

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

IARA GONÇALVES DE AQUINO

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS-TRONCO DO CÂNCER EM LINHAGEM CELULAR METASTÁTICA DE CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL

PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF CANCER STEM CELL SUBPOPULATIONS FROM A METASTATIC ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA CELL LINE

Piracicaba 2023

IARA GONÇALVES DE AQUINO

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS-TRONCO DO CÂNCER EM LINHAGEM CELULAR METASTÁTICA DE CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL

PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF CANCER STEM CELL SUBPOPULATIONS FROM A METASTATIC ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA CELL LINE

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.

Thesis presented to the Piracicaba Dental School of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Oral Medicine and Oral Pathology, in Pathology area.

Orientador: Prof. Dr. Edgard Graner

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA

TESE DEFENDIDA PELA ALUNA IARA GONÇALVES DE AQUINO,

E ORIENTADA PELO PROF. DR. EDGARD GRANER.

Piracicaba 2023

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES - 001

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

Aquino, lara Gonçalves de, 1993-

Aq56c Caracterização fenotípica de subpopulações de células-tronco do câncer em linhagem celular metastática de carcinoma espinocelular oral / lara Gonçalves de Aquino. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2023.

> Orientador: Edgard Graner. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade deOdontologia de Piracicaba.

1. Carcinoma de células escamosas oral. 2. Células-tronco neoplásicas. 3. Transição epitelial-mesenquimal. 4. Ácido graxo sintases. 5. Cisplatino. I. Graner, Edgard, 1968-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Phenotypic characterization of cancer stem cell subpopulations from a metastatic oral squamous cell carcinoma cell line Palavras-chave em inglês: Oral squamous cell carcinoma Neoplastic stem cells Epithelial-mesenchymal transition Fatty acid synthases Cisplatin Área de concentração: Patologia Titulação: Doutora em Estomatopatologia Banca examinadora: Edgard Graner [Orientador] Michelle Agostini Luciana Yamamoto de Almeida Jacks Jorge Junior Renato Assis Machado Data de defesa: 02-03-2023 Programa de Pós-Graduação: Estomatopatologia

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

ORCID do autor: https://orcid.org/0000-0002-4795-7884 - Currículo Lattes do autor: http://lattes.cnpq.br/9395234462749605



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 02 de março de 2023, considerou a candidata IARA GONÇALVES DE AQUINO aprovada.

PROF. DR. EDGARD GRANER

PROF^a. DR^a. MICHELLE AGOSTINI

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

PROF. DR. JACKS JORGE JUNIOR

PROF. DR. RENATO ASSIS MACHADO

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

À minha mãe Maria Aparecida Gonçalves de Aquino:

Lutadora incansável. Exemplo de honestidade, dedicação e amor incondicional. Por ter acompanhado incansavelmente meus passos e nunca ter medido esforços para a concretização dos meus sonhos. Pelo carinho e colo que nunca faltaram e por carregar, todos os dias, meu coração.

> "Nunca se esqueça, nem um segundo Que eu tenho o amor maior do mundo Como é grande o meu amor por você

Mas como é grande o meu amor por você" Roberto Carlos

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, Prof. Dr. Flávio Henrique Baggio Aguiar;

À Coordenadoria de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba na pessoa da Prof. Dr. Valentim Adelino Ricardo Barão e ao Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia em nome do coordenador Prof. Dr. Pablo Augustin Vargas;

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Edgard Graner**, agradeço pela disponibilidade, confiança, e compartilhamento de conhecimentos ao longo deste período. Registro minha gratidão, admiração e respeito.

Aos Profs. Drs. Jacks Jorge Júnior, Oslei Paes de Almeida, Pablo Augustin Vargas, Márcio Ajudarte Lopes, Alan Roger dos Santos Silva e Ricardo Della Coletta professores das áreas de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba por todo suporte, dedicação e valiosos ensinamentos. Agradeço em especial ao Prof. Dr. Ricardo Della Coletta por sua colaboração nesta pesquisa, sem a qual, teríamos muita dificuldade em realiza-la.

A Profa. Dra. **Michelle Agostini** da Universidade Federal do Rio de Janeiro, quem me incentivou a fazer pós-graduação, agradeço por ter me guiado nas fases iniciais da minha formação acadêmica e principalmente pela amizade construída. Registro toda a minha gratidão, admiração e respeito.

Aos amigos do laboratório **Ana Laura Bizeli** e **Renato Assis**, pela troca de conhecimentos, colaborações e momentos de descontração. Especialmente à **Florence** por todo carinho, gentileza e por todos os conselhos e desabafos. À **Débora**

Bastos por todo apoio e contribuições durante esta trajetória acadêmica. Pela sua empatia e, principalmente, por ser um exemplo de ética profissional.

Ao Prof. Dr. Márcio Ajudarte Lopes pela oportunidade de participar do Orocentro. A toda equipe do Orocentro por toda colaboração e receptividade, especificamente a Daniele Morelli e Rogério Elias. Aos colegas do Orocentro Ana Gabriela Normando, Carla Rodrigues, Karen Gallagher, Erison Santana, Caique Mariano, Cristina Saldivia, Anna Luiza Araújo, Reydson Lima-Souza, Mariana Paglioni e Isabel Schausitz, pelo aprendizado e momentos compartilhados. A todos os pacientes atendidos no Orocentro, razão de nossas pesquisas, dedicação e esforços. Agradeço em especial ao Prof. Dr. Alan Roger dos Santos Silva por todos os incentivos, pelo compartilhamento de conhecimentos ao longo deste período, pelos exemplos de humildade e, principalmente, pelo empenho que se dedica as atividades profissionais. Expresso todo meu respeito, admiração e gratidão tanto pelo profissional como pela pessoa.

Aos funcionários do laboratório de patologia **Fabiana Casarotti**, **Fabiane Athayde** e **Fabio Téo** agradeço pela atenção e colaboração em tudo o que precisei.

Aos meus familiares, que sei que torcem pelo meu sucesso, em especial a **Mônica**, **Giovanni**, **Julia** e **Vera**, por terem sempre acreditado no meu potencial. À minha avó **Eleonay** (*in memoriam*), que deixou saudades, amor, ensinamentos e coragem. Sem vocês esta conquista não teria sido possível. À toda família **Aquino** e **Alkmim** agradeço por todo apoio e por terem acredito em mim.

Aos meus amigos do coração Victor Vianna, Vinicius Vianna, Luana Corrêa, Ana Clara Andrade, agradeço pela amizade sincera e incontáveis momentos de alegria que vivemos ao longo de tantos anos. Por todos os incentivos e, mesmo com a distância, estarem sempre presentes.

Ao **Luan César,** que sempre esteve ao meu lado desde o primeiro dia do mestrado, que me incentivou, apoiou e que sempre teve uma palavra amiga para me dizer. Agradeço pela amizade que construímos, por ter me aturado em todos os momentos e por ter sido meu fiel escudeiro. Amo você. À Raisa Sales pela amizade e conselhos sinceros. Ao João Scarini, pelos exemplos de dedicação, esforço e por todo apoio. À Natália Palmier, que me acolheu desde o primeiro dia, e me proporcionou a oportunidade de ser madrinha do seu casamento. Ao Rocharles Fontenele pelo carinho e parceria de todas as horas. À Astrid Valdivia por todo cuidado e tantos momentos de risadas sinceras. Vocês tornaram esta conquista mais leve e possível.

Aos amigos da pós-graduação Paulo Victor Penafort, Ana Carolina Colafêmina, Caique Mariano, Marco Túlio Ribeiro, Bruno Augusto Mariz, Ana Letícia Mello, Isabel Schausltz, Patrícia Fernandes, Maurício Dourado, Leonardo Reis, Mariana Paglioni, Pedro Curioso (*in memoriam*), por toda convivência, companheirismo, diversão, brindes, conversas, um pouco mais de brindes, risadas. Sempre me lembrarei dos nossos melhores momentos com muito carinho e saudades. Obrigada por terem sido minha família em Piracicaba.

RESUMO

O carcinoma espinocelular (CEC) oral apresenta propensão para invasão local, emissão de metástases para os linfonodos regionais e à distância, estando associado a índices consideráveis de recidivas precoces e baixas taxas de sobrevida. Vários estudos têm consistentemente mostrado que a presença de células tronco do câncer (CSC - cancer stem cells) contribuem para a falta de sucesso das terapias atuais contra o câncer. As CSC podem ser definidas como subpopulações de células cancerígenas que apresentam capacidade de autorrenovação indefinida e diferenciação celular, sendo responsáveis pela recorrência local, disseminação metastática e resistência ao tratamento radio/quimioterápico em vários tipos de câncer, incluindo no CEC oral. Embora a identificação precisa das CSC ainda seja um desafio, diversos estudos têm utilizado marcadores de superfície celular, isoladamente ou em combinação, para o estudo destas populações. Portanto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar três subpopulações de CSC com padrões distintos de expressão para os marcadores de superfície celular CD44 e CD326 (CSC-M₁: CD44⁺/CD326⁻, CSC-E: CD44^{Low}/CD326^{High} e CSC-M₂: CD44^{High}/CD326⁻) e compará-las com a linhagem parental metastática LN-1A. Para isto, investigamos in vitro as propriedades proliferativas, o potencial clonogênico e de formação de esferas, a adesão e a migração celular, bem como os níveis das proteínas associadas a transição epitélio-mesenquimal (EMT), da enzima ácido graxo sintase (FASN), do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), da p-Akt e da integrina aV por western blotting. Avaliamos também a sensibilidade as drogas antineoplásicas cisplatina e TVB-3166 por meio de ensaios de viabilidade celular e cálculo da concentração inibitória média (IC₅₀). Por fim, investigamos a capacidade de formação de tumores por meio da inoculação subcutânea de células na região de flanco e ortotopicamente na borda lateral de língua de camundongos BALB/c nude, bem como a formação de metástases para os linfonodos cervicais. Os resultados revelaram que os níveis de E-caderina foram maiores nas células CSC-E, enquanto os níveis de vimentina e slug foram maiores nas células CSC-M₂. Os níveis de N-caderina, FASN e EGFR foram semelhantes entre todas as linhagens celulares. As células CSC-M₁ e CSC-M₂ apresentaram maior potencial proliferativo, o que foi acompanhado por maiores níveis proteicos de p-Akt. Todas as linhagens celulares analisadas formaram esferas e as células CSC-M₁ e CSC-M₂ exibiram maior capacidade de formação de colônias. A migração celular foi semelhante entre todas as linhagens celulares estudas e a adesão ao miogel foi maior nas células CSC-M₁ e -M₂. Os níveis proteicos da integrina αv foram maiores nas células CSC-M₂ e menores nas células CSC-M₁. A sensibilidade à cisplatina foi semelhante entre as linhagens celulares estudadas, no entanto, as células CSC-E foram discretamente mais sensíveis ao TVB-3166 do que as demais linhagens celulares. Todas as linhagens celulares foram capazes de formar tumores quando inoculadas subcutaneamente na região de flanco e ortotopicamente na borda lateral de língua de camundongos BALB/c nude. Adicionalmente, as células CSC-E e CSC-M₂ formaram metástases nos linfonodos cervicais. Os resultados aqui apresentados poderão servir de base para melhor compreensão dos fenótipos das CSC a fim de direcionar tratamentos mais eficazes para o CEC oral.

Palavras-chaves: Carcinoma espinocelular oral. Células-tronco do câncer. CD44. CD326. EpCAM. Transição epitélio-mesenquimal. Ácido graxo sintase. Cisplatina. TVB-3166.

ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) has a propensity for local invasion and emission of metastases to regional and distant lymph nodes, being associated with considerable rates of early recurrences and low survival rates. Several studies have consistently shown that the presence of cancer stem cells (CSC) contributes to the failure of current cancer therapies. CSC can be defined as subpopulations of cancer cells that have an indefinite capacity for self-renewal and cell differentiation, being responsible for local recurrence, metastatic dissemination, and resistance to radio/chemotherapy treatment in various types of cancer, including OSCC. Although the precise identification of CSC is still a challenge, several studies have used cell surface markers, alone or in combination, to study these populations. Therefore, the objective of this work was to characterize three subpopulations of CSC with distinct patterns of expression for cell surface markers CD44 and CD326 (CSC-M1: CD44⁺/CD326⁻, CSC-E: CD44^{Low}/CD326^{High} and CSC-M₂: CD44^{High}/CD326⁻) and compare them with the LN-1A metastatic parental cells. To this, we investigated in vitro proliferative properties, clonogenic and sphere formation potential, cell adhesion, and migration, as well as the levels of proteins associated with epithelial-mesenchymal transition (EMT), the enzyme fatty acid synthase (FASN), epidermal growth factor receptor (EGFR), p-Akt and integrin av by western blotting. We also evaluated the sensitivity to the antineoplastic drugs cisplatin and TVB-3166 through cell viability assays and calculation of the mean inhibitory concentration (IC_{50}). Finally, we investigated the ability to form tumors by subcutaneously inoculating cells in the flank region and orthotopically on the lateral border of the tongue of BALB/c nude mice, as well as the formation of metastases to the cervical lymph nodes. The results revealed that E-cadherin levels were higher in CSC-E cells, while vimentin and slug levels were higher in CSC-M₂ cells. N-cadherin, FASN, and EGFR levels were similar among all cell lines. CSC-M₁ and CSC-M₂ cells showed greater proliferative potential, which was accompanied by higher protein levels of p-Akt. All cell lines analyzed formed spheres, and the greatest ability to form colonies was observed in CSC-M₁ and CSC-M₂ cells. Cell migration was similar among all cell lines studied, and adhesion to the myogel was higher in CSC-M₁ and CSC-M₂ cells. Integrin αν protein levels were higher in CSC-M₂ cells and lower in CSC-M₁ cells. Cisplatin sensitivity was similar between the cell lines studied; however, CSC-E cells were slightly more sensitive to TVB-3166 than the other cell lines. All cell lines were able to form tumors when inoculated subcutaneously in the flank region and orthotopically in the lateral border of the tongue of BALB/c nude mice, and CSC-E and CSC-M₂ cells metastasized to cervical lymph nodes. The results presented here may serve as a basis for a better understanding of CSC phenotypes to direct more effective treatments for OSCC.

Keywords: Oral squamous cell carcinoma. Cancer stem cells. CD44. CD326. EpCAM. Epithelial-mesenchymal transition. Fatty acid synthase. Cisplatin. TVB-3166.

