

# UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

Ana Laura Valença Bizeli

### CARACTERIZAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS-TRONCO DO CÂNCER EM LINHAGEM CELULAR DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL

Piracicaba

2022

Ana Laura Valença Bizeli

### CARACTERIZAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS-TRONCO DO CÂNCER EM LINHAGEM CELULAR DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Mestra em Estomatopatologia, na Área de Estomatologia.

#### Orientador: Prof. Dr. Edgard Graner

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna Ana Laura Valença Bizeli e orientada pelo Prof.Dr. Edgard Graner.

#### Piracicaba

2022

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

Bizeli, Ana Laura Valença, 1995-

B552c Caracterização de subpopulações de células-tronco do câncer em linhagem celular de carcinoma de células escamosas oral / Ana Laura Valença Bizeli. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Edgard Graner. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Carcinoma de células escamosas oral. 2. Células-tronco neoplásicas. I Graner, Edgard, 1968-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade Odontologia de Piracicaba. III. Título.

#### Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Characterization of cancer stem cell subpopulations in an oral squamous cell carcinoma cell line Palavras-chave em inglês: Oral squamous cell carcinoma Neoplastic stem cells Área de concentração: Patologia Titulação: Mestra em Estomatopatologia Banca examinadora: Edgard Graner [Orientador] Débora Campanella Bastos Florence Juana Maria Cuadra Zelaya Data de defesa: 14-06-2022 Programa de Pós-Graduação: Estomatopatologia

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a) ORCID do autor: https://orcid.org/0000-0002-9427-0794 Currículo Lattes do autor: http://lattes.cnpq.br/6625268886133259



## UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS Faculdade de Odontologia de Piracicaba

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 14 de junho de 2022, considerou a candidata ANA LAURA VALENÇA BIZELI aprovada.

#### PROF. DR. EDGARD GRANER

#### PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. DÉBORA CAMPANELLA BASTOS

#### PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. FLORENCE JUANA MARIA CUADRA ZELAYA

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

Para minhas avós, Alice Silva Valença (em memória) e Angelina Carriero Bizeli, que me inspiram a nunca desistir.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ter escutado as orações que eu fiz, desde que eu aprendi a falar. Pelo que já fez e pelo que fará. Por conhecer toda a Ciência e permitir que eu estude uma parte dela.

A Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, ao Programa de Pós-graduação em Estomatopatologia e aos Profs. Drs. Alan Roger dos Santos Silva, Márcio Ajudarte Lopes, Jacks Jorge Júnior, Oslei Paes de Almeida, Pablo Augustin Vargas, Ricardo Della Coletta, por todo o suporte e por todo o conhecimento compartilhado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Edgard Graner**, por desde o princípio ter apresentado com muito carinho seus projetos para mim. Pela disponibilidade, paciência e confiança. Por passar seus conhecimentos com humildade e calma. Expresso aqui minha admiração e respeito.

Aos meus amigos do laboratório, **Débora Campanella Bastos**, **Florence Juana Maria Cuadra Zelaya**, **Iara Gonçalves de Aquino**, **Isadora Ferrari Teixeira**, **Maurício da Rocha Machado**, **Renato de Assis Machado**, por tornarem os dias de trabalhos mais leves. À **Iara**, que me ensinou tanto e esteve presente em todas as etapas do mestrado, sempre pronta para me ajudar. À **Isa**, que me ensinou com muito carinho sobre experimentos com animais. À **Flor**, que me iniciou na cultura de células. À professora **Débora**, pelo exemplo de mulher e profissional, pelo carinho ao ensinar e por toda a motivação.

Aos meus pais, **Márcia Maria Valença Bizeli** e **Samuel Bizeli**, por serem o maior exemplo de amor na minha vida. Por me apoiarem de todas as formas possíveis para que eu realizasse meus sonhos e para que se cumprissem os planos de Deus. Pelas orações, pelas preocupações, pelas broncas, pelo cuidado. Por me perdoarem sempre que eu erro. Por terem me ensinado o caminho.

À minha irmãzinha, Ana Clara Valença Bizeli, que sempre me motiva a ser uma pessoa melhor. Que tornou nossa família maior, mais feliz e cheia de

bagunça. Que sempre orou por mim, seja pelos motivos mais bobos ou pelos mais sérios. Que é minha companheira e melhor amiga.

Aos meus avós maternos, **Alice Silva Valença** (em memória) e **Antônio José Valença**, por me amarem, de uma forma tão particular. Por terem lutado batalhas que muitos nem imaginam. Por todas as orações feitas pelos filhos, netos e bisnetos. Por terem me dado uma família grande, divertida e única. Por serem um grande exemplo de amor.

Aos meus avós paternos, **Angelina Carriero Bizeli** e **Antônio Carlos Bizeli**, por terem sido parte fundamental da minha criação. Por todo o amor, carinho, orações e ensinamentos. Ao meu avô, especificamente, por ter lido a Bíblia para mim quando eu era criança, por me levar em todos os lugares, por me aconselhar. A minha avó, por ter me alimentado, por ter me vestido, por ter me amado, por sempre se preocupar. Por ser uma mulher tão à frente de seu tempo.

À toda minha família, **Valença** e **Bizeli**, por ter me ajudado em absolutamente tudo o que estivesse ao seu alcance. Por ser minha base espiritual. Por nunca deixar que eu me sentisse sozinha. Pelas festas, pelas bagunças, pelas risadas que fazem a barriga doer. Pelo amor.

À família **Sallum** que me recebeu como se eu fosse da família. Que me ajudaram a fazer de Piracicaba um lar. Pela bondade, pela humildade, pelo carinho. À **Arlene Ferraz Sallum** e ao **Antonio Wilson Sallum** por me fazerem sentir tão querida, por todo afeto e acolhimento. À **Marcia Maria Bonetti Sallum** por sempre me incentivar a ser uma pessoa melhor em todos os sentidos, por ser minha companheira fiel, por todas as conversas, músicas e gargalhadas. Ao **Enilson Antônio Sallum** por ensinar com paciência e modéstia, por todos os conselhos, louvores e serões.

As minhas amigas da faculdade, Alana Guaré Dias, Gabrielle Christine Bonetti Sallum, Mariana Possebon Coloço José, Maria Eduarda Scordamaia Lopes e Rafaela Gonçalves Peixoto, que são carinhosamente chamadas de "celsas". Por me amarem do jeito que eu sou e permitirem que eu as ame do meu jeito particular. Em especial, à Gabrielle, por me acolher em sua casa. Pela nossa dinâmica louca, que ninguém entende. Por ser tão diferente e mesmo assim conseguir me ouvir, me entender, me amar.

À minha amiga do ensino médio, **Beatriz Oliveira Mendonça**, por me ter acompanhado em todas as etapas da minha vida profissional, mesmo a distância. Por sempre se fazer presente. Pelo amor e carinho.

Às minhas amigas de infância, **Gabriela Campos Aguiar** e **Ana Paula Costa Barbieri**, por terem feito parte de todas as fases da minha vida. Por me ouvirem, me aconselharem, me acalmarem. Por serem como irmãs. Por todo amor.

À Mariana Amaral Marchetti, minha psicóloga, por me ajudar a trilhar a nada fácil jornada do autoconhecimento.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**), processo 134326/2019-9.

### RESUMO

O carcinoma de células escamosas (CCE) é a neoplasia maligna mais comum da cavidade oral, representando de 90 a 95% dos casos, e tem, de uma maneira geral, prognóstico ruim, com índices consideráreis de metástases, recidivas precoces e alta taxa de mortalidade. O risco para o CCE oral está fortemente ligado a fatores ambientais e genéticos, como tabagismo, consumo de álcool, infecções virais, exposição a raios ultravioleta, dieta, predisposição genética e imunossupressão. A cirurgia é o tratamento de primeira linha para CCE orais pequenos e de fácil acesso. Entretanto, em estágios mais avançados, o tratamento geralmente é combinado, sendo a cirurgia a modalidade primária e radioterapia ou quimioterapia como adjuvantes. Apesar dos recentes avanços nas terapias antineoplásicas, o CCE oral continua com altas taxas de insucesso terapêutico. A presença de subpopulações de células neoplásicas malignas indiferenciadas, chamadas células-tronco do câncer (CTC), é considerada como a principal causa da recorrência local, disseminação metastática e resistência aos tratamentos. As CTC possuem características semelhantes às das célulastronco dos tecidos normais, dentre as quais capacidade de autorrenovação e diferenciação, e são responsáveis por iniciar o tumor e pela heterogeneidade celular destes. A expressão de marcadores de superfície celular é um dos métodos empregados para identificar as CTC, sendo CD44 e CD326 marcadores frequentemente usados para isolar estas células. A caracterização das CTC pode contribuir para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na progressão do CCE oral e, consequentemente, para o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico e tratamentos mais eficazes que as atuais. Portanto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar subpopulações de CTC em linhagens celulares de CCE oral. Para isto, avaliamos, em ensaios in vitro, as propriedades proliferativas, o potencial clonogênico, a adesão e a migração celular, a produção de proteínas associadas à transição epitélio-mesenquimal (TEM) e de ácido graxo sintase (FASN), reguladora central do metabolismo lipídico com papel crítico no crescimento e sobrevivência de alguns tumores, por meio de western blotting. Estudamos também a sensibilidade a drogas antineoplásicas por meio de teste de viabilidade celular, na linhagem SCC-9 ZsGreen parental e duas de suas subpopulações de CTC com padrões distintos

de expressão de CD44 e de CD326: fenótipos SCC-9 ZsG B1 (CD44<sup>+</sup> /CD326<sup>-</sup>) e SCC-9 ZsG E1(CD44<sup>low</sup>/CD326<sup>high</sup>). Os resultados desta dissertação de mestrado evidenciam que, dentre as células estudadas, o fenótipo SCC-9 ZsG B1 é o que tem maior potencial proliferativo, de adesão e migratório, além de apresentar um perfil mais mesenquimal e ser mais sensível à cisplatina e ao TVB-3166, quando comparadas à linhagem celular parental e ao fenótipo SCC-9 ZsG E1. Este último, por sua vez, apesar de não ter apresentado altas taxas de proliferação, adesão e migração quando comparado as fenótipo SCC-9 ZsG B1, parece ser mais resistente às drogas estudadas e possuir natureza epitelial. **Palavras-chave:** Carcinoma de células escamosas oral. Células tronco do câncer. CD44. CD326.

# ABSTRACT

Squamous cell carcinoma (SCC) is the main malignancy that affects the oral cavity, representing 90-95% of all cases. It has a poor overall prognosis with substantial rates of metastasis, early relapses, and high mortality rates. The risk for oral SCC is strongly associated to environmental and genetic factors such as smoking, alcohol consumption, viral infections, ultraviolet radiation exposure, diet, genetic predisposition, and immunosuppression. Surgery is the primary mode of treatment for small and easily accessible oral SCC. However, in advanced stages, the treatment is usually combined, being surgery the primary modality and radiotherapy or chemotherapy its adjuvants. Despite recent advances in anticancer therapies, oral SCC still has high rates of therapeutic failure. Small subpopulations of undifferentiated malignant neoplastic cells, denominated cancer stem cells (CSC), may be the main cause of local recurrence, metastatic spread, and treatment resistance. CSC show characteristics similar to stem cells from normal tissues, including self-renewal and differentiation and are responsible for initiating the tumor and generating tumor heterogeneity. The expression of cell surface markers such as CD44 and CD326, is one of the methods used to identify and isolate CSC. The detailed characterization of CSC may contribute to elucidate the mechanisms involved in the progression of oral SCC and, consequently, to the development of new diagnostic techniques and more effective treatments. Therefore, the aim of the present study was to characterize CSC subpopulations in oral SCC cell lines. We investigated with in vitro assays the proliferative activity, clonogenic potential, cell migration and adhesion, the expression of epithelial mesenchymal transition (EMT) markers and fatty acid synthase (FASN), as well as the sensitivity to antineoplastic drugs in the parental SCC-9 ZsGreen and two CSC subpopulations: SCC-9 ZsG B1 (CD44<sup>+</sup> /CD326<sup>-</sup>) and SCC-9 ZsG E1(CD44<sup>low</sup>/CD326<sup>high</sup>). The results of the present study show that, among the studied cells lines, the phenotype SCC-9 ZsG B1 has higher proliferative, adhesion and migratory potential and presents a more mesenchymal profile, being more sensitive to cisplatin and TVB -3166. On the other hand, the phenotype SCC-9 ZsG E1 is more resistant to the studied drugs and has an epithelial nature.

Keywords: Cancer stem cells. CD44. CD326. Oral squamous cell carcinoma.

# LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**µL:** Microlitro

**µM:** Micromolar

**BSA:** Bovine serum albumin – Albumina de soro bovino

CCE: Carcinoma de células escamosas

CD: Cluster de diferenciação

CDK: Cyclin-Dependent Kinase – Quinase dependente de ciclina

**CSC:** Cancer stem cell

CTC: Células-tronco do câncer

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

DMSO: Di-metilsulfóxido

**DTT:** Ditiotreitol

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

**EpCam:** *Epithelial Cell Adhesion Molecule* – Molécula de adesão das células epiteliais

ESA: Epithelial specific antigen – Antígeno epitelial específico

FASN: Fatty Acid Synthase - ácido graxo sintase

**GLOBOCAN:** Global Cancer Observatory

HPV: Human Papillomavirus - Vírus do papiloma humano

IC50: Half maximal inhibitory concentration - Concentração inibitória média

INCA: Instituo Nacional do Câncer

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

OMS: Organização Mundial da Saúde

PBS: Phosphate buffered saline - Solução salina tamponada com fosfato

PCR: Polymerase chain reaction – Reação em cadeia da polimerase

SCC: Squamous Cell Carcinoma – Carcinoma de células escamosas

SFB: Soro fetal bovino

TEM: Transição epitélio-mesenquimal

TME: Transição mesenquimo-epitelial

**TVB-3166:** *4-(1-(5-(3,4-Dimethyl-1H-pyrazol-5-yl)-2,4-dimethylbenzoyl)azetidin- 3-yl)benzonitrile* 

u.a: Unidade arbitrária

WHO: World Health Organization

ZsG: ZsGreen

# SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
	2.1 Carcinoma de Células Escamosas (CCE) Oral	18
	2.1.1 Etiologia	19
	2.1.2 Apresentação clínica	20
	2.1.3 Características histopatológicas	21
	2.1.4 Classificações dos CCE	22
	2.1.5 Características moleculares	23
	2.1.6 Tratamento	26
	2.2 Células-Tronco do Câncer (CTC)	26
	2.2.1 Origem das CTC	28
	2.2.2 CTC, Transição Epitélio-Mesenquimal (TEM) e Metástase	29
	2.2.3 Metabolismo das CTC	30
	2.2.4 Isolamento, identificação e caracterização das CTC	32
		31
	2.2.5 CTC no CCE oral	54
	2.2.5 CTC no CCE oral 2.2.6 CD44	35
	2.2.5 CTC no CCE oral 2.2.6 CD44 2.2.7 CD326 (EpCAM ou ESA)	35 36
	<ul> <li>2.2.5 CTC no CCE oral</li> <li>2.2.6 CD44</li> <li>2.2.7 CD326 (EpCAM ou ESA)</li> <li>2.2.8 CTC e sua relação com o tratamento para o CCE oral</li> </ul>	34 35 36 37
3	<ul> <li>2.2.5 CTC no CCE oral</li> <li>2.2.6 CD44</li> <li>2.2.7 CD326 (EpCAM ou ESA)</li> <li>2.2.8 CTC e sua relação com o tratamento para o CCE oral</li> <li>PROPOSIÇÃO</li> </ul>	35 36 37 41
3	<ul> <li>2.2.5 CTC no CCE oral</li> <li>2.2.6 CD44</li> <li>2.2.7 CD326 (EpCAM ou ESA)</li> <li>2.2.8 CTC e sua relação com o tratamento para o CCE oral</li> <li>PROPOSIÇÃO</li> <li>3.1. Proposição geral</li> </ul>	34 35 36 37 41 41
3	<ul> <li>2.2.5 CTC no CCE oral</li> <li>2.2.6 CD44</li> <li>2.2.7 CD326 (EpCAM ou ESA)</li> <li>2.2.8 CTC e sua relação com o tratamento para o CCE oral</li> <li>PROPOSIÇÃO</li> <li>3.1. Proposição geral</li> <li>3.2. Proposições específicas</li> </ul>	34 35 36 37 41 41 41
3	<ul> <li>2.2.5 CTC no CCE oral</li> <li>2.2.6 CD44</li> <li>2.2.7 CD326 (EpCAM ou ESA)</li> <li>2.2.8 CTC e sua relação com o tratamento para o CCE oral</li> <li>PROPOSIÇÃO</li> <li>3.1. Proposição geral</li> <li>3.2. Proposições específicas</li> <li>MATERIAL E MÉTODOS</li> </ul>	34 35 36 37 41 41 41 42
3	<ul> <li>2.2.5 CTC no CCE oral</li> <li>2.2.6 CD44</li> <li>2.2.7 CD326 (EpCAM ou ESA)</li> <li>2.2.8 CTC e sua relação com o tratamento para o CCE oral</li> <li>PROPOSIÇÃO</li> <li>3.1. Proposição geral</li> <li>3.2. Proposições específicas</li> <li>MATERIAL E MÉTODOS</li> <li>4.1 Cultura de células</li> </ul>	34 35 36 37 41 41 41 42 42
3	<ul> <li>2.2.5 CTC no CCE oral</li> <li>2.2.6 CD44</li> <li>2.2.7 CD326 (EpCAM ou ESA)</li> <li>2.2.8 CTC e sua relação com o tratamento para o CCE oral</li> <li>PROPOSIÇÃO</li> <li>3.1. Proposição geral</li> <li>3.2. Proposições específicas</li> <li>MATERIAL E MÉTODOS</li> <li>4.1 Cultura de células</li> <li>4.2 Análise da proliferação celular</li> </ul>	34 35 36 37 41 41 41 42 42 43
3	<ul> <li>2.2.5 CTC no CCE oral</li> <li>2.2.6 CD44</li> <li>2.2.7 CD326 (EpCAM ou ESA)</li> <li>2.2.8 CTC e sua relação com o tratamento para o CCE oral</li> <li>PROPOSIÇÃO</li> <li>3.1. Proposição geral</li> <li>3.2. Proposições específicas</li> <li>MATERIAL E MÉTODOS</li> <li>4.1 Cultura de células</li> <li>4.2 Análise da proliferação celular</li> <li>4.3 Ensaio clonogênico.</li> </ul>	35 35 37 41 41 41 42 42 42 43 44
3	<ul> <li>2.2.5 CTC no CCE oral</li> <li>2.2.6 CD44</li> <li>2.2.7 CD326 (EpCAM ou ESA)</li> <li>2.2.8 CTC e sua relação com o tratamento para o CCE oral</li> <li>PROPOSIÇÃO</li> <li>3.1. Proposição geral</li> <li>3.2. Proposições específicas</li> <li>MATERIAL E MÉTODOS</li> <li>4.1 Cultura de células</li> <li>4.2 Análise da proliferação celular</li> <li>4.3 Ensaio clonogênico</li> <li>4.4 Análise da adesão celular</li> </ul>	35 35 37 41 41 41 42 42 43 43 45
3	<ul> <li>2.2.5 CTC no CCE oral</li> <li>2.2.6 CD44</li> <li>2.2.7 CD326 (EpCAM ou ESA)</li> <li>2.2.8 CTC e sua relação com o tratamento para o CCE oral</li> <li>PROPOSIÇÃO</li> <li>3.1. Proposição geral</li> <li>3.2. Proposições específicas</li> <li>MATERIAL E MÉTODOS</li> <li>4.1 Cultura de células</li> <li>4.2 Análise da proliferação celular</li> <li>4.3 Ensaio clonogênico</li> <li>4.4 Análise da adesão celular</li> <li>4.5 Migração celular</li> </ul>	34 35 36 37 41 41 41 42 42 42 43 44 45 46
3	<ul> <li>2.2.5 CTC no CCE oral</li> <li>2.2.6 CD44</li> <li>2.2.7 CD326 (EpCAM ou ESA)</li> <li>2.2.8 CTC e sua relação com o tratamento para o CCE oral</li> <li>PROPOSIÇÃO</li> <li>3.1. Proposição geral</li> <li>3.2. Proposições específicas</li> <li>MATERIAL E MÉTODOS</li> <li>4.1 Cultura de células</li> <li>4.2 Análise da proliferação celular</li> <li>4.3 Ensaio clonogênico</li> <li>4.4 Análise da adesão celular</li> <li>4.5 Migração celular</li> <li>4.6 Experimentos de western blotting</li> </ul>	34 35 37 41 41 41 42 42 42 43 43 45 45 46 47
3	<ul> <li>2.2.5 CTC no CCE oral</li> <li>2.2.6 CD44</li> <li>2.2.7 CD326 (EpCAM ou ESA)</li> <li>2.2.8 CTC e sua relação com o tratamento para o CCE oral</li> <li>PROPOSIÇÃO</li> <li>3.1. Proposição geral</li> <li>3.2. Proposições específicas</li> <li>MATERIAL E MÉTODOS</li> <li>4.1 Cultura de células</li> <li>4.2 Análise da proliferação celular</li> <li>4.3 Ensaio clonogênico</li> <li>4.4 Análise da adesão celular</li> <li>4.5 Migração celular</li> <li>4.6 Experimentos de western blotting</li> <li>4.7 Teste de viabilidade celular</li> </ul>	34 35 36 37 41 41 41 42 42 42 43 43 45 45 45 45 45 45

5 RESULTADOS	51
5.1. Manutenção das características fenotípicas	51
5.2. Análise da proliferação celular nos diferentes fenótipos	51
5.3. Análise do potencial clonogênico	52
5.4. Análise da adesão celular	55
5.5. Análise da migração celular	56
5.6. Produção de proteínas associadas a EMT e de FASN	58
5.7. Teste de viabilidade celular	61
6 DISCUSSÃO	65
7 CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS	79
ANEXOS	
Anexo 1 – Verificação de originalidade e prevenção de plágio 1	17

# 1 INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas (CCE) oral é uma neoplasia maligna originária no epitélio escamoso que reveste a cavidade oral, que pode ocorrer na língua, lábios, gengiva, palato, assoalho da boca e mucosa jugal (Estilo et al., 2009). O CCE é a forma mais comum de câncer oral e apresenta, de uma maneira geral, um prognóstico ruim e alta taxa de mortalidade (Vitório et al., 2020), ocupando o décimo sexto lugar em incidência e mortalidade dentre todos os cânceres, com 377.713 novos casos e 177.757 mortes em 2020 (GLOBOCAN). O CCE oral tem sido estudado separadamente dos outros CCE de cabeça e pescoço, pois está sujeito a fatores de risco específicos (Johnson et al., 2000; Bertolus et al., 2012). Apesar do aspecto multifatorial da doença, o tabaco e álcool são os fatores com maior potencial carcinogênico (Kowalski et al., 2020). O risco para o CCE oral também está fortemente ligado a predisposição familiar e genética, presença de imunossupressão, a infecções virais, em CCE de orofaringe, e exposição aos raios ultravioleta do sol, em CCE de lábio (Kumar et al., 2016).

O diagnóstico precoce pode contribuir para um bom prognóstico (Vitório et al., 2020), pois tumores em estágio avançado apresentam alta chance de recorrência e metástases cervicais (Malik et al. 2016), com taxa de sobrevida de 5 anos considerada improvável (Vitório et al., 2020). O uso de técnicas de biologia molecular pode contribuir para o diagnóstico e melhorar significativamente a detecção de alterações que são invisíveis ao microscópio (Fukuka et al., 2012).

A patogênese molecular do CCE é complexa e resultado de vários mecanismos moleculares interdependentes que envolvem mais do que a expressão alterada de genes e proteínas específicas, compreende também mudanças nos processos metabólicos (Wei et al. 2011; Xie et al. 2012). A iniciação e manutenção de tumores malignos requerem vários elementos essenciais: autossuficiência em sinais estimuladores de crescimento, insensibilidade para fatores supressores de crescimento, capacidade de invasão

de outros tecidos e de metastatizar, potencial ilimitado de replicação, indução do processo de angiogênese, bloqueio dos mecanismos naturais de morte celular, desregulação energética, escape a resposta imune, inflamação como promotor tumoral, instabilidade genômica e mutação, desbloqueio de plasticidade fenotípica, reprogramação epigenética não mutacional, microbiomas polimórficos e senescência celular (Hanahan e Weinberg, 2000; Hanahan e Weinberg, 2011; Hanahan, 2022).

Apesar dos constantes e recentes avanços em relação aos recursos terapêuticos para o manejo CCE oral, a sobrevida global média para pacientes com CCE metastático ou recorrente permanece abaixo de 1 ano (Price e Cohen, 2012). A complexidade molecular, a heterogeneidade tumoral e a presença de subpopulações de células-tronco do câncer (CTC) são responsáveis pelas recorrências locais, disseminação metastática e resistência ao tratamento em vários tipos de cânceres (Hanahan e Weinberg, 2011), inclusive em CCE orais (Okamoto et al., 2008; Yanamoto et al., 2014).

As CTC ou células-tronco tumorais (CTT), também conhecidas por vezes como células iniciadoras de tumor (CIT), são subpopulações de células neoplásicas malignas indiferenciadas presentes nos tumores e responsáveis pela sua iniciação, heterogeneidade, recorrência e resistência terapêutica (Abbaszadegan et al., 2017). Estas células possuem características semelhantes às das células-tronco bem conhecidas nos tecidos normais, incluindo capacidade de autorrenovação e de diferenciação (Bhatia e Kumar, 2016). A capacidade aprimorada das CTC para dar origem a novos tumores sugere que elas sejam portadoras de habilidades para evasão da vigilância imunológica (Lei e Lee, 2021).

Um dos métodos empregados para identificar as CTC é baseado na expressão de marcadores de superfície celular (Chen et al., 2013). Destes, os marcadores para CTC mais frequentemente estudados estão CD44, CD24, CD29, CD90, CD133, CD326 (também conhecido como molécula de adesão celular epitelial, EpCAM) e aldeído desidrogenase 1 (ALDH1), que também são usados para isolar estas células (Yu et al., 2012). O *cluster* de diferenciação 44 ou CD44 é uma glicoproteína transmembrânica multiestrutural e multifuncional, que interage com proteínas da matriz extracelular (Baillie et al., 2017; Senbanjo

e Chellaiah, 2017). Está envolvido na regulação de diversas vias de sinalização vitais que modulam a proliferação, invasão, metástase e resistência a terapias antineoplásicas (Xu et al., 2020), além de seu papel na adesão e em vários processos biológicos como ativação de leucócitos, angiogênese e liberação de citocinas, bem como processos patológicos, incluindo metástase e transição epitélio-mesenquimal (TEM) (Hassn Mesrati et al., 2021). A molécula de adesão celular epitelial (EpCAM), *cluster* de diferenciação 326 (CD326) ou ainda antígeno de superfície epitelial (ESA) é uma glicoproteína transmembrânica expressa em epitélios saudáveis e superexpressa em células malignas oriundas da maioria dos carcinomas humanos, tanto em tumores primários quanto em metástases, principalmente as CTC (Went et al., 2003; Imrich et al., 2012; Barbato et al., 2019; Mohtar et al., 2020). O CD326 tem papel fundamental no crescimento e progressão dos tumores, pois está envolvido na modulação de processos, como proliferação, diferenciação, adesão migração e invasão celular e TEM (Imrich et al., 2012; Gires et al., 2020).

Mediante o exposto e uma vez que existem relativamente poucos estudos caracterizando as CTC em linhagens celulares de CCE da cavidade bucal ou de cabeça e pescoço, no presente trabalho, investigamos as propriedades proliferativas, o potencial clonogênico, a adesão e migração celular, a produção de proteínas associadas à TEM e da enzima responsável pela síntese endógena de ácidos graxos (FASN), assim como a sensibilidade a drogas antineoplásicas, nas linhagens celulares derivadas de CCE de língua SCC-9 ZsGreen e duas de suas subpopulações de CTC com diferentes padrões de expressão de CD44 e de CD326 (Cuadra Zelaya, 2019). Esta caracterização de CTC pode contribuir para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na progressão do CCE oral e, consequentemente, o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico e tratamentos mais eficazes.

# 2 REVISÃO DE LITERATURA

#### 2.1 Carcinoma de Células Escamosas (CCE) Oral

Câncer é um termo genérico usado para se referir a um grande grupo de doenças que podem ter origem em quase qualquer órgão ou tecido, nos quais as células passam a se multiplicar de forma desordenada, ultrapassam seus limites anatômicos habituais e invadem regiões adjacentes e/ou se espalham para outros órgãos, sendo este último processo denominado metástase (WHO, 2020).

O câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo, sendo responsável por quase 10 milhões de mortes somente no ano de 2020 (WHO, 2020). Segundo a GLOBOCAN (The Global Cancer Observatory), foram registrados 19.292.789 casos novos de câncer em 2020. O câncer oral, por sua vez, é o 16° colocado em incidência e mortalidade, com 377.713 novos casos e 177.757 mortes decorrentes da doença, dados também de 2020. No Brasil, de acordo com os dados da última estimativa do Instituo Nacional do Câncer (INCA) para 2020, seriam registrados 15.190 novos casos e 6.605 mortes por câncer oral. Entretanto, deve-se lembrar que o diagnóstico e o tratamento do câncer foram prejudicados pela pandemia da COVID-19. O fechamento de estabelecimentos de saúde resultou em atrasos no diagnóstico e no tratamento desta doença, que podem levar a uma queda de curto prazo na incidência de câncer, seguida por um aumento da doença em estágios avançados e, finalmente, maiores taxas de mortalidade. Esta consequência secundária da pandemia da COVID-19 levará vários anos para ser precisamente quantificada, devido ao atraso na disseminação dos dados de vigilância de base populacional (Siegel et al., 2020).

