 6 μM ($1/2 \text{ IC}_{50}$) e 12 μM (IC_{50}) por 48 horas. (B) Análises da IMF para CD133 nas mesmas células mostradas em A. Os gráficos de barra representam a média de dois experimentos independentes. C: controle; ** $p < 0,01$. Anova *One way* com teste de Dunnet.



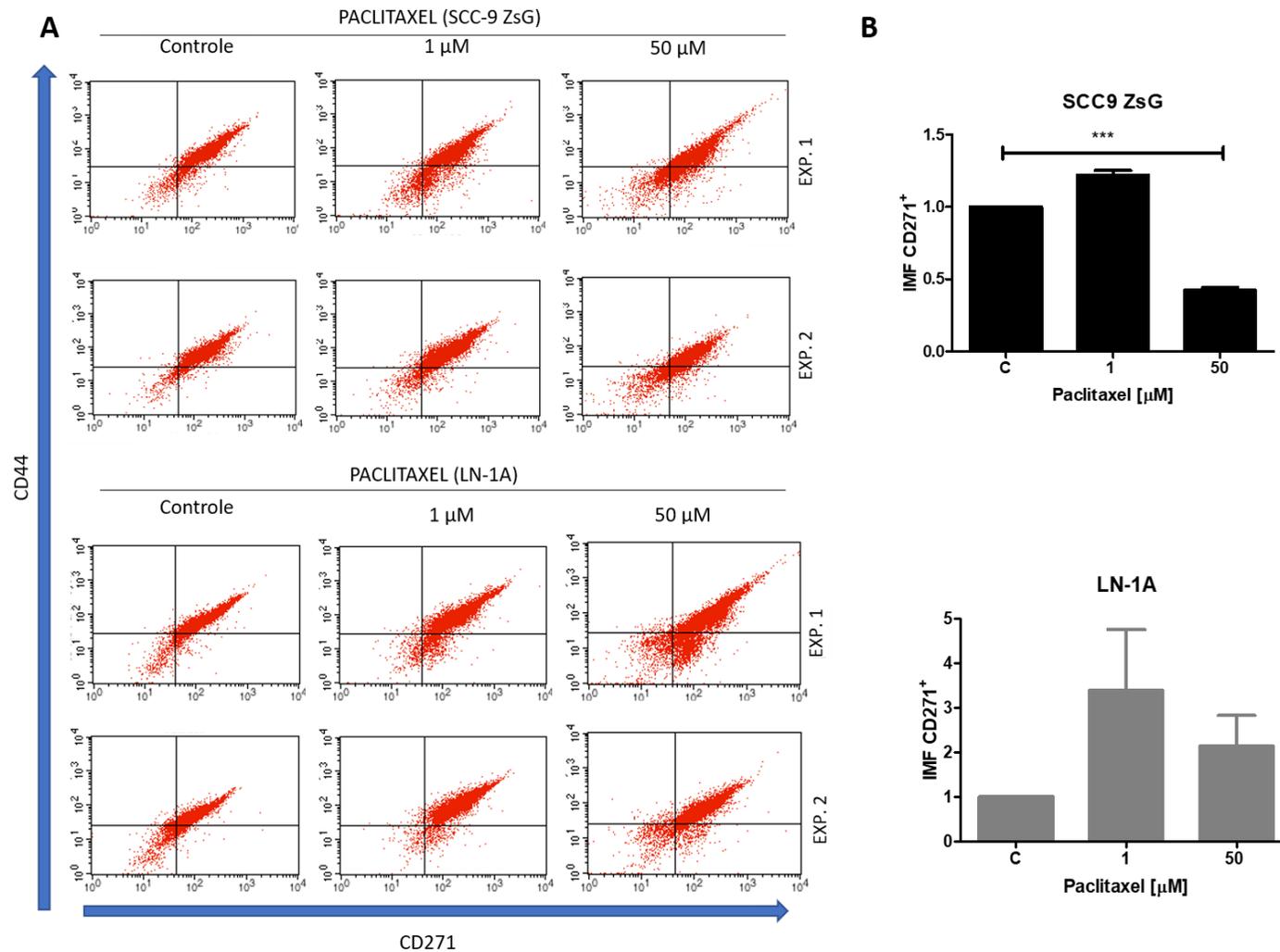
APÊNDICE 3. (A) Imagens de *dot plot* mostrando a expressão de CD44 e CD133 nas linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A expostas a concentrações de 15 e 18,5 μM ($1/2 \text{ IC}_{50}$) ou 30 e 37 μM (IC_{50}) do inibidor de FASN TVB-3166 por 48 horas. (B) IMF de CD133 nas mesmas células mostradas em A. Os gráficos de coluna representam a média de dois experimentos independentes. C: controle; * $p < 0,1$. Anova *One way*.