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA: Bovine serum albumin – albumina de soro bovino

CD326: Cluster de diferenciação 326

CD44: Cluster de diferenciação 44

CEC: Carcinoma espinocelular

CoCl_{2:} Cloreto de cobalto

CSC-E: Células-tronco do câncer CD44^{Low}/CD326^{High};

CSC-M₁: Células-tronco do câncer CD44⁺/CD326⁻;

CSC-M₂: Células-tronco do câncer CD44^{High}/CD326⁻.

CSC: Cancer stem cells - células-tronco do câncer

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

DMSO: Dimethyl sulfoxide - dimetil sulfóxido

ECM: Extracellular matrix - matriz extracelular

EGFR: Epidermal growth factor receptor – receptor do fator de crescimento epidermal

EMT: Epithelial mesenchymal transition – transição epitélio-mesenquimal

EpCAM: Epithelial cell adhesion molecule – Molécula de adesão celular epitelial

ESA: Epithelial surface antigen – antígeno de superfície epitelial

FACS: *Fluorescence-activated cell sorting* – separador celular ativado por fluorescência

FASN: Fatty acid synthase – ácido graxo sintase

FBS: Fetal bovine serum - soro fetal bovino

HIF-1 α : Hypoxia Inducible Factor-1 α : – fator indutor de hipóxia 1 alpha

HPV: Human papillomavirus – papilomavírus humano

IC₅₀: Half maximal inhibitory concentration – concentração inibitória média

INCA: Instituto Nacional do Câncer

kDa: kilodalton – Quilodalton

OSSC: Oral squamous cell carcinoma – carcinoma de células escamosas oral

p-Akt: Phosphorylated Akt – Akt fosforilado

PBS: Phosphate Buffered Saline - solução salina tamponada com fosfato

SFB: Soro fetal bovino

µL: Microlitro

µM: Micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. ARTIGO: Phenotypic characterization of cancer stem cell subpopulations from a metastatic	oral
squamous cell carcinoma cell line	20
Abstract	. 21
Introduction	22
Material e methods	23
Results	28
Discussion	37
References	40
Supplementary figures	49
3. CONCLUSÃO	52
4. REFERÊNCIAS	53
APÊNDICES	. 57
1 Material e métodos	. 57
2 Análise do ciclo celular	63
3 Análise das células em processo de morte celular por apoptose e necrose	64
4 Análise da viabilidade celular em células tratadas com CoCl ₂	65
5 Análise do ciclo celular em células tratadas com CoCl ₂	66
6 Análise das taxas de apoptose e necrose em células tratadas com CoCl ₂	67
7 Morfologia e expressão de vimentina nas células utilizadas no modelo animal	68
8 Análise da média do peso dos animais	69
9 Análise do volume tumoral no flanco de camundongos BALB/c	70
10 Análise do volume tumoral na borda lateral de língua de camundongos BALB/	71
11 Análise dos linfonodos cervicais da cadeia mandibular medial direita	72

12 Análise dos linfonodos cervicais da cadeia mandibular lateral direita	73
13 Expressão imunohistoquímica do CD44 em amostras tumorais	74
ANEXOS	75
ANEXO I: Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	75
ANEXO II: Verificação de originalidade e prevenção de plágio ANEXO III: Comprovante de submissão do artigo	76 77

1 INTRODUÇÃO

O câncer oral é considerado um grave problema de saúde mundial, ocupando o décimo sexto lugar em incidência considerando-se todos os casos de câncer no mundo. Anualmente, estima-se que 177.757 mortes sejam causadas no mundo pelo câncer de boca (Sung et al., 2021). No Brasil, de acordo com os dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), estimou-se para cada ano do triênio de 2023-2025, 15.100 novos casos de câncer oral, sendo 10.900 casos em homens e 4.200 casos em mulheres, o que coloca este tipo de câncer na guinta colocação em incidência na população masculina brasileira (INCA, 2023). O carcinoma espinocelular (CEC), também denominado de carcinoma de células escamosas ou carcinoma epidermóide, é a neoplasia maligna mais comum da cavidade oral, compreendendo mais de 90% de todos os casos. Os principais fatores de risco para o CEC de boca incluem o tabagismo e etilismo crônico, e a interação entre ambos, possui forte sinergismo (Bouvard et al., 2022). O CEC oral apresenta propensão tanto para invasão local como para a emissão de metástases precoces para os linfonodos regionais e/ou à distância. A maioria dos pacientes com CEC de boca é diagnosticada em estágio avançado da doença, já com presença de metástases cervicais, o que contribui diretamente para o prognóstico ruim desta doença (Curado et al., 2016). O estadiamento clínico e a localização do tumor guiam o tratamento da doença, para o qual a cirurgia representa a principal modalidade terapêutica, no entanto, quando em estádios muito avançados, os pacientes são incluídos em protocolos radio/quimioterápicos (Marur & Forastiere, 2016; Nandini et al., 2020).

Apesar de todos os avanços tecnológicos e científicos, as taxas de sobrevida para o CEC de boca não mostraram nenhuma melhora nas últimas décadas e permaneceram em aproximadamente 50% após 5 anos (Cohen Goldemberg et al., 2018; Warnakulasuriya, 2009). O cenário é ainda mais desfavorável para pacientes com tumores metastáticos ou recorrentes, para os quais a sobrevida global média permanece inferior a 1 ano (Kurzweg et al., 2012). As altas taxas de mortalidade têm sido amplamente atribuídas às recorrências locorregionais que podem ser explicadas, pelo menos em parte, devido ao diagnóstico tardio que contribui para o fracasso das abordagens terapêuticas atuais em casos avançados (Borsetto et al., 2019). Neste

contexto, evidências provenientes de pesquisas laboratoriais sugerem que a complexidade molecular, a heterogeneidade celular intratumoral e a presença das chamadas células tronco do câncer (*cancer stem cells* – CSC) são responsáveis pela recorrência local, disseminação metastática e resistência ao tratamento radio/quimioterápico em vários tipos de neoplasias malignas, incluindo o CEC oral (Koukourakis et al., 2012; Noman et al., 2020; Oliveira et al., 2014).

O conceito de CSC foi proposto há cerca de quatro décadas e propõe que o crescimento do tumor é análogo à renovação dos tecidos saudáveis e alimentado por um pequeno número de células-tronco especializadas (Reya et al., 2001). As CSC, também denominadas de células iniciadoras de tumor, compreendem subpopulações de células de natureza maligna que apresentam capacidade de autorrenovação indefinida e de diferenciação celular que impulsionam o crescimento e criam a heterogeneidade do tumor (Jordan et al., 2006). A primeira evidência do papel das CSC no câncer surgiu em 1997, quando pesquisadores descobriram que apenas uma subpopulação de células leucêmicas fenotipicamente bem estabelecidas foi capaz de formar tumores quando transplantada em camundongos imunodeficientes (Bonnet & Dick, 1997). Desde então, os pesquisadores investigaram com profundidade o papel das populações de CSC em diferentes tipos de neoplasias malignas sólidas, como as de mama, próstata, pâncreas, cérebro e o câncer de cabeça e pescoço (Al-Hajj et al., 2003; Collins et al., 2005; Li et al., 2007; Prince et al., 2007; Singh et al., 2003).

A falta de sucesso completo das terapias atuais contra o câncer avançado pode ser causada, pelo menos em parte, pela presença de CSC quiescentes, que permanecem vitais após o tratamento e retêm sua capacidade de repovoar o tumor com o passar do tempo (Baillie et al., 2017). Parece ser necessário, portanto, que novas estratégias de tratamento para a eliminação completa do câncer considerem as consequências da permanência das CSC. Por outro lado, a análise precisa do perfil molecular das CSC permanece um grande desafio para as pesquisas atuais devido às dificuldades existentes para a identificação e, consequentemente, isolamento destas células (LaBarge, 2010). Devido a falta de um marcador universal ou específico para CSC derivadas de neoplasias malignas de diferentes origens teciduais e à falta de seletividade dos marcadores disponíveis, a combinação de dois ou mais marcadores de superfície celular tem sido a abordagem mais utilizada para a identificação e isolamento das CSC (Jariyal et al., 2019). Dentre os marcadores de superfície mais estudados e melhor caracterizados no CEC oral estão CD24, CD29, CD44, CD98, CD133 e CD326, dentre outros (Chen and Wang, 2019; Costea et al., 2006).

Existem evidências crescentes na literatura científica sobre linhagens celulares derivadas de CEC oral apontam que a presença de subpopulações positivas para CD44 e CD326 apresentam características fenotípicas e funcionais compatíveis tanto com células-tronco epiteliais normais quanto com CSC ou células capazes de iniciar tumores *in vivo* (Amôr et al., 2021; Biddle et al., 2011; Prince et al., 2007; Shigeishi et al., 2018). Adicionalmente, estudos prévios do nosso próprio grupo de pesquisa demostraram a expressão de CD24, CD44 e suas isoformas CD44v3 e CD44v6, CD133, CD271 e também CD326 em duas linhagens celulares derivadas de CCE oral, a SCC-9 ZsGreen e sua derivada metastática LN-1A (Cuadra-Zelaya, 2016). A partir deste estudo foi realizado o isolamento de diferentes fenótipos com expressão diferencial de CD44 e CD326, em ambas as linhagens celulares (Cuadra-Zelaya, 2019).

CD44 (cluster de diferenciação 44), é uma glicoproteína transmembrânica complexa que participa de vários processos fisiológicos e sua desregulação ou expressão aberrante parece contribuir para a iniciação e progressão tumoral (Chen et al., 2018). Esta glicoproteína está envolvida na regulação de diversas vias de sinalização que podem modular a proliferação, invasão, metástase, transição epitéliomesenquimal (EMT - epithelial mesenchymal transition) e resistência à terapias contra o câncer (Yan et al., 2015). CD326 (cluster de diferenciação 326) ou molécula de adesão celular epitelial (EpCAM), por sua vez, é uma glicoproteína transmembrânica expressa em um subconjunto de epitélios normais e produzida em grande quantidade por células malignas oriundas de diferentes tipos tumorais, onde desempenha papéis em vários processos biológicos como adesão, migração, proliferação, EMT e diferenciação celular (Imrich et al., 2012; Munz et al., 2009). Entretanto, os dados disponíveis ainda são insuficientes para um entendimento completo da biologia das CSC (sua identidade precisa, localização dentro da massa tumoral e suas características funcionais) e, portanto, modelos que auxiliem na caracterização do comportamento tumorigênico e/ou metastático destas células no CEC oral são imprescindíveis.

Mediante o exposto, no presente estudo o objetivo foi caracterizar os fenótipos de três subpopulações de CSC com diferentes padrões de marcação para CD44 e CD326, previamente isoladas em nosso laboratório, e compará-los com a

linhagem metastática parental LN-1A derivada de CEC oral. Para isto, investigamos as propriedades proliferativas, o potencial clonogênico, a capacidade de formação de esferas, a adesão e a migração celular, bem como a sensibilidade às drogas antineoplásicas cisplatina e TVB-3166. Verificamos também nestas linhagens celulares os níveis de proteínas associadas a EMT, de FASN, EGFR, p-Akt e integrina αv. Por fim, investigamos a capacidade destas células de formarem tumores após inoculação subcutânea na região do flanco ou ortotópica na borda lateral de língua de camundongos imunodeficientes. Os resultados aqui apresentados poderão servir de base para a melhor compreensão dos fenótipos das CSC e direcionar a padronização de futuros tratamentos mais eficazes contra o CEC oral.

2 ARTIGO

Title: Phenotypic characterization of cancer stem cell subpopulations from a metastatic oral squamous cell carcinoma cell line

Authors: Iara Gonçalves Aquino^a, Florence Juana Maria Cuadra-Zelaya^{a,d}, Débora Campanella Bastos^{b,c}, Ana Laura Valença Bizeli^a, Patricia Vianna Bonini Palma^e, Tuula Salo^{g,h,i}, Fernanda Viviano Mariano^f, Ricardo Della Coletta^a, and Edgard Graner^a

^a Department of Oral Diagnosis, School of Dentistry of Piracicaba, State University of Campinas (UNICAMP), Piracicaba, Sao Paulo, Brazil

^b Department of Biosciences, School of Dentistry of Piracicaba, State University of Campinas (UNICAMP), Piracicaba, Sao Paulo, Brazil

^c Faculty of Medicine São Leopoldo Mandic, Campinas, São Paulo, Brazil

^d Department of Pathology, School of Dentistry, University of El Salvador, San Salvador, El Salvador

^e Regional Blood Center of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

^f Department of Pathology, School of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

^g Cancer and Translational Medicine Research Unit, Faculty of Medicine and Medical Research Center Oulu, Oulu University Hospital, University of Oulu, Oulu, Finland.

^h Department of Oral and Maxillofacial Diseases, Helsinki University Central Hospital, and Translational Immunology Research Program (TRIMM), University of Helsinki, Helsinki, Finland

ⁱ HUSLAB, Department of Pathology, Helsinki University Central Hospital, University of Helsinki, Helsinki, Finland

Corresponding Author: Edgard Graner, Department of Oral Diagnosis, School of Dentistry of Piracicaba, State University of Campinas (UNICAMP), Av. Limeira 901, Areão, Piracicaba 13414-018, São Paulo, Brazil. Phone: 55-19-2106-5318. E-mail: graner@unicamp.br

ABSTRACT

Objectives: Cancer stem cells (CSC) are strongly associated with local recurrence, metastatic dissemination, and chemoradiotherapy resistance in several types of cancer, including oral squamous cell carcinoma (OSCC). We aimed to characterize the *in vitro* and *in vivo* behavior of CSC subpopulations derived from a highly metastatic OSCC cell line.

Materials and Methods: Three CSC subpopulations with different patterns of positivity for CD44 and CD326 were isolated by FACS (CSC-M₁, -E, and -M₂) from LN-1A cells. Their proliferation rates, clonogenic and sphere formation potential, adhesion to extracellular matrix, and migration were analysed *in vitro*, as the levels of epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers and p-Akt, and sensitivity to cisplatin and TVB-3166. The ability of these cells to *in vivo* produce tumors was tested both in the flanks and orthotopically in the tongue of BALB/c mice.

Results: E-cadherin levels were higher in CSC-E cells, while vimentin and slug were more produced by CSC-M₂ cells. CSC-M₁ and CSC-M₂ cells showed greater proliferative potential, which was accompanied by a high production of p-Akt. All studied cell lines were able to form spheres, and the greatest ability to grow in colonies was observed in CSC-M₁ and CSC-M₂ cells, which also have stronger adhesion to myogel. Finally, CSC-E cells were more sensitive to the exposure to TVB-3166, and all cell lines were able to form tumors when subcutaneously or orthotopically inoculated in mice.

Conclusion: OSCC-derived CSC subpopulations exhibited distinct and enhanced cancer phenotypes *in vitro*, tumorigenic capacity *in vivo*, and must be exploited to provide novel therapeutic targets for OSCC.