Carcinoma de células escamosas (CCE), carcinoma espinocelular, ou ainda carcinoma epidermóide são termos que se referem a neoplasias epiteliais malignas que acometem órgãos revestidos por epitélio do tipo escamoso (Yan et al., 2011). O CCE é a neoplasia maligna mais comum da cavidade oral (Hirota et al., 2003), representa de 90 a 95% dos casos (Panarese et al., 2018), tem uma taxa de sobrevida relativamente baixa e sua incidência está aumentando em algumas regiões do mundo (Almangush et al., 2020). O CCE acomete também vários outros sítios anatômicos do corpo humano, como pele, esôfago, trato urinário, próstata, pulmões, vagina e colo do útero, sendo, devido a esta variedade, é a neoplasia maligna mais comum capaz de disseminação metastática (Yan et al., 2011). A metástase, responsável por 90% das mortes relacionadas ao câncer, (Zeeshan e Mutahir, 2017), é um processo complexo de várias etapas por meio do qual as células tumorais deixam o tumor primário, migram para um local distante e o colonizam para iniciar seu crescimento e gerar um novo foco da doença (Nassar, 2016). Evidências crescentes sugerem que a metástase é iniciada por células tumorais especializadas que apresentam propriedades de células-tronco (Oskarsson et al., 2014).

#### 2.1.1 Etiologia

O risco para o CCE oral está fortemente ligado a fatores ambientais e genéticos, como tabagismo (com ou sem fumaça), consumo de álcool, predisposição genética, imunossupressão. infecções virais, principalmente em CCE de orofaringe, e exposição a raios ultravioleta, em CCE de lábio (Kumar et al., 2016). Por ser uma doença com múltiplas etiologias que interagem de maneiras diferentes, é difícil determinar o papel preciso de cada uma delas de forma independente (Reidy et al., 2011). Apesar do aspecto multifatorial da doença, o tabaco e álcool são os fatores com maior potencial carcinogênico (Kowalski et al., 2020). O tabagismo e o consumo de álcool parecem ter um efeito sinérgico (Koontongkaew, 2013) e, estão presentes em cerca de 90% dos casos (Dissanayaka et al., 2012).

O fumo de tabaco pode causar alterações no sistema imune, como a inflamação aumentada, desregulação da imunidade mediada por células T, respostas prejudicadas a patógenos e supressão de funções de células imunes antitumorais (Lee et al., 2012). Além da nicotina, outros produtos de tabaco queimados podem liberar uma mistura de mais de 7.000 substâncias químicas, das quais pelo menos 70 são carcinogênicas (Hecht 2012). Ademais, podem existir agentes carcinogênicos que ainda não foram totalmente identificados ou

caracterizados (Tomar et al., 2019). Além disto, o tabaco sem fumaça também aumenta o risco de câncer oral e o desenvolvimento de lesões potencialmente malignas (Muthukrishnan e Warnakulasuriya, 2018). O álcool age tanto como fator de risco local quanto sistêmico, aumentando a permeabilidade da mucosa oral por solubilizar componentes lipídicos do epitélio, causando atrofia epitelial, interferindo nos processos de síntese e reparo do DNA, diminuindo o fluxo salivar, afetando a capacidade do fígado de lidar com compostos tóxicos e/ou potencialmente carcinogênicos e comprometendo as imunidades inata e adquirida (Reidy et al., 2011).

Entre os outros fatores de risco para o CCE oral se destacam ainda as infecções virais como cofatores associados. Como as infecções por Epstein Barr, que embora não tenha papel direto na carcinogênese, está associado à imunodeficiência; citomegalovírus, papilomavírus humanos, principalmente HPV-16 e HPV-18; e o vírus herpes simples tipo 1 (Inchingolo et al., 2020).

O perfil mais comum para o paciente portador de CCE é o de um homem mais velho, de nível socioeconômico baixo (Markopoulos, 2012), fumante e etilista crônico (Chitapanarux et al., 2006). Entretanto, a tendência epidemiológica global está mudando, com um aumento generalizado da prevalência para o sexo feminino em relação ao masculino, atribuída principalmente às mudanças de hábitos relacionados ao consumo de tabaco e álcool e ao comportamento sexual (Kruse et al., 2011; Cook et al., 2014; Sarode et al., 2020).

#### 2.1.2 Apresentação clínica

A dor é um sintoma comum em CCE oral, mas geralmente surge apenas quando as lesões já atingiram grandes proporções, momento em que o paciente solicita assistência médica (Bagan et al., 2010). Assim, os carcinomas iniciais muitas vezes passam despercebidos por serem assintomáticos (Scully e Bagan, 2009). Em lesões tardias e maiores, os sintomas podem variar de leve desconforto a dor intensa, principalmente quando na língua, além de interferir na fala normal, mastigação ou deglutição (Neville e Day, 2002; Scully e Bagan, 2009; Bagan et al., 2010). O CCE oral pode assumir várias formas clínicas, assemelhar-se a leucoplasia, leucoplasia verrucosa, eritroleucoplasia ou eritroplasia, qualquer uma das quais pode eventualmente evoluir para uma úlcera de aspecto necrótico com bordas endurecidas irregulares e elevadas ou para uma massa exofítica de base ampla com uma textura superficial que pode ser verrucosa ou relativamente lisa (Feller e Lemmer, 2012). Outros sintomas incluem sangramento, mobilidade dos dentes, problemas na respiração, dificuldade na fala, disfagia, problemas no uso de prótese, trismo e parestesia (Haya-Fernández et al., 2004). Ocasionalmente, os pacientes podem apresentar linfadenopatia cervical, sem outros sintomas. Em estágios terminais, os pacientes podem desenvolver fístulas cutâneas, sangramento, anemia grave e caquexia (Milian et al., 1993).

#### 2.1.3 Características histopatológicas

O CCE oral é uma neoplasia maligna derivada do epitélio escamoso estratificado da mucosa oral (Tumuluri et al., 2002). Histologicamente, a lesão passa por várias fases até a formação de um tumor. A carcinogênese pode estar associada a lesões potencialmente malignas (Rivera e Venegas, 2014). No entanto, nem todas as lesões reacionais ou potencialmente malignas resultam no desenvolvimento subsequente de neoplasias malignas (Neville e Day, 2002). O CCE oral se origina como uma displasia epitelial e é caracterizado pela proliferação alterada de células escamosas displásicas na superfície da camada epitelial, que posteriormente degrada regiões da membrana basal subepitelial. A degradação da membrana basal resulta em invasão localizada e invasão à distância, pela emissão de metástases (Rivera e Venegas, 2014). A invasão pode começar como células isoladas, pequenos grupos ou pequenas ilhas epiteliais e, então, progredir para uma grande infiltração na submucosa ou tecido ósseo. O processo de invasão dá origem aos dois sinais clínicos mais clássicos do CCE oral e outros tumores: lesões endurecidas e fixas ao exame clínico. Ainda há um terceiro sinal clínico importante, a ulceração superficial do tumor, causada pela falta de suprimento sanguíneo e/ou trauma mecânico (Speight e Farthing, 2018). A capacidade de metástase está diretamente associada ao grau de diferenciação das células tumorais e à arquitetura tanto do tecido neoplásico como do epitélio normal adjacente (Sapp et al., 2004).

#### 2.1.4 Classificações dos CCE

O estadiamento e a gradação do CCE oral são pré-requisitos já muito bem estabelecidos para o seu manejo clínico, pois influenciam a estratificação de risco e representam o primeiro passo para um tratamento personalizado (Almangush et al., 2020). A classificação de Tumores Malignos – TNM, 8ª edição, publicada pela União Internacional contra o Câncer (UICC), utiliza, para descrever a extensão anatômica da doença, três componentes: "T" descreve a extensão do tumor primário, "N" refere-se à ausência ou presença de metástases em linfonodo(s) regional(is) e "M" representa a ausência ou presença de metástases à distância. A adição de números a estes três componentes indica a extensão da doença, utilizando-se desta forma T0, T1, T2, T3, T4; N0, N1, N2, N3 e M0, M1 (Huang e O'Sullivan, 2017). Essa classificação é importante para o planejamento do tratamento, estimativa do risco de recorrência e avaliação da sobrevida geral. Entretanto, essa classificação considera apenas a extensão anatômica da doença e não os demais fatores prognósticos, como comorbidade ou tratamento (Patel e Lydiatt, 2008)

A gradação histológica dos tumores sugerida pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2017) baseia-se na diferenciação citológica das células tumorais e no número de mitoses. Utiliza-se de três graus descritivos de diferenciação: bem diferenciado (grau 1), moderadamente diferenciado (grau 2) e pouco diferenciado (grau 3), entretanto, este modelo ignora fatores como padrão de crescimento tumoral e reações estromais e relação tumor-estroma, tem pouco valor para o prognóstico (Almangush et al., 2020).

Há ainda outra classificação conhecida como Budding and Depth of Invasion (BD) (Almangush et al., 2015), que tem como base a profundidade de invasão e a presença de ninhos de células tumorais no fronte do tumor. Células individuais ou pequenos grupos de células parecem indicar prognóstico ruim devido à sua maior capacidade de invasão (Longo et al., 2021).

#### 2.1.5 Características moleculares

Existem processos fundamentais, conhecidos como "hallmarks do câncer", envolvidos na manutenção de qualquer malignidade, que incluem autossuficiência em sinais estimuladores de crescimento, insensibilidade para fatores supressores de crescimento, invasão de outros tecidos e capacidade de metastatizar, potencial ilimitado de replicação, indução a angiogênese, bloqueio dos mecanismos naturais de morte celular, desregulação energética, escape a resposta imune, inflamação como promotor tumoral, instabilidade genômica e mutação, desbloqueio de plasticidade fenotípica, reprogramação epigenética não mutacional, microbiomas polimórficos e senescência celular (Hanahan e Weinberg, 2000; Hanahan e Weinberg, 2011; Hanahan, 2022).

O CCE oral é uma doença heterogênea e complexa que surge devido à disfunção de múltiplas vias de sinalização molecular (Hsu et al., 2020). Oncogenes e genes supressores de tumor constituem os genes reguladores do crescimento celular. Qualquer alteração ou expressão inadequada desses genes pode induzir à neoplasia (Sugerman et al., 1995). As vias de sinalização celular não são isoladas umas das outras, mas interconectadas formando redes de sinalização complexas (Jain e Hamid, 2020). Os oncogenes podem ser classificados de acordo com os papéis de suas contrapartes normais (protooncogenes) nas vias bioquímicas que regulam o crescimento e a diferenciação, incluindo fatores de crescimento (TGF, FGF, PDGF), receptores de superfície celular (EGFR, FGFR), vias de transdução de sinal intracelular (RAS), fatores de transcrição (Myc, Fos, Jun), proteínas do ciclo celular (ciclinas e proteínas quinases dependentes de ciclina) e inibidores de apoptose (Bcl-2) (Jain e Hamid, 2020). Algumas funções dos oncogenes na carcinogênese estão exemplificados abaixo.

O TGF- $\beta$  (fator de crescimento transformante beta) pode funcionar tanto como supressor de tumor quanto como promotor de tumor (Cui et al., 1996; Akhurst e Derynck, 2001; Inman, 2011; Wendt et al., 2012). Em tecidos saudáveis e em muitos tumores em estágio inicial, o TGF- $\beta$  é um importante regulador do crescimento. No entanto, em tumores avançados, as vias de sinalização do TGF- $\beta$  estão severamente desreguladas e, em vez de inibir a tumorigênese, o TGF- $\beta$  promove o crescimento e progressão tumoral (Akhurst e Derynck, 2001; Pasche, 2001; Langenskiöld et al., 2008; Massagué, 2008; Padua e Massagué, 2009; Inman, 2011; Zhao et al., 2012). Esse paradoxo se reflete na clínica, onde, em cânceres em estágio inicial, os níveis de TGF- $\beta$  estão positivamente associados a um prognóstico favorável. No entanto, em tumores avançados, altos níveis de TGF- $\beta$  no microambiente tumoral estão associados a um prognóstico desfavorável e a predição de recorrência após terapia inicial ou falha terapêutica (Shariat et al., 2001; Langenskiöld et al., 2008; Padua e Massagué, 2009; Zhao et al., 2012; Principe et al., 2014).

O receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) exerce funções críticas na fisiologia das células epiteliais (Schlessinger, 2014). É frequentemente mutado e/ou superexpresso em diferentes tipos de CCE, sendo alvo de múltiplas terapias (Yarden e Pines, 2012). As funções mais bem caracterizadas do EGFR estão no contexto da ativação dependente de ligante e quinase, ou seja, a via de sinalização EGFR 'canônica' (Lemmon e Schlessinger, 2010). No entanto, existem funções, tanto dependentes quanto independentes de quinase, que atuam na regulação da autofagia e do metabolismo (Tan et al., 2016). Essas funções "não canônicas" são geralmente induzidas por estresses celulares e ambientais. Estas vias de estresse são ativadas em células malignas, fornecendo a elas uma vantagem de sobrevivência e resistência à terapia (Jutten et al., 2013; Tan et al., 2016).

RAS é um dos oncogenes mais frequentemente alterados geneticamente e, quando desregulada, pode ativar as duas principais vias de sinalização, PI3K/Akt e MAPK, que levam à proliferação e sobrevivência celular (Murugan et al., 2012).

As quinases dependentes de ciclina (CDK) e seus parceiros regulatórios coordenam a progressão do ciclo celular. Células malignas geralmente dependem da sinalização de CDK aumentada, que impede a função dos reguladores do ciclo celular, como os inibidores de quinases dependentes de ciclina (CDKIs), levando ao aumento das taxas do ciclo celular, proliferação celular, bem como instabilidade genômica e cromossômica (Galeta et al., 2016).

Quando há alteração ou desequilíbrio na proporção de distribuição de proteínas pró e anti-apoptóticas, resultando na superexpressão de membros da

família Bcl-2 anti-apoptóticas, a morte celular apoptótica é inibida (Coutinho-Camillo et al., 2016). A expressão de Bcl-2 é regulada positivamente no CCE oral (Arya et al., 2016). O aumento da expressão de Bcl-2 não é essencial apenas para iniciar o CCE oral (Kannan et al., 1998; Loro et al., 2002), mas também parece influenciar a progressão da doença, pois aumenta a taxa de sobrevivência das células neoplásicas, permitindo que novas mutações genéticas ocorram, conferindo-lhes maior resistência à quimioterapia e radioterapia (de Sousa et al., 2009).

É importante ressaltar aqui que os oncogenes não são suficientes para promover a transformação maligna no CCE oral e parecem ser apenas os iniciadores do processo. A inativação de genes supressores de tumor também é um evento importante que leva ao desenvolvimento de malignidades. Este mecanismo de inativação pode ser devido a mutações pontuais, deleções, hipermetilação e rearranjos cromossômicos (Jain e Hamid, 2020). O gene que codifica a proteína p53 é um importante supressor tumoral e regulador de várias vias de sinalização importantes envolvidas no processo de carcinogênese (Rivlin et al., 2011; Riaz et al., 2014). A proteína p53 induz respostas celulares adaptativas e protetoras por meio da ativação da transcrição de genes cuja atividade previne a proliferação de células danificadas geneticamente, indução de parada do ciclo celular seguida de reparo de DNA ou morte por apoptose, caso o dano não seja reparável, preservando assim a integridade do genoma (Partridge et al., 2007). A superexpressão de formas da proteína p53 aberrante é freqüentemente observada em CCE orais, como resultado de mutação pontual ou deleção em sua sequência gênica (Ragos et al., 2018). O gene que codifica p53 foi encontrado mutado em alta porcentagem de casos de CCE oral (aproximadamente 70%) (Singh et al., 2016), mutações estas associadas à redução da sobrevida nestes pacientes (Ragos et al., 2018).

Embora venham sendo estudados e estejam muito presentes no CCE oral, ainda não existe um marcador molecular ou combinação de marcadores moleculares para estes tumores. Além disto, não há comprovação de relação direta entre a presença destes marcadores com a progressão tumoral e prognóstico. Portanto, até o momento nenhum marcador pode ser recomendado para ser utilizado na clínica (Gupta et al., 2016; Almangush et al., 2017).

25

#### 2.1.6 Tratamento

O objetivo principal do tratamento é erradicar o CCE, prevenir sua recorrência e, na medida do possível, restaurar a forma e a função das partes afetadas (Feller e Lemmer, 2012). O tratamento do CCE oral geralmente reguer os serviços de uma equipe multidisciplinar (Lorch et al., 2009; Shah e Gil, 2009). A maioria dos CCE orais em estágios inicial ou tardio é tratada cirurgicamente com margens livres de 1 a 2 cm (Chi et al., 2015). A cirurgia é o tratamento de primeira linha para CCE orais pequenos e acessíveis. Entretanto, em estágios mais avançados, geralmente o tratamento é combinado, com a cirurgia como modalidade primária e radioterapia ou quimioterapia como adjuvantes (Shah e Gil, 2009; Braakhuis et al., 2010; Chi et al., 2015). A linfadenectomia cervical, por sua vez, é normalmente realizada guando a invasão e colonização linfonodal é evidente ou quando há um risco elevado de metástase regional oculta (Chi et al., 2015). A quimioterapia padrão de tratamento para CCE orais metastáticos tem sido realizada por meio de regimes contendo cisplatina ou carboplatina. Esses medicamentos têm atividade como agentes únicos, mas são mais comumente usados em combinação com outras drogas quimioterápicas, como 5-fluorouracil, docetaxel, paclitaxel e cetuximabe (Hartner, 2017).

#### 2.2 Células-Tronco do Câncer (CTC)

As células-tronco do câncer (CTC) ou células-tronco tumorais (CTT), também conhecidas como células iniciadoras de tumor (CIT), foram identificadas pela primeira vez na leucemia mieloide aguda no final do século passado (Lapidot et al., 1994) e estão sendo a cada ano que passa mais estudadas em vários tipos de tumores sólidos humanos (Ailles e Weissman, 2007). Reya e colaboradores introduziram o termo "célula-tronco do câncer" pela primeira vez em 2001, como constituintes de pequenos subconjuntos de células neoplásicas capazes de iniciar um tumor (tumorigênese), manter a população de células tumorigênicas (autorrenovação) e também de manter a heterogeneidade das células que formam o tumor (pluripotência) (Abbaszadegan et al., 2017). Pela capacidade a elas atribuída de iniciar os tumores, podem ser consideradas de maneira análoga a "sementes" do câncer (Liu et al, 2020).

As CTC recebem esse nome pois, em alguns aspectos, são semelhantes as células-tronco residentes em tecidos normais (Shackleton, 2010). Uma célulatronco de um tecido normal deve possuir duas habilidades para desempenhar sua função natural: autorrenovação e diferenciação. A autorrenovação vem do potencial de, em uma divisão celular, uma célula-tronco gerar outra célula-tronco com o mesmo potencial de desenvolvimento e replicação, permitindo a manutenção de um conjunto de células indiferenciadas específicas no órgão ou tecido. A diferenciação, neste caso, é a produção de células filhas que se tornam células específicas do tecido em que as células-tronco residem (Lobo et al., 2007). Além disto, as células-tronco parecem possuir refinado controle homeostático, ou seja, capacidade de modular e equilibrar a diferenciação e a autorrenovação de acordo com estímulos ambientais e restrições genéticas (Dalerba et al., 2007).

A hipótese das CTC é compatível com os vários estágios da carcinogênese oral, incluindo iniciação, progressão, modulação do microambiente e, finalmente, metástase (Swain et al., 2020). Desta forma, podese considerar que as neoplasias malignas não são simples expansões monoclonais de células em rápida e descontrolada divisão, mas sim relativamente semelhantes a "órgãos anormais", sustentados por uma população doente de células-tronco (CTC), com as capacidades de autorrenovação e diferenciação aberrantes (Reya et al., 2001).

Diferentes modelos têm sido propostos para explicar como uma neoplasia de natureza maligna já estabelecida se propaga. Os mais clássicos incluem o modelo da evolução clonal ou estocástico, o modelo das CTC e o modelo de interconversão (Shackleton, 2010). O modelo da evolução clonal propõe que maioria das neoplasias se origina de uma única célula e que a progressão tumoral é resultante da seleção de uma subpopulação mais agressiva, dentro do clone de origem (Nowell, 1976). De acordo com o modelo das CTC, apenas um subconjunto específico da população de células malignas (CTC de vida longa) é capaz de sustentar o crescimento tumoral *in vivo*, diferente de todos os outros subconjuntos (células tumorais mais diferenciadas de vida curta). Três observações parecem definir a existência das populações de CTC: 1. apenas um a minoria de células malignas dentro de cada tumor é dotada de potencial

tumorigênico, quando transplantadas para camundongos imunodeficientes, 2. as células malignas tumorigênicas são caracterizadas por um perfil distinto de marcadores de superfície e podem ser isoladas de forma diferencial e reprodutível das populações não tumorigênicas por meio de citometria de fluxo ou outros procedimentos de imunosseleção e 3. os tumores cultivados a partir de células tumorigênicas isoladas contêm populações mistas de células malignas (tumorigênicas e não tumorigênicas), recriando assim toda a heterogeneidade fenotípica do tumor original (Dalerba et al., 2007). Por fim, o modelo de interconversão, que foi proposto para explicar as diferenças entre as células no modelo CTC, supõe que as células podem se interconverter entre estados ativamente malignos e relativamente quiescentes, o que pode estar associado a diferenças fenotípicas entre as células (Gupta et al., 2009).

#### 2.2.1 Origem das CTC

Existem hoje algumas hipóteses que tentam explicar a possível origem das CTC. Elas podem surgir por mutações em células-tronco e/ou células diferenciadas, por meio de fusão entre células, por transferência horizontal de genes ou ainda como consequência da reprogramação metabólica (Nimmakayala et al., 2018; Atashzar et al., 2019). Acredita-se que alterações intrínsecas e extrínsecas ao microambiente tumoral das células-tronco, juntamente com mutações e regulações epigenéticas, são os principais responsáveis pelo desenvolvimento de CTC (Bao et al., 2013).

Além do conhecimento científico em processo de solidificação de que as CTC são importantes para a iniciação e manutenção tumoral, ainda não é possível dizer se as neoplasias malignas se originam a partir de células-tronco que acumularam mutações genéticas que favorecem o fenótipo maligno ou se células já com características de malignidade frente a algum estímulo se desdiferenciam e adquirem fenótipos semelhantes aos das células-tronco (Croker e Allan, 2008).

#### 2.2.2 CTC, Transição Epitélio-Mesenquimal (TEM) e Metástase

Um dos processos mais importantes associados com a heterogeneidade e a origem das neoplasias malignas é a chamada transição epitélio-mesenquimal (TEM), que corresponde a um processo pelo qual uma célula de natureza epitelial perde a adesão com suas células vizinhas e adota uma morfologia mesenquimal, o que permite que ela migre por longas distâncias em meio ao tecido conjuntivo que forma o estroma tumoral (Nassar e Blanpain, 2016).

A marca registrada da TEM é a regulação positiva da proteína N-caderina, seguida pela regulação negativa de E-caderina, sendo este processo controlado por uma rede complexa de vias de sinalização e fatores de transcrição (Loh et al., 2015). Os fatores de transcrição indutores de TEM podem ser classificados com base em sua capacidade de inibir a expressão de E-caderina, direta ou indiretamente. Dentre os repressores diretos de E-caderina conhecidos até o momento incluem-se proteínas da superfamília SNAIL, como SNAI1 (SNAIL), SNAI2 (SLUG) e SNAI3 (SMUC), proteínas da família ZEB, como ZEB1 (TCF8) e ZEB2 (SIP1) e os fatores de transcrição bHLH E47 e KLF8 (Kruppel Like Factor 8). Fatores de transcrição da família TWIST, como as proteínas TWIST (TWIST1 e TWIST2), as proteínas GSC e SIX1, o fator bHLH E2-2 e a proteína FOXC2 reprimem indiretamente a transcrição da E-caderina (Puisieux et al., 2014). A vimentina, que é expressa por células mesenquimais normais, também foi reconhecida como um marcador para a TEM. A expressão aumentada de vimentina já foi descrita em vários cânceres de natureza epitelial e, embora a TEM esteja associada a vários eventos tumorigênicos, o papel particular da vimentina nos eventos subjacentes que regem estes processos permanecem desconhecidos (Satelli e Li, 2011).

A superexpressão de fatores de transcrição indutores de TEM não apenas reforça o estabelecimento ou aquisição de um fenótipo mesenquimal de caráter migratório, como também parece exacerbar o potencial de iniciação tumoral das linhagens celulares (Batlle e Clevers, 2017). Evidências experimentais sugerem que a TEM, além de desempenhar um papel fundamental no processo de metástase de tumores humanos, está intimamente relacionada à função das CTC (Mani etal., 2008; Thiery et al., 2009; Babaei et al., 2020).

Entretanto comprovar a necessidade da TEM para metástases *in vivo* tem sido tecnicamente desafiador e esforços recentes para evidenciar a contribuição funcional da TEM para metástases produziram resultados inesperados (Mittal, 2018), como achados clínicos que mostram que metástases a distância exibem um fenótipo epitelial (Chaffer et al., 2005; Tarin et al., 2005; Thompson et al., 2005; Chaffer et al., 2007; Prudkin et al., 2009; Yates, 2011). Tais observações levantaram a possibilidade de que as células tumorais possam se disseminar como células epiteliais e colonizar órgãos distantes sem sofrer TEM (Mittal, 2018). Para explicar essa incongruência, argumenta-se que as células tumorais migratórias, após passarem pela TEM, formam as metástases em órgãos distantes, e depois podem recuperar suas características epiteliais pelo processo inverso, denominado de transição mesenquimo-epitelial ou TME (Kuşoğlu e Biray Avcı, 2019).

A TEM pode ser ainda parte de um *status* celular de alta plasticidade que, além das características migratórias descritas, permite que as células escapem da quimioterapia, se adaptem, pelo menos em parte, à hipóxia e outros desafios inerentes ao microambiente tumoral (Chaffer et al., 2016).

#### 2.2.3 Metabolismo das CTC

Em células somáticas, as mitocôndrias representam a principal fonte de produção de energia por meio do ciclo do ácido tricarboxílico em associação à fosforilação oxidativa (OXPHOS). Várias fontes de carbono, como piruvato, glutamina e ácidos graxos, podem alimentar o ciclo do ácido tricarboxílico para produzir equivalentes redutores (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato - NADH; flavina adenina dinucleotídeo - FADH2) que são posteriormente usados como doadores de elétrons para a cadeia transportadora de elétrons. O transporte de elétrons pelos diferentes complexos desta cadeia gera uma força próton-motriz, a qual é utilizada pela enzima ATP sintase (complexo V) para gerar energia na forma de ATP (Chandel, 2015).

As células malignas, no entanto, são caracterizadas por altas taxas de proliferação e, portanto, precisam adaptar seu metabolismo celular para fornecer suporte constante para a divisão celular, gerando ATP de maneira rápida e

sustentada para manter o estado energético, o aumento da biossíntese de macromoléculas e uma regulação rígida do estado redox celular (Vander Heiden et al., 2009). Células com fenótipo maligno também evitam os controles de checkpoint que, sob condições fisiológicas, inibem a proliferação em condições metabólicas desafiadoras comumente encontradas no microambiente tumoral. Para atender a todas estas necessidades biológicas, ocorre uma reprogramação da maquinaria metabólica durante o crescimento do tumor e frente aos desafios encontrados durante o processo metastático (Sancho et al., 2016). As células tumorais passam a produção de ATP que era via OXPHOS para um processo de glicólise, mesmo ainda possuindo concentrações de oxigênio suficientes no microambiente tumoral, o que recebe o nome de efeito Warburg (Warburg, 1956). Como resultado, grande parte das células transformadas obtêm uma quantidade substancial de sua energia por meio da glicólise aeróbica, que é mais rápida do que a OXPHOS, porém menos eficiente em termos de quantidade de ATP gerado por unidade de glicose consumida, resultando em uma taxa anormalmente alta de absorção de glicose. Nestas circunstâncias, a glicose também é metabolizada através da via das pentoses fosfato (PPP) e outras vias alternativas (Vander Heiden et al, 2009), que produzem grandes quantidades de NADPH reduzido e outras macromoléculas para gerar os blocos de construção necessários para sustentar as altas taxas de divisão celular (Sancho et al., 2016). As características metabólicas das CTC são heterogêneas. Ao contrário das células tumorais não CTC (maior parte da massa celular que compões os tumores sólidos, chamadas de bulk tumoral), que utilizam principalmente a glicólise, as CTC podem exibir fenótipos metabólicos glicolíticos ou fenótipos predominantemente dependentes de OXPHOS (Hammoudi et al., 2011; Emmink et al., 2013). Enquanto alguns estudos relatam que as CTC utilizam preferencialmente a glicólise, outros trabalhos mostram que elas também podem contar com a OXPHOS (Ciavardelli et al., 2014; Pastò et al., 2014). Estas células conseguem reprogramar seu metabolismo, no sentido do favorecimento da glicólise ou do metabolismo oxidativo, para se adaptarem às mudanças ambientais, o que é considerado crucial para aumentar a capacidade compensatória antioxidante e sustentar o processo de autorrenovação (Al-Hajj et al., 2003; Yasumoto et al., 2016). Os mecanismos biológicos que modulam esta plasticidade metabólica não são conhecidos na atualidade e algumas

evidências experimentais indicam que ela está intimamente relacionada ao microambiente tumoral (Sancho et al., 2016).