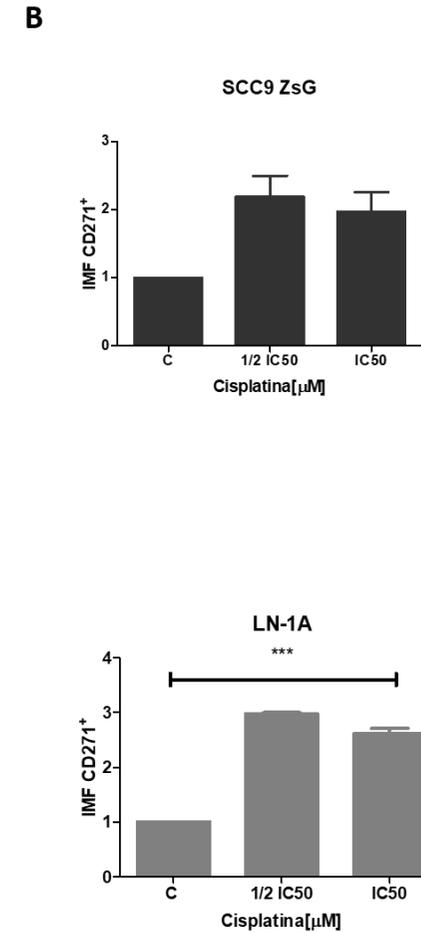
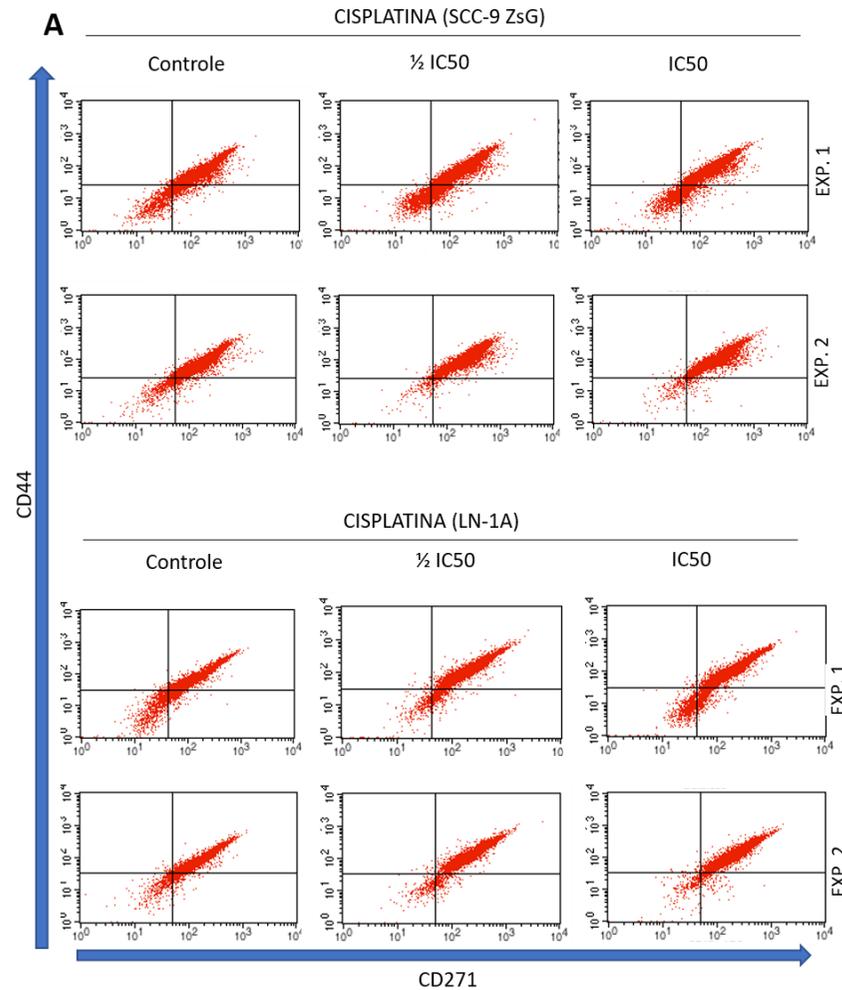
APÊNDICE 4. (A) Imagens de *dot plot* mostrando a expressão de CD44 e CD133 nas linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A expostas a concentrações de 140 μM ($1/2 \text{ IC}_{50}$) e 280 μM (IC_{50}) de ORL por 48 horas. (B) IMF para CD133 nas mesmas células mostradas em A. Os gráficos de coluna representam a média de dois experimentos independentes. C: controle; $**p < 0,01$. Anova *One way*.