Keywords: Oral squamous cell carcinoma. Cancer stem cells. CD44. CD326. Epithelial-mesenchymal transition.

1 Introduction

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common type of malignant tumor that affects the oral cavity and has been estimated to be the sixteenth position among all human malignancies both in incidence and mortality worldwide [1], [2]. Despite current scientific and technological advances, the survival rates of OSCC have remained at approximately 50% after five years [3], [4]. The failure of current therapeutic strategies may be due, at least in part, to the presence of quiescent cancer stem cells (CSC), which remain vital and retain the ability to repopulate the tumor [5]. Therefore, new treatment strategies need to consider the existence of CSC in order to successfully eradicate cancer.

CSC, also known as tumor-initiating cells, comprise subpopulations of cancer cells with the ability of unlimited self-renewal and cell differentiation, driving both tumor growth and cell heterogeneity [6], [7]. The first evidence of CSC came out in 1997 when a subpopulation of phenotypically well-established leukemic cells was the only one able to form tumors when transplanted to immunodeficient mice [8]. Since then, many researchers have extensively investigated the role of CSC populations in different types of human malignant solid tumors, such as those from the breast, prostate, pancreas, brain, and head and neck [9], [10], [11], [12], [13]. Collectively, their results suggest that the presence of CSC is potentially responsible for local recurrence, metastatic spread, and resistance to radiotherapy and chemotherapy in these tumors, including OSCC [14], [15], [16].

The accurate identification, isolation, and phenotypical analysis of CSC remain one of the major challenges for researchers due to the lack of specific markers. Consequently, the combination of several cell surface markers has been the choice for the isolation of CSC [17], [18]. A growing body of evidence with OSCC-derived cell lines shows the presence of subpopulations positive for different cell surface markers, such as CD24, CD29, CD44, CD98, CD133, and CD326, with well-defined malignant properties and capable of developing new tumors when transplanted into mice [19], [20]. CD44 and CD326 (epithelial cell adhesion molecule - EpCAM or epithelial surface antigen - ESA) are transmembrane glycoproteins with roles in several physiological processes, and their dysregulation or aberrant expression seems to contribute to tumor initiation and progression [21], [22]. These cell surface molecules are involved in the control of signaling pathways that affect proliferation, invasion, metastasis, epithelial-

mesenchymal transition (EMT), and resistance to cancer therapy [23], [24]. Therefore, since models that better characterize the tumorigenic and metastatic behavior of CSC populations in OSCC are still needed, in the present study, we characterize the *in vitro* and *in vivo* behavior of the CSC-M₁ (CD44⁺/CD326⁻), CSC-E (CD44^{Low}/CD326^{High}), and CSC-M₂ (CD44^{High}/CD326⁻) putative CSC phenotypes isolated from the metastatic LN-1A cell line.

2 Materials and methods

2.1 Cell culture

The SCC-9 ZsGreen LN-1A (LN-1A) metastatic cell line is derived from human OSCC and was established by *in vivo* selection from SCC-9 ZsGreen cells as previously described by our group [25]. LN-1A cells and LN-1A-derived CSC subpopulations were maintained in DMEM/F-12 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% of FBS (Cultilab, Campinas, Brazil), 400 ng/mL of hydrocortisone (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 1% antibiotic/antimycotic solution (Invitrogen), and 0.2% de MycoZapTM Prophylactic (Lonza, Basel, Switzerland) at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO2.

2.2 Flow cytometry and fluorescence-activated cell sorting (FACS)

LN-1A cells were simultaneously labeled with antibodies against CD44 (clone G44-26, BD Pharmingen, New Jersey, USA) and CD326 (clone HEA-125, Miltenyi Biotec, North Rhine-Westphalia, Germany). Isotype-matched PerCP-Cy5.5 (clone 27-35, BD Pharmingen) or APC-conjugated (clone 11711, R&D Systems, Minnesota, USA) antibodies were used as controls. Samples were analyzed and sorted with the aid of a FACSAriaTMFusion flow cytometer (BD Biosciences) from the Regional Blood Center of Ribeirão Preto of the University of São Paulo and the software FACSDiva 8.0.1 (BD Biosciences).

2.3 Cell proliferation

The proliferative potential of studied cell lines was estimated by seeding 5 × 10³ cells into each well of 48-well plates with DMEM/F-12 containing 10% FBS. After 24 h, cell culture medium was changed by serum-free medium, cells incubated for more of 24 h, and then cultured for 24, 48, 72, and 98 h in fresh medium containing

10% FBS. After that, cells from duplicate wells were trypsinized and counted in a Neubauer chamber.

2.4 Clonogenic assay and spheroid formation

To assess the clonogenic potential of our isolated CSC, 500 cells were grown in DMEM/F-12 supplemented with 10% FBS in 6-well culture plates for 10 days, being the culture medium changed every 48 h. Colonies were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with 0.1% crystal violet, plates extensively washed with distilled water and dried at room temperature. Following scanning in a transilluminator device Alliance 4.7 equipment (UVITEC, Cambridge, England), colonies were counted according to the criteria described by Franken et al. [26] using the Image J software (National Institutes of Health, Maryland, USA). In order to evaluate the ability to form spheres, each cell population was seeded at a density of 8 × 10³ cells in low attachment 96-well plates (Nunclon[™] Sphere[™], Thermo Scientific, Massachusetts, USA) in DMEM/F-12 containing 10% FBS for 24 h. Spheres were observed and documented in an inverted phase-contrast microscope (Nikon Eclipse Ti-S).

2.5 Scratch assays

Cell migration was evaluated as previously described [27]. Briefly, 2.4×10^5 cells were seeded in 24-well plates in DMEM/F-12 medium with 10% FBS. The confluent monolayer formed after 24 h was scraped off with sterile 200 µL micropipette tips to create cell-free areas. After three washes with PBS, medium supplemented with 10% FBS was added, and cells incubated for additional 16 h. Images were obtained with the aid of a Nikon Eclipse Ti-S microscope. Cell migration was calculated with Image J software and expressed as the percentage of wound closure.

2.6 Adhesion assays

Ninety-six-well plates were sensitized with 10 μ g/ μ L of myogel, an extracellular matrix-derived mixture obtained from human uterine leiomyomas [28], at 4 °C for 24 h. Uncoated wells incubated with PBS only were used as negative controls. After a washing step with PBS and incubation with 3% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich) in PBS for 2 h at 37 °C, subconfluent LN-1A cells or CSC subpopulations previously grown in DMEM/F-12 supplemented with 10% FBS for 48 h

were harvested and plated (3 x 10⁴) in the pre-treated wells. After 1 h at 37°C, nonadherent cells were washed, the remaining adherent cells fixed in 10% trichloroacetic acid (TCA, Sigma-Aldrich), stained with 0.1% crystal violet, extensively washed in distilled water, eluted in 70% ethanol, and quantified by using an ELISA reader at 655 nm (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

2.7 Drug resistance assays

Cell viability was estimated using (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich) following the incubation of LN-1A cells or CSC subpopulations with DMEM/F-12 supplemented with 2 or 10% FBS containing increasing concentrations of TVB-3166 or cisplatin for 48 h (both from Sigma-Aldrich). Dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) and 0.9% sodium chloride solution were used as vehicle controls for TVB-3166 and cisplatin, respectively. IC₅₀ values were determined through the dose-effect curve with the aid of GraphPad Prism 8.4.3 software (California, USA).

2.8 Protein extractions and western blotting

Protein lysates were prepared from cell pellets for western blotting reactions as previously described [29]. Fifty micrograms of each protein lysate were probed with the primary antibodies described in **Table 1**, and the resulting protein bands analyzed with the aid of an Alliance 4.7 equipment (UVITEC) and Alliance 16.06 software. Antibodies against β -actin were used as loading controls.

Antibody	Host	Molecular weight (kDa)	Dilution	Reference
FASN	Mouse	265	1:3000	610963, BD Biosciences
EGFR	Rabbit	175	1:1000	D38B1, Cell Signaling Technology
E-cadherin	Rabbit	135	1:1000	24E10, Cell Signaling Technology
Integrin αv	Rabbit	130	1:500	sc-6617-R, Santa Cruz Biotecnology
N-cadherin	Mouse	130	1:1000	610920, BD Biosciences
p-Akt	Rabbit	60	1:1000	Ser473, Cell Signaling Technology
Vimentin	Rabbit	57	1:1000	D21H3, Cell Signaling Technology
β-actin	Mouse	42	1:10000	A1978, Sigma-Aldrich
Slug	Rabbit	30	1:1000	C19G7, Cell Signaling Technology

Table 1. Antibodies used in western blotting reactions with protein extracts obtained from LN-1A cells and CSC-M₁, -E, and M₂ subpopulations.

FASN: Fatty acid synthase; EGFR: Epidermal growth factor receptor; p-Akt: phospho-Akt; kDa: kilodalton

2.9 In vivo tumorigenic assays

In vivo experiments were conducted with 6–8-week-old BALB/c nude male mice obtained from the Animal Facility of the Faculty of Medicine of the University of São Paulo (USP, Brazil). All animal experiments were approved by the Animal Research Ethics Committee of the Piracicaba Dental School, University of Campinas, Brazil (protocol 6020-1/2022). LN-1A cells and their CSC subpopulations were grown until 70% confluency in DMEM/F-12 with 10% FBS and 10^5 , 5 x 10^5 , or 10×10^5 cells in 100 µL of culture medium subcutaneously injected into the flank region of each animal. In addition, orthotopic implantations of 2 x 10^5 cells in the right lateral portion of their tongues were performed in 20 µL of culture medium, both with syringes with 30-gauge disposable needles (Ultra Fine II, BD Biosciences). Mice were anesthetized with intraperitoneal injections of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), and had their body weight weekly monitored. Twenty-five days after implantations, the animals were euthanized, carefully dissected, and their tongues, cervical lymph nodes, and subcutaneous tumors collected. The volumes of subcutaneous tumors were

determined with a digital caliper using the formula volume = 0.5 × length × width². Tongues were observed and documented in an Alliance 4.7 equipment (UVITEC) under blue light exposure, and the volumes of primary tumors evaluated with Image J software using the formula described above. Cervical lymph nodes were analyzed with an epifluorescence microscope for the detection of metastatic *foci*. All tissue samples were fixed in 10% buffered formalin solution and embedded in paraffin for histological processing. Serial sections of tongues were stained with hematoxylin and eosin (H&E). Immunohistochemical reactions were performed as previously described [30], using anti-cytokeratin antibodies (1:200 dilution, clone AE1/AE3, Dako, USA) for confirmation of lymph node metastasis. All slides were scanned in an Aperio Scanscope CS Slide Scanner (Aperio Technologies Inc), and digital images obtained and visualized with the ImageScope software (Aperio Technologies Inc).

2.10 Statistical analysis

All *in vitro* experiments were repeated at least three times independently. Data are expressed as the mean \pm SD. Data distribution was verified using the Shapiro-Wilk test, and comparisons between groups were performed using one-way ANOVA with Tukey's or Dunnett's post hoc analysis. p < 0.05 was considered significant.

3 Results

3.1 OSCC CSC subpopulations exhibit distinct morphology, expression of EMT markers, and increased proliferation potential.

Putative CSC subpopulations were identified from the LN-1A metastatic lineage by FACS using CD44 and CD326 as selection markers. Here, we found that most LN-1A cells were double positive for CD44 and CD326, and three subpopulations with different staining intensities were isolated: 2.7% of cells were CD44⁺/CD326⁻ (CSC-M₁), 8.4% were CD44^{Low}/CD326^{High} (CSC-E), and 1.5% CD44^{High}/CD326⁻ (CSC-M₂) (**Fig. S1**). After cell sorting, isolated subpopulations were immediately expanded and stored in liquid nitrogen for subsequent functional assays. The morphological characteristics of the CSC-M₁, -E, and M₂ cell lines were constantly evaluated throughout the culture passages, as well as their expression of EMT markers.

The morphology of our putative CSC subpopulations was constantly monitored by phase contrast microscopy and compared to the characteristics of parental LN-1A cells. As observed in **Fig. 1A**, CSC-M₁ and -E subpopulations show polygonal cells with abundant cytoplasm and evident nucleoli arranged in epithelial islands, similar to LN-1A cells. On the other hand, CSC-M₂ cells exhibit elongated and more dispersed cells (**Fig. 1A**). We then searched for EMT markers in protein lysates obtained from LN-1A and its subpopulations by western blotting reactions (**Fig. 1B**). E-cadherin levels were higher in CSC-E cells compared to other cell lines (**Fig. 1B** and **C**), and in contrast, vimentin (**Fig. 1B** and **D**) and slug (**Fig. 1B** and **E**) bands were clearly stronger CSC-M₂ cells than in the other studied cell lines. In addition, N-cadherin production was similar in all cell lysates (**Fig. 1B**). During all the experiments here described, the cell lines maintained their original phenotypic characteristics, as described in **Fig. S1**.

To investigate the proliferative potential of our CSC subpopulations, we counted viable cells with a Neubauer chamber after culture periods of 24, 48, 72, and 96 h and observed that CSC-M₁ cells had more viable cells than the parental LN-1A, mainly after 48 h (**Fig. 1F**). Interestingly, LN-1A, CSC-M₁, and -M₂ cell lines showed significantly more cells than the CSC-E subpopulation after 96 h (**Fig. 1F**). Next, we evaluated FASN, EGFR, and p-Akt levels by western blotting in cells cultured for 48 h (**Fig. 1G**) and found that CSC-M₁ and -M₂ subpopulations have significantly higher p-

Akt levels than LN-1A and CSC-E cells (**Fig. 1G** and **H**). The amount of FASN and EGFR were similar in all studied cell lines (**Fig. 1G**).