Além disto, um crescente número de dados da literatura apoia a visão de que alterações no metabolismo lipídico, incluindo um aumento na captação de ácidos graxos, lipogênese de novo, formação de gotículas lipídicas e oxidação mitocondrial de ácidos graxos estão envolvidas na regulação das funções das CTC (Liu et al., 2022). A ácido graxo sintase (FASN), proteína multienzimática que funciona como um regulador central do metabolismo lipídico, está envolvida na síntese de ácidos graxos pela conversão de malonil-CoA e acetil-CoA em palmitato e tem sua atividade frequentemente aumentada nas CTC (Wakil, 1989; Menendez e Lupu, 2007; Yadav et al., 2020). Tais cadeias de ácidos graxos alongadas são componentes estruturais das membranas e sua síntese de novo é altamente ativada em células tumorais em comparação com tecidos normais (Kuhajda, 2000; Mashima et al., 2009; Yadav et al., 2020). Há relatos que apoiam o aumento da atividade e expressão da FASN em vários cânceres humanos, como de mama (Jensen et al., 1995; Alo et al., 1996), ovário (Gansler et al., 1997), câncer de próstata (Epstein et al., 1995; Shurbaji et al., 1996), oral (Krontiras et al., 1999; Agostini et al., 2004), colorretal (Rashid et al., 1997), endometrial (Pizer et al., 1998), renal (Horiguchi et al., 2008) e retinoblastoma (Camassei et al., 2003; Vandhana et al., 2011). Um estudo ainda demonstrou que uma dieta rica em lipídeos aumenta especificamente o potencial metastático de células que expressam altos níveis do receptor de ácidos graxos CD36, e o bloqueio deste receptor inibe as metástases, quase completamente, em modelo ortotópico de CCE oral. Estes resultados indicam que as CTC dependem particularmente dos lipídeos da dieta para promover a metástase. (Pascual et al., 2017).

#### 2.2.4 Isolamento, identificação e caracterização das CTC

Considerando o envolvimento das CTC na recidiva tumoral e na resistência aos tratamentos radioterápicos e quimioterápicos hoje disponíveis, a identificação destas subpopulações celulares em neoplasias malignas se torna imperativa para o desenvolvimento de terapias que, de maneira eficaz, eliminem

o tumor e previna suas recidivas locais e metástases regionais ou para órgãos distantes (Moghbeli et al., 2014). No entanto, obter uma precisa definição dos perfis moleculares completos e específicos das CTC existentes nos mais variados tipos de câncer tem sido uma grande barreira, decorrente principalmente das dificuldades inerentes ao isolamento de populações puras de CTC e indisponibilidade de métodos totalmente confiáveis para a caracterização destas (Jariyal et al., 2019).

O primeiro estudo experimental que realizou o isolamento de CTC foi o de Bonnet e Dick (1997), no qual os autores isolaram uma subpopulação CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> a partir de células de leucemia mieloide aguda, a qual tinha habilidade de iniciar e reproduzir a doença camundongos imunodeficientes, diferentemente das células CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> e CD34. Alguns anos depois deste trabalho pioneiro, Al-Hajj e colaboradores identificaram e isolaram CTC a partir de amostras de câncer de mama, utilizando como marcadores as moléculas CD44 e CD24 (Al-Hajj et al., 2003).

A separação das CTC das outras populações de células malignas é geralmente realizada por citometria de fluxo, por meio de ensaios conhecidos como de "side population", pela avaliação da atividade da enzima aldeído desidrogenase (ALDH) e pela capacidade de crescimento como esferas flutuantes em meio de cultura sem a adição de componentes do soro. A caracterização fenotípica tem sido feita por meio da avaliação da expressão de marcadores específicos para células-tronco, para fatores de transcrição e outros marcadores de superfície supostamente específicos, além da verificação da quimiorresistência, da multipotência e da tumorigenicidade (Tirino et al., 2013; Moghbeli et al., 2014; Jariyal et al., 2019; Abbaszadegan et al., 2017). Como pode ser observado pelo descrito acima, marcadores moleculares de superfície celular são importantes para identificar, caracterizar e isolar as CTC. Entretanto, a literatura tem mostrado que marcadores universais parecem não existir para esta finalidade, sendo diversas moléculas utilizadas, de forma individual ou em combinação. A presença de marcadores de CTC está na dependência do tipo de tumor de origem, das linhagens celulares analisadas e também do tempo de cultivo em laboratório (Tirino et al., 2013). Os biomarcadores de CTC mais utilizados, até o presente momento, parecem ser CD44, CD133 e CD326 (Han et al., 2020).

#### 2.2.5 CTC no CCE oral

Vários tecidos compartilham com o sangue a necessidade de renovação contínua ou cíclica. Dentre eles estão a pele e todos os principais epitélios do trato gastrointestinal (boca, faringe, esôfago, estômago e intestino), os epitélios respiratórios (laringe, traqueia, brônquios e pulmões) e os epitélios dos sistemas reprodutor e geniturinário (mama, ovário, vagina, útero, bexiga e próstata) (Dalerba et al., 2007). Pesquisas realizadas com diversos tipos de câncer, incluindo os CCE orais, conseguiram identificar CTC usando marcadores moleculares. Como até o momento parece não existir um marcador específico ou único para identificar de maneira definitiva populações de CTC, aliado ao fato de que existem vários subtipos fenotipicamente distintos de CTC dentro dos CCE orais e de outras neoplasias malignas, a procura por estas células depende da aplicação combinada de vários marcadores (Baillie et al., 2017).

NANOG, OCT4 e SOX2 parecem ser os principais marcadores de célulastronco embrionárias e têm sido relacionados com o processo de iniciação do CCE oral, por terem sua expressão aumentada em distúrbios orais potencialmente malignos e também CCE da cavidade oral (Swain et al., 2020). Além disto, poucos estudos observacionais com tecidos de origem humana relatam a expressão destas três moléculas nas células da mucosa oral morfologicamente normal (Fu et al., 2016; Baillie et al., 2017; Swain et al., 2020). Outro marcador de células-tronco embrionárias, o STAT3, desempenha um papel crítico em células pluripotentes por promover a proliferação celular e a resistência à morte por apoptose, induzir a angiogênese, a invasão e a migração celular. Em CCE orais, a expressão de STAT3 parece ocorrer dentro de uma subpopulação de células arranjada em ninhos que também produzem CD44, NANOG e SOX2 (Baillie et al., 2016; Baillie et al., 2017; Timofeeva et al., 2020). Dentre os marcadores de superfície para CTC, c-MET, Musashi-1, ALDH1 e os clusters de diferenciação (CD) CD44, CD326 (ou EpCAM), CD24, CD133, CD117, CD24 e CD147 são os principais estudados no CCE oral. Outros

marcadores de células-tronco, como Bmi1, Klf4, LGR5, RAS (do sistema reninaangiotensina) também estão sendo estudados neste tipo de carcinoma (Patel et al., 2014; Baillie et al., 2017; Varun et al., 2019; Tahmasebi et al., 2020).

#### 2.2.6 CD44

O CD44 é uma proteína expressa tanto em neoplasias malignas sólidas quanto nas de origem hematológica (Walcher et al., 2020). Foi descrito pela primeira vez como um marcador de CTC no câncer de mama (Al-Hajj et al., 2003) e foi também o primeiro marcador para CTC identificado em CCE orais e de cabeça e pescoço (Prince et al., 2007). Consiste numa glicoproteína transmembrânica multiestrutural e multifuncional, que interage com proteínas da matriz extracelular e tem como principal ligante o ácido hialurônico (Baillie et al., 2017; Senbanjo e Chellaiah, 2017; Hassn Mesrati et al., 2021).

O gene que codifica CD44 está mapeado no *locus* cromossômico 11p13 (Goodfellow et al., 1982) e é formado por 20 éxons divididos em dois grupos: éxons constantes, de 1 a 5 e de 16 a 20 e éxons variáveis, de 6 a 15. A combinação destes éxons por splicing alternativo gera isoformas distintas em função e estrutura, sendo a menor e ao mesmo tempo mais expressa a chamada isoforma padrão CD44 (CD44s – "standard"), que contém os dez éxons constantes e não possui nenhum dos éxons variáveis. As isoformas variáveis de CD44 (CD44v) diferem de CD44s pela inserção ou remoção de éxons entre os éxons 5 e 16 (Loh et al., 2015; Senbanjo e Chellaiah, 2017; Hassn Mesrati et al., 2021). CD44s é expressa pela maioria das células dos vertebrados, enguanto as isoformas CD44v são produzidas apenas em condições específicas (Yan et al., 2015). As células dos CCE frequentemente expressam diversas isoformas variantes de CD44, particularmente quando em estágio avançado (Yan et al., 2015). As células tumorais que expressam CD44 podem aderir à matriz extracelular por meio de seus ligantes, como ácido hialurônico, sulfato de condroitina, fibronectina, laminina, como as lamininas 10 e 11, e colágeno, incluindo o colágeno IV e o colágeno XIV (Sneath e Mangham, 1998; Turley e Naor, 2012; Petreaca e Martins-Green, 2013), desempenhando um papel fundamental na comunicação com o microambiente (Yan et al., 2015). Por ser

uma proteína envolvida no processo de adesão celular, CD44 pode atuar nas interações célula-célula e célula-matriz extracelular, motilidade, migração, diferenciação, sinalização celular e também regulação da transcrição gênica (Mishra et al., 2019ca). As células que superexpressam CD44 possuem características de CTC, como autorrenovação e TEM, bem como resistência à quimioterapia e radioterapia (Senbanjo e Chellaiah, 2017; Mishra et al., 2019).

#### 2.2.7 CD326 (EpCAM ou ESA)

A molécula de adesão celular epitelial (EpCAM), CD326 ou ainda antígeno de superfície epitelial (ESA) é uma glicoproteína transmembrânica expressa pela maioria dos carcinomas humanos (Went et al., 2003; Barbato et al., 2019), mas também pelas células epiteliais morfologicamente normais, com exceção do epitélio escamoso, dos hepatócitos e dos queratinócitos (Patel et al., 2014). Este foi o primeiro antígeno associado a uma neoplasia maligana humana, quando detectado em células de carcinoma colorretal por meio de anticorpos monoclonais, então chamado de antígeno 17-1A (Herlyn et al., 1979). O gene que codifica o CD326 humano está localizado no braço curto do cromossomo 2, na região 2, na banda 1 (2p21) e é composto por 9 éxons (Gires et al., 2020).

Em células normais, CD326 está presente nos espaços intercelulares e, portanto, menos acessível aos anticorpos do que o CD326 produzido pelos tecidos tumorais, homogeneamente distribuído nas superfícies celulares (Munz et al., 2009). Este biomarcador tem sido usado para o isolamento de CTC em amostras de pacientes com carcinomas colorretal, de pulmão, de próstata, de mama e de colo do útero (Jariyal et al., 2019). Com relação ao CCE de cabeça e pescoço, o aumento da expressão de CD326 já foi observado tanto em hiperplasias epiteliais sem displasia quanto em tumores propriamente ditos, sugerindo sua possível participação no processo de carcinogênese (van der Gun et al., 2010). A associação entre este marcador e características clínicopatológicas dos CCE orais é ainda nebulosa. Um estudo específico sobre CCE de língua sugeriu uma relação direta entre a expressão de CD326 e a presença de metástases linfonodais, entretanto, trabalhos mais recentes com CCE orais
indicaram uma associação entre diminuição da sua expressão com tumores de maior tamanho e presença de metástases linfonodais (Patel et al., 2014). O CD326, portanto, poderá ser considerado, após estudos mais abrangentes e detalhados, como um potencial indicador prognóstico e candidato para abordagens de imunoterapia em pacientes portadores de CCE orais (Tahmasebi et al., 2020).

## 2.2.8 CTC e sua relação com o tratamento para o CCE oral

As recidivas dos tumores primários e as metástases regionais ou a distância após o tratamento hoje realizado continuam sendo os principais problemas clínicos no manejo e controle do CCE oral. Evidências experimentais bastante recentes têm sugerido que os fenômenos de resistência terapêutica e de disseminação metastática são dependentes da presença das CTC (Shahoumi, 2021). Por esta razão, novas estratégias terapêuticas direcionadas para a eliminação destas células estão sendo estudadas em laboratórios de todo o mundo para, no futuro, serem utilizadas, em combinação com as terapias convencionais, para prevenir a recidiva, evitar a formação de metástases e combater a quimio e radiorresistência (Shahoumi, 2021). A cirurgia associada a radioterapia e a quimioterapia é o principal tratamento para os CCE orais e capaz de reduzir significativamente o tamanho total do tumor (Baillie et al., 2017). Entretanto, as CTC, em tese resistentes à radioterapia e aos agentes quimioterápicos como cisplatina, carboplatina, doxetaxel, paclitaxel, etoposídeo, gencitabina e 5-fluorouracil (Okamoto et al., 2008; Zhang et al., 2009; Song et al., 2010; Yanamoto et al., 2011; Noto et al., 2013; Nör et al., 2014; Han et al., 2014), são enriquecidas numericamente dentro da população total de células malignas durante e após o tratamento, o que pode explicar, pelo menos em parte, as frequentes recorrências loco-regionais e metástases na presença de tratamentos tão agressivos (Baillie et al., 2017). Assim, o conhecimento detalhado do conceito das CTC inspira o desenvolvimento de estratégias de tratamento inovadoras para tumores recidivantes ou não, visando diminuir o volume da massa tumoral e ao mesmo tempo exterminar as CTC (Batlle e Clevers, 2017).

Algumas características biológicas peculiares das CTC, apesar de complexas e não completamente conhecidas até o presente momento, podem ser futuros alvos para terapias específicas contra o câncer. Para isto, é necessário um profundo conhecimento sobre a heterogeneidade metabólica que ocorre dentro dos tumores, dos diversos microambientes tumorais e dos nichos das CTC (Huang et al., 2021). O aparente aumento da dependência do metabolismo lipídico em CTC derivadas de alguns tipos de neoplasias malignas, como gliomas, carcinoma hepatocelular e câncer de mama (Vlashi et al., 2011; Bartesaghi et al., 2015; Chen et al., 2016; Wang et al., 2018), torna este último um alvo promissor na tentativa de eliminá-las (Yi et al., 2018). O aumento da síntese endógena de lipídeos tem sido bem descrito nas células que compõe a massa tumoral (bulk) em diversas neoplasias malignas humanas, inclusive o CCE oral. A enzima anabólica ácido graxo sintase (FASN) é superexpressa em vários cânceres humanos e sua inibição farmacológica ou knockdown reduz a proliferação das células malignas, induz à morte por apoptose e é capaz de diminuir o tamanho de xenoenxertos de CCE orais (Agostini et al., 2014). A inibição da FASN com orlistat diminui o número de linfonodos cervicais metastáticos em modelo ortotópico de CCE de língua oral (Agostini et al., 2014). Nosso grupo de pesquisa demonstrou recentemente também que TVB-3166, um inibidor reversível da atividade de FASN, tem propriedades antineoplásicas em células de CCE oral inibindo a viabilidade e reduzindo as taxas de proliferação, promovendo a parada do ciclo e morte celular, além de modular os fenômenos de migração e adesão (Aquino et al., 2020).

As causas da resistência terapêutica observadas nas CTC podem ser explicadas, pelo menos em parte, pelos dados publicados por alguns grupos de pesquisa. Por exemplo, as CTC parecem não serem sensíveis aos quimioterápicos comuns, pois estas células permanecem no estágio G0 do ciclo celular (Yang et al., 2020). As CTC resistem à radioterapia por conterem baixas quantidades de espécies reativas de oxigênio (ROS), devido a eficiente eliminação destes últimos, o que promove a proliferação celular e as protege de danos permanentes ao DNA, RNA e outras macromoléculas essenciais (Wang et al., 2013). Além disto, a expressão aumentada dos transportadores ABC (ABCB1, ABCC2 e ABCG2) em CTC contribui para a resistência a diversas drogas, pois estas moléculas bombeiam os quimioterápicos para o meio extracelular (Cho e Kim, 2020).

O objetivo central da terapia molecular é encontrar um alvo terapêutico, que pode ser DNA, RNA, proteína ou outras moléculas, cuja atividade possa ser modulada pelo tratamento e isto inviabilize a célula maligna (Huang et al., 2021). Potenciais alvos terapêuticos em CTC do CCE oral parecem residir nas características de autorrenovação, no "nicho" onde elas se encontram, no fenômeno da TEM e nos diversos marcadores em estudo atualmente (Liu et al, 2020). O regulador de autorrenovação BMI1, altamente expresso em CTC de CCE oral, quando bloqueado em xenoenxertos, resulta na interrupção da progressão tumoral. Além disto, o mesmo trabalho mostrou que o inibidor de BMI1 tem efeitos terapêuticos em tumores resistentes à cisplatina e parece reduzir metástases iniciadas por CTC circulantes (Hu et al., 2019). As CTC residem em nichos, que são regiões anatomicamente distintas dentro do microambiente tumoral; nas quais elas conseguem manter suas principais propriedades, como a plasticidade metabólica e ao mesmo tempo se proteger do sistema imunológico, o que facilita seu potencial metastático (Plaks et al., 2015). A aplicação de drogas antiangiogênicas, visando atacar os nichos das CTC, em combinação com drogas convencionais, pode ser uma estratégia terapêutica promissora, porém, vários estudos ainda são necessários neste campo (Liu et al, 2020). Estratégias de ataque relacionadas à TEM nas CTC são alternativas que podem melhorar o prognóstico dos CCE, um estudo, por exemplo já demonstrou que a metformina inibe as CTC, embora seu alvo molecular no processo de TEM não seja claro (Vazquez-Martin et al., 2010; Du e Shim, 2016).

Por fim, os marcadores de CTC podem ser alvos em potencial para terapias direcionadas. Anticorpos monoclonais constituem a melhor estratégia devido à sua especificidade e baixa toxicidade para o paciente (Huang et al., 2021). Exemplos clássicos deste tipo de abordagem são o uso de trastuzumab para cânceres de mama HER2<sup>+ (</sup>Derakhshani et al., 2019) e de cetuximab para carcinomas colorretais que expressam EGFR, os quais são bem descritos na literatura (Fornasier et al., 2018;). Anticorpos monoclonais anti-CD44 inibem o crescimento e a disseminação metastática de tumores pancreáticos transplantados em camundongos e sua combinação com a radioterapia poderia

reduzir a recidiva tumoral (Li et al., 2014). Em ensaios pré-clínicos com grupos de pacientes portadores CCE de cabeça e pescoço, foi demonstrado que a aplicação combinada de anticorpos monoclonais anti-CD44v6 e DM1, que é um fármaco sintético derivado de maitansina e atua nos microtúbulos de células tumorais, em conjunto com a radiação, pode melhorar significativamente o controle da progressão tumoral (Lopus, 2011; Gurtner et al, 2012).

Um problema enfrentado para este tipo de terapia é que os marcadores de superfície expressos por CTC também podem ser encontrados em células normais, o que impede, em grande parte, a realização de um tratamento realmente específico (Huang et al., 2021).

# **3 PROPOSIÇÃO**

## 3.1. Proposição geral

Caracterizar a linhagem celular de CCE de língua SCC-9 ZsGreen e duas de suas subpopulações de CTC com diferentes padrões de expressão de CD44 e de CD326.

## 3.2. Proposições específicas

Investigar as propriedades proliferativas, o potencial clonogênico, a adesão, a migração celular e a produção de FASN e de proteínas associadas à TEM e, além da sensibilidade a cisplatina e ao TVB-3166, na linhagem parental SCC-9 ZsG e em duas subpopulações dela derivadas, os fenótipos SCC-9 ZsG B1 (CD44<sup>+</sup> /CD326<sup>-</sup>) e SCC-9 ZsG E1 (CD44<sup>low</sup>/CD326<sup>high</sup>).

# **4 MATERIAL E MÉTODOS**

#### 4.1 Cultura de células

Foram utilizadas no presente estudo células da linhagem SCC-9 ZsGreen (SCC-9 ZsG), além de duas subpopulações dela derivadas, denominadas SCC-9 ZsG B1 e SCC-9 ZsG E1.

Para obtenção da linhagem SCC-9 ZsG (Agostini et al., 2014), foi realizada a transdução com o vetor retroviral pLNCX2 (Clontech), que contém a sequência que codifica a proteína verde fluorescente ZsGreen, em células SCC-9. As células SCC-9 (número de catálogo CRL-1629) foram adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC) e são provenientes de um CCE primário de língua, de um paciente do sexo masculino com 25 anos de idade. As subpopulações SCC-9 ZsG B1 e SCC-9 ZsG E1 (Cuadra Zelaya, 2019) foram isoladas por meio de ensaios de imunofenotipagem pela técnica de imunofluorescência direta em citômetro de fluxo. A imunomarcação foi realizada com anticorpos dirigidos contra CD44 e CD326 e a seleção feita a partir de 6 *gates* realizados para o isolamento de diferentes fenótipos, dentre os quais os fenótipos B (CD44<sup>+</sup>/CD326<sup>-</sup>) e E (CD44<sup>low</sup>/CD326<sup>high</sup>), aqui chamados de SCC-9 ZsG B1 e SCC-9

Todas as linhagens foram cultivadas em frascos plásticos (Corning) de 25 cm<sup>2</sup> ou 75 cm<sup>2</sup>, em meio de cultura DMEM/F-12 (Invitrogen) com suplementação de 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab), 400ng/mL de hidrocortisona (succinato sódico de hidrocortisona, Eurofarma) e solução antibiótica e antimicótica (Gibco, Life Technologies TM) em uma diluição de 1:100, mantidos a 37°C em atmosfera contendo 95% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub> e substituído por meio novo a cada intervalo de 48 horas. As células foram cultivadas até em torno de 70% da capacidade da superfície dos frascos, momento em que o meio era retirado do frasco e as células lavadas com solução salina tamponada com fosfato autoclavada (PBS, pH 7,4). Depois disto, as células eram tratadas com 27  $\mu$ L/cm<sup>2</sup> de tripsina a 2% (0,25% Trypsin-EDTA, Gibco, Life ThecnologiesTM) por aproximadamente 5 minutos, até o desprendimento de todas da superfície

de cultura, o que foi acompanhado em microscópio de contraste de fase invertido (Nikon Eclipse TI). Então, a ação da tripsina foi interrompida pela adição de meio com 10% de SFB em um volume pelo menos três vezes maior do que o volume de tripsina utilizado. A suspensão de células em tripsina e meio era a seguir transferida para tubos cônicos de plástico estéreis de 15 mL (Corning) e centrifugada (centrífuga Excelsa Modelo 206 BL, FANEM) a 900 xg por 3 minutos. Logo após, o sobrenadante era descartado e o pellet ressuspendido em meio de cultura suplementado com 10% de SFB, a partir da qual era realizada a contagem de células em câmara de Neubauer, para então semeá-las para os experimentos desta dissertação, mantê-las em cultura ou congelá-las, visando sempre manter um estoque no menor número de passagens possível. Para o congelamento, as células eram suspendias em solução de 10% de di-metil sulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) e 90% de SFB e 1 mL desta suspensão acondicionado em tubos criogênicos (Nunctm) e estocados em freezer a -80 °C ou em tambores contendo nitrogênio líquido. Para o descongelamento, os tubos criogênicos eram incubados em banho de água a 37 °C, as células rapidamente transferidas para tubos plásticos estéreis de 15 mL contendo 9 mL de meio com 10% de SFB e então centrifugados a 900 xg, por 3 minutos, quando os pellets eram ressuspendidos em meio contendo 10% FBS e as células cultivadas em novos frascos de cultura. As linhagens celulares estudadas foram subcultivadas por até no máximo dez passagens após o descongelamento e então descartadas, para evitar quaisquer alterações fenotípicas decorrentes da longa permanência em cultivo.

Durante todos os procedimentos descritos acima, foram tomados todos os cuidados para a manutenção da esterilidade. Além disso, as células eram testadas periodicamente para a presença de *Mycoplasma* spp. por meio de reações em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction – PCR).

## 4.2 Análise da proliferação celular

Para avaliar a proliferação celular nas diferentes linhagens aqui estudadas, 5 x 10<sup>3</sup> células SCC-9 ZsG, SCC-9 ZsG B1 ou SCC-9 ZsG E1 foram ressuspendidas em 250µL de meio DMEM/F-12 contendo 10% de SFB e

semeadas em cada poço de placas de 96 poços. Após 24 horas de incubação, os poços foram lavados com PBS e o meio substituído por DMEM/F-12 livre de SFB e as células então incubadas por mais 24 horas, para a sincronização dos ciclos celulares. Nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas, as células foram lavadas com 250µL de PBS e incubadas com 80µL de tripsina a 2% a 37 °C, por até 5 minutos e/ou até que todas as células estivessem desprendidas do fundo das placas de cultura. A tripsina foi inativada com 250µL de meio DMEM/F-12 suplementado com 10% de SFB, a suspensão transferida para tubos plásticos de 1,5 mL (Kasvi), os quais foram centrifugados a 900 xg por 3 minutos (centrífuga modelo 5430 R, Eppendorf), os *pellets* ressuspendidos em 120µL ou 220µL de meio, dependendo da quantidade de células obtida, e 10µL desta suspensão utilizados para contagem em câmara de Neubauer. Todas as contagens foram feitas em duplicatas e os experimentos repetidos três vezes de maneira independente.

#### 4.3 Ensaio clonogênico

Para avaliar a formação de colônias nas linhagens estudadas neste trabalho de dissertação de mestrado, 500 células SCC-9 ZsG, SCC-9 ZsG B1 e SCC-9 ZsG E1 foram ressuspendidas em 2 mL de meio DMEM/F-12 com 10% SFB e semeadas em placas de cultura de 6 poços. As células foram mantidas por 10 e 14 dias e o meio foi trocado a cada 48 horas. Após este período, as colônias formadas por cada linhagem celular foram fotografadas, o meio removido e cada poço lavado com 2 mL de PBS. Em seguida, 1 mL de paraformaldeído a 4% (Êxodo Cientifica) foi colocado em cada poço, onde permaneceu por 1 hora, quando foi removido e os poços então lavados mais uma vez com 2 mL de PBS. Na sequência, cada poço recebeu 500 µL de solução de cristal violeta a 0,1% (Merck) por 15 minutos, período após o qual foi removido, os poços lavados abundantemente com água destilada e deixados para secar por cerca de 12 horas. Depois disto, as placas foram scaneadas por meio de aparelho transiluminador (UVITEC,Cambrigde) e as colônias contadas com o auxílio do software Image J. Segundo Franken et al. (2006), para ser considerada uma colônia, esta dever ter pelo menos 50 células e, por esse motivo, as placas também foram observadas em microscópio invertido de contraste de fase e as colônias com aproximadamente este número de células foram identificadas e a média de suas áreas utilizada como o valor mínimo a ser considerado nas análises comparativas. Os experimentos aqui descritos foram repetidos três vezes de maneira independente e cada experimento foi realizado em duplicatas para cada linhagem estudada.

## 4.4 Análise da adesão celular

Para avaliar a adesão das linhagens estudadas no presente trabalho utilizamos uma matriz extracelular preparada a partir de leiomiomas humanos, denominada de miogel e desenvolvida por Salo e colaboradores (2015) e gentilmente cedida ao Prof. Dr. Ricardo Della Coletta para utilização em nosso trabalho. Para estes experimentos, placas de cultura de 96 poços foram sensibilizadas com 10 µg/µL de miogel diluído em PBS enquanto poços controle, utilizados para testar especificidade da adesão ao miogel, foram mantidos apenas com PBS. As placas foram então embaladas com papel alumínio e guardadas na geladeira a 4°C. Após 24 horas, os poços foram lavados duas vezes com PBS e receberam solução de albumina sérica bovina (BSA, Pentex Miles) diluída a 3% em PBS e incubadas durante 2 horas a 37 °C. Paralelamente, 6 x 10<sup>4</sup> células de cada linhagem celular foram cultivadas em 2 mL meio DMEM/F-12 com 10% de SFB em placas de 6 poços e, após 24 horas do plaqueamento, os meios foram substituídos por DMEM/F-12 livre de SFB, o que foi seguido de incubação por mais 24 horas para sincronizar os ciclos celulares. Em seguida, as células foram incubadas com DMEM/F-12 suplementado com 10% de SFB durante mais 48 horas, tripsinizadas, e 3 x 10<sup>4</sup> células SCC-9 ZsG, SCC-9 ZsG B1 e SCC-9 ZsG E1 ressuspendidas em 200 µL de meio DMEM/F-12 com 3% de BSA, semeadas em cada poço das placas de 96 poços previamente sensibilizadas como descrito acima e mantidas a 37 °C por 1 hora. Após a adesão celular, os poços foram lavados duas vezes com PBS, para remoção das células não aderentes, e as células que permaneceram aderidas fixadas com 200 µL de paraformaldeído a 4% durante 15 minutos e coradas com 70 µL de cristal violeta a 0,1% por 10 minutos. Depois disto, as células foram

abundantemente lavadas com água destilada para remoção do excesso de corante e os poços fotografados. A seguir, o corante contido nas células aderidas de cada poço foi solubilizado e homogeneizado com 100 µL etanol absoluto e as respectivas absorbâncias mensuradas em espectrofotômetro calibrado para o comprimento de onda 655 nm (iMarkTM Microplate Absorbance Reader, BioRad). Os experimentos foram realizados em triplicatas e repetidos duas vezes de maneira independente.