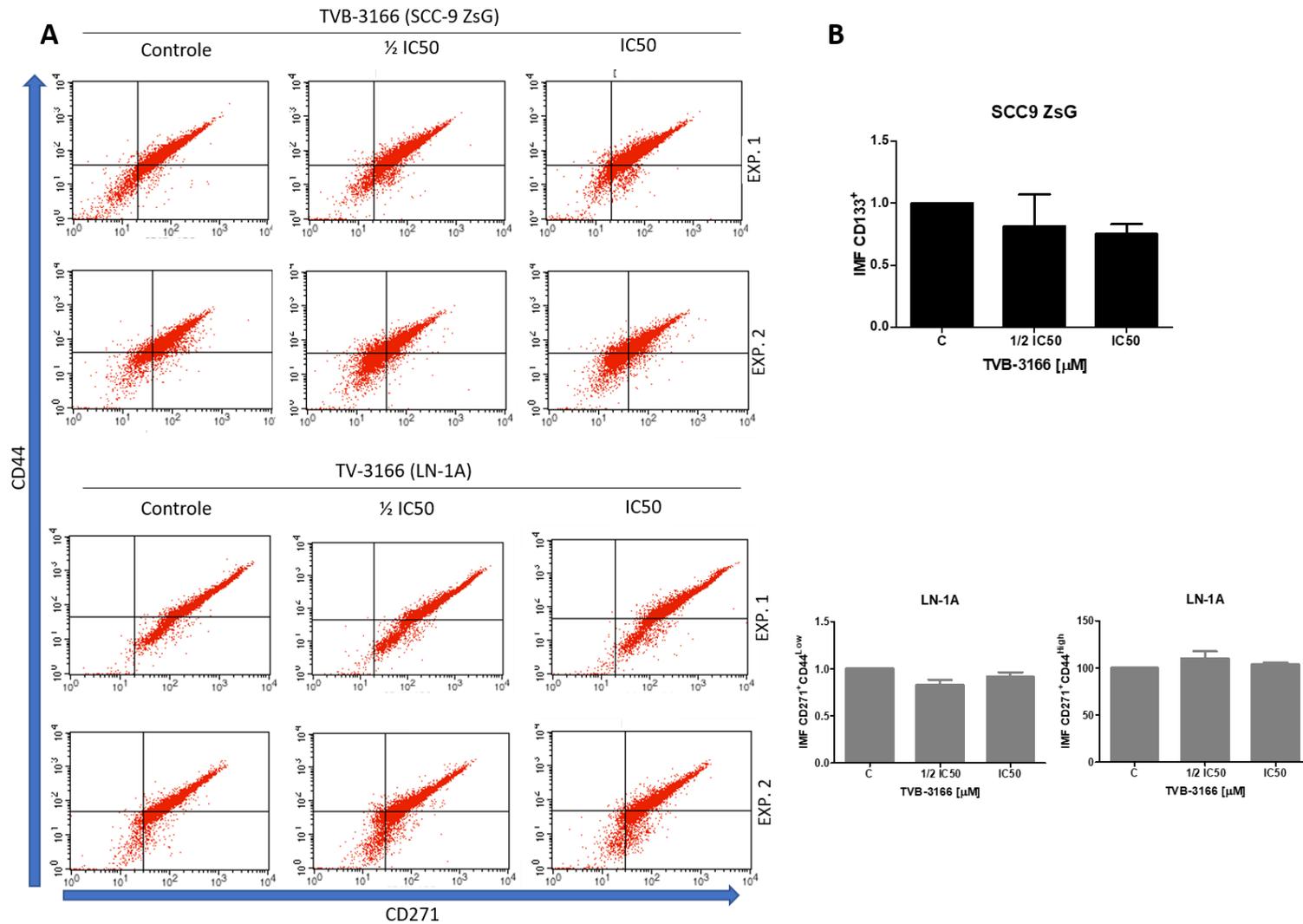
APÊNDICE 5. (A) Imagens de *dot plot* mostrando a expressão dos marcadores CD44 e CD271 nas linhagens celulares SCC-9 ZsG e LN-1A expostas ao PTX, nas concentrações de 1 ou 50 μM por 48 horas. (B) Análises da IMF para CD271 nas mesmas células mostradas em A. Os gráficos de coluna representam a média de dois experimentos independentes. * $p < 0,1$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Anova *One way* com teste de Dunnet.