Figure 1. OSCC CSC subpopulations exhibit distinct morphology, expression of EMT markers, and increased proliferation. (**A**) LN-1A cells, CSC-M₁, and -E subpopulations grow in islands and present a predominantly polygonal phenotype in subconfluent monolayers, while CSC-M₂ cells are fusiform with clearly evident cytoplasmic extensions. (**B**) E-cadherin, N-cadherin, vimentin, and slug production was analyzed by western blotting in protein lysates prepared from LN-1A cells and its CSC subpopulations. The amount of E-cadherin (**C**) was slightly higher in CSC-E cells, whereas vimentin (**D**) and slug (**E**) bands were stronger in the CSC-M₂ subpopulation. (**F**) The proliferation rate was higher in CSC-M₁ cells, mainly after 72 h. (**G**) The production of FASN, EGFR, and p-Akt was also evaluated by western blotting from lysates prepared from the studied cell lines and p-Akt was also evaluated by western blotting from lysates prepared from the studied cell lines and p-Akt levels (**H**) were higher in CSC-M₁ and -M₂ subpopulations. (**A**) Phase contrast microscopy, original magnification: 100X. (**C-E**, **H**) * p < 0.05, ** p < 0.01, Anova and Tukey's test. (**F**) α LN-1A vs. CSC-M₁ (p < 0.01), β LN-1A vs. CSC-M₂ (p < 0.05), δ LN-1A vs. CSC-M₂ (p < 0.01); **c** CSC-M₁ vs. CSC-M₂ (p < 0.05), **n** CSC-E vs. CSC-M₂ (p < 0.01), Anova and Tukey's test, error bar = mean ± SD of at least three independent experiments. (**A**-**H**) CSC-M₁: CD44⁺/CD326⁻; CSC-E: CD44^{Low}/CD326^{High}; CSC-M₂: CD44^{High}/CD326⁻.



3.2 OSCC CSC subpopulations produce spheres and show increased colony formation.

Cancer spheroids are formed when cells grow in suspension, resulting in cell aggregation. As seen in **Fig. 2A**, we observed that the LN-1A cell line and its CSC subpopulations form spheroids with uniform shape and size after 24 h, without the addition of extracellular matrix components. In order to analyze their potential for colony formation, we next performed clonogenic assays during 10 days (colonies were considered if composed of at least 50 cells, as described by Franken et al. (2006). Ours results show that the CSC-M₁ and -M₂ subpopulations produce statistically more colonies than CSC-E and LN-1A cells in the studied conditions (**Fig. 2B** and **C**).

Figure 2. OSCC CSC subpopulations grow in spheres and have increased colony formation ability. (**A**) The parental metastatic LN-1A cells and their CSC subpopulations grow in non-adherent plates and form spheres after 24 h. (**B**) Representative images of the clonogenic assay showing that CSC-M₁ and -M₂ subpopulations produce more colonies than the LN-1A and CSC-E cells after 10 days of culture (**C**). (**A**) Phase contrast microscopy, original magnification: 100X, * p < 0.05, ** p < 0.01, Anova and Tukey's test, error bar = mean ± SD of at least three independent experiments. (**A-C**) CSC-M₁: CD44⁺/CD326⁻; CSC-E: CD44^{Low}/CD326^{High}; CSC-M₂: CD44^{High}/CD326⁻.



3.3 OSCC CSC subpopulations show increased adhesion to myogel and similar migratory capacity.

In order to investigate the ability of CSC subpopulations to adhere to extracellular matrix components, we used myogel, a tumor-derived extracellular matrix (ECM) that mimics, at least in part, the microenvironment of human solid cancers [28]. With this experimental model, we demonstrated that CSC-M₁ and -M₂ cells have considerably greater adhesion to myogel compared to CSC-E and LN-1A cells (**Fig. 3A** and **B**). Since the integrin α v participates in cell adhesion to extracellular matrix components, such as fibronectin, vitronectin, and fibrinogen, we investigated here its production by the studied cell lines (**Fig. 3C**). As seen in **Fig. 3D**, the amount of the integrin α v chain is higher in CSC-M₂ cells, and interestingly, a lower amount of this cell surface protein is observed in the CSC-M₁ subpopulation. Finally, we evaluated cell migration by using the "*scratch*" method after 16 h (**Fig. 3E**) and found no significant differences in the migratory capacity between the investigated cell lines (**Fig. 3F**).

Figure 3. Adhesion and migration of OSCC CSC subpopulations. (A-B) CSC-M₁ and -M₂ cells have increased adhesion to extracellular matrix components of myogel in comparison with LN-1A and CSC-E cells. (C-D) Western blotting analysis shows increased integrin α v levels in CSC-M₂ and -E cells in comparison with LN-1A and CSC-M₁ cells. (E-F) Migratory capacity assessed by scratch assays was similar in all studied cell lines after 16 h. (A and E) Phase contrast microscopy, original magnification: 40X. (B and D) ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001, Anova and Tukey's test, error bar = mean ± SD of at least three independent experiments. (A-F) CSC-M₁: CD44⁺/CD326⁻, CSC-E: CD44^{Low}/CD326^{High}, CSC-M₂: CD44^{High}/CD326⁻.



3.4 The cell viability of OSCC CSC subpopulations is reduced by cisplatin and TVB-3166.

The chemoresistance of LN-1A and its derived CSC was evaluated by assessing their sensitivity to cisplatin and the FASN inhibitor TVB-3166 with MTT after 48 h of exposure to the drugs. All tested cell lines were strongly affected by both cisplatin (**Fig. 4A-D**) and TVB-3166 (**Fig. 4E-H**). The decrease in viability of cisplatin-treated LN-1A cells (**Fig. 4A**) was statistically significant at 15 μ M, whereas significant differences were observed at lower doses (5 μ M) in CSC-M₁ (**Fig. 4B**), -E (**Fig. 4C**), and -M₂ (**Fig. 4D**) subpopulations. On the other hand, TVB-3166 reduces cell viability at higher doses, such as 75 μ M for LN-1A cells (**Fig. 4E**) and 50 μ M for CSC-M₁ (**Fig. 4F**), -E (**Fig. 4G**) and -M₂ (**Fig. 4H**). The IC₅₀ for each drug was calculated and shown in **Table 2**. There are no significant differences in IC₅₀ values for cisplatin in LN-1A cells (86.26 μ M) compared to CSC subpopulations, particularly CSC-E (63.14 μ M).

Table 2. IC₅₀ for each drug calculated using dose-response curves with MTT assays after48 h.

Cell lines	IC₅₀ Cisplatin (µM)	IC₅₀ TVB-3166 (µM)
LN-1A	25.57	86.26
CSC-M ₁	21.49	74.43
CSC-E	26.35	63.14
CSC-M ₂	27.06	72.34

CSC-M₁: CD44⁺/CD326⁻; CSC-E: CD44^{Low}/CD326^{High}; CSC-M₂: CD44^{High}/CD326⁻. IC₅₀: half maximal inhibitory concentration.

Figure 4. Cell viability of OSCC CSC subpopulations is reduced with cisplatin and TVB-3166 progressively. MTT experiments show that the treatment with increasing concentrations of cisplatin or TVB-3166 reduces the viability of LN-1A cells (A, E), CSC-M₁ (B, F), -E (C, G), and -M₂ (D, H) subpopulations progressively. (A-H) * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, # p< 0.0001, Anova and Dunnett's test, error bar = mean ± SD of at least three independent experiments. CSC-M₁: CD44⁺/CD326⁻; CSC-E: CD44^{Low}/CD326^{High}; CSC-M₂: CD44^{High}/CD326⁻.


4 Discussion

CSC in OSSC have been recently suggested as central components for the progression of the disease and targets for the development of effective treatments [5]. CD44 is one of the biological markers suggested for the isolation and characterization of CSC in several types of tumors and has a role in tumor growth [21]. Its immunohistochemical positivity is associated with advanced disease and poor survival in head and neck squamous cell cancer (HNSCC) patients; however, CD44 prognostic value in OSCC remains controversial [31]. CD44 is often used as a tool for CSC recognition in combination with other cell surface markers, such as CD326. Although less studied, CD326 has been indicated as a potential prognostic marker in OSCC, in which its overexpression is associated with local recurrence and patient survival [32]. Yet, the biological role of CD326 in tumor invasion and metastases is controversial [33]. Here, we demonstrate that CSC-M₁, -E, and -M₂ cells, whose isolation was based on the positivity for CD44 and, to a lesser extent CD326, exhibit enhanced abilities associated with tumor progression in comparison with LN-1A parental cells.

Metastases are the main causes of cancer-related deaths and involve several complex molecular events. EMT, a dedifferentiation process that converts polarized epithelial cells into migrating cells, influences invasiveness, stemness, and metastatic abilities of cancer cells [34], [35]. Indeed, CD44^{High}CD24^{Low} breast cancer cells with tumor-initiating phenotype express EMT markers, a finding that first established a link between CSC and EMT [36]. Currently, it has been increasingly recognized that EMT plays important roles in the metastatic process of several types of carcinomas, including OSCC [37], [38]. Examples of OSCC-derived CSC found in cell lines are a proliferative CD44^{High}CD326^{High} population that maintains epithelial characteristics (Epi-CSC or non-EMT CSC) and a migratory and fibroblast-like CD44^{High}CD326^{Low} population that expresses high levels of EMT markers such as vimentin, Twist, and Snail (EMT-CSC) [39], [40]. Accordingly, here we found in CSC-E a high production of E-cadherin and in CSC-M₂ high levels of vimentin and slug, thus reinforcing the coexistence of biologically distinct phenotypes within the tumor mass.

Cell migration, adhesion, and invasion are closely associated with EMT and tumor invasion and metastases. Here, we observed that CSC-M₁ and CSC-M₂ cells have a greater potential for adhesion to myogel, an ECM extracted from human uterine leiomyoma tissue [28]. Overexpression of CD44 increases adhesion and invasion of

ovarian cancer cells, while overexpression of E-cadherin decreases cell invasion in the same cells [41]. Cell adhesion molecules such as cadherins and integrins interact with the ECM and cells of the tumor microenvironment during invasion and metastasis [42]. Integrin αv is a member of the integrin alpha chain family, which could associate with up to five beta chains, and its expression was correlated with differentiation and metastasis in HNSCC [43]. This integrin chain was shown to influence migration and invasion in various types of cancer cells, including OSCC, where it facilitates proliferation and invasion via activation of MEK/ERK signaling when dimerized with integrin $\beta 8$ chains [44]. In the present study, we observed that CSC-M₂ cells produce more integrin αv chain, which was accompanied by a greater adhesion ability. Conversely, CSC-M₁ cells, which also showed high adhesion to myogel components, are low av producers and may use other cell adhesion molecules to interact with ECM.

We also observed that our CSC-M₁ and CSC-M₂ cells have greater proliferative and clonogenic potential than CSC-E and parental LN-1A cells. CD44 can induce cell proliferation by up-regulating the EMT markers Zeb1 and Snail1 [45]. On the other hand, the role of CD326 in cancer cell proliferation is still unclear, and Wang et al. (2018) demonstrated that this molecule does not affect nasopharyngeal HNSCC growth [46]. In fact, here we observed that CSC-E cells have a lower proliferative potential than the other studied cell lines. Other signaling pathways, such as PI3K-AktmTOR and EGFR, are also involved in CSC self-renewal [47], and we observed in the present studies that p-Akt protein levels are higher in CSC-M₂ cells, while EGFR amount is similar in all analyzed cell lines. In fact, a positive correlation between CD44 and phosphorylated Akt was observed in lung metastases in an *in vivo* OSCC model, suggesting that the connection between these proteins favor the metastatic process [48].

One of the main characteristics of CSC is resistance to chemotherapeutic agents, and cisplatin is the first-line chemotherapy against advanced OSCC [49]. Overexpression of both CD44 and CD326 was recently described in HNSCC-derived cisplatin-resistant cells [16] [50]. Herein we observed that our putative CSC subpopulations were similarly sensitive to exposure to cisplatin. Furthermore, CSC-E cells were slightly more sensitive than CSC-M₁ and CSC-M₂ cells to the FASN activity inhibitory molecule TVB-3166. Accordingly, EpCAM-positive cells showed sensitivity to doxorubicin, another antineoplastic drug, in hepatocellular carcinoma [51]. Our

research group has already demonstrated that the FASN inhibitors orlistat and TVB-3166 exhibit antitumor properties in OSCC and melanoma models [25], [52], [53], [54], [55]. High FASN activity has been shown in CD44⁺/CD24^{Low} breast cancer cells [56]; however, the literature is still limited regarding FASN expression and activity in CSC, particularly in cells positive for CD44 and CD326. Further investigations will be necessary to understand the biological role of FASN in CSC populations.

Despite the lack of specific markers for identifying CSC, the transplantation of primary human tumors or cancer cell lines into immunodeficient mice is a useful system for the study of these cell populations [57]. In fact, Prince et al. (2007) revealed that an HNSCC-derived CD44⁺ cell population exhibited greater tumor-initiating capacity than a CD44⁻ counterpart in a xenograft model [12]. We observed here that our putative CSC generate tumors when inoculated subcutaneously in the flank (**Fig. S2**) and orthotopically on the tongue (**Fig. S3**) of BALB/c mice. Additionally, we found that CSC-E and -M₂ cells were able to metastasize to cervical lymph nodes (**Fig. S3**). It was already demonstrated in an orthotopic *in vivo* model for OSCC that CD44^{High}ESA^{High} cells are more tumorigenic than CD44^{High}ESA^{Low} cells [40]. Furthermore, Biddle et al. (2011) revealed that both CD44^{High}ESA^{Low} and CD44^{High}ESA^{High} cells show tumor initiation capacity, but only the first were able to colonize lymph nodes [39].

In summary, we found that CSC subpopulations exhibited distinct phenotypes *in vitro* and tumorigenic abilities *in vivo*. A detailed characterization of the role of CD44 and CD326 in CSC may provide new clues for the treatment of OSCC metastatic disease.

Acknowledgements

This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brazil (CAPES) – Finance Code 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 2014/20832-3), and Conselho Nacional Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 303064/2018-8). The authors thank Dimas Tadeu Covas and Luciana Yamamoto de Almeida for their help with the cell sorting performed at the Regional Blood Center of Ribeirão Preto of the University of São Paulo.