## 4.5 Migração celular

A capacidade de migração das células SCC-9 ZsG e suas subpopulações foi avaliada por meio do ensaio de migração em monocamada (Liang et al., 2007), utilizando o método de "scratch". Com este protocolo, as taxas de migração celular podem ser estimadas a partir da criação de uma área livre de células na monocamada confluente ("ferida"), seguida da captura de imagens em intervalos de tempo curtos e regulares, o que permite quantificar o potencial migratório (Yarrow et al., 2004). Para isto, cerca de 2,4 x 10<sup>5</sup> células foram cultivadas em meio DMEM/F-12 contendo 10% SFB em cada poço de uma placa de 24 poços e incubadas a 37 °C por 16 horas para formação de uma monocamada confluente. Uma "ferida" foi criada em cada poço raspando-se uma ponteira estéril de 200µL e os poços lavados por três vezes com PBS, sendo depois disto adicionado meio DMEM/F-12 suplementado com 2% de SFB. As células foram incubadas por mais 24 horas e fotomicrografias em microscópio de contraste de fase (Nikon Eclipse Ti-S) realizadas nos tempos 0 e 16 horas. A migração celular foi analisada com auxílio do software Image J (National Institutes of Health), a partir da medida da área livre de células entre as bordas da "ferida", e os valores obtidos normalizados em relação ao tempo 0 de cada linhagem. Foram realizadas duplicatas amostrais e os experimentos repetidos quatro vezes de maneira independente.

#### 4.6 Experimentos de western blotting

As quantidades da proteína FASN e de proteínas associadas ao processo de TEM (transição epitélio-mesenguimal), como E-caderina, vimentina, Ncaderina e slug, foram avaliadas nas células SCC-9 ZsG, SCC-9 ZsG B1 e SCC-9 ZsG E1. Para obtenção dos extratos proteicos, 9 x 10<sup>5</sup> foram semeadas em frascos de 75 cm<sup>2</sup> em DMEM/F12 suplementado com 10% de SFB e, após 24 horas do plaqueamento, os meios de cultura foram substituídos por DMEM/F12 livre de SFB, para a sincronização dos ciclos celulares. Então, os meios foram novamente trocados por DMEM/F12 com 10% de SFB e, 48 horas depois, as células foram tripsinizadas e os pellets ressuspendidos e coletados em PBS. As proteínas foram extraídas por meio de dissociação e homogeneização por pipetagem em 70 µL de tampão de lise contendo Anita buffer (5g de sacarose, 500 µL de NP40, 1 mL de Tris\HCI 1M, 6,85 mL de NaCI 1M, 5 mL de glicerol e 200 µL de EDTA (5 Mm)) mais inibidores de protease 7x concentrados (Complete Mini Cocktail, Roche Diagnostics) numa proporção de 8,5:1,5. As amostras foram mantidas em gelo por 30 minutos e vortexadas a cada 10 minutos, sendo a seguir centrifugadas a 12.000 xg por 15 minutos a 4°C e os sobrenadantes coletados e armazenados em freezer a -80°C, onde foram mantidos até o momento do uso. A concentração de proteínas totais de cada extrato foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando-se o reagente de Bradford (Bio-Rad), e absorbâncias mensuradas em espectrofotômetro ajustado para o as comprimento de onda de 595 nm (iMarkTM Microplate Absorbance Reader, BioRad). Trinta microgramas de cada um dos extratos proteicos estudados (SCC-9 ZsG, SCC-9 ZsG B1 e SCC-9 ZsG E1) foram misturados com tampão de amostra redutor com ditiotreitol (DTT, Sigma) numa proporção de 1:4, as amostras fervidas por 5 minutos e separadas por eletroforese em géis de poliacrilamida-SDS a 8% ou 10%. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond, GE Healthcare) e coradas com Ponceau S (Sigma) para verificar a eficácia do procedimento. Depois disto, as membranas de nitrocelulose de cada uma das linhagens foram cortadas de acordo com o peso molecular das proteínas de interesse. Cada uma das membranas foi incubada em solução contendo 20 mM de Tris-HCI (pH 7,6), 150 mM de NaCl e 1% de Tween 20 (TBST) durante 15 minutos e bloqueadas no

mesmo tampão contendo 5% de leite em pó desnatado (Nestlé) por 2 horas a temperatura ambiente. As membranas foram a seguir incubadas durante a noite, sob agitação constante e a temperatura de 4°C, com os seus respectivos anticorpos primários (tabela 4.1), diluídos em TBST com 5% de leite em pó desnatado ou 5% de BSA. Depois deste período, as membranas foram lavadas 4 vezes com TBST por 15 minutos e posteriormente incubadas por uma hora com os anticorpos secundários conjugados com peroxidase ou com fluorocromos. As membranas passaram por mais uma sequência de 4 lavagens com TBST e, por fim, as reações feitas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase foram reveladas por meio de quimioluminescência (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific). Por fim, as imagens foram obtidas no equipamento Alliance 4.7 (Uvitec, Cambridge), as bandas das proteínas avaliadas submetidas a análises de densitometria e seus valores normalizados pelo valor da leitura das bandas de  $\beta$ -Actina, com auxílio do programa ImageJ.

Anticorpo	Peso	Diluição	Anticorpo	Marca	Catálogo
	molecular		secundário		
FASN	265 kDa	1:3000	Mouse	BD Biosciences	610963
N-caderina	140 kDa	1:1000	Rabbit	Cell Signaling	D4R1H
E-caderina	137 kDa	1:1000	Rabbit	Cell Signaling	24E10
Vimentina	57 kDa	1:1000	Rabbit	Cell Signaling	D21H3
β-actina	42 kDa	1:10000	Mouse	Sigma	A1978
Slug	30 kDa	1:1000	Rabbit	Cell Signaling	C19G7

**Tabela 4.1 –** Anticorpos utilizados nas reações de western blotting com extratos proteicos obtidos das células SCC-9 ZsG, SCC-9 ZsG CTC B1 e SCC-9 ZsG.

#### 4.7 Teste de viabilidade celular

A viabilidade celular após o tratamento com cisplatina e TVB 3166 foi determinada pelo método colorimétrico com MTT (3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma-Aldrich), que evidencia a atividade mitocondrial em células metabolicamente viáveis pela estimativa da formação de cristais de formazan a partir da redução do sal tetrazólio (Mosmann, 1983). Para o tratamento com cisplatina, células da linhagem SCC-9 ZsG e suas subpopulações SCC-9 ZsG B1 e SCC-9 ZsG E1 foram semeadas em placas de 24 poços (3,5 x 10<sup>4</sup> células em 500 µL de meio DMEM/F-12 suplementado com 10% de SFB), enquanto que para o tratamento com TVB 3166, as células foram semeadas em placas de 48 poços (6 x 103 células em 300 µL de meio DMEM/F-12 com 10% de SFB). Após 24 horas dos respectivos plaqueamentos, os meios de cultura foram substituídos por DMEM/F-12 livre de SFB e as células incubadas por mais 24 horas para que ocorresse a sincronização dos seus ciclos celulares. Então, os meios foram removidos e substituídos por meios novos contendo concentrações crescentes de cisplatina (0, 1, 5, 10, 15, 25, 50, 75 e 100 µM) ou de TVB 3166 (0, 10, 25, 50, 75 e 100 µM) na presença de 10% ou 2% de SFB, respectivamente. Após 48 horas de tratamento, as células foram incubadas a 37 °C na presença de 0,3 mg/mL. de MTT por 4 horas adicionais, os meios removidos e os cristais de formazan presentes em cada poço solubilizados com etanol absoluto (Merck), em volumes de 500 µL para as placas de 24 poços e 250 µL para as placas de 48 poços. As soluções foram então homogeneizadas e 100 µL de cada condição experimental transferidos para poços de uma placa de 96 poços, sendo as absorbâncias mensuradas em espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado para 595 nm e corrigidos para 655 nm (iMarkTM Microplate Absorbance Reader, BioRad). A viabilidade celular foi então expressa em porcentagens em relação aos controles experimentais, todas as concentrações testadas em duplicatas e os experimentos repetidos três vezes de maneira independente para cada linhagem celular estudada. A metade da concentração inibitória (IC50) foi calculada por meio do software CompuSyn (Chou e Martin, 2005) para a realização dos experimentos em cultura. Cisplatina e TVB-3166 foram utilizados nas

concentrações descritas nos trabalhos prévios desenvolvidos em nosso próprio laboratório (Moreira, 2017).

## 4.8 Análise dos resultados

Os resultados foram realizados através da análise de variância ANOVA One-Way com o teste de comparações múltiplas de Tukey. O nível de significância estabelecido foi de 5% (p< 0,05). Os dados foram analisados com auxílio do programa GraphPad Prism, versão 5.0.

## **5 RESULTADOS**

### 5.1. Manutenção das características fenotípicas

Durante todos os experimentos, as linhagens celulares mantiveram suas características fenotípicas originais, como observadas na figura 5.1. O fenótipo SCC-9 ZsG B1 apresenta células poligonais que crescem formando ninhos, eventualmente unidos entre si por células alongadas ou fusiformes. Enquanto as células SCC-9 ZsG E1 crescem em ninhos de células poligonais na sua porção central, com células alongadas na periferia e algumas raras células de formato mais arredondado.



**Figura 5.1** – Fotomicrografias representativas de cada um dos fenótipos isolados: **A.** Células SCC-9 ZsG. **B.** Células SCC-9 ZsG B1 (CD44<sup>+</sup>/CD326<sup>-</sup>). **C.** Células SCC-9 ZsG E1 (CD44<sup>low</sup>/CD326<sup>High</sup>). Microscopia de contraste de fase, aumento original de 40x.

## 5.2. Análise da proliferação celular nos diferentes fenótipos

Para observar as características proliferativas dos diferentes fenótipos obtidos do isolamento realizado a partir da marcação para CD44 e CD326 na linhagem SCC-9 ZsG, as células foram acompanhadas pelos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas, assim como descrito na descrito no item 4.2 desta dissertação. As taxas de proliferação celular foram investigadas pela contagem do número de células em câmara de Neubauer e os resultados normalizados pela linhagem SCC-9 ZsG, em cada período de tempo estudado.

O fenótipo SCC-9 ZsG B1 apresentou um número maior de células quando comparado aos fenótipos SCC-9 ZsG e SCC-9 ZsG E1. O número de células aderidas aos poços nos quatro tempos avaliados foi maior para o fenótipo SCC-9 ZsG B1, mas apenas nos períodos de 72 e 96 horas esta diferença foi estatisticamente significativa. Nos demais períodos, o aumento da proliferação celular não apresentou significância estatística (P > 0.05 relativo a 24 horas; P > 0.05 relativo a 48 horas, P<0.001 relativo a 72 horas e P<0.001 relativo a 96 horas), como observado no gráfico 5.1.



**Gráfico 5.1** – Proliferação das células SCC-9 ZsG, SCC-9 ZsG B1 e SCC-9 ZsG E1 após 24, 48, 72 e 96 horas de acompanhamento. As células foram contadas em câmara de Neubauer e o seu número normalizado pelas células SCC-9 ZsG, em cada período avaliado. O gráfico representa a média de três experimentos independentes. \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001 para SCC-9 ZsG B1 relativo a SCC-9 ZsG e ### p< 0.001 para SCC-9 ZsG B1 relativo a SCC-9 ZsG E1. Anova One-way com teste de Tukey.

### 5.3. Análise do potencial clonogênico

A fim de analisar a formação de colônias pelas células SCC-9 ZsG, SCC-9 ZsG B1 e SCC-9 ZsG E1, foram realizados ensaios clonogênicos, como descrito no item 4.3 deste trabalho, pelos períodos de 10 e 14 dias. O potencial clonogênico foi investigado por meio de três parâmetros diferentes: número de colônias, área total ocupada pelas colônias e média da área de cada colônia. Todos os valores foram normalizados em relação as células SCC-9 ZsG.

Nos experimentos de 10 dias (figura 5.2), podemos observar que o fenótipo SCC-9 ZsG B1 apresentou maior número de colônias, maior área total de colônias e maior área por colônia, quando comparado às células SCC-9 ZsG e ao fenótipo SCC-9 ZsG E1. Entretanto, apenas para as células SCC-9 ZsG esta diferença foi estatisticamente significativa, como evidenciado nos gráficos 5.2 – A, B e C.



**Figura 5.2** – Imagens representativas do ensaio de formação de colônias realizado com as células SCC-9 ZsG, SCC9 ZsG B1 e SCC9 ZsG E1 pelo período de 10 dias. As placas foram scaneadas por meio de aparelho transiluminador (UVITEC,Cambrigde).



**Gráficos 5.2** – **A.** O número de colônias das células SCC-9 ZsG B1 foi maior quando comparado ao número de colônias das células SCC-9 ZsG. **B.** A área total ocupada pelas colônias foi maior no fenótipo SCC-9 ZsG B1 em comparação as células SCC-9 ZsG. **C.** A média da área de cada colônia foi maior nas células SCC-9 ZsG B1 em relação as SCC-9 ZsG. Os gráficos representam a média de três experimentos independentes; \* p<0,05; \*\* p<0.01. Anova Oneway com teste de Tukey.

No período experimental de 14 dias (figura 5.3) não houve grandes diferenças em relação ao número de colônias, apenas uma discreta tendência a um maior número de colônias no fenótipo SCC-9 ZsG E1. O valor da área total

ocupada pelas colônias foi ligeiramente maior para o fenótipo SCC-9 ZsG B1, mas sem significância do ponto de vista estatístico. Por último, o valor referente a média das áreas por colônia foi maior no fenótipo SCC-9 ZsG B1 e esta diferença só foi estatisticamente significante quando comparada aos valores das células SCC-9 ZsG, como pode-se observar nos gráficos 5.3 – A, B e C.



**Figura 5.3** – Imagens representativas do ensaio de formação de colônias realizado com as células SCC-9 ZsG, SCC9 ZsG B1 e SCC9 ZsG E1 pelo período de 14 dias. As placas foram scaneadas por meio de aparelho transiluminador (UVITEC,Cambrigde).



**Gráficos 5.3** – **A.** O número de colônias não apresentou diferença estatística entre os fenótipos. **B.** A área total ocupada pelas colônias pelos fenótipos não apresentou valores estatisticamente significativos, apesar de ser discretamente maior nas células SCC-9 ZsG B1. **C.** A média da área de cada colônia foi maior nas células SCC-9 ZsG B1 em relação as SCC-9 ZsG. Os gráficos representam a média de três experimentos independentes; \* p<0,05. Anova One-way com teste de Tukey.

#### 5.4. Análise da adesão celular

Para comparar a adesão das células SCC-9 ZsG, SCC-9 ZsG B1 e SCC-9 ZsG E1 à componentes da matriz extracelular, foram realizados ensaios de adesão sobre miogel. Para isto, as linhagens celulares foram semeadas em poços previamente sensibilizados com miogel ou tratados apenas com PBS e os valores obtidos normalizados em relação as células SCC-9 ZsG.

Tanto a linhagem SCC-9 ZsG quanto suas subpopulações aqui estudadas, SCC-9 ZsG B1 e SCC-9 ZsG E1, apresentaram capacidade de adesão aos componentes do miogel. O tempo médio de adesão das células ao miogel foi de 20 minutos e a figura 5.4 representa as células aderidas após a finalização do experimento, fixação e coloração.

Não houve diferença estatisticamente significante entre a capacidade de adesão ao miogel das células estudadas. Apenas um discreto aumento da adesão das células SCC-9 ZsG B1 e uma pequena redução da adesão das SCC-9 ZsG E1 quando comparadas as células SCC-9 ZsG (P > 0.05), como pode ser observado no gráfico 5.4.



**Figura 5.4** - Fotomicrografias representativas do ensaio de adesão celular ao miogel com as células SCC-9 ZsG e sua subpopulações. As células aderidas foram fixadas com paraformaldeído a 4% e coradas com cristal violeta a 0,1%. Microscopia de contraste de fase, aumento original de 40x.



**Gráfico 5.4** - Adesão nas células SCC-9 ZsG, SCC-9 ZsG B1 e SCC-9 ZsG E1 ao miogel. O gráfico representa a média de três experimentos independentes. Anova One-way com teste de Tukey.

#### 5.5. Análise da migração celular

Com o objetivo de verificar o potencial migratório de cada subpopulação aqui estudada, as células SCC-9 ZsG, SCC-9 ZsG B1 e SCC-9 ZsG E1 foram submetidas a ensaios de migração em monocamada, de acordo com o protocolo descrito no item 4.5 desta dissertação. A migração celular foi determinada pela medida da área entre as bordas da "ferida" e os valores obtidos foram comparados ao tempo 0 e normalizados pelo valor das células SCC-9 ZsG B1 no período de 16h. Neste experimento, excepcionalmente, a normalização foi feita por essa subpopulação, pois ela foi a primeira a fechar totalmente a "ferida". A figura 5.5 e o gráfico 5.5 demonstram o comportamento migratório das células SCC-9 ZsG E1.

Após 16 horas, a subpopulação SCC-9 ZsG B1 foi a única capaz de promover o fechamento completo da "ferida" (100%), evidenciando assim seu elevado potencial migratório. As células SCC-9 ZsG fecharam a "ferida" em 71,48% enquanto que as células SCC-9 ZsG E1 o fizeram em apenas 57,89%. As diferenças de migração entre as linhagens SCC-9 ZsG e SCC-9 ZsG E1 apresentaram significância estatística (p<0.01 e p<0.001, respectivamente), quando comparadas com as células SCC9 ZsG B1, como pode-se observar no gráfico 5.2.



**Figura 5.5** – Fotomicrografias representativas do ensaio de migração em monocamada realizado com as células SCC-9 ZsG, SCC9 ZsG B1 e SCC9 ZsG E1, nos períodos de 0 e 16 horas. Observa-se que apenas o fenótipo SCC9 ZsG B1 fechou toda a área disponível para a migração. Microscopia de contraste de fase, aumento original de 40x.



**Gráfico 5.5** – Os potenciais de migração das células SCC-9 ZsG e SCC9 ZsG E1 foram menores quando comparadas com o das células SCC9 ZsG B1. O gráfico representa a média de quatro experimentos independentes; \*\* p<0.01 para SCC-9 ZsG B1 relativo a SCC-9 ZsG; \*\*\* p<0.001 para SCC-9 ZsG E1. Anova One-way com teste de Tukey.

#### 5.6. Produção de proteínas associadas a EMT e de FASN

Pela técnica de western blotting, descrita no item 4.6 desta dissertação, extratos proteicos obtidos das células SCC-9 ZsG, SCC-9 ZsG B1 e SCC-9 ZsG E1 foram analisados com relação à produção das proteínas FASN, E-caderina, N-caderina vimentina e slug.

A figura 5.6-A mostra que as células estudadas produzem de maneira muito semelhante a proteína FASN. A análise densitométrica aponta, como mostrado na figura 5.6-B, que o extrato proteico oriundo do fenótipo SCC-9 ZsG B1 contém menos FASN do que os extratos das células SCC-9 ZsG e SCC-9 ZsG E1, porém não há significância estatística. Todos os extratos proteicos também contêm a proteína E-caderina, como evidenciado na Figura 5.7-A, na forma de duas bandas, das guais a de menor massa molecular apresenta-se com maior intensidade. Assim como FASN, as bandas correspondentes a Ecaderina formal muito semelhantes em intensidade nas três linhagens celulares (figura 5.7-A). A análise de densitometria (figura 5.7-B), entretanto, revela uma quantidade discretamente menor desta proteína no fenótipo SCC-9 ZsG B1. Em relação a N-caderina, a figura 5.8-A mostra que todas as células estudadas produzem esta proteína, na forma de múltiplas bandas e com semelhante intensidade. Curiosamente, a densitometria apontou o fenótipo SCC-9 ZsG B1 como o maior produtor de N-caderina, em comparação com as células SCC-9 ZsG e ao fenótipo SCC-9 ZsG E1 (figura 5.8-B). Vimentina foi também detectada nos extratos proteicos de todas as células, como pode-se observar na figura 5.9-A, com uma quantidade nitidamente menor no fenótipo SCC-9 ZsG E1 e discretamente menor no fenótipo SCC-9 ZsG B1. Estes resultados foram confirmados pela análise densitométrica, com diferenças estatisticamente significantes entre todas as células estudadas (figura 5.9-B). Por fim, as bandas correspondentes a proteína slug foram fortes e de intensidade similar, como mostrado na figura 5.10-A, com uma quantidade discretamente menor no fenótipo SCC-9 ZsG E1. A análise densitométrica (figura 5.10-B) confirma que as quantidades de proteína são similares entre as células, embora as diferenças se mostrem estatisticamente significantes.



**Figura 5.6** – Análise da produção de FASN pelas células SCC-9 ZsG, SCC-9 ZsG B1 e SCC-9 ZsG E1. **A.** Imagem representativa de um dos ensaios de western blotting realizados, mostrando as bandas de FASN. **B.** Gráfico que representa a análise densitométrica das bandas obtidas e evidencia uma quantidade ligeiramente menor de FASN no fenótipo SCC-9 ZsG B1, quando comparada as quantidades da proteína nas células SCC-9 ZsG e SCC-9 ZsG E1. Estão representados dados de dois experimentos independentes. Anova One-way com teste de Tukey.



**Figura 5.7** – Análise da quantidade de E-caderina das células SCC-9 ZsG, SCC-9 ZsG B1 e SCC-9 ZsG E1. A. Imagem representativa de um dos experimentos de western blotting, mostrando quantidades semelhantes desta proteína nos extratos analisados. B. Gráfico representando as análises densitométricas em que as células SCC-9 ZsG aparecem como as maiores produtoras de Ecaderina, quando comparadas as outras células estudadas. Estão representados dados de dois experimentos independentes; \* p<0,05, Anova One-way com teste de Tukey.



**Figura 5.8** – Quantidade da proteína N-caderina nos extratos proteicos obtidos das células SCC-9 ZsG, SCC-9 ZsG B1 e SCC-9 ZsG E1. **A.** Imagem representativa de um dos experimentos de western blotting realizados mostrando bandas duplas de intensidade muito semelhante. **B.** Gráfico proveniente da análise densitométrica, sugerindo maior quantidade de N-caderina no fenótipo SCC-9 ZsG B1 em relação as células SCC-9 ZsG e ao fenótipo SCC9-9 ZsG E1. Estão representados dados de quatro experimentos independentes; \* p<0.05; \*\*\* p<0.001, Anova One-way com teste de Tukey.



**Figura 5.9** – Análise da produção de vimentina pelas células SCC-9 ZsG, SCC-9 ZsG B1 e SCC-9 ZsG E1. **A.** Imagem representativa de um dos ensaios de western blotting realizados, evidenciando claramente uma menor quantidade desta proteína no fenótipo SCC-9 ZsG E1. **B.** Gráfico da densitometria das bandas obtidas, que mostra uma quantidade ligeiramente menor de vimentina no fenótipo SCC-9 ZsG B1 e uma quantidade significativamente menor no fenótipo SCC-9 ZsG E1, quando comparadas as células SCC-9 ZsG. Estão representados dados de três experimentos independentes; \* p<0,05; \*\*\* p<0.001, Anova One-way com teste de Tukey.



**Figura 5.10** – Quantidade da proteína slug nos extratos proteicos obtidos das células SCC-9 ZsG, SCC-9 ZsG B1 e SCC-9 ZsG E1. **A.** Imagem representativa de um dos ensaios de western blotting revelando banda discretamente menor no fenótipo SCC-9 ZsG E1. **B.** Gráfico gerado pela análise densitométrica, evidenciando quantidades ligeiramente menores de slug nos fenótipos SCC-9 ZsG B1 e SCC-9 ZsG E1, quando comparados as quantidades da proteína nas células SCC-9 ZsG. Estão representados dados de dois experimentos independentes; \* p<0.05; \*\*; p<0.01, Anova One-way com teste de Tukey.

#### 5.7. Teste de viabilidade celular

A viabilidade das células da linhagem SCC-9 ZsG e de suas duas subpopulações SCC-9 ZsG B1 e SCC-9 ZsG E1 foi avaliada pelo ensaio de MTT, após 48 horas de tratamento com doses crescentes de cisplatina (0, 1, 5, 10, 15, 25, 50, 75 e 100  $\mu$ M) e de TVB 3166 (0, 10, 25, 50, 75 e 100  $\mu$ M) na presença de 10 e 2% de SFB, respectivamente. Nestes experimentos, verificou-se que a redução da viabilidade celular ocorreu de forma dose-dependente em todos os fenótipos celulares aqui estudados tanto para a cisplatina (gráficos 5.6 – A, B e C) quanto para o TVB 3166 (gráficos 5.8 – A, B e C). A metade da concentração inibitória (IC50) foi calculada com o auxílio do software CompuSyn, revelando valores de IC50 diferentes para cada fenótipo analisado, para os dois compostos testados (gráficos 5.7 – A, B e C e 5.9 – A, B e C)

Embora a redução da viabilidade celular tenha ocorrido de forma dosedependente em todos os fenótipos celulares, os efeitos da cisplatina (gráficos 5.6 – A, B e C) foram estatisticamente significativos a partir de doses menores nas células SCC-9 ZsG (de 10  $\mu$ M a 100  $\mu$ M) e SCC-9 ZsG B1 (de 5  $\mu$ M a 100  $\mu$ M), enquanto significância estatística só foi observada em doses maiores nas células SCC-9 ZsG E1 (de 50  $\mu$ M a 100  $\mu$ M). Isto foi evidenciado também nos valores de IC50, sendo necessária uma concentração maior de cisplatina para reduzir para a metade o número de células SCC-9 ZsG E1 (IC50 de 36,71  $\mu$ M), quando comparado as células SCC-9 ZsG (IC50 de 22,88  $\mu$ M) e SCC-9 ZsG B1 (IC50 de 20,98  $\mu$ M).



**Gráficos 5.6** – O tratamento com cisplatina reduziu a viabilidade das células de maneira progressiva, quando expostas a doses crescentes desta droga por 48 horas, e a viabilidade determinada pelo método de MTT. **A.** Valores referentes a viabilidade das células SCC-9 ZsG. **B.** Valores referentes a viabilidade das células SCC-9 ZsG B1. **C.** Valores referentes a viabilidade das células SCC-9 ZsG E1. Os gráficos representam a média de três experimentos independentes; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.00, Anova One-way com teste de Tukey.



**Gráficos 5.7** – Cálculos da IC50 da cisplatina, após 48 horas de tratamento, gerados com o auxílio do software CompuSyn. Representações gráficas geradas pelo CompuSyn, destacando o valor de 22,88  $\mu$ M para células SCC-9 ZsG (**A**), 20,98  $\mu$ M para o fenótipo SCC-9 ZsG B1 (**B**) e 36,71  $\mu$ M para o fenótipo SCC-9 ZsG E1 (**C**). Representados aqui os mesmos três experimentos mostrados nos gráficos 5.6 – A-C.

Os efeitos do TVB 3166 (gráficos 5.8 – A, B e C) também foram estatisticamente significativos a partir de doses um pouco menores nas células SCC-9 ZsG (de 50  $\mu$ M a 100  $\mu$ M) e no fenótipo SCC-9 ZsG B1 (de 75  $\mu$ M e 100  $\mu$ M), enquanto significância estatística foi observada na maior dose estuda no fenótipo SCC-9 ZsG E1 (100  $\mu$ M). Os valores de IC50 foram altos, sendo inclusive necessária uma concentração maior de TVB 3166 do que as aqui estudadas para reduzir pela metade o número de células SCC-9 ZsG B1 (IC50 de 109  $\mu$ M). As células SCC-9 ZsG (IC50 de 74,95  $\mu$ M) e SCC-9 ZsG E1 (IC50 de 98,84  $\mu$ M) também apresentaram valores altos de IC50.



**Gráficos 5.8** – Gráficos que evidenciam redução progressiva de viabilidade com o tratamento com TVB 3166 com doses crescentes por 48 horas (viabilidade determinada pelo método de MTT). Representações gráficas mostrando valores referentes a viabilidade das células SCC-9 ZsG (A), SCC-9 ZsG B1 (B) e SCC-9 ZsG E1 (C). Os gráficos representam a média de três experimentos independentes; \* p<0,05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.00. Anova One-way com teste de Tukey.



**Gráficos 5.9** – Cálculos da IC50 do TVB3166, após 48 horas de tratamento, gerados pelo software CompuSyn. Gráficos gerados pelo Compusyn destacando o valor de 74,95  $\mu$ M para células SCC-9 ZsG (**A**), 109  $\mu$ M para o fenótipo SCC-9 ZsG B1 (**B**) e 98,84  $\mu$ M para as células SCC-9 ZsG E1 (**C**). Representação dos mesmos três experimentos mostrados nos gráficos 5.8 – A-C.

# 6 DISCUSSÃO

O câncer representa o maior ônus clínico, social e econômico em termos de esperança de vida corrigida pela incapacidade (EVCI) de todas as doenças humanas. O risco geral de uma pessoa desenvolver câncer, entre 0 e 74 anos, é de 20,2% (22,4% em homens e 18,2% em mulheres) (Global Burden of Disease, 2019; Mattiuzzi e Lipp, 2019). O câncer é hoje a segunda causa mundial de morte (quase 10 milhões em 2020), logo após a doença isquêmica do coração, entretanto, segundo a GLOBOCAN, provavelmente será a primeira por volta de 2060, ano com 18,63 milhões de mortes projetadas. Estimativas globais recentes indicam que o câncer oral representa a décima sexta neoplasia maligna mais comum em todo o mundo, com 377.713 novos casos por ano (WHO, 2020). Mais de 90% dos cânceres orais são carcinomas de células escamosas (CCE) (Warnakulasuriya e Kerr, 2021), a maioria dos quais ocorre em pacientes acima de 65 anos do sexo masculino (Chi et al., 2015). O CCE oral pode ocorrer devido a diversos fatores etiológicos, mas o tabagismo e o etilismo continuam sendo os fatores de risco mais importantes (Bugshan e Farooq, 2020).

As abordagens terapêuticas só podem ser consideradas realmente efetivas se todas as células de uma neoplasia maligna forem destruídas durante a terapia antitumoral. Existe, porém, uma subpopulação de células malignas que é caracterizada por suas habilidades de autorrenovação e de sobrevivência após os tratamentos citotóxicos, chamada de CTC (Skvortsova, 2021). Estas células parecem ser a principal causa das recidivas tumorais e da resistência aos mais diversos tratamentos que existem na atualidade (Moghbeli et al., 2014) e, por consequência, responsáveis pelo prognóstico ruim destas doenças. Neste contexto, a identificação e a caracterização destas células são essenciais para encontrar alvos terapêuticos que efetivamente melhorem as terapias antineoplásicas. Entretanto, estudar as características biológicas das CTC não é uma tarefa simples devido às dificuldades inerentes ao isolamento destas populações numa forma pura (Jariyal et al., 2019).

O presente estudo tem o objetivo de caracterizar subpopulações de CTC em linhagens celulares de CCE oral. Para isto, como detalhado no item 4.1 desta

dissertação, utilizamos como ferramenta de trabalho a linhagem SCC-9 ZsG (Agostini et al., 2014) e duas de suas subpopulações obtidas por meio da combinação de anticorpos dirigidos contra CD44 e CD326 em citometria de fluxo (Cuadra Zelava, 2019). A seleção foi feita a partir de 6 gates realizados para o isolamento de diferentes fenótipos, dentre os quais, os fenótipos escolhidos: B (CD44<sup>+</sup> /CD326<sup>-</sup>) e E (CD44<sup>low</sup>/CD326<sup>high</sup>), aqui chamados de SCC-9 ZsG B1 e SCC-9 ZsG E1, respectivamente. O fenótipo SCC-9 ZsG B1 apresenta células poligonais que crescem formando ninhos, eventualmente unidos entre si por células alongadas ou fusiformes. Por outro lado, as células SCC-9 ZsG E1 crescem em ninhos de células poligonais na sua porção central, com células alongadas na periferia e algumas raras células de formato mais arredondado. Análises pela técnica de western blotting mostraram que o fenótipo SCC-9 ZsG B1 produz menor quantidade de E-caderina e o fenótipo SCC-9 ZsG E1 menor quantidade de vimentina. Tais resultados apontam para um fenótipo com características mais mesenguimais e outro mais epitelial, para SCC-9 ZsG B1 e SCC-9 ZsG E1, respectivamente (Cuadra Zelaya FJM, 2019). Sendo assim, estes dois fenótipos distintos são interessantes para a caracterização das propriedades proliferativas, do potencial clonogênico, da adesão e migração celular, da expressão de proteínas associadas à TEM e de FASN, assim como da sensibilidade a drogas antineoplásicas.

O crescimento celular desordenado, umas das marcas registradas do câncer (Hanahan e Weinberg, 2000; Hanahan e Weinberg, 2011; Hanahan, 2022), é uma das principais características da doença, essencial para o seu desenvolvimento e progressão (Feitelson et al., 2015). As CTC, por sua vez, podem se autorrenovar dividindo-se simetricamente ou dar origem aos vários tipos de células que constituem as neoplasias malignas e que estão envolvidas em processos fundamentais como proliferação e disseminação metastática (Makena et al., 2020). Portanto, a análise da proliferação celular é de suma importância quando estudamos células tumorais malignas e suas subpopulações de CTC. Trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa já investigaram a proliferação de células derivadas de CCE orais e demonstraram a importância da FASN neste processo, por meio da avaliação dos efeitos de diferentes inibidores farmacológicos desta enzima, como C75, triclosan, orlistat e TVB-3166

(Agostini et al, 2004; Silva et al., 2008; Agostini et al., 2014; Bastos et al., 2017; Aquino et al., 2020).

No presente trabalho, para avaliar as características proliferativas dos fenótipos estudados, as células foram acompanhadas pelos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas, por meio, da contagem em câmara de Neubauer do número de células aderidas aos poços das placas de cultura. O número de células aderidas nos quatro tempos avaliados foi maior para o fenótipo SCC-9 ZsG B1, quando comparadas a linhagem parental SCC-9 ZsG e com o fenótipo SCC-9 ZsG E1, sendo esta discrepância maior nos períodos de 72 e 96 horas. As células SCC-9 ZsG B1 demonstraram, portanto, maior potencial proliferativo, resultado semelhante aos obtidos por estudos com CTC positivas para a marcação do CD44 isoladas a partir de CCE oral, molécula que está envolvida em muitas funções celulares, inclusive proliferação (Patil, 2021).

Outra forma de avaliar o potencial proliferativo das células malignas e, principalmente das CTC, é a realização dos chamados ensaios clonogênicos (Ali et al., 2010; Bao et al., 2013). Bruce e Van Der Gaag demonstraram, em 1963, que, assim como as células da medula óssea, apenas uma minoria de células de linfoma consegue formar colônias no baço de camundongos. Já em 1977, Hamburger e Salmon descobriram que somente uma pequena porcentagem de células tumorais, provenientes de diferentes neoplasias malignas de natureza epitelial consegue produzir colônias in vitro. Devido a estas semelhanças, especulou-se que estas células malignas com potencial clonogênico seriam as CTC. Argumenta-se, no entanto, que de todas as células tumorais que foram clonogênicas in vivo, apenas algumas foram capazes de crescer em ensaios in vitro (Bruce e van der Gaag, 1963; Hamburger e Salmon, 1977; Lobo et al., 2007). Em relação ao CCE de cabeça e pescoço, há evidências de que subpopulações de suas células podem formar colônias com potencial de expansão, sugerindo que este tipo de câncer também pode conter CTC (Mackenzie, 2004; Mannelli e Gallo, 2012; Zhang et al., 2012; Rodini et al., 2017). Tais resultados estão de acordo com o conceito de que as massas tumorais são heterogêneas em sua composição, contendo CTC que possuem capacidade proliferativa e que sustentam o crescimento do tumor, células amplificadoras transitórias, que se dividem algumas vezes antes de amadurecer e, por fim,

células malignas diferenciadas, que não contribuem significativamente para o crescimento tumoral (Reya et al., 2001; Hanahan e Weinberg, 2011; Rodini et al., 2017).

Existem três formas de avaliar o potencial clonogênico de células malignas: (1) os chamados ensaios de esferas não aderentes, (2) ensaios em que as células tumorais podem ser passadas diretamente para o plástico dos recipientes de cultura, ou (3) o considerado padrão-ouro para avaliar a presença de CTC, que é o transplante ortotópico de subpopulações de células malignas em camundongos imunocomprometidos (Visvader e Lindeman, 2008). No presente trabalho, realizamos o segundo tipo de ensaio, com as células SCC-9 ZsG, SCC-9 ZsG B1 e SCC-9 ZsG E1, como descrito no item 4.4, pelos períodos de 10 e 14 dias. O potencial clonogênico foi investigado por meio de três parâmetros diferentes: número de colônias, área total ocupada pelas colônias e média da área de cada colônia para cada fenótipo aqui estudado. Nos experimentos de 10 dias, o fenótipo SCC-9 ZsG B1 apresentou maior número de colônias, maior área total de colônias e maior área por colônia, quando comparado às outras células estudadas. No período de 14 dias, não houve grandes diferenças em relação ao número de colônias, com uma discreta tendência a um maior número de colônias para o fenótipo SCC-9 ZsG E1 (provavelmente devido à fusão entre colônias a medida que elas cresciam). O valor da área total ocupada pelas colônias foi ligeiramente maior para o fenótipo SCC-9 ZsG B1, assim como o valor referente a média das áreas por colônia. Estes resultados sugerem um maior potencial clonogênico e proliferativo para as células positivas para a o biomarcador CD44.

Os resultados de ambas as abordagens experimentais realizadas para avaliar a proliferação das potenciais CTC aqui estudadas estão de acordo com a literatura, pois células positivas para CD44 parecem estar associadas a um alto potencial proliferativo em vários tipos de câncer, como por exemplo os de mama, fígado, pâncreas, bexiga, próstata, CCE de cabeça e pescoço, pulmão, colorretal, cervical e glioblastoma (Jayachandran et al., 2016; Sun et al., 2016; Ahmed et al., 2017; Xiao et al., 2017; Barnes et al., 2018; Chen et al., 2018; Crabtree e Miele, 2018; Li et al., 2018; Makena et al., 2020; Lim et al., 2021). A proteína CD44 pode induzir a proliferação celular por meio de diferentes vias,

como por exemplo regulando positivamente os biomarcadores da TEM Snail1 e Zeb1 (Wang et al., 2015), ativando KRAS via MAPK (Zhao et al., 2013), modulando c-Src (proto-oncogene tirosina-quinase) na via de sinalização intracelular AKT/GSK-3β (Nam et al., 2015), ou, por fim, através da regulação da via Wnt/β-catenina (Chang et al., 2013). Além disto, CD44 é capaz de estabilizar o antiporter cistina/glutamato, levando ao aumento de glutationa e diminuição dos níveis de espécies reativas de oxigênio, resultando em proliferação de células tumorais e resistência terapêutica mediada pela supressão da via de p38 (Thanee et al., 2016). O domínio intracelular de CD44 interage com o elemento de resposta ao AMP cíclico (cAMP response element-binding protein - CREB), aumentando a fosforilação de S133 e enriquecendo o recrutamento de CREB para o promotor da ciclina D1, resultando em proliferação celular (De Falco et al., 2012; Hassn Mesrati et al., 2021). Por outro lado, as células da linhagem SCC-9 ZsG parental e do fenótipo SCC-9 ZsG E1, positivas para CD326, apresentaram, no presente estudo, menor potencial proliferativo. Este marcador, também conhecido como EpCAM, se associa à integrina b1 para regular as vias de sinalização FAK/ERK e tem descrições contraditórias com relação ao seu papel na diferenciação, proliferação e migração celular, dependendo do tipo e origem da célula (Osta et al., 2004; Chaudry et al., 2007; Trzpis et al., 2007; Gostner et al., 2011). Segundo Wang e colaboradores (2018), CD326 não afeta a capacidade proliferativa de células de CCE nasofaríngeo.

Outras duas características importantes do câncer são perda de adesão célula-célula e crescimento independente de ancoragem, ambas dependentes de moléculas de adesão celular (Janiszewska et al., 2020). A perda da adesão intercelular e das células a lâmina basal permite que as células malignas escapem de seu *habitat* de origem, degradem macromoléculas componentes da matriz extracelular, adquiram um fenótipo de maior motilidade e invasivo e, finalmente, obtenham sucesso no processo de metástase (Okegawa et al., 2004). Todas as alterações acima mencionadas estão associadas ao fenômeno de TEM (Kalluri e Weinberg, 2009; Pastushenko et al., 2018). As moléculas de adesão celular são divididas em quatro grupos principais: caderinas, integrinas, selectinas e imunoglobulinas. Além de ancorarem fisicamente as células, elas também participam da comunicação com o microambiente extracelular, podendo

regular uma variedade de funções, como transdução de sinais, crescimento, diferenciação e motilidade celular, cicatrização de feridas e inflamação (Okegawa et al., 2004; Janiszewska et al., 2020). Particularmente, as caderinas e as integrinas são, com bastante frequência, associadas ao fenótipo maligno (Janiszewska et al., 2020). A contribuição de muitas destas interações célula-célula e célula-matriz extracelular ainda não são conhecidas nas CTC, mas já existem algumas evidências do seu impacto no fenótipo deste tipo de célula (Hale et al., 2012).

Para avaliar a adesão à matriz extracelular das linhagens celulares do presente trabalho, estas foram semeadas em poços previamente sensibilizados com miogel, um composto formado por cerca de 760 proteínas de matriz extracelular humana (Salo et al., 2015). Em nossos experimentos, não houve diferenças estatisticamente significantes entre a capacidade de adesão das células estudadas, entretanto, uma discreta maior adesão das células SCC-9 ZsG B1 e menor adesão das SCC-9 ZsG E1, quando comparadas as células SCC-9 ZsG, pôde ser observada. Buscando respostas na literatura, as células positivas para CD44 parecem estar associadas com interações moleculares de adesão em vários tipos de câncer, como glioblastoma, linfoma não Hodgkin e câncer de próstata (Ni et al., 2014; Hassn Mesrati et al., 2020; Wolf et al., 2020). Em um trabalho realizado com células-tronco isoladas de CCE orais, as células CD44+ tiveram expressão diminuída dos genes PCDH18, MGP, SPARCL1 e KRTDAP, em comparação as células negativas para CD44, sendo o produto do gene PCDH18 uma molécula de adesão célula-célula (Mishra et al., 2018). Em relação ao CD326, espera-se que a produção desta molécula interfira negativamente na formação de metástases, entretanto, já foi relatado que esta proteína está envolvida na supressão da adesão célula-célula mediada pela Ecaderina, interrompendo a ligação entre  $\alpha$ -catenina e F-actina. Estes achados apontam para um possível envolvimento funcional desta molécula na progressão tumoral. Além disto, devido a existência de uma sequência peptídica em comum com o nidogênio, um componente da matriz extracelular, acredita-se que CD326 também esteja envolvido na adesão célula-matriz (Simon et al., 1990; Behrens, 1994; Winter et al., 2003; Mohan et al, 2007; Marhaba et al., 2008; Gaiser et al., 2012; Yang et al., 2020).

A migração celular é essencial para uma resposta imune adequada, para o sucesso no reparo de feridas e homeostase tecidual, mas também é encontrada, de forma aberrante, em várias doenças e é particularmente importante no câncer (Trepat et al., 2012). A disseminação de células tumorais é um dos pré-requisitos para que ocorram as metástases e está correlacionada com a desdiferenciação epitelial e aquisição de um fenótipo migratório, marca registrada da progressão dos tumores malignos (Brabletz et al., 2005). É importante ressaltar que cerca de 90% de todas as mortes relacionadas a neoplasias de natureza maligna são causadas por metástases (Hoeppner e Bronsert, 2021). A visão clássica sobre metástase na literatura científica é aquela na qual a migração das células tumorais começa a partir de células isoladas, que passam por uma série de etapas e, finalmente, conseguem sobreviver em tecidos ou órgãos distantes daqueles que originaram a doença. Porém, estudos recentes descreveram um novo mecanismo de migração, em várias neoplasias malignas, como por exemplo em CCE de pulmão (Kuriyama et al., 2016) e de mama (Jolly et al., 2017), chamado de migração celular coletiva. A migração celular coletiva é o tipo de migração que parece acontecer durante a metástase de tumores de origem epitelial (Yang et al., 2019). As células que migram coletivamente usam mecanismos semelhantes às células individuais para se projetar, polarizar, contrair e aderir à matriz extracelular circundante (Trepat et al., 2012). Além disto, a TEM confere propriedades mesenquimais às células epiteliais, caracterizadas por maior capacidade de migração, invasividade e resistência à morte celular. Foi relatado que a TEM promove a formação das CTC, o que envolve as vias de sinalização TGF-β, Wnt, Hedgehog, Notch e JAK/STAT3, além de outros fatores como miRNAs, microambiente e citocinas (Cai et al., 2018; Makena et al., 2020).

Com o objetivo de verificar a capacidade migratória das células SCC-9 ZsG e suas subpopulações, utilizamos aqui o ensaio de migração em monocamada (Liang et al., 2007) ou método de "scratch", como descrito na sessão 4.3 desta dissertação. As taxas de migração celular foram estimadas a partir da medida da área entre as bordas da "ferida" e os valores obtidos foram comparados ao tempo 0 e normalizados pelo valor das células SCC-9 ZsG B1 no período de 16h. A normalização foi feita desta forma pois esta subpopulação foi a única capaz de promover o fechamento completo da "ferida", com nítido maior potencial migratório. As células SCC-9 ZsG fecharam a "ferida" em 71,48% e as células SCC-9 ZsG E1 em apenas 57,89%. Este resultado está de acordo com a literatura, pois células malignas positivas para o marcador CD44 são capazes de migrar significantemente em vários tipos de câncer, como os de bexiga, de mama e de próstata, adenocarcinomas colorretais, CCEs de cabeça e pescoço e glioblastomas. (Wielenga et al., 1993; lida e Bourguignon, 1997; Bourguignon et al., 1999; Reategui et al, 2006; lida et al., 2014; Spiegelberg et al., 2014; Todaro et al., 2014; Hiraga e Nakamura, 2016; Kobayashi et al., 2016; Li et al. 2017; Chen et al., 2018; Hassn Mesrati et al., 2020; Wolf, 2020; Hassn Mesrati et al., 2021). Isto pode ser explicado, pelo menos em parte, pelo fato de que o principal ligante de CD44 é o ácido hialurônico, molécula muito abundante na matriz extracelular, e que esta interação ativa vias de sinalização intracelular promotoras de migração, proliferação, adesão, e também invasão celular (Ponta et al., 2003; Zöller, 2011; Banerjee et al., 2015; Chen et al., 2018). CD44 pode participar da migração celular utilizando-se de várias vias, como por exemplo da ativação do oncogene Hippo-YAP (Lai et al., 2019) ou modulação de c-Src (proto-oncogene tirosina-proteína quinase) via AKT/GSK-3β (Nam et al., 2015). Em contrapartida, a linhagem SCC-9 ZsG E1 foi a que apresentou o menor potencial migratório em nossos ensaios. Como já mencionado anteriormente, a função biológica da proteína CD326 é ainda contraditória com relação à diferenciação, proliferação e migração celular, sendo dependente do tipo e origem da célula (Osta et al., 2004; Chaudry et al., 2007; Trzpis et al., 2007; Gostner et al., 2011). Em alguns estudos, assim como no nosso, a expressão de CD326 não resulta em aumento da migração, podendo inclusive modulá-la negativamente (Gostner et al., 2011; Maghzal et al., 2013; Barth et al., 2018; Yang et al., 2019). A conexão entre a expressão de CD326 e a migração celular permanece em grande parte desconhecida (Yang et al., 2020).

FASN funciona como um regulador central do metabolismo lipídico e desempenha um papel crítico no crescimento e sobrevivência de neoplasias malignas com fenótipos lipogênicos. Além do metabolismo lipídico, tanto em condições fisiológicas como no câncer, FASN tem papéis em outros processos celulares, como na glicólise e no metabolismo de aminoácidos (Fhu e Ali, 2020).
Vários estudos utilizando amostras clínicas e reações de imuno-histoquímica demonstraram que os tumores de natureza maligna frequentemente têm a expressão aumentada da proteína FASN, como os cânceres de mama, próstata, bexiga, ovário, pulmão e colorretal, os osteossarcomas e os linfomas não Hodgkin. Ao contrário, tecidos morfologicamente normais adjacentes aos tumores raramente expressam quantidades significativas desta proteína. (Pizer et al., 1996a; Pizer et al., 1996b; Menendez e Lupu, 2005; Orita et al., 2007; Chen et al., 2012; Liu et al., 2012a; Liu et al., 2012b; Zaytseva et al., 2012; Cai et al, 2015; Gelebart et al., 2012; Bhatt et al., 2012; Yoshii et al., 2013; Schcolnik-Cabrera et al., 2018). Sugere-se na literatura científica que FASN não apenas fornece uma vantagem metabólica para impulsionar a sobrevivência e a proliferação das células malignas, mas também favorece um fenótipo tumoral mais agressivo (Liu et al., 2012a; Liu et al., 2012b; Zaytseva et al., 2012). O metabolismo lipídico parece ser alto também nas CTC (Vlashi et al., 2011; Folmes et al., 2013; Knobloch et al., 2013; Bartesaghi et al., 2015; Chen et al., 2016; Wang et al., 2018a) e estas alterações exercem grande impacto nas propriedades destas células, como capacidade de autorrenovação, diferenciação, invasão, metástase e sensibilidade a drogas (Li et al., 2020).

A TEM é um processo celular no qual as células malignas "perdem" suas características epiteliais originais e adquirem características similares às das células de origem mesenquimal. Embora seja um processo embrionário fundamental, a TEM está associada a várias funções tumorais, dentre as quais iniciação, progressão, migração, invasão, metástase e resistência terapêutica (Brabletz, 2012; De Craene e Berx, 2013; Puisieux et al., 2014; Nieto et al., 2016; Pastushenko e Blanpain, 2019). A TEM está associada a regulação positiva da proteína N-caderina, seguida pela regulação negativa de E-caderina e pela expressão do marcador mesenquimal vimentina, sendo estes processos controlados por uma complexa rede de vias de sinalização e fatores de transcrição (Loh et al., 2019; Pastushenko e Blanpain, 2019). Esta transformação ocorre de maneira gradual e é caracterizada por vários estados celulares, chamados de estados TEM parciais, incompletos ou híbridos, que expressam diferentes níveis de marcadores epiteliais e mesenquimais e exibem características morfológicas, transcricionais e epigenéticas intermediárias entre

células epiteliais e mesenquimais (Jordan et al., 2011; Huang et al, 2013; Zhang et al., 2014; Hong et al., 2015; Jolly et al., 2016; Pastushenko et al., 2018; Pastushenko e Blanpain, 2019). Os fatores de transcrição indutores de TEM podem ser classificados com base em sua capacidade de inibir a expressão de E-caderina, de maneira direta ou indireta. Dentre os repressores diretos de E-caderina conhecidos até o momento incluem-se proteínas da superfamília SNAIL, como SNAI1 (SNAIL) e SNAI2 (SLUG) (Puisieux et al., 2014). A TEM foi identificada também como um dos mecanismos que controlam a biologia das CTC e responsável pela aquisição de um fenótipo semelhante a CTC pelas outras células tumorais (não CTC) (Chen et al., 2018; Zhang et al., 2018; Najafi et al., 2019).

Pela técnica de western blotting, descrita no item 4.6 desta dissertação, investigamos, nos extratos proteicos obtidos das células estudadas, a produção das proteínas FASN, E-caderina, N-caderina vimentina e slug. Apesar de muito semelhantes, o fenótipo SCC-9 ZsG B1 apresentou discreta menor quantidade de FASN. Entretanto, um trabalho evidenciou alta atividade de FASN em CTC de CCE de mama CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-/low</sup> (Rabionet et al., 2021). A literatura ainda é relativamente escassa em relação a produção de FASN por CTC, principalmente positivas para os biomarcadores CD44 e CD326. No presente trabalho, uma produção discretamente maior desta proteína foi observada nas células CD326+, confirmando resultados recentes ainda não publicados do nosso grupo de pesquisa (Cuadra Zelaya, 2019). Serão necessárias investigações futuras mais aprofundadas e detalhadas para melhor caracterizar os padrões de produção e o papel biológico de FASN em CTC.

Em relação as proteínas associadas à TEM, o fenótipo SCC-9 ZsG B1 apresentou produção discretamente menor de E-caderina e maior de Ncaderina, comparado ao outro fenótipo estudado, ao passo que a quantidade de vimentina foi ligeiramente menor do que nas células SCC-9 ZsG parentais, porém significativamente maior em relação às células da linhagem SCC-9 ZsG E1. Nos extratos proteicos obtidos das células SCC-9 ZsG E1, a quantidade de E-caderina detectada foi ligeiramente maior e a de N-caderina menor em relação ao fenótipo SCC-9 ZsG B1, porém, similares às das células SCC-9 ZsG. Vimentina foi muito pouco produzida neste fenótipo e slug foi detectado em

quantidades semelhantes em todos os fenótipos estudados. Estes resultados estão de acordo com a literatura, pois CD44 induz eficientemente a TEM em vários tipos de câncer, como os de cólon, pâncreas, próstata, fígado, gástrico e também gliomas (Cho et al., 2012; Ju et al., 2014; Nevo et al., 2014; Shang et al., 2014; Wang et al., 2014; Yu et al., 2014; Fernando et al., 2015; Jiang et al., 2015; Xu, 2015; Wang, 2015). Isto parece ocorrer devido ao seu efeito como regulador negativo para E-caderina e positivo para N-caderina e vimentina (Cho et al., 2012; De Craene e Berx, 2013; Gao et al., 2015; Jayachandran et al., 2016; Chen et al., 2018; Hassn Mesrati et al., 2021), aparentemente pelas vias EGFR/Akt e TGF-β (Piek et al., 1999; Valcourt et al., 2005; Deckers et al., 2006; Cho et al., 2012; Mima et al., 2012; Hassn Mesrati et al., 2021). Além disto, genes relacionados com o fenótipo mesenguimal, como o que codifica a proteína slug, estão positivamente correlacionados com a expressão de CD44 (Li e Zhou, 2011; Way et al., 2014; Xu et al., 2015). CD326, por sua vez, parece ter uma relação positiva com a expressão de E-caderina e negativa com a quantidade de Ncaderina e vimentina (Chen et al., 2011; Driemel et al., 2014; Jayachandran et al., 2016; Wang et al., 2018a; Keller et al., 2019) e reguladas pela via PTEN/AKT/mTOR (Wang et al., 2018a; Keller et al., 2019). Geralmente ocorre uma correlação positiva entre o CD326 e a expressão do fator de transcrição slug, (Lin et al., 2012; Wang et al., 2018a; Keller et al., 2019; Gires et al., 2020), mas associações negativas também já foram descritas (Puram et al., 2017; Keller et al., 2019; Liu et al, 2020). Nossos resultados, aliados aos achados da literatura, confirmam o caráter mais mesenguimal do fenótipo SCC-9 ZsG B1, pela regulação positiva de marcadores mesenguimais e regulação negativa marcadores epiteliais. Podemos inferir também, da mesma maneira, que as células SCC-9 ZsG E1 apresentam um caráter mais voltado ao epitelial, devido à maior produção de marcadores epiteliais e menor quantidade dos marcadores mesenquimais.

Para avaliar a resistência a drogas, por meio da viabilidade das células da linhagem SCC-9 ZsG e suas subpopulações SCC-9 ZsG B1 e SCC-9 ZsG E1, utilizamos o ensaio de MTT como descrito no item 4.6 desta dissertação. Nestes experimentos, verificou-se que a redução da viabilidade celular ocorre de forma

dose-dependente em todas as linhagens celulares aqui estudadas, frente ao desafio com cisplatina ou TVB-3166.

Os efeitos da cisplatina foram estatisticamente significativos a partir de doses mais baixas nas células SCC-9 ZsG e SCC-9 ZsG B1, o que ocorreu somente com doses mais altas no fenótipo SCC-9 ZsG E1. Isto ficou evidenciado também nos valores de IC50, sendo necessária uma concentração maior de cisplatina para reduzir à metade o número de células SCC-9 ZsG E1 (36,71 µM), quando comparado as células SCC-9 ZsG (22,88 µM) e SCC-9 ZsG B1 (20,98 µM). Tais resultados sugerem que o fenótipo SCC-9 ZsG E1 é mais resistente a cisplatina do que as outras células aqui estudadas. A cisplatina é uma droga quimioterápica bastante conhecida e muito usada para o tratamento de várias neoplasias malignas, incluindo o CCE oral e de cabeça e pescoço (Dasari e Tchounwou, 2014). Esta droga induz danos no DNA pela formação de adutos de cisplatina-DNA, levando à parada do ciclo celular e apoptose (Cheng et al., 2021). Segundo os achados da literatura, a expressão de CD44 é inversamente proporcional ao grau de resposta celular à quimioterapia com cisplatina e este marcador é superexpresso em células quimiorresistentes derivadas de CCE de cabeça e pescoço (Wang e Bourguignon, 2006; Roy et al., 2020), de pulmão (Quan et al., 2019; Yin et al., 2020) e de bexiga (Hagiwara et al., 2018). Isto pôde ser comprovado pela inibição de CD44 por meio da perturbação da sinalização da sinalização do Ca<sup>2+</sup> mediada pela fosfolipase C (Wang e Bourguignon, 2006), por siRNA (Hagiwara et al., 2018; Quan et al., 2019; Yin et al., 2020) e com tetrahidroisoquinolina (Roy et al., 2020), que aumenta a sensibilidade das células à cisplatina. Células malignas de CCE de cabeça e pescoço (Noman et al., 2020) de ovário (Latifi et al., 2011; Tayama et al., 2017; Akhter et al., 2018), de pulmão (Alama et al., 2015) e de adenocarcinomas (Sun et al., 2018) positivas para CD326 também parecem ser mais resistentes a cisplatina. Nossos resultados estão de acordo com estes achados, pois evidenciam que células positivas para ambos os marcadores são susceptíveis à cisplatina apenas em doses altas e apresentam um maior valor de IC50.

Os efeitos do TVB 3166 também foram estatisticamente significativos com doses um pouco mais baixas nas células SCC-9 ZsG e SCC-9 ZsG B1, enquanto que só houve significância do ponto de vista estatístico com a maior dosagem

estudada, no fenótipo SCC-9 ZsG E1. Consequentemente, os valores de IC50 foram altos nas três linhagens aqui estudadas (SCC-9 ZsG B1 - 109 µM, SCC-9 ZsG - 74,95 µM e SCC-9 ZsG E1 - 98,84 µM). Desde a relativamente recente atribuição de um papel oncogênico para FASN, esta enzima tem sido considerada como um potencial alvo terapêutico para o tratamento do câncer (Migita et al., 2009). Trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa já demonstraram as propriedades antitumorais/antimetastáticas do inibidor de FASN orlistat em modelos experimentais de CCE oral e de melanoma (Agostini et al., 2014; Bastos et al., 2017; Carvalho et al., 2008; Seguin et al., 2012). O TVB-3166 é um inibidor de FASN, reversível, potente e seletivo, disponível por via oral e com efeitos dose-dependentes observados entre 20 e 200 nM (Ventura et al., 2015). Em nossas mãos, TVB-3166 se mostrou altamente eficaz na promoção da parada do ciclo celular e indução de morte celular, bem como na modulação da migração e adesão de linhagens celulares de CCE oral (Aquino et al., 2020). Os resultados apresentados nesta dissertação mostram que os fenótipos estudados, possivelmente CTC oriundas de CCE oral, mostraram-se mais resistentes a este composto do que as células parentais SCC-9 ZsG.

Em resumo, os achados desta dissertação mostram que dentre as células estudadas, o fenótipo SCC-9 ZsG B1 (CD44<sup>+</sup> /CD326<sup>-</sup>) tem maior potencial proliferativo, adesivo e migratório, além de apresentar um perfil mais mesenquimal e ser mais sensível à cisplatina e ao TVB-3166, quando comparadas à linhagem celular parental SCC-9 ZsG e ao outro fenótipo SCC-9 ZsG E1 (CD44<sup>low</sup>/CD326<sup>high</sup>) que, apesar de não ter apresentado altas taxas de proliferação, adesão e migração, parece também ser mais resistente às drogas estudadas e possuir natureza epitelial.

## 7 CONCLUSÕES

**7.1.** As células SCC-9 ZsG B1 têm maior potencial proliferativo que as das linhagens parental SCC-9 ZsG e SCC-9 ZsG E1.

**7.2.** A linhagem SCC-9 ZsG B1 possui maior capacidade de formar colônias, em relação as outras células estudadas.

**7.3.** A capacidade de adesão ao miogel foi semelhante entre as células estudadas.

**7.4.** A migração celular foi maior na linhagem SCC-9 ZsG B1 do que nas linhagens SCC-9 ZsG e SCC-9 ZsG E1.

**7.5.** As células do fenótipo SCC-9 ZsG E1 produzem menor quantidade de vimentina, sugerindo uma natureza mais epitelial. A maior quantidade de vimentina na linhagem SCC-9 ZsG B1 aponta para características mesenquimais. A produção de FASN, E-caderina, N-caderina e Slug foi semelhante nas três linhagens celulares estudadas.

**7.6.** As células SCC-9 ZsG B1 são mais sensíveis à cisplatina e as células parentais SCC-9 ZsG mais sensíveis ao TVB-3166.

## **REFERÊNCIAS**\*

Ailles LE, Weissman IL. Cancer stem cells in solid tumors. Curr Opin Biotechnol. 2007 Oct;18(5):460-6. doi: 10.1016/j.copbio.2007.10.007.

Abbaszadegan MR, Bagheri V, Razavi MS, Momtazi AA, Sahebkar A, Gholamin M. Isolation, identification, and characterization of cancer stem cells: A review. J Cell Physiol. 2017 Aug;232(8):2008-2018. doi: 10.1002/jcp.25759.

Agostini M, Silva SD, Zecchin KG, Coletta RD, Jorge J, Loda M, Graner E. Fatty acid synthase is required for the proliferation of human oral squamous carcinoma cells. Oral Oncol. 2004 Aug;40(7):728-35.

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

Ahmed M, Chaudhari K, Babaei-Jadidi R, Dekker LV, Shams Nateri A. Concise Review: Emerging Drugs Targeting Epithelial Cancer Stem-Like Cells. Stem Cells. 2017 Apr;35(4):839-850. doi: 10.1002/stem.2579.

Akhter MZ, Sharawat SK, Kumar V, Kochat V, Equbal Z, Ramakrishnan M, et al. Aggressive serous epithelial ovarian cancer is potentially propagated by EpCAM+CD45+ phenotype. Oncogene. 2018 Apr;37(16):2089-2103. doi: 10.1038/s41388-017-0106-y.

Akhurst RJ, Derynck R. TGF-beta signaling in cancer--a double-edged sword. Trends Cell Biol. 2001 Nov;11(11):S44-51. doi: 10.1016/s0962-8924(01)02130-4.

Alama A, Gangemi R, Ferrini S, Barisione G, Orengo AM, Truini M, et al. CD133-Positive Cells from Non-Small Cell Lung Cancer Show Distinct Sensitivity to Cisplatin and Afatinib. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2015 Jun;63(3):207-14. doi: 10.1007/s00005-015-0330-5.

<sup>\*</sup> 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.

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 Apr 1;100(7):3983-8. doi: 10.1073/pnas.0530291100. Epub 2003 Mar 10. Erratum in: Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 May 27;100(11):6890.

Ali S, Ahmad A, Banerjee S, Padhye S, Dominiak K, Schaffert JM, et al. Gemcitabine sensitivity can be induced in pancreatic cancer cells through modulation of miR-200 and miR-21 expression by curcumin or its analogue CDF. Cancer Res. 2010 May 1;70(9):3606-17. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4598. Epub 2010 Apr 13. Retraction in: Cancer Res. 2018 Sep 15;78(18):5466.

Almangush A, Coletta RD, Bello IO, Bitu C, Keski-Säntti H, Mäkinen LK, et al. A simple novel prognostic model for early stage oral tongue cancer. Int J Oral Maxillofac Surg. 2015 Feb;44(2):143-50. doi: 10.1016/j.ijom.2014.10.004.

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

Almangush A, Mäkitie AA, Triantafyllou A, de Bree R, Strojan P, Rinaldo A, et al. Staging and grading of oral squamous cell carcinoma: An update. Oral Oncol. 2020 Aug;107:104799. doi: 10.1016/j.oraloncology.2020.104799.

Alo' PL, Visca P, Marci A, Mangoni A, Botti C, Di Tondo U. Expression of fatty acid synthase (FAS) as a predictor of recurrence in stage I breast carcinoma patients. Cancer. 1996 Feb 1;77(3):474-82. doi: 10.1002/(SICI)1097-0142(19960201)77:3<474::AID-CNCR8>3.0.CO;2-K.

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

Arya V, Singh S, Daniel MJ. Clinicopathological correlation of Bcl-2 oncoprotein expression in oral precancer and cancer. J Oral Biol Craniofac Res. 2016 Jan-Apr;6(1):18-23. doi: 10.1016/j.jobcr.2015.12.011.

Atashzar MR, Baharlou R, Karami J, Abdollahi H, Rezaei R, Pourramezan F, et al. Cancer stem cells: A review from origin to therapeutic implications. J Cell Physiol. 2020 Feb;235(2):790-803. doi: 10.1002/jcp.29044.

Babaei G, Aziz SG, Jaghi NZZ. EMT, cancer stem cells and autophagy; The three main axes of metastasis. Biomed Pharmacother. 2021 Jan;133:110909. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110909.

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

Baillie R, Itinteang T, Yu HH, Brasch HD, Davis PF, Tan ST. Cancer stem cells in moderately differentiated oral tongue squamous cell carcinoma. J Clin Pathol. 2016 Aug;69(8):742-4. doi: 10.1136/jclinpath-2015-203599.

Baillie R, Tan ST, Itinteang T. Cancer Stem Cells in Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma: A Review. Front Oncol. 2017 Jun 2;7:112. doi: 10.3389/fonc.2017.00112.

Banerjee S, Modi S, McGinn O, Zhao X, Dudeja V, Ramakrishnan S, et al. Impaired Synthesis of Stromal Components in Response to Minnelide Improves Vascular Function, Drug Delivery, and Survival in Pancreatic Cancer. Clin Cancer Res. 2016 Jan 15;22(2):415-25. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1155.

Bao B, Ahmad A, Azmi AS, Ali S, Sarkar FH. Overview of cancer stem cells (CSCs) and mechanisms of their regulation: implications for cancer therapy. Curr Protoc Pharmacol. 2013 Jun;Chapter 14:Unit 14.25. doi: 10.1002/0471141755.ph1425s61.

Barbato L, Bocchetti M, Di Biase A, Regad T. Cancer Stem Cells and Targeting Strategies. Cells. 2019 Aug 18;8(8):926. doi: 10.3390/cells8080926.

Barnes JM, Kaushik S, Bainer RO, Sa JK, Woods EC, Kai F, et al. A tension-mediated glycocalyx-integrin feedback loop promotes mesenchymal-like glioblastoma. Nat Cell Biol. 2018 Oct;20(10):1203-1214. doi: 10.1038/s41556-018-0183-3.

Bartesaghi S, Graziano V, Galavotti S, Henriquez NV, Betts J, Saxena J, et al. Inhibition of oxidative metabolism leads to p53 genetic inactivation and transformation in neural stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Jan 27;112(4):1059-64. doi: 10.1073/pnas.1413165112. Barth AIM, Kim H, Riedel-Kruse IH. Regulation of epithelial migration by epithelial cell adhesion molecule requires its Claudin-7 interaction domain. PLoS One. 2018 Oct 10;13(10):e0204957. doi: 10.1371/journal.pone.0204957.

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

Batlle E, Clevers H. Cancer stem cells revisited. Nat Med. 2017 Oct 6;23(10):1124-1134. doi: 10.1038/nm.4409.

Behrens J. Cell contacts, differentiation, and invasiveness of epithelial cells. Invasion Metastasis. 1994-1995;14(1-6):61-70.

Bertolus C, Goudot P, Gessain A, Berthet N. Clinical relevance of systematic human papillomavirus (HPV) diagnosis in oral squamous cell carcinoma. Infect Agent Cancer. 2012 May 30;7(1):13. doi: 10.1186/1750-9378-7-13.

Bhatia A, Kumar Y. Cancer stem cells and tumor immunoediting: putting two and two together. Expert Rev Clin Immunol. 2016 Jun;12(6):605-7. doi: 10.1586/1744666X.2016.1159133.

Bhatt AP, Jacobs SR, Freemerman AJ, Makowski L, Rathmell JC, et al. Dysregulation of fatty acid synthesis and glycolysis in non-Hodgkin lymphoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Jul 17;109(29):11818-23. doi: 10.1073/pnas.1205995109.

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

Bourguignon LY, Zhu H, Shao L, Zhu D, Chen YW. Rho-kinase (ROK) promotes CD44v(3,8-10)-ankyrin interaction and tumor cell migration in metastatic breast cancer cells. Cell Motil Cytoskeleton. 1999;43(4):269-87. doi: 10.1002/(SICI)1097-0169(1999)43:4<269::AID-CM1>3.0.CO;2-5.

Braakhuis BJ, Bloemena E, Leemans CR, Brakenhoff RH. Molecular analysis of surgical margins in head and neck cancer: more than a marginal issue. Oral Oncol. 2010 Jul;46(7):485-91. doi: 10.1016/j.oraloncology.2010.01.019.

Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T. Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. Nat Rev Cancer. 2005 Sep;5(9):744-9. doi: 10.1038/nrc1694.

Brabletz T. To differentiate or not--routes towards metastasis. Nat Rev Cancer. 2012 May 11;12(6):425-36. doi: 10.1038/nrc3265.

Bruce WR, van der Gaag H. A Quantitative Assay for the number of murine lymphoma cells capable of proliferation in vivo. Nature. 1963 Jul 6;199:79-80. doi: 10.1038/199079a0.

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

Cai Y, Wang J, Zhang L, Wu D, Yu D, Tian X, et al. Expressions of fatty acid synthase and HER2 are correlated with poor prognosis of ovarian cancer. Med Oncol. 2015 Jan;32(1):391. doi: 10.1007/s12032-014-0391-z.

Cai Z, Cao Y, Luo Y, Hu H, Ling H. Signalling mechanism(s) of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells in tumour therapeutic resistance. Clin Chim Acta. 2018 Aug;483:156-163. doi: 10.1016/j.cca.2018.04.033.

Camassei FD, Cozza R, Acquaviva A, Jenkner A, Ravà L, Gareri R, et al. Expression of the lipogenic enzyme fatty acid synthase (FAS) in retinoblastoma and its correlation with tumor aggressiveness. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003 Jun;44(6):2399-403. doi: 10.1167/iovs.02-0934.

Carvalho MA, Zecchin KG, Seguin F, Bastos DC, Agostini M, Rangel AL, et al. Fatty acid synthase inhibition with Orlistat promotes apoptosis and reduces cell growth and lymph node metastasis in a mouse melanoma model. Int J Cancer. 2008 Dec 1;123(11):2557-65. doi: 10.1002/ijc.23835.

Chaffer CL, Brennan JP, Slavin JL, Blick T, Thompson EW, Williams ED. Mesenchymal-to-epithelial transition facilitates bladder cancer metastasis: role of fibroblast growth factor receptor-2. Cancer Res. 2006 Dec 1;66(23):11271-8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2044.

Chaffer CL, Thompson EW, Williams ED. Mesenchymal to epithelial transition in development and disease. Cells Tissues Organs. 2007;185(1-3):7-19. doi: 10.1159/000101298.

Chaffer CL, San Juan BP, Lim E, Weinberg RA. EMT, cell plasticity and metastasis. Cancer Metastasis Rev. 2016 Dec;35(4):645-654. doi: 10.1007/s10555-016-9648-7.

Chandel NS. Evolution of Mitochondria as Signaling Organelles. Cell Metab. 2015 Aug 4;22(2):204-6. doi: 10.1016/j.cmet.2015.05.013. Epub 2015 Jun 11.

Chang G, Zhang H, Wang J, Zhang Y, Xu H, Wang C, et al. CD44 targets Wnt/βcatenin pathway to mediate the proliferation of K562 cells. Cancer Cell Int. 2013 Nov 20;13(1):117. doi: 10.1186/1475-2867-13-117.

Chaudry MA, Sales K, Ruf P, Lindhofer H, Winslet MC. EpCAM an immunotherapeutic target for gastrointestinal malignancy: current experience and future challenges. Br J Cancer. 2007 Apr 10;96(7):1013-9. doi: 10.1038/sj.bjc.6603505.

Chen X, Lingala S, Khoobyari S, Nolta J, Zern MA, Wu J. Epithelial mesenchymal transition and hedgehog signaling activation are associated with chemoresistance and invasion of hepatoma subpopulations. J Hepatol. 2011 Oct;55(4):838-45. doi: 10.1016/j.jhep.2010.12.043.

Chen HW, Chang YF, Chuang HY, Tai WT, Hwang JJ. Targeted therapy with fatty acid synthase inhibitors in a human prostate carcinoma LNCaP/tk-luc-bearing animal model. Prostate Cancer Prostatic Dis. 2012 Sep;15(3):260-4. doi: 10.1038/pcan.2012.15.

Chen K, Huang YH, Chen JL. Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. Acta Pharmacol Sin. 2013 Jun;34(6):732-40. doi: 10.1038/aps.2013.27.

Chen CL, Uthaya Kumar DB, Punj V, Xu J, Sher L, Tahara SM, et al. NANOG Metabolically Reprograms Tumor-Initiating Stem-like Cells through Tumorigenic Changes in Oxidative Phosphorylation and Fatty Acid Metabolism. Cell Metab. 2016 Jan 12;23(1):206-19. doi: 10.1016/j.cmet.2015.12.004.

Chen C, Zhao S, Karnad A, Freeman JW. The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications. J Hematol Oncol. 2018 May 10;11(1):64. doi: 10.1186/s13045-018-0605-5.

Chen C, Okita Y, Watanabe Y, Abe F, Fikry MA, Ichikawa Y, et al. Glycoprotein nmb Is Exposed on the Surface of Dormant Breast Cancer Cells and Induces Stem Cell-like Properties. Cancer Res. 2018 Nov 15;78(22):6424-6435. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0599.

Cheng Y, Li S, Gao L, Zhi K, Ren W. The Molecular Basis and Therapeutic Aspects of Cisplatin Resistance in Oral Squamous Cell Carcinoma. Front Oncol. 2021 Oct 22;11:761379. doi: 10.3389/fonc.2021.761379.

Chi AC, Day TA, Neville BW. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma - an update. CA Cancer J Clin. 2015 Sep-Oct;65(5):401-21. doi: 10.3322/caac.21293.

Chitapanarux I, Lorvidhaya V, Sittitrai P, Pattarasakulchai T, Tharavichitkul E, Sriuthaisiriwong P, et al. Oral cavity cancers at a young age: analysis of patient, tumor and treatment characteristics in Chiang Mai University Hospital. Oral Oncol. 2006 Jan;42(1):83-8. doi: 10.1016/j.oraloncology.2005.06.015.

Cho Y, Kim YK. Cancer Stem Cells as a Potential Target to Overcome Multidrug Resistance. Front Oncol. 2020 Jun 2;10:764. doi: 10.3389/fonc.2020.00764.

Cho SH, Park YS, Kim HJ, Kim CH, Lim SW, Huh JW, et al. CD44 enhances the epithelial-mesenchymal transition in association with colon cancer invasion. Int J Oncol. 2012 Jul;41(1):211-8. doi: 10.3892/ijo.2012.1453.

Chou TC and Martin N. CompuSyn for Drug Combinations: PC Software and User's Guide: A Computer Program for Quantitation of Synergism and Antagonism in Drug Combinations, and the Determination of IC50 and ED50 and LD50 Values, ComboSyn Inc, Paramus, (NJ). 2005.

Ciavardelli D, Rossi C, Barcaroli D, Volpe S, Consalvo A, Zucchelli M, et al. Breast cancer stem cells rely on fermentative glycolysis and are sensitive to 2-deoxyglucose treatment. Cell Death Dis. 2014 Jul 17;5(7):e1336. doi: 10.1038/cddis.2014.285.

Cook RL, Thompson EL, Kelso NE, Friary J, Hosford J, Barkley P, et al. Sexual behaviors and other risk factors for oral human papillomavirus infections in young women. Sex Transm Dis. 2014 Aug;41(8):486-92. doi: 10.1097/OLQ.000000000000159.

Coutinho-Camillo CM, Lourenço SV, Nishimoto IN, Kowalski LP, Soares FA. Expression of Bcl-2 family proteins and association with clinicopathological characteristics of oral squamous cell carcinoma. Histopathology. 2010 Aug;57(2):304-16. doi: 10.1111/j.1365-2559.2010.03621.x.

Crabtree JS, Miele L. Breast Cancer Stem Cells. Biomedicines. 2018 Jul 17;6(3):77. doi: 10.3390/biomedicines6030077.

Croker AK, Allan AL. Cancer stem cells: implications for the progression and treatment of metastatic disease. J Cell Mol Med. 2008 Apr;12(2):374-90. doi: 10.1111/j.1582-4934.2007.00211.x.

Cuadra Zelaya F. Efeitos do paclitaxel, cisplatina e inibidores da enzima ácido graxo sintase na expressão de marcadores associados às células-tronco do câncer e isolamento de subpopulações em linhagens celulares de carcinoma de células escamosas oral [tese]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas; 2019.

Cui W, Fowlis DJ, Bryson S, Duffie E, Ireland H, Balmain A, et al. TGFbeta1 inhibits the formation of benign skin tumors, but enhances progression to invasive spindle carcinomas in transgenic mice. Cell. 1996 Aug 23;86(4):531-42. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80127-0.

da Silva SD, Ferlito A, Takes RP, Brakenhoff RH, Valentin MD, Woolgar JA, et al. Advances and applications of oral cancer basic research. Oral Oncol. 2011;47:783-91.

Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. Cancer stem cells: models and concepts. Annu Rev Med. 2007;58:267-84. doi: 10.1146/annurev.med.58.062105.204854.

Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. Eur J Pharmacol. 2014 Oct 5;740:364-78. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025.

De Craene B, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. Nat Rev Cancer. 2013 Feb;13(2):97-110. doi: 10.1038/nrc3447.

De Falco V, Tamburrino A, Ventre S, Castellone MD, Malek M, Manié SN, et al. CD44 proteolysis increases CREB phosphorylation and sustains proliferation of thyroid cancer cells. Cancer Res. 2012 Mar 15;72(6):1449-58. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3320.

de Sousa FA, Paradella TC, Carvalho YR, Rosa LE. Comparative analysis of the expression of proliferating cell nuclear antigen, p53, bax, and bcl-2 in oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma. Ann Diagn Pathol. 2009 Oct;13(5):308-12. doi: 10.1016/j.anndiagpath.2009.06.001. Epub 2009 Jul 10. PMID: 19751907.

Deckers M, van Dinther M, Buijs J, Que I, Löwik C, van der Pluijm G, ten Dijke P. The tumor suppressor Smad4 is required for transforming growth factor beta-induced epithelial to mesenchymal transition and bone metastasis of breast cancer cells. Cancer Res. 2006 Feb 15;66(4):2202-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3560.

Derakhshani A, Rezaei Z, Safarpour H, Sabri M, Mir A, Sanati MA, et al. Overcoming trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancer using combination therapy. J Cell Physiol. 2020 Apr;235(4):3142-3156. doi: 10.1002/jcp.29216.

Dissanayaka WL, Pitiyage G, Kumarasiri PV, Liyanage RL, Dias KD, Tilakaratne WM. Clinical and histopathologic parameters in survival of oral squamous cell carcinoma. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2012 Apr;113(4):518-25. doi: 10.1016/j.0000.2011.11.001.

Driemel C, Kremling H, Schumacher S, Will D, Wolters J, Lindenlauf N, et al. Contextdependent adaption of EpCAM expression in early systemic esophageal cancer. Oncogene. 2014 Oct 9;33(41):4904-15. doi: 10.1038/onc.2013.441.

Du B, Shim JS. Targeting Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) to Overcome Drug Resistance in Cancer. Molecules. 2016 Jul 22;21(7):965. doi: 10.3390/molecules21070965.

Emmink BL, Verheem A, Van Houdt WJ, Steller EJ, Govaert KM, Pham TV, et al. The secretome of colon cancer stem cells contains drug-metabolizing enzymes. J Proteomics. 2013 Oct 8;91:84-96. doi: 10.1016/j.jprot.2013.06.027.

Epstein JI, Carmichael M, Partin AW. OA-519 (fatty acid synthase) as an independent predictor of pathologic state in adenocarcinoma of the prostate. Urology. 1995 Jan;45(1):81-6. doi: 10.1016/s0090-4295(95)96904-7.

Estilo CL, O-charoenrat P, Talbot S, Socci ND, Carlson DL, Ghossein R, et al. Oral tongue cancer gene expression profiling: Identification of novel potential prognosticators by oligonucleotide microarray analysis. BMC Cancer. 2009 Jan 12;9:11. doi: 10.1186/1471-2407-9-11.

Feitelson MA, Arzumanyan A, Kulathinal RJ, Blain SW, Holcombe RF, Mahajna J, et al. Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. Semin Cancer Biol. 2015 Dec;35 Suppl(Suppl):S25-S54. doi: 10.1016/j.semcancer.2015.02.006.

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

Fernando J, Malfettone A, Cepeda EB, Vilarrasa-Blasi R, Bertran E, Raimondi G, et al. A mesenchymal-like phenotype and expression of CD44 predict lack of apoptotic response to sorafenib in liver tumor cells. Int J Cancer. 2015 Feb 15;136(4):E161-72. doi: 10.1002/ijc.29097.

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

Folmes CD, Park S, Terzic A. Lipid metabolism greases the stem cell engine. Cell Metab. 2013 Feb 5;17(2):153-5. doi: 10.1016/j.cmet.2013.01.010.

Fornasier G, Francescon S, Baldo P. An Update of Efficacy and Safety of Cetuximab in Metastatic Colorectal Cancer: A Narrative Review. Adv Ther. 2018 Oct;35(10):1497-1509. doi: 10.1007/s12325-018-0791-0.

Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. Nat Protoc. 2006;1(5):2315-9. doi: 10.1038/nprot.2006.339.

Fu TY, Hsieh IC, Cheng JT, Tsai MH, Hou YY, Lee JH, et al. Association of OCT4, SOX2, and NANOG expression with oral squamous cell carcinoma progression. J Oral Pathol Med. 2016 Feb;45(2):89-95. doi: 10.1111/jop.12335.

Fukuda M, Kusama K, Sakashita H. Molecular insights into the proliferation and progression mechanisms of the oral cancer: Strategies for the effective and personalized therapy. Japanese Dental Science Review. 2012;48:23-41.

Gaiser MR, Lämmermann T, Feng X, Igyarto BZ, Kaplan DH, Tessarollo L, et al. Cancer-associated epithelial cell adhesion molecule (EpCAM; CD326) enables epidermal Langerhans cell motility and migration in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Apr 10;109(15):E889-97. doi: 10.1073/pnas.1117674109. Gansler TS, Hardman W 3rd, Hunt DA, Schaffel S, Hennigar RA. Increased expression of fatty acid synthase (OA-519) in ovarian neoplasms predicts shorter survival. Hum Pathol. 1997 Jun;28(6):686-92. doi: 10.1016/s0046-8177(97)90177-5.

Gao Y, Ruan B, Liu W, Wang J, Yang X, Zhang Z, et al. Knockdown of CD44 inhibits the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma both in vitro and in vivo by reversing epithelial-mesenchymal transition. Oncotarget. 2015 Apr 10;6(10):7828-37. doi: 10.18632/oncotarget.3488.

Gelebart P, Zak Z, Anand M, Belch A, Lai R. Blockade of fatty acid synthase triggers significant apoptosis in mantle cell lymphoma. PLoS One. 2012;7(4):e33738. doi: 10.1371/journal.pone.0033738.

Geleta B, Makonnen E, Abay SM. Cyclic dependent kinase (CDK): Role in cancer pathogenesis and as drug target in cancer therapeutics. Journal of Cancer Science and Therapy. 2016;8(6):160-167

Gires O, Pan M, Schinke H, Canis M, Baeuerle PA. Expression and function of epithelial cell adhesion molecule EpCAM: where are we after 40 years? Cancer Metastasis Rev. 2020 Sep;39(3):969-987. doi: 10.1007/s10555-020-09898-3.

Global Burden of Disease 2019 Cancer Collaboration, Kocarnik JM, Compton K, Dean FE, Fu W, Gaw BL, et al. Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life Years for 29 Cancer Groups From 2010 to 2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. JAMA Oncol. 2022 Mar 1;8(3):420-444. doi: 10.1001/jamaoncol.2021.6987.

Goodfellow PN, Banting G, Wiles MV, Tunnacliffe A, Parkar M, Solomon E, et al. The gene, MIC4, which controls expression of the antigen defined by monoclonal antibody F10.44.2, is on human chromosome 11. Eur J Immunol. 1982 Aug;12(8):659-63. doi: 10.1002/eji.1830120807.

Gostner JM, Fong D, Wrulich OA, Lehne F, Zitt M, Hermann M, et al. Effects of EpCAM overexpression on human breast cancer cell lines. BMC Cancer. 2011 Jan 31;11:45. doi: 10.1186/1471-2407-11-45. PMID: 21281469;

Gupta PB, Chaffer CL, Weinberg RA. Cancer stem cells: mirage or reality? Nat Med. 2009 Sep;15(9):1010-2. doi: 10.1038/nm0909-1010.

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

Gurtner K, Hessel F, Eicheler W, Dörfler A, Zips D, Heider KH, et al. Combined treatment of the immunoconjugate bivatuzumab mertansine and fractionated irradiation improves local tumour control in vivo. Radiother Oncol. 2012 Mar;102(3):444-9. doi: 10.1016/j.radonc.2011.10.013.

Hagiwara M, Kikuchi E, Tanaka N, Kosaka T, Mikami S, Saya H, et al. Variant isoforms of CD44 involves acquisition of chemoresistance to cisplatin and has potential as a novel indicator for identifying a cisplatin-resistant population in urothelial cancer. BMC Cancer. 2018 Jan 31;18(1):113. doi: 10.1186/s12885-018-3988-3.

Hale JS, Li M, Lathia JD. The malignant social network: cell-cell adhesion and communication in cancer stem cells. Cell Adh Migr. 2012 Jul-Aug;6(4):346-55. doi: 10.4161/cam.21294. Epub 2012 Jul 1.

Hamburger AW, Salmon SE. Primary bioassay of human tumor stem cells. Science. 1977 Jul 29;197(4302):461-3. doi: 10.1126/science.560061.

Hammoudi N, Ahmed KB, Garcia-Prieto C, Huang P. Metabolic alterations in cancer cells and therapeutic implications. Chin J Cancer. 2011 Aug;30(8):508-25. doi: 10.5732/cjc.011.10267.

Han J, Fujisawa T, Husain SR, Puri RK. Identification and characterization of cancer stem cells in human head and neck squamous cell carcinoma. BMC Cancer. 2014 Mar 11;14:173. doi: 10.1186/1471-2407-14-173.

Han J, Won M, Kim JH , Jung E , Min K , Jangili P , et al . Cancer stem cell-targeted bio-imaging and chemotherapeutic perspective. Chem Soc Rev. 2020 Nov 21;49(22):7856-7878. doi: 10.1039/d0cs00379d.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000 Jan 7;100(1):57-70. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9.

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

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

Hartner L. Chemotherapy for Oral Cancer. Dent Clin North Am. 2018 Jan;62(1):87-97. doi: 10.1016/j.cden.2017.08.006.

Hassn Mesrati M, Behrooz AB, Y Abuhamad A, Syahir A. Understanding Glioblastoma Biomarkers: Knocking a Mountain with a Hammer. Cells. 2020 May 16;9(5):1236. doi: 10.3390/cells9051236.

Hassn Mesrati M, Syafruddin SE, Mohtar MA, Syahir A. CD44: A Multifunctional Mediator of Cancer Progression. Biomolecules. 2021 Dec 9;11(12):1850. doi: 10.3390/biom11121850.

Haya-Fernández MC, Bagán JV, Murillo-Cortés J, Poveda-Roda R, Calabuig C. The prevalence of oral leukoplakia in 138 patients with oral squamous cell carcinoma. Oral Dis. 2004 Nov;10(6):346-8. doi: 10.1111/j.1601-0825.2004.01031.x.

Hecht SS. Research opportunities related to establishing standards for tobacco products under the Family Smoking Prevention and Tobacco Control Act. Nicotine Tob Res. 2012 Jan;14(1):18-28. doi: 10.1093/ntr/ntq216.

Herlyn M, Steplewski Z, Herlyn D, Koprowski H. Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979 Mar;76(3):1438-42. doi: 10.1073/pnas.76.3.1438.

Hiraga T, Nakamura H. Comparable roles of CD44v8-10 and CD44s in the development of bone metastases in a mouse model. Oncol Lett. 2016 Oct;12(4):2962-2969. doi: 10.3892/ol.2016.4985.

Hirota SK, Migliari DA, Sugaya NN. Oral squamous cell carcinoma in a young patient: case report and literature review. An. Bras. Dermatol. 81(3):251-254. 2006 June; doi: 10.1590/S0365-05962006000300007.

Hoeppner J, Bronsert P. Metastasis and Tumor Cell Migration of Solid Tumors. Cancers (Basel). 2021 Nov 8;13(21):5576. doi: 10.3390/cancers13215576.

Hoeppner J, Bronsert P. Metastasis and Tumor Cell Migration of Solid Tumors. Cancers (Basel). 2021 Nov 8;13(21):5576. doi: 10.3390/cancers13215576. Hong T, Watanabe K, Ta CH, Villarreal-Ponce A, Nie Q, Dai X. An Ovol2-Zeb1 Mutual Inhibitory Circuit Governs Bidirectional and Multi-step Transition between Epithelial and Mesenchymal States. PLoS Comput Biol. 2015 Nov 10;11(11):e1004569. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004569.

Horiguchi A, Asano T, Asano T, Ito K, Sumitomo M, Hayakawa M. Pharmacological inhibitor of fatty acid synthase suppresses growth and invasiveness of renal cancer cells. J Urol. 2008 Aug;180(2):729-36. doi: 10.1016/j.juro.2008.03.186.

Hsu PJ, Yan K, Shi H, Izumchenko E, Agrawal N. Molecular biology of oral cavity squamous cell carcinoma. Oral Oncol. 2020 Mar;102:104552. doi: 10.1016/j.oraloncology.2019.104552.

Hu J, Mirshahidi S, Simental A, Lee SC, De Andrade Filho PA, Peterson NR, et al. Cancer stem cell self-renewal as a therapeutic target in human oral cancer. Oncogene. 2019 Jul;38(27):5440-5456. doi: 10.1038/s41388-019-0800-z.

Huang SH, O'Sullivan B. Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. Curr Treat Options Oncol. 2017 Jul;18(7):40. doi: 10.1007/s11864-017-0484-y.

Huang RY, Wong MK, Tan TZ, Kuay KT, Ng AH, Chung VY, et al. An EMT spectrum defines an anoikis-resistant and spheroidogenic intermediate mesenchymal state that is sensitive to e-cadherin restoration by a src-kinase inhibitor, saracatinib (AZD0530). Cell Death Dis. 2013 Nov 7;4(11):e915. doi: 10.1038/cddis.2013.442.

Huang B, Yan X, Li Y. Cancer Stem Cell for Tumor Therapy. Cancers (Basel). 2021 Sep 26;13(19):4814. doi: 10.3390/cancers13194814.

lida N, Bourguignon LY. Coexpression of CD44 variant (v10/ex14) and CD44S in human mammary epithelial cells promotes tumorigenesis. J Cell Physiol. 1997 May;171(2):152-60. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(199705)171:2<152::AID-JCP5>3.0.CO;2-N.

lida J, Clancy R, Dorchak J, Somiari RI, Somiari S, Cutler ML, e tal. DNA aptamers against exon v10 of CD44 inhibit breast cancer cell migration. PLoS One. 2014 Feb 19;9(2):e88712. doi: 10.1371/journal.pone.0088712.

Imrich S, Hachmeister M, Gires O. EpCAM and its potential role in tumor-initiating cells. Cell Adh Migr. 2012 Jan-Feb;6(1):30-8. doi: 10.4161/cam.18953. Inchingolo F, Santacroce L, Ballini A, Topi S, Dipalma G, Haxhirexha K, et al. Oral Cancer: A Historical Review. Int J Environ Res Public Health. 2020 May 2;17(9):3168. doi: 10.3390/ijerph17093168.

Inman GJ. Switching TGFβ from a tumor suppressor to a tumor promoter. Curr Opin Genet Dev. 2011 Feb;21(1):93-9. doi: 10.1016/j.gde.2010.12.004.

Instituto Nacional de Câncer - INCA. Câncer de boca, [acesso 2022 Jan 27]. Disponível em URL: <u>https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-boca</u>.

Instituto Nacional de Câncer - INCA. Estatísticas de câncer, [acesso 2022 Jan 27]. Disponível em URL: <u>https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer</u>

Jain A. Chapter 2: Molecular Pathogenesis of Oral Squamous Cell Carcinoma. In: Hamid, ED. Squamous Cell Carcinoma - Hallmark and Treatment Modalities. London: 2020. May doi:10.5772/intechopen.85650.

Janiszewska M, Primi MC, Izard T. Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. J Biol Chem. 2020 Feb 21;295(8):2495-2505. doi: 10.1074/jbc.REV119.007759.

Jariyal H, Gupta C, Bhat VS, Wagh JR, Srivastava A. Advancements in Cancer Stem Cell Isolation and Characterization. Stem Cell Rev Rep. 2019 Dec;15(6):755-773. doi: 10.1007/s12015-019-09912-4.

Jayachandran A, Dhungel B, Steel JC. Epithelial-to-mesenchymal plasticity of cancer stem cells: therapeutic targets in hepatocellular carcinoma. J Hematol Oncol. 2016 Aug 30;9(1):74. doi: 10.1186/s13045-016-0307-9.

Jensen V, Ladekarl M, Holm-Nielsen P, Melsen F, Soerensen FB. The prognostic value of oncogenic antigen 519 (OA-519) expression and proliferative activity detected by antibody MIB-1 in node-negative breast cancer. J Pathol. 1995 Aug;176(4):343-52. doi: 10.1002/path.1711760405.

Jiang W, Zhang Y, Kane KT, Collins MA, Simeone DM, di Magliano MP, Nguyen KT. CD44 regulates pancreatic cancer invasion through MT1-MMP. Mol Cancer Res. 2015 Jan;13(1):9-15. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0076.

Johnson NW, Jayasekara P, Amarasinghe AA. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. Periodontol 2000. 2011 Oct;57(1):19-37. doi: 10.1111/j.1600-0757.2011.00401.x.

Jolly MK, Tripathi SC, Jia D, Mooney SM, Celiktas M, Hanash SM, et al. Stability of the hybrid epithelial/mesenchymal phenotype. Oncotarget. 2016 May 10;7(19):27067-84. doi: 10.18632/oncotarget.8166.

Jolly MK, Boareto M, Debeb BG, Aceto N, Farach-Carson MC, Woodward WA, Levine H. Inflammatory breast cancer: a model for investigating cluster-based dissemination. NPJ Breast Cancer. 2017 Jun 6;3:21. doi: 10.1038/s41523-017-0023-9.

Jordan NV, Johnson GL, Abell AN. Tracking the intermediate stages of epithelialmesenchymal transition in epithelial stem cells and cancer. Cell Cycle. 2011 Sep 1;10(17):2865-73. doi: 10.4161/cc.10.17.17188.

Ju SY, Chiou SH, Su Y. Maintenance of the stemness in CD44(+) HCT-15 and HCT-116 human colon cancer cells requires miR-203 suppression. Stem Cell Res. 2014 Jan;12(1):86-100. doi: 10.1016/j.scr.2013.09.011.

Jutten B, Keulers TG, Schaaf MB, Savelkouls K, Theys J, Span PN, et al. EGFR overexpressing cells and tumors are dependent on autophagy for growth and survival. Radiother Oncol. 2013 Sep;108(3):479-83. doi: 10.1016/j.radonc.2013.06.033.

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. J Clin Invest. 2009 Jun;119(6):1420-8. doi: 10.1172/JCI39104.

Kannan K, Latha PN, Shanmugam G. Expression of bcl-2 oncoprotein in Indian oral squamous cell carcinomas. Oral Oncol. 1998 Sep;34(5):373-6. doi: 10.1016/s1368-8375(98)00037-2.

Keller L, Werner S, Pantel K. Biology and clinical relevance of EpCAM. Cell Stress. 2019 May 21;3(6):165-180. doi: 10.15698/cst2019.06.188.

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

Kobayashi K, Matsumoto H, Matsuyama H, Fujii N, Inoue R, Yamamoto Y, Nagao K. Clinical significance of CD44 variant 9 expression as a prognostic indicator in bladder cancer. Oncol Rep. 2016 Nov;36(5):2852-2860. doi: 10.3892/or.2016.5061.

Koontongkaew S. The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. J Cancer. 2013;4(1):66-83. doi: 10.7150/jca.5112.

Krontiras H, Roye GD, Beenken SE, Myers RB, Mayo MS, Peters GE, Grizzle WE. Fatty acid synthase expression is increased in neoplastic lesions of the oral tongue. Head Neck. 1999 Jul;21(4):325-9. doi: 10.1002/(sici)1097-0347(199907)21:4<325::aid-hed6>3.0.co;2-p.

Kowalski LP, Oliveira MM, Lopez RVM, Silva DRME, Ikeda MK, Curado MP. Survival trends of patients with oral and oropharyngeal cancer treated at a cancer center in São Paulo, Brazil. Clinics (Sao Paulo). 2020 Apr 6;75:e1507. doi: 10.6061/clinics/2020/e1507.

Kruse AL, Bredell M, Grätz KW. Oral cancer in men and women: are there differences? Oral Maxillofac Surg. 2011 Mar;15(1):51-5. doi: 10.1007/s10006-010-0253-6.

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

Kumar M, Nanavati R, Modi TG, Dobariya C. Oral cancer: Etiology and risk factors: A review. J Cancer Res Ther. 2016 Apr-Jun;12(2):458-63. doi: 10.4103/0973-1482.186696.

Kuriyama S, Yoshida M, Yano S, Aiba N, Kohno T, Minamiya Y, et al. LPP inhibits collective cell migration during lung cancer dissemination. Oncogene. 2016 Feb 25;35(8):952-64. doi: 10.1038/onc.2015.155.

Kuşoğlu A, Biray Avcı Ç. Cancer stem cells: A brief review of the current status. Gene. 2019 Jan 10;681:80-85. doi: 10.1016/j.gene.2018.09.052.

Lai CJ, Lin CY, Liao WY, Hour TC, Wang HD, Chuu CP. CD44 Promotes Migration and Invasion of Docetaxel-Resistant Prostate Cancer Cells Likely via Induction of Hippo-Yap Signaling. Cells. 2019 Mar 30;8(4):295. doi: 10.3390/cells8040295. Langenskiöld M, Holmdahl L, Falk P, Angenete E, Ivarsson ML. Increased TGF-beta 1 protein expression in patients with advanced colorectal cancer. J Surg Oncol. 2008 Apr 1;97(5):409-15. doi: 10.1002/jso.20961.

Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. Nature. 1994 Feb 17;367(6464):645-8. doi: 10.1038/367645a0.

Latifi A, Abubaker K, Castrechini N, Ward AC, Liongue C, Dobill F, et al. Cisplatin treatment of primary and metastatic epithelial ovarian carcinomas generates residual cells with mesenchymal stem cell-like profile. J Cell Biochem. 2011 Oct;112(10):2850-64. doi: 10.1002/jcb.23199.

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

Lei MML, Lee TKW. Cancer Stem Cells: Emerging Key Players in Immune Evasion of Cancers. Front Cell Dev Biol. 2021 Jun 21;9:692940. doi: 10.3389/fcell.2021.692940.

Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. Cell. 2010 Jun 25;141(7):1117-34. doi: 10.1016/j.cell.2010.06.011.

Li J, Zhou BP. Activation of β-catenin and Akt pathways by Twist are critical for the maintenance of EMT associated cancer stem cell-like characters. BMC Cancer. 2011 Feb 1;11:49. doi: 10.1186/1471-2407-11-49.

Li L, Hao X, Qin J, Tang W, He F, Smith A, et al. Antibody against CD44s inhibits pancreatic tumor initiation and postradiation recurrence in mice. Gastroenterology. 2014 Apr;146(4):1108-18. doi: 10.1053/j.gastro.2013.12.035.

Li X, Ma X, Chen L, Gu L, Zhang Y, Zhang F, et al. Prognostic value of CD44 expression in renal cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. Sci Rep. 2015 Aug 19;5:13157. doi: 10.1038/srep13157.

Li X, Meng Y, Xie C, Zhu J, Wang X, Li Y, et al. Diallyl Trisulfide inhibits breast cancer stem cells via suppression of Wnt/β-catenin pathway. J Cell Biochem. 2018 May;119(5):4134-4141. doi: 10.1002/jcb.26613.

Li H, Feng Z, He ML. Lipid metabolism alteration contributes to and maintains the properties of cancer stem cells. Theranostics. 2020 May 30;10(16):7053-7069. doi: 10.7150/thno.41388.

Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. Nat Protoc. 2007;2(2):329-33. doi: 10.1038/nprot.2007.30.

Lim JR, Mouawad J, Gorton OK, Bubb WA, Kwan AH. Cancer stem cell characteristics and their potential as therapeutic targets. Med Oncol. 2021 May 29;38(7):76. doi: 10.1007/s12032-021-01524-8.

Lin CW, Liao MY, Lin WW, Wang YP, Lu TY, Wu HC. Epithelial cell adhesion molecule regulates tumor initiation and tumorigenesis via activating reprogramming factors and epithelial-mesenchymal transition gene expression in colon cancer. J Biol Chem. 2012 Nov 16;287(47):39449-59. doi: 10.1074/jbc.M112.386235.

Liu Y, Yang M, Luo J, Zhou H. Radiotherapy targeting cancer stem cells "awakens" them to induce tumour relapse and metastasis in oral cancer. Int J Oral Sci. 2020 Jun 24;12(1):19. doi: 10.1038/s41368-020-00087-0.

Liu ZL, Wang G, Peng AF, Luo QF, Zhou Y, Huang SH. Fatty acid synthase expression in osteosarcoma and its correlation with pulmonary metastasis. Oncol Lett. 2012 Nov;4(5):878-882. doi: 10.3892/ol.2012.862.

Liu ZL, Zhou Y, Luo QF, Hu M, Wang G, Huang SH, Shu Y. Inhibition of fatty acid synthase supresses osteosarcoma cell invasion and migration. Indian J Pathol Microbiol. 2012 Apr-Jun;55(2):163-9. doi: 10.4103/0377-4929.97849.

Liu H, Zhang Z, Song L, Gao J, Liu Y. Lipid metabolism of cancer stem cells. Oncol Lett. 2022 Apr;23(4):119. doi: 10.3892/ol.2022.13239.

Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF. The biology of cancer stem cells. Annu Rev Cell Dev Biol. 2007;23:675-99. doi: 10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104154.

Loh TJ, Moon H, Cho S, Jang H, Liu YC, Tai H, et al. CD44 alternative splicing and hnRNP A1 expression are associated with the metastasis of breast cancer. Oncol Rep. 2015 Sep;34(3):1231-8. doi: 10.3892/or.2015.4110.

Loh CY, Chai JY, Tang TF, Wong WF, Sethi G, Shanmugam MK, et al. The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. Cells. 2019 Sep 20;8(10):1118. doi: 10.3390/cells8101118.

Longo BC, Pereira EC, Rossi DC, Pereira LS, Coletta RD, Morais CF, et al. Estudo comparativo de duas classificações histopatológicas para carcinoma de células escamosas bucal. J Bras Patol. Med Lab. 2021; 57: 1-8. doi: 10.5935/1676-2444.20210039.

Lopus M. Antibody-DM1 conjugates as cancer therapeutics. Cancer Lett. 2011 Aug 28;307(2):113-8. doi: 10.1016/j.canlet.2011.03.017.

Lorch JH, Posner MR, Wirth LJ, Haddad RI. Seeking alternative biological therapies: the future of targeted molecular treatment. Oral Oncol. 2009 Apr-May;45(4-5):447-53. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.08.009.

Loro LL, Johannessen AC, Vintermyr OK. Decreased expression of bcl-2 in moderate and severe oral epithelia dysplasias. Oral Oncol. 2002 Oct;38(7):691-8. doi: 10.1016/s1368-8375(02)00002-7.

Mackenzie IC. Growth of malignant oral epithelial stem cells after seeding into organotypical cultures of normal mucosa. J Oral Pathol Med. 2004 Feb;33(2):71-8. doi: 10.1111/j.1600-0714.2004.00157.x.

Maghzal N, Kayali HA, Rohani N, Kajava AV, Fagotto F. EpCAM controls actomyosin contractility and cell adhesion by direct inhibition of PKC. Dev Cell. 2013 Nov 11;27(3):263-77. doi: 10.1016/j.devcel.2013.10.003.

Makena MR, Ranjan A, Thirumala V, Reddy AP. Cancer stem cells: Road to therapeutic resistance and strategies to overcome resistance. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2020 Apr 1;1866(4):165339. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.11.015.

Malik UU, Zarina S, Pennington SR. Oral squamous cell carcinoma: Key clinical questions, biomarker discovery, and the role of proteomics. Arch Oral Biol. 2016 Mar;63:53-65. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.11.017.

Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelialmesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. Cell. 2008 May 16;133(4):704-15. doi: 10.1016/j.cell.2008.03.027. Mannelli G, Gallo O. Cancer stem cells hypothesis and stem cells in head and neck cancers. Cancer Treat Rev. 2012 Aug;38(5):515-39. doi: 10.1016/j.ctrv.2011.11.007.

Marhaba R, Klingbeil P, Nuebel T, Nazarenko I, Buechler MW, Zoeller M. CD44 and EpCAM: cancer-initiating cell markers. Curr Mol Med. 2008 Dec;8(8):784-804. doi: 10.2174/156652408786733667.

Markopoulos AK. Current aspects on oral squamous cell carcinoma. Open Dent J. 2012;6:126-30. doi: 10.2174/1874210601206010126.

Mashima T, Seimiya H, Tsuruo T. De novo fatty-acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy. Br J Cancer. 2009 May 5;100(9):1369-72. doi: 10.1038/sj.bjc.6605007.

Massagué J. TGFbeta in Cancer. Cell. 2008 Jul 25;134(2):215-30. doi: 10.1016/j.cell.2008.07.001.

Mattiuzzi C, Lippi G. Current Cancer Epidemiology. J Epidemiol Glob Health. 2019 Dec;9(4):217-222. doi: 10.2991/jegh.k.191008.001.

Menendez JA, Lupu R. RNA interference-mediated silencing of the p53 tumorsuppressor protein drastically increases apoptosis after inhibition of endogenous fatty acid metabolism in breast cancer cells. Int J Mol Med. 2005 Jan;15(1):33-40.

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

Migita T, Ruiz S, Fornari A, Fiorentino M, Priolo C, Zadra G, et al. Fatty acid synthase: a metabolic enzyme and candidate oncogene in prostate cancer. J Natl Cancer Inst. 2009 Apr 1;101(7):519-32. doi: 10.1093/jnci/djp030.

Milian A, Bagan JV, Vera F. Squamous cell carcinoma of the oral cavity: a follow up study of 85 cases and analysis of prognostic variables. Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol. 1993 Mar-Jun;36(1-2):29-35.

Mima K, Okabe H, Ishimoto T, Hayashi H, Nakagawa S, Kuroki H, et al. CD44s regulates the TGF-β-mediated mesenchymal phenotype and is associated with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. Cancer Res. 2012 Jul 1;72(13):3414-23. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0299.

Mishra A, Sriram H, Chandarana P, Tanavde V, Kumar RV, Gopinath A, et al. Decreased expression of cell adhesion genes in cancer stem-like cells isolated from primary oral squamous cell carcinomas. Tumour Biol. 2018 May;40(5):1010428318780859. doi: 10.1177/1010428318780859.

Mishra MN, Chandavarkar V, Sharma R, Bhargava D. Structure, function and role of CD44 in neoplasia. J Oral Maxillofac Pathol. 2019 May-Aug;23(2):267-272. doi: 10.4103/jomfp.JOMFP\_246\_18.

Mittal V. Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Metastasis. Annu Rev Pathol. 2018 Jan 24;13:395-412. doi: 10.1146/annurev-pathol-020117-043854.

Moghbeli M, Moghbeli F, Forghanifard MM, Abbaszadegan MR. Cancer stem cell detection and isolation. Med Oncol. 2014 Sep;31(9):69. doi: 10.1007/s12032-014-0069-6.

Mohan A, Nalini V, Mallikarjuna K, Jyotirmay B, Krishnakumar S. Expression of motilityrelated protein MRP1/CD9, N-cadherin, E-cadherin, alpha-catenin and beta-catenin in retinoblastoma. Exp Eye Res. 2007 Apr;84(4):781-9. doi: 10.1016/j.exer.2006.06.014.

Mohtar MA, Syafruddin SE, Nasir SN, Low TY. Revisiting the Roles of Pro-Metastatic EpCAM in Cancer. Biomolecules. 2020 Feb 7;10(2):255. doi: 10.3390/biom10020255.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

Munz M, Baeuerle PA, Gires O. The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling. Cancer Res. 2009 Jul 15;69(14):5627-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0654.

Murugan AK, Munirajan AK, Tsuchida N. Ras oncogenes in oral cancer: the past 20 years. Oral Oncol. 2012 May;48(5):383-92. doi: 10.1016/j.oraloncology.2011.12.006.

Muthukrishnan A, Warnakulasuriya S. Oral health consequences of smokeless tobacco use. Indian J Med Res. 2018 Jul;148(1):35-40. doi: 10.4103/ijmr.IJMR\_1793\_17.

Najafi M, Farhood B, Mortezaee K. Cancer stem cells (CSCs) in cancer progression and therapy. J Cell Physiol. 2019 Jun;234(6):8381-8395. doi: 10.1002/jcp.27740.

Nam K, Oh S, Lee KM, Yoo SA, Shin I. CD44 regulates cell proliferation, migration, and invasion via modulation of c-Src transcription in human breast cancer cells. Cell Signal. 2015 Sep;27(9):1882-94. doi: 10.1016/j.cellsig.2015.05.002.

Nassar D, Blanpain C. Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. Annu Rev Pathol. 2016 May 23;11:47-76. doi: 10.1146/annurev-pathol-012615-044438.

Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. CA Cancer J Clin. 2002 Jul-Aug;52(4):195-215. doi: 10.3322/canjclin.52.4.195.

Nevo I, Woolard K, Cam M, Li A, Webster JD, Kotliarov Y, et al. Identification of molecular pathways facilitating glioma cell invasion in situ. PLoS One. 2014 Nov 3;9(11):e111783. doi: 10.1371/journal.pone.0111783.

Ni J, Cozzi PJ, Hao JL, Beretov J, Chang L, Duan W, et al. CD44 variant 6 is associated with prostate cancer metastasis and chemo-/radioresistance. Prostate. 2014 May;74(6):602-17. doi: 10.1002/pros.22775.

Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. Cell. 2016 Jun 30;166(1):21-45. doi: 10.1016/j.cell.2016.06.028.

Nimmakayala RK, Batra SK, Ponnusamy MP. Unraveling the journey of cancer stem cells from origin to metastasis. Biochim Biophys Acta Rev Cancer. 2019 Jan;1871(1):50-63. doi: 10.1016/j.bbcan.2018.10.006.

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 Aug 20;11(8):663. doi: 10.1038/s41419-020-02907-x.

Nör C, Zhang Z, Warner KA, Bernardi L, Visioli F, Helman JI, et al. Cisplatin induces Bmi-1 and enhances the stem cell fraction in head and neck cancer. Neoplasia. 2014 Feb;16(2):137-46. doi: 10.1593/neo.131744.

Noto Z, Yoshida T, Okabe M, Koike C, Fathy M, Tsuno Het al. CD44 and SSEA-4 positive cells in an oral cancer cell line HSC-4 possess cancer stem-like cell characteristics. Oral Oncol. 2013 Aug;49(8):787-95. doi: 10.1016/j.oraloncology.2013.04.012.

Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. Science. 1976 Oct 1;194(4260):23-8. doi: 10.1126/science.959840.

Okamoto A, Chikamatsu K, Sakakura K, Hatsushika K, Takahashi G, Masuyama K. Expansion and characterization of cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. Oral Oncol. 2009 Jul;45(7):633-9. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.10.003.

Okegawa T, Pong RC, Li Y, Hsieh JT. The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy. Acta Biochim Pol. 2004;51(2):445-57.

Orita H, Coulter J, Lemmon C, Tully E, Vadlamudi A, Medghalchi SM, et al. Selective inhibition of fatty acid synthase for lung cancer treatment. Clin Cancer Res. 2007 Dec 1;13(23):7139-45. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1186.

Oskarsson T, Batlle E, Massagué J. Metastatic stem cells: sources, niches, and vital pathways. Cell Stem Cell. 2014 Mar 6;14(3):306-21. doi: 10.1016/j.stem.2014.02.002.

Osta WA, Chen Y, Mikhitarian K, Mitas M, Salem M, Hannun YA, et al. EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy. Cancer Res. 2004 Aug 15;64(16):5818-24. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0754.

Padua D, Massagué J. Roles of TGFbeta in metastasis. Cell Res. 2009 Jan;19(1):89-102. doi: 10.1038/cr.2008.316.

Panarese I, Aquino G, Ronchi A, Longo F, Montella M, Cozzolino I, et al. Oral and Oropharyngeal squamous cell carcinoma: prognostic and predictive parameters in the etiopathogenetic route. Expert Rev Anticancer Ther. 2019 Feb;19(2):105-119. doi: 10.1080/14737140.2019.1561288.

Partridge M, Costea DE, Huang X. The changing face of p53 in head and neck cancer. Int J Oral Maxillofac Surg. 2007 Dec;36(12):1123-38. doi: 10.1016/j.ijom.2007.06.006.

 Pasche B. Role of transforming growth factor beta in cancer. J Cell Physiol. 2001

 Feb;186(2):153-68.
 doi:
 10.1002/1097-4652(200002)186:2<153::AID-</td>

 JCP1016>3.0.CO;2-J.
 JCP1016>3.0.CO;2-J.
 10.1002/1097-4652(200002)186:2<153::AID-</td>

Pascual G, Avgustinova A, Mejetta S, Martín M, Castellanos A, Attolini CS, et al. Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36. Nature. 2017 Jan 5;541(7635):41-45. doi: 10.1038/nature20791.

Pastò A, Bellio C, Pilotto G, Ciminale V, Silic-Benussi M, Guzzo G, et al. Cancer stem cells from epithelial ovarian cancer patients privilege oxidative phosphorylation, and resist glucose deprivation. Oncotarget. 2014 Jun 30;5(12):4305-19. doi: 10.18632/oncotarget.2010.

Pastushenko I, Blanpain C. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. Trends Cell Biol. 2019 Mar;29(3):212-226. doi: 10.1016/j.tcb.2018.12.001.

Pastushenko I, Brisebarre A, Sifrim A, Fioramonti M, Revenco T, Boumahdi S, et al. Identification of the tumour transition states occurring during EMT. Nature. 2018 Apr;556(7702):463-468. doi: 10.1038/s41586-018-0040-3.

Patel SG, Lydiatt WM. Staging of head and neck cancers: is it time to change the balance between the ideal and the practical? J Surg Oncol. 2008 Jun 15;97(8):653-7. doi: 10.1002/jso.21021.

Patel SS, Shah KA, Shah MJ, Kothari KC, Rawal RM. Cancer stem cells and stemness markers in oral squamous cell carcinomas. Asian Pac J Cancer Prev. 2014;15(20):8549-56. doi: 10.7314/apjcp.2014.15.20.8549.

Patil S. CD44 Sorted Cells Have an Augmented Potential for Proliferation, Epithelial-Mesenchymal Transition, Stemness, and a Predominantly Inflammatory Cytokine and Angiogenic Secretome. Curr Issues Mol Biol. 2021 Jun 21;43(1):423-433. doi: 10.3390/cimb43010034.

Petreaca M, Martins-Green M. (2013). The Dynamics of Cell-ECM Interactions, with Implications for Tissue Engineering. Principles of Tissue Engineering: Fourth Edition. 161-187. 10.1016/B978-0-12-398358-9.00009-4.

Piek E, Moustakas A, Kurisaki A, Heldin CH, ten Dijke P. TGF-(beta) type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells. J Cell Sci. 1999 Dec;112 (Pt 24):4557-68. doi: 10.1242/jcs.112.24.4557.

Pizer ES, Jackisch C, Wood FD, Pasternack GR, Davidson NE, Kuhajda FP. Inhibition of fatty acid synthesis induces programmed cell death in human breast cancer cells. Cancer Res. 1996 Jun 15;56(12):2745-7.

Pizer ES, Wood FD, Heine HS, Romantsev FE, Pasternack GR, Kuhajda FP. Inhibition of fatty acid synthesis delays disease progression in a xenograft model of ovarian cancer. Cancer Res. 1996 Mar 15;56(6):1189-93.

Plaks V, Kong N, Werb Z. The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? Cell Stem Cell. 2015 Mar 5;16(3):225-38. doi: 10.1016/j.stem.2015.02.015.

Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. Nat Rev Mol Cell Biol. 2003 Jan;4(1):33-45. doi: 10.1038/nrm1004.

Price KA, Cohen EE. Current treatment options for metastatic head and neck cancer. Curr Treat Options Oncol. 2012 Mar;13(1):35-46. doi: 10.1007/s11864-011-0176-y.

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 U S A. 2007 Jan 16;104(3):973-8. doi: 10.1073/pnas.0610117104.

Prudkin L, Liu DD, Ozburn NC, Sun M, Behrens C, Tang X, et al. Epithelial-tomesenchymal transition in the development and progression of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. Mod Pathol. 2009 May;22(5):668-78. doi: 10.1038/modpathol.2009.19.

Puisieux A, Brabletz T, Caramel J. Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. Nat Cell Biol. 2014 Jun;16(6):488-94. doi: 10.1038/ncb2976.

Puram SV, Tirosh I, Parikh AS, Patel AP, Yizhak K, Gillespie S, et al. Single-Cell Transcriptomic Analysis of Primary and Metastatic Tumor Ecosystems in Head and Neck Cancer. Cell. 2017 Dec 14;171(7):1611-1624.e24. doi: 10.1016/j.cell.2017.10.044.

Quan YH, Lim JY, Choi BH, Choi Y, Choi YH, Park JH, Kim HK. Self-targeted knockdown of CD44 improves cisplatin sensitivity of chemoresistant non-small cell lung cancer cells. Cancer Chemother Pharmacol. 2019 Mar;83(3):399-410. doi: 10.1007/s00280-018-3737-y.

Rabionet M, Polonio-Alcalá E, Relat J, Yeste M, Sims-Mourtada J, Kloxin AM, et al. Fatty acid synthase as a feasible biomarker for triple negative breast cancer stem cell subpopulation cultured on electrospun scaffolds. Mater Today Bio. 2021 Nov 16;12:100155. doi: 10.1016/j.mtbio.2021.100155.

Ragos V, S Mastronikolis N, Tsiambas E, Baliou E, N Mastronikolis S, Tsoukalas N, et al. p53 mutations in oral cavity carcinoma. J BUON. 2018 Nov-Dec;23(6):1569-1572.

Rashid A, Pizer ES, Moga M, Milgraum LZ, Zahurak M, Pasternack GR, et al. Elevated expression of fatty acid synthase and fatty acid synthetic activity in colorectal neoplasia. Am J Pathol. (1997) 150:201.

Reategui EP, de Mayolo AA, Das PM, Astor FC, Singal R, Hamilton KL, et al. Characterization of CD44v3-containing isoforms in head and neck cancer. Cancer Biol Ther. 2006 Sep;5(9):1163-8. doi: 10.4161/cbt.5.9.3065.

Reidy J, McHugh E, Stassen LF. A review of the relationship between alcohol and oral cancer. Surgeon. 2011 Oct;9(5):278-83. doi: 10.1016/j.surge.2011.01.010.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature. 2001 Nov 1;414(6859):105-11. doi: 10.1038/35102167.

Riaz N, Morris LG, Lee W, Chan TA. Unraveling the molecular genetics of head and neck cancer through genome-wide approaches. Genes Dis. 2014 Sep;1(1):75-86. doi: 10.1016/j.gendis.2014.07.002.

Rivera C, Venegas B. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review). Oncol Lett. 2014 Jul;8(1):7-11. doi: 10.3892/ol.2014.2103. Epub 2014 Apr 29.

Rivlin N, Brosh R, Oren M, Rotter V. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. Genes Cancer. 2011 Apr;2(4):466-74. doi: 10.1177/1947601911408889.

Rodini CO, Lopes NM, Lara VS, Mackenzie IC. Oral cancer stem cells - properties and consequences. J Appl Oral Sci. 2017 Nov-Dec;25(6):708-715. doi: 10.1590/1678-7757-2016-0665.

Roy S, Kar M, Roy S, Padhi S, Kumar A, Thakur S, et al. Inhibition of CD44 sensitizes cisplatin-resistance and affects Wnt/β-catenin signaling in HNSCC cells. Int J Biol Macromol. 2020 Apr 15;149:501-512. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.01.131.

Sadasivam S, Subramanian R. A perspective on challenges and opportunities in characterizing oral cancer stem cells. Front Biosci (Landmark Ed). 2020 Mar 1;25(6):1011-1021. doi: 10.2741/4845.

Salo T, Sutinen M, Hoque Apu E, Sundquist E, Cervigne NK, de Oliveira CE, et al. A novel human leiomyoma tissue derived matrix for cell culture studies. BMC Cancer. 2015 Dec 16;15:981. doi: 10.1186/s12885-015-1944-z.

Sancho P, Barneda D, Heeschen C. Hallmarks of cancer stem cell metabolism. Br J Cancer. 2016 Jun 14;114(12):1305-12. doi: 10.1038/bjc.2016.152.

Sapp JP, Eversole LR, Wysocki GP. Chapter 6: Epithelial Disorders. In: Oral and Maxillofacial Pathology. 2. ed. Mosby Year Book Inc, Maryland Heights, MO; 2004. p. 184-193.

Sarode G, Maniyar N, Sarode SC, Jafer M, Patil S, Awan KH. Epidemiologic aspects of oral cancer. Dis Mon. 2020 Dec;66(12):100988. doi: 10.1016/j.disamonth.2020.100988.

Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. Cell Mol Life Sci. 2011 Sep;68(18):3033-46. doi: 10.1007/s00018-011-0735-1.

Schcolnik-Cabrera A, Chávez-Blanco A, Domínguez-Gómez G, Taja-Chayeb L, Morales-Barcenas R, Trejo-Becerril C, et al. Orlistat as a FASN inhibitor and multitargeted agent for cancer therapy. Expert Opin Investig Drugs. 2018 May;27(5):475-489. doi: 10.1080/13543784.2018.1471132.

Schlessinger J. Receptor tyrosine kinases: legacy of the first two decades. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014 Mar 1;6(3):a008912. doi: 10.1101/cshperspect.a008912.

Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma overview. Oral Oncol. 2009 Apr-May;45(4-5):301-8. doi: 10.1016/j.oraloncology.2009.01.004. Seguin F, Carvalho MA, Bastos DC, Agostini M, Zecchin KG, Alvarez-Flores MP, Chudzinski-Tavassi AM, Coletta RD, Graner E. The fatty acid synthase inhibitor orlistat reduces experimental metastases and angiogenesis in B16-F10 melanomas. Br J Cancer. 2012 Sep 4;107(6):977-87. doi: 10.1038/bjc.2012.355.

Senbanjo LT, Chellaiah MA. CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. Front Cell Dev Biol. 2017 Mar 7;5:18. doi: 10.3389/fcell.2017.00018.

Shackleton M. Normal stem cells and cancer stem cells: similar and different. Semin Cancer Biol. 2010 Apr;20(2):85-92. doi: 10.1016/j.semcancer.2010.04.002.

Shah JP, Gil Z. Current concepts in management of oral cancer--surgery. Oral Oncol. 2009 Apr-May;45(4-5):394-401. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.05.017.

Shahoumi LA. Oral Cancer Stem Cells: Therapeutic Implications and Challenges. Front Oral Health. 2021 Jul 21;2:685236. doi: 10.3389/froh.2021.685236.

Shang Z, Cai Q, Zhang M, Zhu S, Ma Y, Sun L, et al. A switch from CD44<sup>+</sup> cell to EMT cell drives the metastasis of prostate cancer. Oncotarget. 2015 Jan 20;6(2):1202-16. doi: 10.18632/oncotarget.2841.

Shariat SF, Shalev M, Menesses-Diaz A, Kim IY, Kattan MW, Wheeler TM, Slawin KM. Preoperative plasma levels of transforming growth factor beta(1) (TGF-beta(1)) strongly predict progression in patients undergoing radical prostatectomy. J Clin Oncol. 2001 Jun 1;19(11):2856-64. doi: 10.1200/JCO.2001.19.11.2856.

Shurbaji MS, Kalbfleisch JH, Thurmond TS. Immunohistochemical detection of a fatty acid synthase (OA-519) as a predictor of progression of prostate cancer. Hum Pathol. 1996 Sep;27(9):917-21. doi: 10.1016/s0046-8177(96)90218-x.

Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. CA Cancer J Clin. 2021 Jan;71(1):7-33. doi: 10.3322/caac.21654.

Silva SD, Perez DE, Nishimoto IN, Alves FA, Pinto CA, Kowalski LP, Graner E. Fatty acid synthase expression in squamous cell carcinoma of the tongue: clinicopathological findings. Oral Dis. 2008 May;14(4):376-82.

Simon B, Podolsky DK, Moldenhauer G, Isselbacher KJ, Gattoni-Celli S, Brand SJ. Epithelial glycoprotein is a member of a family of epithelial cell surface antigens homologous to nidogen, a matrix adhesion protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Apr;87(7):2755-9. doi: 10.1073/pnas.87.7.2755.

Singh RD, Patel KR, Patel PS. "p53 mutation spectrum and its role in prognosis of oral cancer patients: A study from Gujarat, West India". Mutat Res. 2016 Jan;783:15-26. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2015.12.001.

Skvortsova I. Cancer Stem Cells: What Do We Know about Them? Cells. 2021 Jun 17;10(6):1528. doi: 10.3390/cells10061528.

Sneath RJ, Mangham DC. The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. Mol Pathol. 1998 Aug;51(4):191-200. doi: 10.1136/mp.51.4.191.

Song J, Chang I, Chen Z, Kang M, Wang CY. Characterization of side populations in HNSCC: highly invasive, chemoresistant and abnormal Wnt signaling. PLoS One. 2010 Jul 6;5(7):e11456. doi: 10.1371/journal.pone.0011456.

Speight PM, Farthing PM. The pathology of oral cancer. Br Dent J. 2018 Nov 9;225(9):841-847. doi: 10.1038/sj.bdj.2018.926.

Spiegelberg D, Kuku G, Selvaraju R, Nestor M. Characterization of CD44 variant expression in head and neck squamous cell carcinomas. Tumour Biol. 2014 Mar;35(3):2053-62. doi: 10.1007/s13277-013-1272-3.

Sugerman PB, Joseph BK, Savage NW. Review article: The role of oncogenes, tumour suppressor genes and growth factors in oral squamous cell carcinoma: a case of apoptosis versus proliferation. Oral Dis. 1995 Sep;1(3):172-88. doi: 10.1111/j.1601-0825.1995.tb00181.x.

Sun JH, Luo Q, Liu LL, Song GB. Liver cancer stem cell markers: Progression and therapeutic implications. World J Gastroenterol. 2016 Apr 7;22(13):3547-57. doi: 10.3748/wjg.v22.i13.3547.

Sun X, Martin RCG, Zheng Q, Farmer R, Pandit H, Li X, et al. Drug-induced expression of EpCAM contributes to therapy resistance in esophageal adenocarcinoma. Cell Oncol (Dordr). 2018 Dec;41(6):651-662. doi: 10.1007/s13402-018-0399-z.
Swain N, Thakur M, Pathak J, Swain B. SOX2, OCT4 and NANOG: The core embryonic stem cell pluripotency regulators in oral carcinogenesis. J Oral Maxillofac Pathol. 2020 May-Aug;24(2):368-373. doi: 10.4103/jomfp.JOMFP\_22\_20.

Tahmasebi E, Alikhani M, Yazdanian A, Yazdanian M, Tebyanian H, Seifalian A. The current markers of cancer stem cell in oral cancers. Life Sci. 2020 May 15;249:117483. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117483.

Tan X, Lambert PF, Rapraeger AC, Anderson RA. Stress-Induced EGFR Trafficking: Mechanisms, Functions, and Therapeutic Implications. Trends Cell Biol. 2016 May;26(5):352-366. doi: 10.1016/j.tcb.2015.12.006.

Tarin D, Thompson EW, Newgreen DF. The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia. Cancer Res. 2005 Jul 15;65(14):5996-6000; discussion 6000-1. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0699.

Tayama S, Motohara T, Narantuya D, Li C, Fujimoto K, Sakaguchi I, et al. The impact of EpCAM expression on response to chemotherapy and clinical outcomes in patients with epithelial ovarian cancer. Oncotarget. 2017 Jul 4;8(27):44312-44325. doi: 10.18632/oncotarget.17871.

Thanee M, Loilome W, Techasen A, Sugihara E, Okazaki S, Abe S, et al. CD44 variantdependent redox status regulation in liver fluke-associated cholangiocarcinoma: A target for cholangiocarcinoma treatment. Cancer Sci. 2016 Jul;107(7):991-1000. doi: 10.1111/cas.12967.

Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. Cell. 2009 Nov 25;139(5):871-90. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.007.

Thompson EW, Newgreen DF, Tarin D. Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? Cancer Res. 2005 Jul 15;65(14):5991-5; discussion 5995. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0616.

Timofeeva OA, Tarasova NI, Zhang X, Chasovskikh S, Cheema AK, Wang H, et al. STAT3 suppresses transcription of proapoptotic genes in cancer cells with the involvement of its N-terminal domain. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Jan 22;110(4):1267-72. doi: 10.1073/pnas.1211805110.

Tirino V, Desiderio V, Paino F, De Rosa A, Papaccio F, La Noce M, et al. Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization. FASEB J. 2013 Jan;27(1):13-24. doi: 10.1096/fj.12-218222.

Todaro M, Gaggianesi M, Catalano V, Benfante A, Iovino F, Biffoni M, et al. CD44v6 is a marker of constitutive and reprogrammed cancer stem cells driving colon cancer metastasis. Cell Stem Cell. 2014 Mar 6;14(3):342-56. doi: 10.1016/j.stem.2014.01.009.

Tomar SL, Hecht SS, Jaspers I, Gregory RL, Stepanov I. Oral Health Effects of Combusted and Smokeless Tobacco Products. Adv Dent Res. 2019 Oct;30(1):4-10. doi: 10.1177/0022034519872480.

Trepat X, Chen Z, Jacobson K. Cell migration. Compr Physiol. 2012 Oct;2(4):2369-92. doi: 10.1002/cphy.c110012.

Trzpis M, McLaughlin PM, de Leij LM, Harmsen MC. Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule. Am J Pathol. 2007 Aug;171(2):386-95. doi: 10.2353/ajpath.2007.070152.

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

Turley EA, Naor D. RHAMM and CD44 peptides-analytic tools and potential drugs. Front Biosci (Landmark Ed). 2012 Jan 1;17(5):1775-94. doi: 10.2741/4018.

Valcourt U, Kowanetz M, Niimi H, Heldin CH, Moustakas A. TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelialmesenchymal cell transition. Mol Biol Cell. 2005 Apr;16(4):1987-2002. doi: 10.1091/mbc.e04-08-0658.

van der Gun BT, Melchers LJ, Ruiters MH, de Leij LF, McLaughlin PM, Rots MG. EpCAM in carcinogenesis: the good, the bad or the ugly. Carcinogenesis. 2010 Nov;31(11):1913-21. doi: 10.1093/carcin/bgq187.

Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. Science. 2009 May 22;324(5930):1029-33. doi: 10.1126/science.1160809. Vandhana S, Deepa PR, Jayanthi U, Biswas J, Krishnakumar S. Clinico-pathological correlations of fatty acid synthase expression in retinoblastoma: an Indian cohort study. Exp Mol Pathol. 2011 Feb;90(1):29-37. doi: 10.1016/j.yexmp.2010.11.007.

Varun BR, Jayanthi P, Ramani P. Cancer stem cells: A comprehensive review on identification and therapeutic implications. J Oral Maxillofac Pathol. 2020 Jan-Apr;24(1):190. doi: 10.4103/jomfp.JOMFP\_336\_19.

Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Cufí S, Del Barco S, Martin-Castillo B, Menendez JA. Metformin regulates breast cancer stem cell ontogeny by transcriptional regulation of the epithelial-mesenchymal transition (EMT) status. Cell Cycle. 2010 Sep 15;9(18):3807-14.

Ventura R, Mordec K, Waszczuk J, Wang Z, Lai J, Fridlib M, et al. Inhibition of de novo Palmitate Synthesis by Fatty Acid Synthase Induces Apoptosis in Tumor Cells by Remodeling Cell Membranes, Inhibiting Signaling Pathways, and Reprogramming Gene Expression. EBioMedicine. 2015 Jul 2;2(8):808-24. doi: 10.1016/j.ebiom.2015.06.020.

Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. Nat Rev Cancer. 2008 Oct;8(10):755-68. doi: 10.1038/nrc2499.

Vitório JG, Duarte-Andrade FF, Dos Santos Fontes Pereira T, Fonseca FP, Amorim LSD, Martins-Chaves RR, et al. Metabolic landscape of oral squamous cell carcinoma. Metabolomics. 2020 Sep 30;16(10):105. doi: 10.1007/s11306-020-01727-6.

Vlashi E, Lagadec C, Vergnes L, Matsutani T, Masui K, Poulou M, et al. Metabolic state of glioma stem cells and nontumorigenic cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Sep 20;108(38):16062-7. doi: 10.1073/pnas.1106704108.

Wakil SJ. Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme. Biochemistry. 1989 May 30;28(11):4523-30. doi: 10.1021/bi00437a001.

Walcher L, Kistenmacher AK, Suo H, Kitte R, Dluczek S, Strauß A, et al. Cancer Stem Cells-Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies. Front Immunol. 2020 Aug 7;11:1280. doi: 10.3389/fimmu.2020.01280.

Wang SJ, Bourguignon LY. Hyaluronan-CD44 promotes phospholipase C-mediated Ca2+ signaling and cisplatin resistance in head and neck cancer. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2006 Jan;132(1):19-24. doi: 10.1001/archotol.132.1.19.

Wang K, Zhang T, Dong Q, Nice EC, Huang C, Wei Y. Redox homeostasis: the linchpin in stem cell self-renewal and differentiation. Cell Death Dis. 2013 Mar 14;4(3):e537. doi: 10.1038/cddis.2013.50.

Wang D, Zhu H, Liu Y, Liu Q, Xie X, Zhou Y, et al. The low chamber pancreatic cancer cells had stem-like characteristics in modified transwell system: is it a novel method to identify and enrich cancer stem-like cells? Biomed Res Int. 2014;2014;760303. doi: 10.1155/2014/760303.

Wang L, Yang H, Abel EV, Ney GM, Palmbos PL, Bednar F, et al. ATDC induces an invasive switch in KRAS-induced pancreatic tumorigenesis. Genes Dev. 2015 Jan 15;29(2):171-83. doi: 10.1101/gad.253591.114.

Wang MH, Sun R, Zhou XM, Zhang MY, Lu JB, Yang Y, et al. Epithelial cell adhesion molecule overexpression regulates epithelial-mesenchymal transition, stemness and metastasis of nasopharyngeal carcinoma cells via the PTEN/AKT/mTOR pathway. Cell Death Dis. 2018 Jan 5;9(1):2. doi: 10.1038/s41419-017-0013-8.

Wang T, Fahrmann JF, Lee H, Li YJ, Tripathi SC, Yue C, et al. JAK/STAT3-Regulated Fatty Acid β-Oxidation Is Critical for Breast Cancer Stem Cell Self-Renewal and Chemoresistance. Cell Metab. 2018 Jan 9;27(1):136-150.e5. doi: 10.1016/j.cmet.2017.11.001.

Warburg O. On the origin of cancer cells. Science. 1956 Feb 24;123(3191):309-14. doi: 10.1126/science.123.3191.309.

Warnakulasuriya S, Kerr AR. Oral Cancer Screening: Past, Present, and Future. J Dent Res. 2021 Nov;100(12):1313-1320. doi: 10.1177/00220345211014795.

Way TD, Huang JT, Chou CH, Huang CH, Yang MH, Ho CT. Emodin represses TWIST1-induced epithelial-mesenchymal transitions in head and neck squamous cell carcinoma cells by inhibiting the  $\beta$ -catenin and Akt pathways. Eur J Cancer. 2014 Jan;50(2):366-78. doi: 10.1016/j.ejca.2013.09.025.

Wei J, Xie G, Zhou Z, Shi P, Qiu Y, Zheng X, et al. Salivary metabolite signatures of oral cancer and leukoplakia. Int J Cancer. 2011 Nov 1;129(9):2207-17. doi: 10.1002/ijc.25881.

Wendt MK, Tian M, Schiemann WP. Deconstructing the mechanisms and consequences of TGF- $\beta$ -induced EMT during cancer progression. Cell Tissue Res. 2012 Jan;347(1):85-101. doi: 10.1007/s00441-011-1199-1.

Went PT, Lugli A, Meier S, Bundi M, Mirlacher M, Sauter G, Dirnhofer S. Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. Hum Pathol. 2004 Jan;35(1):122-8. doi: 10.1016/j.humpath.2003.08.026.

World Health Organization - WHO. Cancer, [acesso 2022 Jan 28]. Disponível em URL: <u>https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer</u>

World Health Organization - WHO. Cancer, [acesso 2022 Jan 28]. Disponível em URL: <a href="https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab\_1">https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab\_1</a>

Wielenga VJ, Heider KH, Offerhaus GJ, Adolf GR, van den Berg FM, Ponta H, et al. Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. Cancer Res. 1993 Oct 15;53(20):4754-6.

Winter MJ, Nagelkerken B, Mertens AE, Rees-Bakker HA, Briaire-de Bruijn IH, Litvinov SV. Expression of Ep-CAM shifts the state of cadherin-mediated adhesions from strong to weak. Exp Cell Res. 2003 Apr 15;285(1):50-8. doi: 10.1016/s0014-4827(02)00045-9.

Wolf KJ, Shukla P, Springer K, Lee S, Coombes JD, Choy CJ, et al. A mode of cell adhesion and migration facilitated by CD44-dependent microtentacles. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020 May 26;117(21):11432-11443. doi: 10.1073/pnas.1914294117.

Xiao Y, Lin M, Jiang X, Ye J, Guo T, Shi Y, Bian X. The Recent Advances on Liver Cancer Stem Cells: Biomarkers, Separation, and Therapy. Anal Cell Pathol (Amst). 2017;2017:5108653. doi: 10.1155/2017/5108653.

Xie GX, Chen TL, Qiu YP, Shi P, Zheng X, Su MM, et al. Urine metabolite profling ofers potential early diagnosis of oral cancer. Metabolomics, 2012, 8, 220–231.doi: 10.1007/s11306-011-0302-7.

Xu H, Tian Y, Yuan X, Wu H, Liu Q, Pestell RG, Wu K. The role of CD44 in epithelialmesenchymal transition and cancer development. Onco Targets Ther. 2015 Dec 16;8:3783-92. doi: 10.2147/OTT.S95470.

Xu H, Niu M, Yuan X, Wu K, Liu A. CD44 as a tumor biomarker and therapeutic target. Exp Hematol Oncol. 2020 Dec 10;9(1):36. doi: 10.1186/s40164-020-00192-0.

Yadav UP, Singh T, Kumar P, Sharma P, Kaur H, Sharma S, et al. Metabolic Adaptations in Cancer Stem Cells. Front Oncol. 2020 Jun 25;10:1010. doi: 10.3389/fonc.2020.01010.

Yan W, Wistuba II, Emmert-Buck MR, Erickson HS. Squamous Cell Carcinoma -Similarities and Differences among Anatomical Sites. Am J Cancer Res. 2011 Jan 1;1(3):275-300.

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 Sep;4(9):1033-43. doi: 10.5966/sctm.2015-0048.

Yanamoto S, Kawasaki G, Yamada S, Yoshitomi I, Kawano T, Yonezawa H, et al. Isolation and characterization of cancer stem-like side population cells in human oral cancer cells. Oral Oncol. 2011 Sep;47(9):855-60. doi: 10.1016/j.oraloncology.2011.06.501.

Yanamoto S, Yamada S, Takahashi H, Naruse T, Matsushita Y, Ikeda H, et al. Expression of the cancer stem cell markers CD44v6 and ABCG2 in tongue cancer: effect of neoadjuvant chemotherapy on local recurrence. Int J Oncol. 2014 Apr;44(4):1153-62. doi: 10.3892/ijo.2014.2289.

Yang Y, Zheng H, Zhan Y, Fan S. An emerging tumor invasion mechanism about the collective cell migration. Am J Transl Res. 2019 Sep 15;11(9):5301-5312.

Yang L, Shi P, Zhao G, Xu J, Peng W, Zhang J, et al. Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy. Signal Transduct Target Ther. 2020 Feb 7;5(1):8. doi: 10.1038/s41392-020-0110-5.

Yang J, Isaji T, Zhang G, Qi F, Duan C, Fukuda T, Gu J. EpCAM associates with integrin and regulates cell adhesion in cancer cells. Biochem Biophys Res Commun. 2020 Feb 19;522(4):903-909. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.11.152.

Yarden Y, Pines G. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. Nat Rev Cancer. 2012 Jul 12;12(8):553-63. doi: 10.1038/nrc3309.

Yarrow JC, Perlman ZE, Westwood NJ, Mitchison TJ. A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. BMC Biotechnol. 2004 Sep 9;4:21.

Yasumoto Y, Miyazaki H, Vaidyan LK, Kagawa Y, Ebrahimi M, Yamamoto Y, et al. Inhibition of Fatty Acid Synthase Decreases Expression of Stemness Markers in Glioma Stem Cells. PLoS One. 2016 Jan 25;11(1):e0147717. doi: 10.1371/journal.pone.0147717.

Yates C. Prostate tumor cell plasticity: a consequence of the microenvironment. Adv Exp Med Biol. 2011;720:81-90. doi: 10.1007/978-1-4614-0254-1\_7.

Yi M, Li J, Chen S, Cai J, Ban Y, Peng Q, et al. Emerging role of lipid metabolism alterations in Cancer stem cells. J Exp Clin Cancer Res. 2018 Jun 15;37(1):118. doi: 10.1186/s13046-018-0784-5. Erratum in: J Exp Clin Cancer Res. 2018 Jul 16;37(1):155.

Yin J, Zhang H, Wu X, Zhang Y, Li J, Shen J, Zhao Y, et al. CD44 inhibition attenuates EGFR signaling and enhances cisplatin sensitivity in human EGFR wild type non small cell lung cancer cells. Int J Mol Med. 2020 Jun;45(6):1783-1792. doi: 10.3892/ijmm.2020.4562.

Yoshii Y, Furukawa T, Oyama N, Hasegawa Y, Kiyono Y, Nishii R, et al. Fatty acid synthase is a key target in multiple essential tumor functions of prostate cancer: uptake of radiolabeled acetate as a predictor of the targeted therapy outcome. PLoS One. 2013 May 31;8(5):e64570. doi: 10.1371/journal.pone.0064570.

Yu Z, Pestell TG, Lisanti MP, Pestell RG. Cancer stem cells. Int J Biochem Cell Biol. 2012 Dec;44(12):2144-51. doi: 10.1016/j.biocel.2012.08.022.

Yu D, Shin HS, Lee YS, Lee YC. miR-106b modulates cancer stem cell characteristics through TGF-β/Smad signaling in CD44-positive gastric cancer cells. Lab Invest. 2014 Dec;94(12):1370-81. doi: 10.1038/labinvest.2014.125.

Zadra G, Ribeiro CF, Chetta P, Ho Y, Cacciatore S, Gao X, et al. Inhibition of de novo lipogenesis targets androgen receptor signaling in castration-resistant prostate cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 Jan 8;116(2):631-640. doi: 10.1073/pnas.1808834116. Zaytseva YY, Rychahou PG, Gulhati P, Elliott VA, Mustain WC, O'Connor K, et al. Inhibition of fatty acid synthase attenuates CD44-associated signaling and reduces metastasis in colorectal cancer. Cancer Res. 2012 Mar 15;72(6):1504-17. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-4057.

Zeeshan R, Mutahir Z. Cancer metastasis - tricks of the trade. Bosn J Basic Med Sci. 2017 Aug 20;17(3):172-182. doi: 10.17305/bjbms.2017.1908.

Zhang Q, Shi S, Yen Y, Brown J, Ta JQ, Le AD. A subpopulation of CD133(+) cancer stem-like cells characterized in human oral squamous cell carcinoma confer resistance to chemotherapy. Cancer Lett. 2010 Mar 28;289(2):151-60. doi: 10.1016/j.canlet.2009.08.010.

Zhang Z, Filho MS, Nör JE. The biology of head and neck cancer stem cells. Oral Oncol. 2012 Jan;48(1):1-9. doi: 10.1016/j.oraloncology.2011.10.004.

Zhang J, Tian XJ, Zhang H, Teng Y, Li R, Bai F, et al. TGF-β-induced epithelial-tomesenchymal transition proceeds through stepwise activation of multiple feedback loops. Sci Signal. 2014 Sep 30;7(345):ra91. doi: 10.1126/scisignal.2005304.

Zhang D, Tang DG, Rycaj K. Cancer stem cells: Regulation programs, immunological properties and immunotherapy. Semin Cancer Biol. 2018 Oct;52(Pt 2):94-106. doi: 10.1016/j.semcancer.2018.05.001.

Zhao Z, Ma W, Zeng G, Qi D, Ou L, Liang Y. Preoperative serum levels of early prostate cancer antigen (EPCA) predict prostate cancer progression in patients undergoing radical prostatectomy. Prostate. 2012 Feb;72(3):270-9. doi: 10.1002/pros.21428.

Zhao P, Damerow MS, Stern P, Liu AH, Sweet-Cordero A, Siziopikou K, et al. CD44 promotes Kras-dependent lung adenocarcinoma. Oncogene. 2013 Oct 24;32(43):5186-90. doi: 10.1038/onc.2012.542.

Zöller M. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? Nat Rev Cancer. 2011 Apr;11(4):254-67. doi: 10.1038/nrc3023.

## ANEXOS

## ANEXO 1 – VERIFICAÇÃO DE ORIGINALIDADE E PREVENÇÃO DE PLÁGIO

## CARACTERIZAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS-TRONCO DO CÂNCER EM LINHAGEM CELULAR DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL