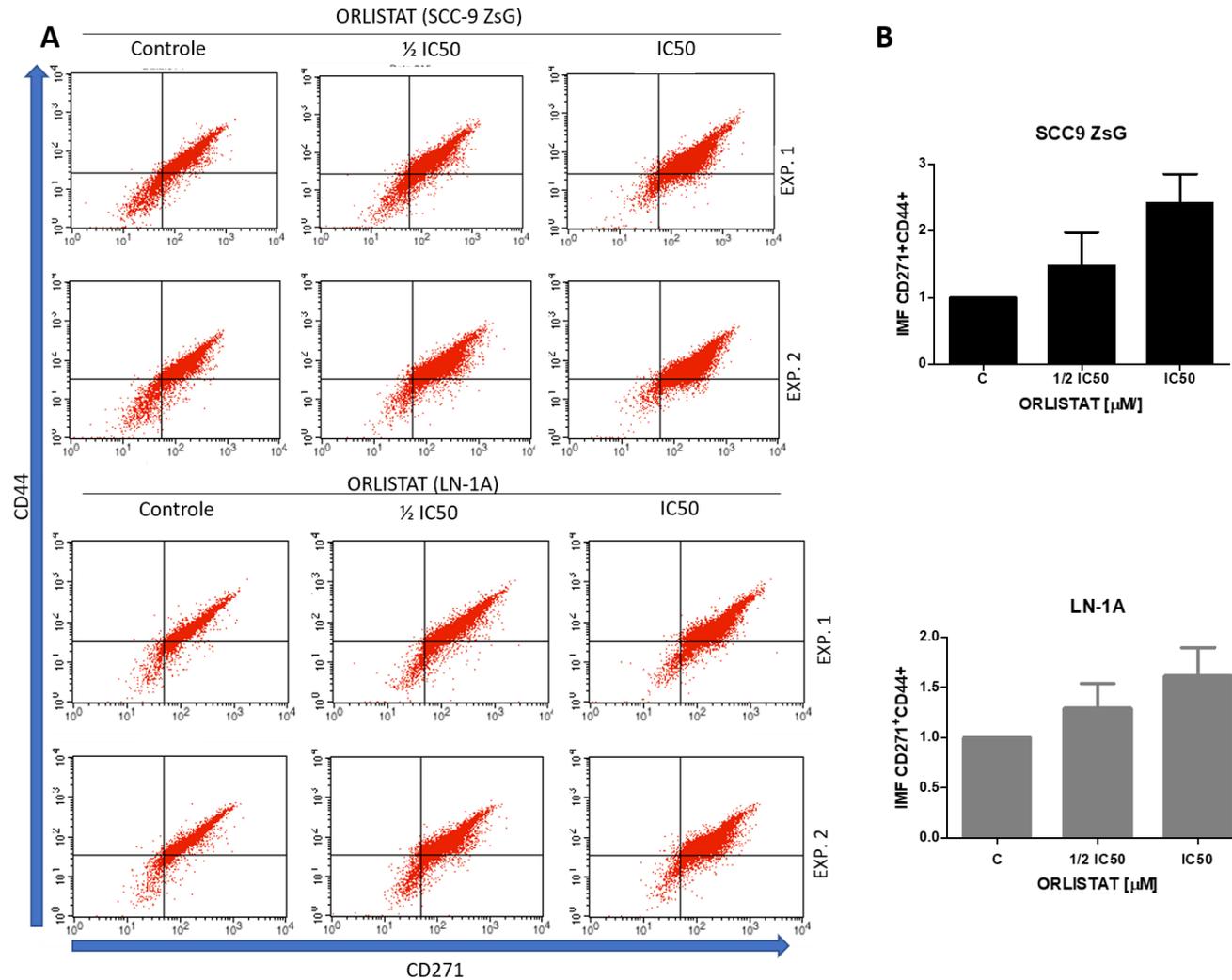
APÊNDICE 6. (A) Imagens de *dot plot* mostrando a expressão dos marcadores CD44 e CD271 nas linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A expostas a CIS em concentrações de 6 μM ($1/2 \text{ IC}_{50}$) e 12 μM (IC_{50}) por 48 horas. (B) Análises da IMF para CD271 nas mesmas células mostradas em A. Os gráficos de barra representam a média de dois experimentos independentes. C: controle; * $p < 0,1$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Anova *One way* com teste de Dunnet.



APÊNDICE 7. (A) Imagens de *dot plot* mostrando a expressão de CD44 e CD271 nas linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A expostas a concentrações de 15 e 18,5 μM ($1/2 \text{ IC}_{50}$) ou 30 e 37 μM (IC_{50}) do inibidor de FASN TVB-3166 por 48 horas. (B) IMF de CD271 nas mesmas células mostradas em A. Os gráficos de coluna representam a média de dois experimentos independentes. C: controle; * $p < 0,1$. Anova *One way*.



APÊNDICE 8. (A) Imagens de *dot plot* mostrando a expressão de CD44 e CD271 nas linhagens SCC-9 ZsG e LN-1A expostas a concentrações de 140 μM ($1/2 \text{ IC}_{50}$) e 280 μM (IC_{50}) de ORL por 48 horas. (B) IMF para CD271 nas mesmas células mostradas em A. Os gráficos de coluna representam a média de dois experimentos independentes. * $p < 0,1$. Anova *One way* com teste de Dunnet.



ANEXO 1 – VERIFICAÇÃO DE ORIGINALIDADE E PREVENÇÃO DE PLÁGIO

EFEITOS DO PACLITAXEL, CISPLATINA E INIBIDORES DA ENZIMA ÁCIDO GRAXO SINTASE NA EXPRESSÃO DE MARCADORES ASSOCIADOS ÀS CÉLULAS-TRONCO DO CÂNCER E ISOLAMENTO DE SUBPOPLAÇÕES EM LINHAGENS CELULARES DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL

| Tese Florence | | | |
|----------------------------|---|-------------|-----------------------|
| RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE | | | |
| 5% | 3% | 3% | 3% |
| ÍNDICE DE SEMELHANÇA | FONTES DA INTERNET | PUBLICAÇÕES | DOCUMENTOS DOS ALUNOS |
| FONTES PRIMÁRIAS | | | |
| 1 | Submitted to Universidade Estadual de Campinas Documento do Aluno | | 1% |
| 2 | www.oncotarget.com Fonte da Internet | | <1% |
| 3 | Submitted to Universidade de Sao Paulo Documento do Aluno | | <1% |
| 4 | lume.ufrgs.br Fonte da Internet | | <1% |
| 5 | Fontenele, Rafaela Salgado(Corrêa, José Raimundo and Magalhães, Kelly Grace). "Análise do papel de mediadores inflamatórios na manutenção do estado tumoral no modelo câncer de próstata in vitro", RIUnB, 2014. Publicação | | <1% |
| 6 | "Encyclopedia of Cancer", Springer Nature, 2009 Publicação | | <1% |