REFERENCES

[1] Bouvard, V., Nethan, S. T., Singh, D., Warnakulasuriya, S., Mehrotra, R., Chaturvedi, A. K., Chen, T. H.-H., Ayo-Yusuf, O. A., Gupta, P. C., Kerr, A. R., Tilakaratne, W. M., Anantharaman, D., Conway, D. I., Gillenwater, A., Johnson, N. W., Kowalski, L. P., Leon, M. E., Mandrik, O., Nagao, T., ... Lauby-Secretan, B. (2022). IARC Perspective on Oral Cancer Prevention. *New England Journal of Medicine*, 387(21), 1999–2005. https://doi.org/10.1056/NEJMsr2210097

[2] Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, caac.21660. https://doi.org/10.3322/caac.21660

[3] Cohen Goldemberg, D., de Araújo, L. H. L., Antunes, H. S., de Melo, A. C., & Santos Thuler, L. C. (2018). Tongue cancer epidemiology in Brazil: incidence, morbidity and mortality. *Head and Neck*, *40*(8), 1834–1844. https://doi.org/10.1002/hed.25166

[4] Warnakulasuriya, S. (2009). Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology*, *45*(4–5), 309–316. https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2008.06.002

[5] Baillie, R., Tan, S. T., & Itinteang, T. (2017). Cancer Stem Cells in Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma: A Review. *Frontiers in Oncology*, 7. https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00112

[6] Jordan, C. T., Guzman, M. L., & Noble, M. (2006). Cancer Stem Cells. New England Journal of Medicine, 355(12), 1253–1261. https://doi.org/10.1056/NEJMra061808

[7] Neuzil, J., Stantic, M., Zobalova, R., Chladova, J., Wang, X., Prochazka, L., Dong,L., Andera, L., & Ralph, S. J. (2007). Tumour-initiating cells vs. cancer 'stem' cells

and CD133: What's in the name? *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 355(4), 855–859. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.01.159

[8] Bonnet, D., & Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine*, *3*(7), 730–737. https://doi.org/10.1038/nm0797-730

[9] Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F.
(2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(7), 3983– 3988. https://doi.org/10.1073/pnas.0530291100

[10] Collins, A. T., Berry, P. A., Hyde, C., Stower, M. J., & Maitland, N. J. (2005).
Prospective Identification of Tumorigenic Prostate Cancer Stem Cells. *Cancer Research*, 65(23), 10946–10951. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2018

[11] Li, C., Heidt, D. G., Dalerba, P., Burant, C. F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M. F., & Simeone, D. M. (2007). Identification of Pancreatic Cancer Stem Cells. *Cancer Research*, 67(3), 1030–1037. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2030

[12] Prince, M. E., Sivanandan, R., Kaczorowski, A., Wolf, G. T., Kaplan, M. J., Dalerba, P., Weissman, I. L., Clarke, M. F., & Ailles, L. E. (2007). Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(3), 973–978. https://doi.org/10.1073/pnas.0610117104

[13] Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J., & Dirks, P. B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Research*, 63(18), 5821–5828.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14522905

[14] Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Tsakmaki, V., Danielidis, V., & Sivridis, E. (2012). Cancer stem cell phenotype relates to radio-chemotherapy outcome in locally

advanced squamous cell head-neck cancer. *British Journal of Cancer*, *106*(5), 846-853. https://doi.org/10.1038/bjc.2012.33

[15] Oliveira, L. R., Castilho-Fernandes, A., Oliveira-Costa, J. P., Soares, F. A., Zucoloto, S., & Ribeiro-Silva, A. (2014). CD44+/CD133+ immunophenotype and matrix metalloproteinase-9: Influence on prognosis in early-stage oral squamous cell carcinoma. *Head & Neck*, *36*(12), 1718–1726. https://doi.org/10.1002/hed.23527

[16] Noman, A. S. M., Parag, R. R., Rashid, M. I., Islam, S., Rahman, M. Z.,
Chowdhury, A. A., Sultana, A., Jerin, C., Siddiqua, A., Rahman, L., Nayeem, J.,
Akther, S., Baidya, S., Shil, R. K., Rahman, M., Shirin, A., Mahmud, R., Hossain, S.
M. I., Sumi, S. A., ... Islam, S. S. (2020). Chemotherapeutic resistance of head and
neck squamous cell carcinoma is mediated by EpCAM induction driven by IL-6/p62
associated Nrf2-antioxidant pathway activation. *Cell Death & Disease*, *11*(8), 663.
https://doi.org/10.1038/s41419-020-02907-x

[17] LaBarge, M. A. (2010). The Difficulty of Targeting Cancer Stem Cell Niches. *Clinical Cancer Research*, *16*(12), 3121–3129. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-2933

[18] Jariyal, H., Gupta, C., Bhat, V. S., Wagh, J. R., & Srivastava, A. (2019).
Advancements in Cancer Stem Cell Isolation and Characterization. *Stem Cell Reviews and Reports*, *15*(6), 755–773. https://doi.org/10.1007/s12015-019-09912-4

[19] Satpute, P. S., Hazarey, V., Ahmed, R., & Yadav, L. (2013). Cancer Stem Cells in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *14*(10), 5579–5587. https://doi.org/10.7314/APJCP.2013.14.10.5579

[20] Chen, D., & Wang, C.-Y. (2019). Targeting cancer stem cells in squamous cell carcinoma. *Precision Clinical Medicine*, *2*(3), 152–165.
 https://doi.org/10.1093/pcmedi/pbz016

 [21] Chen, C., Zhao, S., Karnad, A., & Freeman, J. W. (2018). The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications. *Journal of Hematology & Oncology*, *11*(1), 64. https://doi.org/10.1186/s13045-018-0605-5

[22] Imrich, S., Hachmeister, M., & Gires, O. (2012). EpCAM and its potential role in tumor-initiating cells. *Cell Adhesion & Migration*, 6(1), 30–38. https://doi.org/10.4161/cam.18953

[23] Yan, Y., Zuo, X., & Wei, D. (2015). Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells: A Promising Biomarker and Therapeutic Target. *Stem Cells Translational Medicine*, *4*(9), 1033–1043. https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0048

 [24] Munz, M., Baeuerle, P. A., & Gires, O. (2009). The Emerging Role of EpCAM in Cancer and Stem Cell Signaling. *Cancer Research*, 69(14), 5627–5629.
 https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0654

[25] Agostini, M., Almeida, L. Y., Bastos, D. C., Ortega, R. M., Moreira, F. S., Seguin, F., Zecchin, K. G., Raposo, H. F., Oliveira, H. C. F., Amoêdo, N. D., Salo, T., Coletta, R. D., & Graner, E. (2014). The Fatty Acid Synthase Inhibitor Orlistat Reduces the Growth and Metastasis of Orthotopic Tongue Oral Squamous Cell Carcinomas. *Molecular Cancer Therapeutics*, *13*(3), 585–595. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-12-1136

[26] Franken, N. A. P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., & van Bree, C.
(2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, *1*(5), 2315–2319.
https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339

[27] Liang, C.-C., Park, A. Y., & Guan, J.-L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols*, *2*(2), 329–333. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30

[28] Salo, T., Sutinen, M., Hoque Apu, E., Sundquist, E., Cervigne, N. K., de Oliveira,C. E., Akram, S. U., Ohlmeier, S., Suomi, F., Eklund, L., Juusela, P., Åström, P., Bitu,

C. C., Santala, M., Savolainen, K., Korvala, J., Paes Leme, A. F., & Coletta, R. D. (2015). A novel human leiomyoma tissue derived matrix for cell culture studies. *BMC Cancer*, *15*(1), 981. https://doi.org/10.1186/s12885-015-1944-z

[29] Carvalho, M. A., Zecchin, K. G., Seguin, F., Bastos, D. C., Agostini, M., Rangel, A. L. C. A., Veiga, S. S., Raposo, H. F., Oliveira, H. C. F., Loda, M., Coletta, R. D., & Graner, E. (2008). Fatty acid synthase inhibition with Orlistat promotes apoptosis and reduces cell growth and lymph node metastasis in a mouse melanoma model. *International Journal of Cancer*. https://doi.org/10.1002/ijc.23835

[30] Ferreira do Carmo, A., Dourado, M. R., Ervolino de Oliveira, C., Bastos, D. C., Domingueti, C. B., Ribeiro Paranaíba, L. M., Sawazaki-Calone, Í., Borges, G. Á., Silva Guerra, E. N., Casarin, R. C., Graner, E., Salo, T. A., de Almeida Freitas, R., Galvão, H. C., & Coletta, R. D. (2020). Stanniocalcin 2 contributes to aggressiveness and is a prognostic marker for oral squamous cell carcinoma. *Experimental Cell Research*, 393(2), 112092. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.112092

[31] Chen, J., Zhou, J., Lu, J., Xiong, H., Shi, X., & Gong, L. (2014). Significance of CD44 expression in head and neck cancer: a systemic review and meta-analysis. *BMC Cancer*, *14*(1), 15. https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-15

[32] Sen, S., & Carnelio, S. (2016). Expression of epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) in oral squamous cell carcinoma. *Histopathology*, *68*(6), 897–904. https://doi.org/10.1111/his.12870

[33] Fagotto, F., & Aslemarz, A. (2020). EpCAM cellular functions in adhesion and migration, and potential impact on invasion: A critical review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, *1874*(2), 188436.
https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188436

[34] Singh, A., & Settleman, J. (2010). EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*, *29*(34), 4741–4751. https://doi.org/10.1038/onc.2010.215 [35] Tang, Y., Wang, S., Jiang, J., & Liang, X. (2015). Links between cancer stem cells and epithelial– mesenchymal transition. *OncoTargets and Therapy*, 2973. https://doi.org/10.2147/OTT.S91863

[36] Mani, S. A., Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C. C., Shipitsin, M., Campbell, L. L., Polyak, K., Brisken, C., Yang, J., & Weinberg, R. A. (2008). The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell*, *133*(4), 704–715. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.027

[37] Jayanthi, P., Varun, B., & Selvaraj, J. (2020). Epithelial–mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma: An insight into molecular mechanisms and clinical implications. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, *24*(1), 189. https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_334_19

[38] Bakir, B., Chiarella, A. M., Pitarresi, J. R., & Rustgi, A. K. (2020). EMT, MET, Plasticity, and Tumor Metastasis. *Trends in Cell Biology*, *30*(10), 764–776. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.07.003

[39] Biddle, A., Liang, X., Gammon, L., Fazil, B., Harper, L. J., Emich, H., Costea, D.
E., & Mackenzie, I. C. (2011). Cancer Stem Cells in Squamous Cell Carcinoma
Switch between Two Distinct Phenotypes That Are Preferentially Migratory or
Proliferative. *Cancer Research*, *71*(15), 5317–5326. https://doi.org/10.1158/00085472.CAN-11-1059

[40] Amôr, N. G., Buzo, R. F., Ortiz, R. C., Lopes, N. M., Saito, L. M., Mackenzie, I. C., & Rodini, C. O. (2021). In vitro and in vivo characterization of cancer stem cell subpopulations in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, *50*(1), 52–59. https://doi.org/10.1111/jop.13101

[41] Mao, M., Zheng, X., Jin, B., Zhang, F., Zhu, L., & Cui, L. (2017). Effects of CD44 and E-cadherin overexpression on the proliferation, adhesion and invasion of ovarian

cancer cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*. https://doi.org/10.3892/etm.2017.5259

[42] Nemeth, J. A., Nakada, M. T., Trikha, M., Lang, Z., Gordon, M. S., Jayson, G. C., Corringham, R., Prabhakar, U., Davis, H. M., & Beckman, R. A. (2007). Alpha-v Integrins as Therapeutic Targets in Oncology. *Cancer Investigation*, *25*(7), 632–646. https://doi.org/10.1080/07357900701522638

[43] Lu, J. G., Sun, Y. N., Wang, C., Jin, D. J., & Liu, M. (2009). Role of the αvintegrin subunit in cell proliferation, apoptosis and tumor metastasis of laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinomas: a clinical and in vitro investigation. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 266(1), 89–96. https://doi.org/10.1007/s00405-008-0675-z

[44] Hayashido, Y., Kitano, H., Sakaue, T., Fujii, T., Suematsu, M., Sakurai, S., & Okamoto, T. (2014). Overexpression of integrin αv facilitates proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma cells via MEK/ERK signaling pathway that is activated by interaction of integrin $\alpha v \beta 8$ with type I collagen. *International Journal of Oncology*, *45*(5), 1875–1882. https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2642

[45] Wang, L., Yang, H., Abel, E. V., Ney, G. M., Palmbos, P. L., Bednar, F., Zhang, Y., Leflein, J., Waghray, M., Owens, S., Wilkinson, J. E., Prasad, J., Ljungman, M., Rhim, A. D., Pasca di Magliano, M., & Simeone, D. M. (2015). ATDC induces an invasive switch in KRAS-induced pancreatic tumorigenesis. *Genes & Development*, *29*(2), 171–183. https://doi.org/10.1101/gad.253591.114

[46] Wang, M.-H., Sun, R., Zhou, X.-M., Zhang, M.-Y., Lu, J.-B., Yang, Y., Zeng, L.-S., Yang, X.-Z., Shi, L., Xiao, R.-W., Wang, H.-Y., & Mai, S.-J. (2018). Epithelial cell adhesion molecule overexpression regulates epithelial-mesenchymal transition, stemness and metastasis of nasopharyngeal carcinoma cells via the PTEN/AKT/mTOR pathway. *Cell Death & Disease*, *9*(1), 2. https://doi.org/10.1038/s41419-017-0013-8

[47] Shahoumi, L. A. (2021). Oral Cancer Stem Cells: Therapeutic Implications and

Challenges. Frontiers in Oral Health, 2. https://doi.org/10.3389/froh.2021.685236

[48] Yuan, S.-S. F., Hung, A. C., Hsu, C.-W., Lan, T.-H., Su, C.-W., Chi, T.-C., Chang, Y.-C., Chen, Y.-K., & Wang, Y.-Y. (2022). CD44 Mediates Oral Squamous Cell Carcinoma-Promoting Activity of MRE11 via AKT Signaling. *Journal of Personalized Medicine*, *12*(5), 841. https://doi.org/10.3390/jpm12050841

[49] Cheng, Y., Li, S., Gao, L., Zhi, K., & Ren, W. (2021). The Molecular Basis and Therapeutic Aspects of Cisplatin Resistance in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Frontiers in Oncology*, *11*. https://doi.org/10.3389/fonc.2021.761379

[50] Roy, S., Kar, M., Roy, S., Padhi, S., Kumar, A., Thakur, S., Akhter, Y., Gatto, G., & Banerjee, B. (2020). Inhibition of CD44 sensitizes cisplatin-resistance and affects Wnt/β-catenin signaling in HNSCC cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, *149*, 501–512. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.131

[51] Li, Y., Farmer, R. W., Yang, Y., & Martin, R. C. G. (2016). Epithelial cell adhesion molecule in human hepatocellular carcinoma cell lines: a target of chemoresistence. *BMC Cancer*, *16*(1), 228. https://doi.org/10.1186/s12885-016-2252-y

[52] Boelcke WP, Teixeira IF, Aquino IG, et al. Pharmacological fatty acid synthase inhibitors differently affect the malignant phenotype of oral cancer cells. *Arch Oral Biol*. 2022;135:105343. doi:10.1016/j.archoralbio.2021.105343

[53] Aquino, I. G. de, Bastos, D. C., Cuadra-Zelaya, F. J. M., Teixeira, I. F., Salo, T., Coletta, R. Della, & Graner, E. (2020). Anticancer properties of the fatty acid synthase inhibitor TVB-3166 on oral squamous cell carcinoma cell lines. *Archives of Oral Biology*, *113*(February), 104707. https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104707

[54] Almeida LY de, Moreira F dos S, Santos GAS dos, et al. FASN inhibition sensitizes metastatic OSCC cells to cisplatin and paclitaxel by downregulating cyclin

B1. Oral Dis. 2023;29(2):649-660. doi:10.1111/odi.14017

[55] Bastos, D. C., Paupert, J., Maillard, C., Seguin, F., Carvalho, M. A., Agostini, M., Coletta, R. D., Noël, A., & Graner, E. (2017). Effects of fatty acid synthase inhibitors on lymphatic vessels: An in vitro and in vivo study in a melanoma model. *Laboratory Investigation*. https://doi.org/10.1038/labinvest.2016.125

[56] Rabionet, M., Polonio-Alcalá, E., Relat, J., Yeste, M., Sims-Mourtada, J., Kloxin, A. M., Planas, M., Feliu, L., Ciurana, J., & Puig, T. (2021). Fatty acid synthase as a feasible biomarker for triple negative breast cancer stem cell subpopulation cultured on electrospun scaffolds. *Materials Today Bio*, *12*, 100155. https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2021.100155

[57] S. Franco, S., Szczesna, K., Iliou, M. S., Al-Qahtani, M., Mobasheri, A., Kobolák, J., & Dinnyés, A. (2016). In vitro models of cancer stem cells and clinical applications. *BMC Cancer*, *16*(S2), 738. https://doi.org/10.1186/s12885-016-2774-3

Figure Supplementary 1. OSCC CSC subpopulations exhibit distinct morphology and expression of EMT markers. (**A**) Representative FACS dot-plot of the metastatic LN-1A cell line after incubation with isotypic controls IgG2b and IgG1 conjugated with PerCP-Cy 5.5 and APC, respectively. (**B**) Dot-plot of LN-1A cells labeled with the monoclonal antibodies anti-CD44 and anti-CD326 conjugated with the fluorochromes PerCP Cy 5.5 and APC, respectively. Three subpopulations were isolated: CD44⁺/CD326⁻ (CSC-M₁); CD44^{Low}/CD326^{High} (CSC-E), and CD44^{High}/CD326⁻ (CSC-M₂). (**C**) The CSC-M₁ and -E subpopulations present a typical epithelial phenotype and form islands of polygonal cells in subconfluent monolayers. CSC-M₂ cells have a more fusiform morphological pattern. (**D and E**) E-cadherin, N-cadherin, vimentin, and slug production were analyzed by western blotting in protein lysates prepared from LN-1A, CSC-M₁, -E, and-M₂ cells. The amount of E-cadherin was clearly higher in CSC-E cells whereas N-cadherin, vimentin, and slug levels were more abundant in the CSC-M₁ and M₂ subpopulations. (**C**) Phase contrast microscopy original magnification: 100X. CSC-M₁: CD44⁺/CD326⁻; CSC-E: CD44^{Low}/CD326^{High}, and CSC-M₂: CD44^{High}/CD326⁻.



Figure Supplementary 2. OSCC CSC subpopulations promote tumor growth after subcutaneous injection in BALB/c nude mice. (**A**) Mice received bilateral subcutaneous injections in the flank with different amounts of LN-1A, CSC-M₁, -E, and -M₂ cells. (**B**) Tumors were dissected, documented with the aid of a transilluminator under blue light exposure, and measured using a digital caliper after 25 days (**C**). (**D**) Microscopic aspects of tumors stained with H&E showing malignant epithelial compact masses, occasionally with central keratinization as in LN-1A tumor, surrounded by fibrous connective tissue. (**E**) Higher magnification of the tumor formed by CSC-M₂ cells shown in (**D**) demonstrating pleomorphic epithelial malignant cells (asterisk) infiltrating adjacent striated muscle tissue (arrowheads). Original magnification: 40X (**D**) and 100X (**E**). CSC-M₁: CD44⁺/CD326⁻; CSC-E: CD44^{Low}/CD326^{High}; CSC-M₂: CD44^{High}/CD326⁻.



Figure Supplementary 3. OSCC CSC subpopulations promote tumor growth after orthotopic inoculation into the tongues of BALB/c nude mice. (**A**) Primary tumors in the tongue tissues of mice promoted by the inoculation of LN-1A, CSC-M₁, -E, and -M₂ cells. Tongues were dissected and documented with the aid of a transilluminator under blue light exposure. (**B**) Tumor volumes were estimated using the Image J software 25 days following cell injections. (**C**) Tissue sections stained with H&E showing tumor growth as irregular islands of malignant epithelial within the muscle tissue (black arrows). (**D**) High magnification of the CSC-E tumor shown in (**C**) evidencing a mass of pleomorphic epithelial cells (asterisk) infiltrating adjacent muscle tissue (arrowheads). (**E**) Lymph node metastases found by epifluorescence in CSC-E and -M₂-induced tumors (white arrows). (**F**) H&E staining of the metastatic *foc*us that infiltrates the lymph node colonized by CSC-M₂ cells shown in (**E**) (arrowhead). (**G**) Immunohistochemical positivity for cytokeratin confirms the epithelial origin of the lymph node metastasis. Original magnification: 40X (**C**), 100X (**D**), and 200X (**E**, **F** and **G**). CSC-M₁: CD44^{+/}/CD326⁻; CSC-E: CD44^{Low}/CD326^{High}; CSC-M₂: CD44^{High}/CD326⁻.



3 CONCLUSÃO

As subpopulações de CSC isoladas da linhagem de CEC oral apresentaram propriedades biológicas associadas à progressão tumoral aprimoradas em relação a linhagem parental LN-1A.

3.1 A produção de E-caderina é significantemente maior nas células CSC-E, enquanto que a de vimentina e slug é maior nas células CSC-M₂.

3.2 As células CSC-M₁ e -M₂ proliferam mais do que as LN-1A e CSC-E, o que é acompanhado por níveis proteicos mais elevados de p-Akt.

3.3 Todas as linhagens celulares analisadas formam esferas, no entanto, as células CSC-M₁ e -M₂ têm maior capacidade de formação colônias.

3.4 As células CSC-M₁ e -M₂ aderem melhor às proteínas do miogel.

3.5 A sensibilidade à cisplatina foi semelhante entre as linhagens celulares estudadas, no entanto, as células CSC-E foram discretamente mais sensíveis ao TVB-3166.

3.6 Todas as linhagens celulares aqui estudadas foram capazes de formar tumores quando inoculadas subcutaneamente no flanco e ortotopicamente na borda lateral de língua de camundongos BALB/c.

4 REFERÊNCIAS*

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;100:3983–8. https://doi.org/10.1073/pnas.0530291100.

Amôr NG, Buzo RF, Ortiz RC, Lopes NM, Saito LM, Mackenzie IC, et al. In vitro and in vivo characterization of cancer stem cell subpopulations in oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med 2021;50:52–9. https://doi.org/10.1111/jop.13101.

Baillie R, Tan ST, Itinteang T. Cancer Stem Cells in Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma: A Review. Front Oncol 2017;7. https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00112.

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;71:5317–26. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1059.

Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nat Med 1997;3:730–7. https://doi.org/10.1038/nm0797-730.

Borsetto D, Higginson JA, Aslam A, Al-Qamachi L, Dhanda J, Marioni G, et al. Factors affecting prognosis in locoregional recurrence of oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med 2019;48:206–13. https://doi.org/10.1111/jop.12815.

Bouvard V, Nethan ST, Singh D, Warnakulasuriya S, Mehrotra R, Chaturvedi AK, et al. IARC Perspective on Oral Cancer Prevention. N Engl J Med 2022;387:1999–2005. https://doi.org/10.1056/NEJMsr2210097.

Chen C, Zhao S, Karnad A, Freeman JW. The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications. J Hematol Oncol 2018;11:64. https://doi.org/10.1186/s13045-018-0605-5.

Chen D, Wang C-Y. Targeting cancer stem cells in squamous cell carcinoma. Precis Clin Med 2019;2:152–65. https://doi.org/10.1093/pcmedi/pbz016.

Cohen Goldemberg D, de Araújo LHL, Antunes HS, de Melo AC, Santos Thuler LC. Tongue cancer epidemiology in Brazil: incidence, morbidity and mortality. Head Neck 2018;40:1834–44. https://doi.org/10.1002/hed.25166.

Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective Identification of Tumorigenic Prostate Cancer Stem Cells. Cancer Res 2005;65:10946–51. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2018.

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

Costea D, Tsinkalovsky O, Vintermyr O, Johannessen A, Mackenzie I. Cancer stem cells – new and potentially important targets for the therapy of oral squamous cell carcinoma. Oral Dis 2006;12:443–54. https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2006.01264.x.

Cuadra-Zeluaya FJM. dentificação de células tronco associadas ao câncer (CTCs) nas linhagens celulares SCC-9 ZsGreen e SCC-9 ZsGreen LN-1. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, 2016.

Cuadra-Zeluaya FJM. 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: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, 2019.

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;1:2057178X1665376. https://doi.org/10.1177/2057178X16653761.

Imrich S, Hachmeister M, Gires O. EpCAM and its potential role in tumor-initiating cells. Cell Adh Migr 2012;6:30–8. https://doi.org/10.4161/cam.18953.

Instituto Nacional de Câncer - INCA. Estimativas da incidência e mortalidade por Câncer no Brasil, [acesso 2023 Jan 15]. Disponível em URL: https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2023-incidencia-de-cancer-nobrasil

Jariyal H, Gupta C, Bhat VS, Wagh JR, Srivastava A. Advancements in Cancer Stem Cell Isolation and Characterization. Stem Cell Rev Reports 2019;15:755–73. https://doi.org/10.1007/s12015-019-09912-4.

Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer Stem Cells. N Engl J Med 2006;355:1253–61. https://doi.org/10.1056/NEJMra061808.

Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Tsakmaki V, Danielidis V, Sivridis E. Cancer stem cell phenotype relates to radio-chemotherapy outcome in locally advanced squamous cell head–neck cancer. Br J Cancer 2012;106:846–53. https://doi.org/10.1038/bjc.2012.33.

Kurzweg T, Möckelmann N, Laban S, Knecht R. Current treatment options for recurrent/metastatic head and neck cancer: a post-ASCO 2011 update and review of last year's literature. Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology 2012;269:2157–67. https://doi.org/10.1007/s00405-012-1998-3.

LaBarge MA. The Difficulty of Targeting Cancer Stem Cell Niches. Clin Cancer Res

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

2010;16:3121-9. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-2933.

Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, et al. Identification of Pancreatic Cancer Stem Cells. Cancer Res 2007;67:1030–7. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2030.

Marur S, Forastiere AA. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. Mayo Clin Proc 2016;91:386–96. https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2015.12.017.

Munz M, Baeuerle PA, Gires O. The Emerging Role of EpCAM in Cancer and Stem Cell Signaling. Cancer Res 2009;69:5627–9. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0654.

Nandini DB, Rao RS, Hosmani J, Khan S, Patil S, Awan KH. Novel therapies in the management of oral cancer: An update. Disease-a-Month 2020;66:101036. https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2020.101036.

Noman ASM, Parag RR, Rashid MI, Islam S, Rahman MZ, Chowdhury AA, et al. Chemotherapeutic resistance of head and neck squamous cell carcinoma is mediated by EpCAM induction driven by IL-6/p62 associated Nrf2-antioxidant pathway activation. Cell Death Dis 2020;11:663. https://doi.org/10.1038/s41419-020-02907-x.

Oliveira LR, Castilho-Fernandes A, Oliveira-Costa JP, Soares FA, Zucoloto S, Ribeiro-Silva A. CD44+/CD133+ immunophenotype and matrix metalloproteinase-9: Influence on prognosis in early-stage oral squamous cell carcinoma. Head Neck 2014;36:1718–26. https://doi.org/10.1002/hed.23527.

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;104:973–8. https://doi.org/10.1073/pnas.0610117104.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature 2001;414:105–11. https://doi.org/10.1038/35102167.

Shigeishi H, Hashikata M, Yokoyama S, Sakuma M, Murozumi H, Kato H, et al. CD44high/ESAlow squamous cell carcinoma cell-derived prostaglandin E2 confers resistance to 5-fluorouracil-induced apoptosis in CD44high/ESAhigh cells. Int J Clin

Exp Pathol 2018;11:2356–63.

Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. Cancer Res 2003;63:5821–8.

*De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin 2021:caac.21660. https://doi.org/10.3322/caac.21660.

Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. Oral Oncol 2009;45:309–16. https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2008.06.002.

Yan Y, Zuo X, Wei D. Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells: A Promising Biomarker and Therapeutic Target. Stem Cells Transl Med 2015;4:1033–43. https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0048.

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

APÊNDICE 1 – Material e métodos

Preparo das soluções de cisplatina, TVB-3166 e cloreto de cobalto.

Os experimentos de viabilidade celular com MTT (3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma-Aldrich) foram realizados após o tratamento das células LN-1A e as subpopulações CSC-M₁, -E e M₂ com as drogas cisplatina, TVB-3166 e cloreto de cobalto (CoCl₂). Adicionalmente, o composto CoCl₂ foi utilizado para análise de ciclo e morte celular por meio de citometria de fluxo e para o preparo de extratos proteicos com o objetivo de verificar a expressão de HIF-1 α por western blotting, como será descrito posteriormente.

A cisplatina (Sigma-Aldrich) foi dissolvida em solução de NaCl a 0,9% para uma concentração final de 5 mM, mantida em agitação por 30 minutos, filtrada e estocada em alíquotas a –20 °C e protegidas da luz. O TVB-3166 (Sigma-Aldrich) foi diluído em DMSO (*dimethyl sulfoxide*, Sigma-Aldrich) para uma concentração final de 50 mM e separado em alíquotas, as quais foram armazenadas a –20 °C protegidas da luz. O cloreto de cobalto (CoCl₂, Labsynth), agente químico indutor de hipóxia, foi diluído em água destilada ultra pura (*UltrapureTM DNase/RNase-Free Distilled Water*, Invitrogen) para uma concentração final de 50,4 mM, separado em alíquotas e armazenado a – 20 °C. As células dos grupos controles receberam volumes de NaCl, DMSO e água destilada equivalentes ao dos grupos das células tratadas com cisplatina, TVB-3166 e CoCl₂, respectivamente.

Análise da viabilidade celular por MTT em células tratadas com CoCl₂

A viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico com MTT, que demonstra a atividade mitocondrial em células viáveis pela medida da formação de cristais de formazan a partir da redução do sal tetrazólio (Mosmann, 1983). Para isso, 6 x 10³ células de cada linhagem celular foram ressuspendidas em 300 µL de meio DMEM/F-12 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e plaqueadas em cada poço de uma placa de 48 poços. Após 24 horas, o meio foi substituído por DMEM/F-12 livre de SFB, seguida de incubação por mais 24 horas para promover a

sincronização das células. O meio foi então removido e concentrações crescentes de CoCl₂ diluídas em meio DMEM/F-12 suplementado com 10% de SFB foram adicionadas aos poços. Passadas 48 horas de tratamento, as células foram incubadas a 37 °C com 0,3 mg/mL de MTT diluído em meio livre de SFB por mais 4 horas. Em seguida, o meio foi removido e os cristais de formazan presentes em cada poço foram solubilizados com 250 µL de etanol absoluto (Merck). A solução foi então homogeneizada, 100 µL de cada condição experimental foram transferidos para poços de uma placa de 96 poços, e as absorbâncias mensuradas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 595 nm, corrigidos para 655 nm (iMark[™] Microplate Absorbance Reader, BioRad). A viabilidade celular foi expressa em porcentagem em relação aos controles. Todos os experimentos foram feitos em duplicata e repetidos três vezes.

Análise do ciclo celular

A análise da distribuição das células dentre as fases do ciclo celular foi feita através da marcação do DNA com iodeto de propídeo. Para isso, 8 x 10⁴ células de cada linhagem celular foram cultivadas em meio DMEM/F-12 contendo 10% de SBF em placas de 6 poços (Corning). Depois de 24 horas, foi feita lavagem com PBS e sincronização do ciclo celular em meio DMEM/F-12 livre de SFB por 24 horas. Em seguida, o meio DMEM/F-12 suplementado com 10% de SFB foram adicionados por 48 horas. Para o tratamento com CoCl₂, 150 μM do composto em DMEM/F-12 suplementado com 10% de SFB foram adicionados por 48 horas. Após este período, as células foram tripsinizadas, centrifugadas, fixadas com etanol 70% gelado a -20 °C por 12 horas, lavadas com PBS gelado e tratadas com RNAse A (Sigma-Aldrich) na concentração de 10 µg/mL a 37 °C durante 1 hora. Posteriormente, as células foram incubadas com 50 µg/mL de iodeto de propídeo a 4 °C por 2 horas protegidas da incidência de luz, seguida da leitura de todas as amostras em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences) no canal FL2. Dez mil eventos foram analisados para cada amostra e as porcentagens de células distribuídas em cada fase do ciclo celular obtidas com auxílio do programa ModFit LTTM (Verity Software House, EUA). Os experimentos foram repetidos três vezes.

Avaliação das taxas de morte celular por apoptose e necrose

A identificação das células em processo de morte por apoptose ou necrose foi realizada por citometria de fluxo, através da marcação com Anexina V-PE e 7AA-D – PerCP (BD Pharmingen[™]), respectivamente. Para isso, 6 x 10⁴ células de cada linhagem celular foram plaqueadas em placas de 6 poços em meio DMEM/F-12 com 10% de SFB. Depois de 24 horas, o meio foi substituído por DMEM/F-12 sem adição de SFB por 24 horas adicionais. Após o período de sincronização, as células foram incubadas com DMEM/F-12 suplementado com 10% de SFB ou com 150 μM de CoCl₂ durante 48 horas. Ao término deste período, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e incubadas com 0,2 μg/μL de Anexina V-PE e 7AA-D – PerCP em tampão de ligação contendo 10 mM de HEPES pH 7,4, 150 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de MgCl₂ e 1,8 mM de CaCl₂ por 20 minutos protegidas da luz e à temperatura ambiente. A leitura das amostras foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences) no canal FL2 e FL3 e as análises realizadas com o auxílio do programa CellQuest (Becton Dickinson). Dez mil eventos foram analisados para cada condição experimental e os experimentos repetidos três vezes.

Western blotting

Para análise proteica em western blotting, 9×10^5 células de cada linhagem celular foram semeadas em frascos de 75 cm² em DMEM/F-12 suplementado com 10% de SFB e, após 24 horas do plaqueamento, os meios de cultura foram substituídos por DMEM/F12 livre de SFB. Passadas outras 24 horas de carenciamento, o meio foi trocado novamente por DMEM/F-12 com 10% de SFB, e 48 horas depois, as células foram tripsinizadas e os *pellets* celulares coletados em PBS. Para a análise especificamente da proteína HIF-1 α , as células foram tratadas com 150 μ M de CoCl₂ em DMEM/F-12 suplementado com 10% de SFB por 48 horas e, os pellets ressuspendidos e também coletados em PBS. Em seguida, as proteínas foram extraídas por meio de dissociação e homogeneização por pipetagem em aproximadamente 70 μ L de tampão de lise (10 % de sacarose, 1 % de Triton X-100, 20 mM de Tris-HCI (pH 8,0), 137 mM de NaCL, 10% de glicerol, 2 mM de EDTA e 1 mM de NaF) suplementado com inibidores de protease 7x concentrados (Complete

Mini Cocktail, Roche Diagnostics, Alemanha). Os pellets foram dissociados por pipetagem e os homogenatos resultantes mantidos no gelo por 30 minutos, sendo agitados a cada 10 minutos. Passado esse tempo, as amostras foram centrifugadas a 12.000 xg por 15 minutos a 4°C e os sobrenadantes coletados e armazenados a -80 °C até o momento do uso. As concentrações de proteínas totais foram estimadas pelo método de Bradford (Sigma-Aldrich) e as absorbâncias mensuradas em espectofotômetro com comprimento de onda de 595 nM (iMark[™] Microplate Absorbance Reader, BioRad). Trinta ou cinquenta microgramas de proteína de cada extrato obtido foram misturadas com tampão de amostra redutor concentrado guatro vezes (8% de SDS, 0,25 M de Tris-HCI (pH 6,8), 30 % de glicerol e 0,2% de azul de bromofenol) contendo 20 % do volume total de Ditiotreitol (DTT, Sigma-Aldrich), aquecidas minutos а 100°C (Thermoblock, por 5 Labnet), separadas eletroforeticamente em géis de poliacrilamida-SDS a 10% e então transferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond, GE Healthcare). Estas membranas foram bloqueadas por 18 horas a 4°C em solução de leite em pó desnatado a 5% (Molico, Brasil) dissolvido em tampão contendo 20 mM de Tris-HCI (pH 7,6), 150 mM de NaCI e 1% de Tween 20 (TBST) e incubadas com os anticorpos primários HIF-1 α (1:1000, MGC3, Abcam) e vimentina (1:1000, D21H3, Cell Signaling), diluídos em TBST com 5% de BSA (albumina de soro bovino), por 2 horas a temperatura ambiente e sob agitação constante. Após 3 lavagens consecutivas com TBST, as membranas foram incubadas com os respectivos anticorpos secundários conjugados com peroxidase e reveladas por meio de quimioluminescência (ECL[™] Western Blotting Analysis System, GE Healthcare). Após sucessivas lavagens com TBST, os resultados foram documentados com o auxilio do equipamento Alliance 4.7 (Uvitec, Cambridge, Inglaterra) e do software Alliance 16.06. As bandas das proteínas avaliadas foram submetidas a análises de densitometria e seus valores normalizados pelo valor da leitura das bandas de β-Actina (1:10000, A1978, Sigma-Aldrich) com auxilio do programa ImageJ.

Não foi possível detectar as bandas de HIF-1 α em nossas reações de western blotting nas condições experimentais testadas nesta tese. Acreditamos que a concentração de 150 μ M de CoCl₂ utilizada para o tratamento das linhagens celulares

não tenha sido suficiente para induzir a condição de hipóxia e, portanto, aumentar os níveis proteicos de HIF-1α. Nosso laboratório irá retomar a padronização destes ensaios, possivelmente com doses aumentadas de CoCl₂ ou ainda com anticorpos primários de outra marca comercial.

Imunohistoquímica

Para as reações de imunohistoquímica, os cortes com espessura de 3 µm foram aplicados sobre lâminas sinalizadas (tratadas com 3-aminopropil-trietoxi-silano, Sigma-Aldrich) e posteriormente colocadas em estufa a 60 °C overnigth. A desparafinação dos cortes foi feia em xilol e a reidratação em concentrações decrescentes de álcool (absoluto, 90%, 70% e 50%), seguida de lavagem em água destilada. A recuperação antigênica foi realizada em panela de pressão digital por 15 minutos, em ácido cítrico na concentração de 10 mM e pH 6. Após o resfriamento em temperatura ambiente durante 20 minutos, as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos e por mais duas vezes em água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com H₂O₂ (10 volumes) em duas trocas de 15 minutos, seguido de lavagens seguenciais em água corrente, água destilada e PBS. Na sequência, foram realizadas incubações com anticorpos primários anti-CD44 (clone G44-26, BD Pharmigen) e anti-CD326 (EpCAM, clone HEA-125, Miltenyi Biotec) previamente diluídos em Antibody Diluent (EnVision[™] FLEX, Dako) a 1:100 em câmara escura e úmida, que foi armazenada a 4 °C por overnight. Após a incubação com anticorpos primários, foram realizadas três lavagens com PBS com dois minutos de duração cada. Em seguida, soluções prontas para uso com anticorpos secundários biotinilados (anti-rabbit e anti-mouse, LSAB2 System, HRP) foram adicionadas as amostras e incubados à temperatura ambiente por 20 minutos, o que foi seguido de novas lavagens em PBS (três lavagens de dois minutos cada). As reações foram evidenciadas utilizando-se o cromógeno 3,3'diaminobenzidina (DAB, Dako, E.U.A) por um minuto, inativado a seguir em água destilada. Os cortes foram contra corados com hematoxilina de Carazzi durante 3 minutos, seguidos de diferenciação em água corrente por cinco minutos e, por fim, desidratados, diafanizados e montados com Entellan New (Merck). As lâminas foram escaneadas em um Aperio Scanscope CS Slide Scanner (Aperio Technologies Inc) e as imagens digitais foram obtidas e visualizadas com o software ImageScope (Aperio Technologies Inc).

Não foi possível detectar a expressão imunohistoquímica de CD326 nas amostras dos tumores coletados da região de flanco e da borda lateral de língua dos camundongos BALB/c nude. Nosso laboratório irá retomar a padronização destes ensaios, possivelmente com anticorpos primários de outra marca comercial. **APÊNDICE 2 – Análise do ciclo celular.** Distribuição das células entre as fases do ciclo celular após 48 (**A**-**C**) ou 96 horas (**D**-**F**) de incubação com meio DMEM/F-12 suplementado com 10% de SFB. **A** e **D** – Avaliação da porcentagem de células diploides e tetraploides identificadas por citometria de fluxo. **B** e **E** – Análise da distribuição das células diploides entre as fases G0/G1, S e G2/M do ciclo celular. **C** e **F** – Análise da distribuição das células tetraploides entre as fases G0/G1, S e G2/M do ciclo celular. Os gráficos representam as médias obtidas de 3 experimentos realizados de maneira independente. Anova One-way com teste de Tukey. CSC-M₁: CD44⁺/CD326⁻; CSC-E: CD44^{Low}/CD326^{High}; CSC-M₂: CD44^{High}/CD326⁻.



APÊNDICE 3 – Análise das células em processo de morte celular por apoptose e necrose. As taxas de morte celular foram avaliadas por citometria de fluxo após 48 horas de incubação com meio DMEM/F-12 + 10% SFB, seguida de marcação com Anexina V-PE e 7-AAD-PerCP. **A** – Avaliação da taxa de células em apoptose (células marcadas apenas com Anexina V-PE). **B** – Análise da taxa de necrose (células positivas apenas 7-ADD-PerCP). **C** – Avaliação da taxa total de morte celular (células positivas para Anexina V-PE e 7-ADD-PerCP). **D** – Análise da taxa de células negativas para Anexina V-PE e 7-ADD-PerCP). **D** – Análise da taxa de células viáveis (células negativas para Anexina V-PE e 7-ADD-PerCP). **D** – Análise da taxa de células viáveis (células negativas para Anexina V-PE e 7-ADD-PerCP). **D** – Análise da taxa de células viáveis (células negativas para Anexina V-PE e 7-ADD-PerCP). **D** – Análise da taxa de células viáveis (células negativas para Anexina V-PE e 7-ADD-PerCP). **D** – Análise da taxa de células viáveis (células negativas para Anexina V-PE e 7-ADD-PerCP). **D** – Análise da taxa de células viáveis (células negativas para Anexina V-PE e 7-ADD-PerCP). **D** – Análise da taxa de células viáveis (células negativas para Anexina V-PE e 7-ADD-PerCP). **D** – Análise da taxa de células viáveis (células negativas para Anexina V-PE e 7-ADD-PerCP). **D** – Análise da taxa de células viáveis (células negativas para Anexina V-PE e 7-ADD-PerCP). **D** – Análise da taxa de células viáveis (células negativas para Anexina V-PE e 7-ADD-PerCP). **D** – Análise da taxa de células células celulas de 3 experimentos realizados de maneira independente. Anova One-way com teste de Tukey. u.a: unidades arbitrárias. CSC-M₁: CD44⁺/CD326⁻; CSC-E: CD44^{Low}/CD326^{High}; CSC-M₂: CD44^{High}/CD326⁻.



0.0

LN'A CSC.M' CSC.K CSC.M'

0.0

LN'A SCIN SCIE SCINY

APÊNDICE 4 – **Análise da viabilidade celular em células tratadas com CoCl₂.** As linhagens celulares foram tratadas com doses crescentes de CoCl₂ diluídas em DMEM/F-12 + 10% SFB por 48 horas e a viabilidade determinada pelo método de MTT. **A** – A viabilidade das células LN-1A foi reduzida significativamente a partir da concentração de 75 μ M de CoCl₂. **B** – O tratamento com CoCl₂ reduziu a viabilidade das células CSC-M₁ significativamente a partir da concentração de 100 μ M. **C** – A viabilidade das células CSC-E foi reduzida significativamente a partir da concentração de 75 μ M de CoCl₂. **D** – O tratamento com CoCl₂ reduziu a viabilidade das células CSC-E foi reduzida significativamente a partir da concentração de 75 μ M de CoCl₂. **D** – O tratamento com CoCl₂ reduziu a viabilidade das células CSC-E foi reduzida significativamente a partir da concentração de 75 μ M de CoCl₂. **D** – O tratamento com CoCl₂ reduziu a viabilidade das células CSC-M₂ significativamente a partir da concentração de 50 μ M. Os gráficos representam as médias obtidas de 3 experimentos realizados de maneira independente. Anova One-way com teste de Dunett. CoCl₂: cloreto de cobalto. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001 CSC-M₁: CD44⁺/CD326⁻; CSC-E: CD44^{Low}/CD326^{High}; CSC-M₂: CD44^{High}/CD326⁻.











APÊNDICE 5 – Análise do ciclo celular em células tratadas com CoCl₂. A distribuição das células entre as fases do ciclo celular foi avaliada por citometria de fluxo após tratamento com 150 μM de CoCl₂ em DMEM/F-12 suplementado com 10% de SFB por 48 horas. **A** – Análise da porcentagem de células diploides e tetraploides alteradas pelo tratamento com CoCl₂, evidenciando o aumento no número de células tetraploides subpopulação CSC-M₁ e -E. **B** – Avaliação da distribuição das células diploides entre as fases G0/G1, S e G2/M do ciclo celular. **C** – O tratamento com CoCl₂ provocou o aumento da fase G0/G1 nas células tetraploides nas subpopulações CSC-M₁ e -M₂. Os gráficos representam as médias obtidas de 3 experimentos realizados de maneira independente. Anova One-way com teste de Tukey. CoCl₂: cloreto de cobalto. * p<0,05; ** p<0,01; CSC-M₁: CD44⁺/CD326⁻; CSC-E: CD44^{Low}/CD326^{High}; CSC-M₂: CD44^{High}/CD326⁻.



APÊNDICE 6 – Análise do processo de morte celular por apoptose e necrose em células tratadas com CoCl₂. As taxas de morte celular foram avaliadas por citometria de fluxo após o tratamento com 150 μM de CoCl₂ em meio DMEM/F-12 + 10% de SFB por 48 horas. **A** – Avaliação da taxa de células em apoptose (células marcadas apenas com Anexina V-PE). **B** – Análise da taxa de necrose (células positivas apenas 7-ADD-PerCP). **C** – Avaliação da taxa total de morte celular (células positivas para Anexina V-PE e 7-ADD-PerCP), evidenciando que o tratamento com CoCl₂ aumenta a morte celular na subpopulação CSC-M₂. **D** – Avaliação da taxa de células viáveis (células negativas para Anexina V-PE e 7-ADD-PerCP). Os gráficos representam as médias obtidas de 3 experimentos realizados de maneira independente. Anova One-way com teste de Tukey. u.a: unidades arbitrárias. CoCl₂: cloreto de cobalto. * p<0,05; ** p<0,01. CSC-M₁: CD44⁺/CD326⁻; CSC-E: CD44^{Low}/CD326^{High}; CSC-M₂: CD44^{High}/CD326⁻.



APÊNDICE 7 – Aspecto morfológico e níveis de vimentina nas linhagens celulares utilizadas no modelo animal. As células LN-1A, CSC-M₁, CSC-E e CSC-M₂ foram cultivadas em DMEM/F12 + 10% de SFB por 48 horas, seguida da inoculação subcutânea em flanco e ortotópica na língua dos camundongos. (**A**) Fotomicrografias das células LN-1A, CSC-M₁, CSC-E e CSC-M₂ inoculadas nos animais evidenciando características morfológicas semelhantes às células utilizadas em todos os experimentos *in vitro*. (**B**) Os níveis de vimentina avaliados por western blotting foram equivalentes aos experimentos anteriores. Microscopia de contraste de fase, aumento de 40x. CSC-M₁: CD44⁺/CD326⁻; CSC-E: CD44^{Low}/CD326^{High}; CSC-M₂: CD44^{High}/CD326⁻

A IN-1A CSC-M₁ CSC-E CSC-E CSC-M₂

Β



APÊNDICE 8 – Análise da média do peso dos animais de cada linhagem celular. Os camundongos que receberam injeções subcutâneas no flanco e ortotópicas na borda lateral de língua de células LN-1A, CSC-M₁, -E e -M₂ foram pesados semanalmente durante todo o período experimental. De modo geral, os grupos LN-1A (**A**), CSC-M₁ (**B**), CSC-E (**C**) e CSC-M₂ (**D**) apresentaram perda de peso gradual ao longo das semanas. Entretanto, somente os animais dos grupos LN-1A estiveram próximos de atingir o peso crítico (perda \geq 20%) no décimo quinto dia. CSC-M₁: CD44⁺/CD326⁻; CSC-E: CD44^{Low}/CD326^{High}; CSC-M₂: CD44^{High}/CD326⁻.



APÊNDICE 9 – Análise do volume tumoral após inoculação subcutânea células LN-1A, CSC-M₁, CSC-E e CSC-M₂ em região de flanco de camundongos BALB/c. Os camundongos receberam injeções subcutâneas na região de flanco bilateral de células LN-1A, CSC-M₁, -E e - M₂. O camundongo 1 de cada grupo experimental recebeu 10^5 células em cada lado, enquanto o camundongo 2 recebeu 5 x 10^5 células, e por fim, o camundongo 3 recebeu 10 x 10^5 em cada lado. O camundongo 1 de cada grupo experimental foi acompanhado por 75 dias enquanto os camundongos 2 e 3 foram avaliados após 25 dias. Ao final do período experimental, os tumores foram medidos com auxílio de um paquímetro digital e o volume calculado por meio da fórmula v = 0,5 x comprimento x largura².

		Volume tumoral (mm ³)				
Linhagem celular	Camundongo	Flanco direito	Flanco esquerdo			
	1	2,17	0,35			
LN-1A	2					
	3	0,19	0,21			
	1	0,89	4,09			
CSC-M ₁	2	0,47	0,37			
	3	1,38	3,97			
	1	0,63	0,35*			
CSC-E	2	2,45	3,15			
	3	10,78	3,72			
CSC-M₂	1	0,25	1,92			
	2	0,85	1,08			
	3	12,74	2,97			
*Tumor do lado dir	eito, CD44 ⁺ /CD326	⁵⁻ ; CSC-E: CD44	Low/CD326 ^{High} ; CSC-M ₂ :			

CD44^{High}/CD326⁻

APÊNDICE 10 – Análise do volume tumoral e presença de metástase linfonodal após inoculação ortotópica células LN-1A, CSC-M₁, CSC-E e CSC-M₂ em borda lateral de língua de camundongos BALB/c. 2×10^5 de células LN-1A, CSC-M₁, -E e -M₂ foram inoculadas na borda lateral de língua direta dos camundongos, os quais foram camundongos acompanhados por 25 dias. Os tumores foram medidos com o auxílio do programa Image J e o volume calculado por meio da fórmula v = 0,5 x comprimento x largura². A presença de metástases linfonodais nas cadeias MMD e MME foi avaliada pela técnica de fluorescência e confirmada por coloração de H&E e IHC para citoqueratina.

	Volume tumoral (mm ³)			Metástase				
					linfonodal			
Linhagem	Camundor	ngo Língua	a Média		MMD	MME		
celular								
	1	2			Ausente	Ausente		
LN-1A	2	4,69	3,3	88	Ausente	Ausente		
	3	3,44			Ausente	Ausente		
	1				Ausente	Ausente		
CSC-M ₁	2	30,49	10,	16	Ausente	Ausente		
	3				Ausente	Ausente		
	1	26,06			Presente	Ausente		
CSC-E	2	0,5	61,	56	Ausente	Ausente		
	3	158,11			Ausente	Ausente		
	1	49			Ausente	Ausente		
CSC-M ₂	2	23,33	29,	87	Presente	Ausente		
	3	17,28			Ausente	Ausente		
MMD: mandibul	lar medial c	direita; MME:	mandibular	medial	esquerda	CSC-M ₁ :		
CD44 ⁺ /CD326 ⁻ ; CSC-E: CD44 ^{Low} /CD326 ^{High} ; CSC-M ₂ : CD44 ^{High} /CD326 ⁻ .								

APÊNDICE 11 – Análise dos linfonodos cervicais da cadeia mandibular medial direita (MMD). Imagens representativas dos linfonodos cervicais da cadeia MMD provenientes do modelo ortotópico em camundongos BALB/c nude com as células LN-1A, CSC-M₁, -E e -M₂. Os linfonodos foram avaliados pela técnica de fluorescência, pois as metástases são demonstradas pela coloração verde intensa, conferidas pela proteína ZsGreen presente nas células LN-1A. Nota-se aqui uma maior intensidade de fluorescência presente no linfonodo do animal CSC-E e CSC-M2, evidenciando possíveis focos de metástases (indicados pelas setas). Todos os outros linfonodos foram negativos para fluorescência. As imagens foram obtidas com o auxilio de microscópio com epifluorescência, no aumento original de 40x. CSC-M₁: CD44⁺/CD326⁻; CSC-E: CD44^{Low}/CD326^{High}; CSC-M₂: CD44^{High}/CD326⁻.


APÊNDICE 12 – Análise dos linfonodos cervicais da cadeia mandibular lateral direita (MLD). Imagens representativas dos linfonodos cervicais da cadeia MLD provenientes do modelo ortotópico em camundongos BALB/c nude com as células LN-1A, CSC-M₁, -E e -M₂. Os linfonodos foram avaliados pela técnica de fluorescência, pois as metástases são demonstradas pela coloração verde intensa, conferidas pela proteína ZsGreen presente nas células LN-1A. Observa-se aqui a negativamente para fluorescência de todos os linfonodos nos quatro grupos experimentais avaliados. As imagens foram obtidas com o auxilio de microscópio com epifluorescência, no aumento original de 40x. CSC-M₁: CD44⁺/CD326⁻; CSC-E: CD44^{Low}/CD326^{High}; CSC-M₂: CD44^{High}/CD326⁻.



APÊNDICE 13 – Expressão imunohistoquímica do CD44 em amostras tumorais da região de flanco de camundongos BALB/c nude. Fotomicrografias representativas das reações de imunohistoquímica para detecção da proteína CD44 nas amostras coletadas dos tumores na região de flanco dos camundongos BALB/c nude. Pode-se observar as células LN-1A, CSC-M₁, CSC-E e CSC-M₂ com a membrana plasmática fortemente marcada. Padrão de marcação semelhante para CD44 também foi observado nos tumores ortotópicos da região de borda lateral de língua (dados não mostrados). Não foram observadas diferenças na intensidade de marcação entre as linhagens celulares estudadas. Aumento original de 100x CSC-M₁: CD44⁺/CD326⁻; CSC-E: CD44^{Low}/CD326^{High}; CSC-M₂: CD44^{High}/CD326⁻.



ANEXO I – Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

CERTIFICADO CEUA nº 171/2022





CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Caracterização de subpopulações de células-tronco do câncer derivadas de linhagem metastática de carcinoma espinocelular de língua.**, registrada com o nº **6020-1/2022**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Edgard Graner e lara Gonçalves de Aquino, Ana Laura Valença Bizeli, Débora Campanella Bastos**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido** aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais** da **Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de <u>16/05/2022</u>.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	20/06/2022 a 28/02/2023
Vigência da autorização para manipulação	16/05/2022 a 28/02/2023
animal:	
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/c.CgFoxn1nu/AnNTacUnib
No. de animais:	12
Idade/Peso:	6.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	12 Machos
Origem:	Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba,
	FOP/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao IBAMA,SISBIO ou CIBio e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 22 de junho de 2022.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro Presidente

Rosangela dos Santos

Secretária Executiva

Documento assinado eletronicamente por WAGNER JOSE FAVARO, PRESIDENTE DA CEUA/UNICAMP, em 23/06/2022, às 22:33 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

Documento assinado eletronicamente por ROSANGELA DOS SANTOS, SECRETÁRIA EXECUTIVA CEUA/UNICAMP, em 24/06/2022, às 08:55 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site: sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador: 9A38B272 F0054A29 B881E11A F16BA432



ANEXO II: Verificação de originalidade e prevenção de plágio

Caracterização fenotípica de subpopulações de células-tronco do câncer em linhagem celular metastática de carcinoma espinocelular oral

RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE ÍNDICE DE PUBLICAÇÕES DOCUMENTOS DOS FONTES DA INTERNET SEMELHANÇA ALUNOS FONTES PRIMÁRIAS repositorio.unicamp.br 6% 6% Fonte da Internet doi.org Fonte da Internet Nádia Ghinelli Amôr, Rodrigo Fonseca Buzo, 1% 3 Rafael Carneiro Ortiz, Nathália Martins Lopes et al. "In vitro and in vivo characterization of cancer stem cell subpopulations in oral squamous cell carcinoma", Journal of Oral Pathology & Medicine, 2020 Publicação mts.intechopen.com 4 % Fonte da Internet link.springer.com 5 Fonte da Internet

ANEXO III: Comprovante de submissão do artigo

Oral Oncology

Phenotypic characterization of cancer stem cell subpopulations from a metastatic oral squamous cell carcinoma cell line --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	OO-D-23-285
Article Type:	Original Research Article
Section/Category:	Basic
Keywords:	Oral squamous cell carcinoma; Cancer stem cells; CD44; CD326; Epithelial-mesenchymal transition
Corresponding Author:	Edgard Graner, Ph.D.
First Author	
Order of Authors: Iara Gonçalves Aquino Florence Juana Maria Cuadra-Zelaya Débora Campanella Bastos Ana Laura Valença Bizeli Patricia Vianna Bonini Palma Tuula Salo Fernanda Viviano Mariano Ricardo Della Coletta Edecard Oragen Bh D	
	Flatance lucas Maria Cuedra Zelava
	Pibrence Suana Maria Cuaura-Zelaya
	Ana Laura Valença bizeli
	Formanda Viviana Mariana
	Pierranda Viviano Manano
	Edgard Graper, Ph.D.
Abstract	
	Cancer stem cells (CSC) are strongly associated with local recurrence, metastatic dissemination, and chemoradiotherapy resistance in several types of cancer, including oral squamous cell carcinoma (OSCC). We aimed to characterize the in vitro and in vivo behavior of CSC subpopulations derived from a highly metastatic OSCC cell line.
	Material and metods
	Three CSC subpopulations with different patterns of positivity for CD44 and CD326 were isolated by FACS from LN-1A cells. Their proliferation rates, clonogenic and sphere formation potential, adhesion to extracellular matrix, and migration were analysed in vitro, as the levels of epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers and p-Akt, and sensitivity to cisplatin and TVB-3166. The ability of these cells to in vivo produce tumors was tested both in the flanks and orthotopically in the tongue of BALB/c mice.
	Results
	E-cadherin levels were higher in CSC-E cells, while vimentin and slug were more produced by CSC-M2 cells. CSC-M1 and CSC-M2 cells showed greater proliferative potential, which was accompanied by a high production of p-Akt. All studied cell lines were able to form spheres, and the greatest ability to grow in colonies was observed in CSC-M1 and CSC-M2 cells, which also have stronger adhesion to myogel. Finally, CSC-E cells were more sensitive to the exposure to TVB-3166, and all cell lines were able to form tumors when subcutaneously or orthotopically inoculated in mice.
	Conclusion
	OSCC-derived CSC subpopulations exhibited distinct and enhanced cancer

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation