UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Análise dos mecanismos antitumora humanas de carcinoma espinocelu	_
	Leandro Figueiredo dos Santos

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Análise dos mecanismos antitumorais de FTY720 em linhagens humanas de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientado: Leandro Figueiredo dos Santos

Orientadora: Profa. Dra. Andréia Machado Leopoldino

Versão corrigida da Tese de Doutorado Direto apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia no dia 13/12/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto 2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Santos, Leandro Figueiredo

Análise dos mecanismos antitumorais de FTY720 em linhagens humanas de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. Ribeirão Preto, 2018. 101p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Leopoldino, Andréia Machado.

1. Antitumoral. 2. Autofagia. 3. FTY720. 4. Câncer de cabeça e pescoço.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Leandro Figueiredo dos Santos

Análise dos mecanismos antitumorais de FTY720 em linhagens humanas de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora:Profa. Dra. Andréia Machado Leopoldino

Aprovado em	:	/	/	
-------------	---	---	---	--

Banca Examinadora

Prof. (a) Dr. (a):	
	_Assinatura:
Prof. (a) Dr. (a):	
	_Assinatura:
	_Assinatura:
Instituição:	_Assinatura:
Prof. (a) Dr. (a):	
Instituição:	_Assinatura:
Prof. (a) Dr. (a):	
Instituição:	Assinatura:



AGRADECIMENTOS

À FCFRP/USP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realizar este curso.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2013/08135-2; 2013/10898-4; 2016/19103-2) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo financiamento obtido. Em especial à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e CNPq pela bolsa de doutorado concedida.

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

À Profa. Dra. Andréia Machado Leopoldino, pela oportunidade de trabalho no Laboratório de Marcadores e Sinalização Celular no Câncer (LMSCC), pelo auxilio em todos os momentos da realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Curti, por todas as correções e sugestões.

À Prof. Dr. Sergio Akira, Prof. Dra. Cristiane Damas Gil, Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes, Dr. Daniel Demarque e Dr. Lucas Maciel, Ms. Emerson Santos e demais alunos e técnicos de seus laboratórios pela valiosa colaboração tanto estrutural quanto intelectual para realização de vários experimentos.

Aos amigos do Laboratório LMSCC, Camila, Renata, Karina, Lays, Neto, Tálita, Verônica, Lais, Lucas e Cristiana, pela ajuda intelectual e técnica durante a realização desse trabalho.

Aos professores e funcionários da bioquímica, pelas trocas de experiências durante conversas informais e disponibilização equipamentos indispensáveis ao desenvolvimento do projeto.

A todos os funcionários da pós-graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, pela grande ajuda durante essa caminhada.

À todos os funcionários da FCFRP, que de acordo com suas funções, prestaram sua importante parcela de contribuição nos diferentes estágios de realização desta pesquisa.

Às novas amizades que surgiram durante a realização do doutorado, que presenciaram muito das alegrias e dificuldades desse processo ao meu lado. E em especial aos poucos que se tornaram amigos fora do ambiente de trabalho tornando essa jornada mais prazerosa, sempre agradecerei por ter esse contato humano com cada um de vocês. Minha eterna gratidão à Camila, Alinne, Bianca, Tálita, Neto, Verônica, Lais e Micássio.

Aos familiares e amigos que prestaram apoio emocional durante o processo em especial, ao que acompanhou toda a finalização deste trabalho, o querido Robson Pinheiro a qual compartilho imensa gratidão.



RESUMO

Santos, Leandro Figueiredo. Análise dos mecanismos antitumorais de FTY720 em linhagens humanas de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. 2018. 101f. Tese (doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O FTY720 foi considerado um agente antitumoral contra vários tipos de câncer na promoção da morte celular, diminuição da proliferação, angiogênese e metástase; no carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECP), ainda não foi descrito sua ação em todas as vias ativadas ou inibidas por este composto. O objetivo deste estudo foi avaliar a ação do FTY720 em modelo in vitro (cultura celular) e in vivo (camundongos) de CECP. Analisamos a atividade da PP2A, uma fosfatase antitumoral inibida em CECP, em um painel de linhagens de células de CECP, além de avaliar o tratamento com FTY720 nestas células e eleger duas linhagens para os posteriores experimentos. As células HN12 e SCC9 foram selecionadas para os estudos de mecanismo baseados nos menores níveis de atividade da PP2A sendo posteriormente incubadas com FTY720 e tendo as principais proteínas alvo analisadas por Westernblotting. Determinamos a viabilidade celular por citometria de fluxo, e estudos funcionais de sinalização de morte celular foram realizados utilizandose inibidores de caspases/apoptose (Q-VD-OPh), necroptose (Necrostatina-1) e autofagia (3-metiladenina). A degradação de proteínas foi analisada com o inibidor de proteassoma MG132. A formação de tumor de xenoenxerto em camundongos Balb/c Nude foi utilizada, com a linhagem HN12, para avaliar o efeito de FTY720 in vivo. Como esperado, FTY720 aumentou as atividades de fosfatases em células CECP, incluindo PP2A, diminuiu os níveis de proteína SphK1 e ativou caspase-8 e -3 em ambas as células, bem como aumentou a lactato desidrogenase, que é marcador de necrose quando presente no meio extracelular. O bloqueio da apoptose recuperou a viabilidade celular enquanto a inibição da necroptose não afetou a morte celular promovida por FTY720. Por outro lado, a inibição da autofagia aumentou drasticamente a morte celular promovida pelo FTY720 in vitro, sugerindo autofagia como uma resposta protetora. *In vivo*, foi confirmado que a combinação de FTY720 com inibidor de autofagia (3-MA) reduz a formação do tumor xenoenxerto (HN12) em camundongos combinado ao aumento de ceramidas no sangue dos animais. Nós evidenciamos o FTY720, pelo seus efeitos antitumorais sinérgicos com inibidor de autofagia, como potencial estratégia antitumoral em CECP e talvez outros tipos de câncer, assim como os níveis de ceramidas no sangue como potencial marcador de resposta terapêutica.

Palavras-chave: Antitumoral, autofagia, fingolimod, câncer de cabeça e pescoço.

ABSTRACT

Santos, Leandro Figueiredo. Analysis of the antitumor mechanisms of FTY720 in human cell lines of head and neck squamous carcinoma. 2018. 101f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

FTY720 has been considered an antitumor agent against several cancer types decreased proliferation, angiogenesis and metastasis; in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), it has not been addressed yet in all pathways activated or inhibited by this compound. The objective of this study was to evaluate the action of FTY720 in vitro (cell culture) and in vivo (mice) HNSCC models. PP2A, an inhibited antitumor phosphatase in HNSCC, activity was assessed in a panel of HNSCC cell lines. HN12 and SCC9 cells were selected for the studies of mechanisms based on the lower levels of PP2A activity were subsequently incubated with FTY720 and having the main target proteins analyzed by Western blot. Cell viability was determined by flow cytometry, and functional studies of cell death signaling were performed by using inhibitors for apoptosis (Q-VD-OPh), necroptosis (Necrostatin-1) and autophagy (3-Methyladenine). Protein degradation was analyzed with the proteasome inhibitor MG132. Xenograft tumor formation in Balb/c Nude, with HN12, mice was used to evaluate the FTY720 effect in vivo. As expected, FTY720 increased phosphatases activities in HNSCC cells, including PP2A, decreased SphK1 protein levels, and activated caspase-8 and -3 in both cells, as well as increased the release of lactate dehydrogenase activity, which is a marker of necrosis when present in the medium extracellular. Apoptosis blockage recovered cell viability while necroptosis inhibition did not affect FTY720-promoted cell death. On the other hand, autophagy inhibition drastically increased cell death promoted by FTY720 in vitro, suggesting autophagy as a protective response. In vivo, it was confirmed that the combination of FTY720 with autophagy inhibitor (3-MA) reduces the formation of xenograft tumor (HN12) in mice combined with increased blood ceramides in animals. We have shown FTY720, for its synergistic antitumor effects with autophagy inhibitor, as a potential antitumor strategy in HNSCC and perhaps other cancers types, as well as blood ceramides levels as a potential marker of therapeutic response.

Keywords: Antitumoral, autophagy, fingolimod, head and neck cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Atividade total de fosfatases em linhagem de queratinocito (NOK-SI) e de câncer de cabeça e pescoço (HN6, HN13, HN12, Cal27, SCC9)	27
Figura 2: Atividade específica de PP2A em linhagem de queratinocito (NOK-SI) e de câncer de cabeça e pescoço (HN6, HN13, HN12, Cal27, SCC9)	28
Figura 3: Atividade de fosfatases em linhagens de câncer de cabeça e pescoço (HN12 e SCC9) tratadas com FTY720	29
Figura 4: Atividade específica de PP2A em linhagens de câncer de cabeça e pescoço (HN12 e SCC9) tratadas com FTY720	30
Figura 5: Silenciamento (knockdown) da proteína SET nas células HN12 e SCC9	31
Figura 6: Redução da viabilidade celular por FTY720 em células HN12	32
Figura 7: Redução da viabilidade celular por FTY720 em células SCC9	33
Figura 8: Clivagem de capsase-8 e caspase-3 em células HN12 incubadas com FTY720	34
Figura 9: Clivagem de capsase-8 e caspase-3 em células SCC9 incubadas com FTY720	35
Figura 10: Liberação de lactato desidrogenase por células HN12 após exposição ao FTY720	36
Figura 11: Liberação de lactato desidrogenase por células SCC9 após exposição ao FTY720	37
Figura 12: Microscopia de campo claro	38
Figura 13: Microscopia Eletrônica de Transmissão	39
Figura 14: FTY720 promove aumento de LC3-II em células CECP	40
Figura 15: Microscopia confocal de fluorescência para LC3 e P62 em células HN12 após incubação com FTY720	41
Figura 16: Microscopia confocal de fluorescência para LC3 e P62 em células SCC9 após incubação com FTY720	42
Figura 17: Ensaio funcional para identificação das vias de morte e sobrevivência celular em HN12 após incubação com FTY720	44

Figura 18: Ensaio funcional para identificação das vias de morte e sobrevivência celular em SCC9 após incubação com FTY720	46
Figura 19: O FTY720 reduz os níveis de SphK1 em células HN12 e SCC9	47
Figura 20: A degradação de SphK1 em células CECP com knockdown de SET e/ou com FTY720 é via proteassoma	48
Figura 21: Efeito de FTY720 nos níveis de SphK1 em células HN12 com e sem tratamento com AO	49
Figura 22: Aumento nos níveis da SphK1 em células HN12	50
Figura 23: Aumento da SphK1 nas células HN12 sensibiliza ao FTY720	51
Figura 24: Redução dos níveis de SphK1 em células HN12	52
Figura 25: Redução dos níveis de SphK1 aumenta viabilidade após tratamento com FTY720	53
Figura 26: Viabilidade celular em células HN12 após incubação com FTY720 e 3-MA	55
Figura 27: Curva de crescimento do tumor HN12 xenoenxerto	57
Figura 28: Peso dos tumores HN12 xenoenxerto	58
Figura 29: Imagens representativas do tumor HN12 xenoenxerto dos animais após tratamentos	59
Figura 30: Níveis de FTY720 e FTY720-p no sangue dos animais após tratamento com FTY720	60
Figura 31: Níves de esfingosina-1-fosfato (S1P) e ceramidas no sangue dos animais com tumores HN12 xenoenxerto após tratamento com FTY720, 3-MA, FTY720+3-MA.	61
Figura 32: Esquema representativo dos principais resultados de FTY720 em CECP <i>in vitro</i> neste trabalho	62
Figura 33: Esquema representativo dos principais resultados de FTY720 em CECP in vivo neste trabalho	63

LISTA DE TABELAS

Tabela1: Reagentes utilizados durante o estudo	17
Tabela 2: Anticorpos primários e secundários utilizados nas técnicas de westerblotting e imunofluorescência	20
Tabela 3: Coeficiente de interação de drogas em células HN12 após incubação com FTY720 e 3-MA	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3-MA 3-Metil-Adenina

AKT Proteína quinase B

AO Ácido Ocadaico

AP-1 Proteína ativadora 1

APAF-1 Apoptotic protease activating factor 1

ATCC American Type Culture Colection

ATP Adenosine triphosphate

BAK Bcl-2 homologous antagonista/killer

BAX Bcl-2-associated X protein

BCL-2 B-cell lymphoma 2

BCLxL B-cell lymphoma-extra large

BH3 ou BID BH3 interacting-domain death agonist

CA Califórnia

CAF Cancer-associated fibroblast
CDKN2A Cyclin-dependent kinase 2A

CECP Carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço

CID Coeficiente de interação entre drogas

CNX Calnexina

CXCL1 ou IL-1 Chemokine (C-X-C motif) ligand 1ou Interleucina 1

CXCL8 ou IL-8 Chemokine (C-X-C motif) ligand 8 ou Interleucina 8

c-MET tyrosine-protein kinase Met

dATP Deoxyadenosine triphosphate

DISC death-inducing signaling comple

DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium

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

DNA Ácido desoxirribonucléico

ECL Enhanced chemiluminescence

EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGFR Receptor do Fator de Crescimento Epidermal

EMT Epithelial–mesenchymal transition

ERK Extracellular signal—regulated kinases

ER Endoplasmic reticulum

EUA Estados Unidos da América

FADD Proteína associada à Fas com domínio de morte

FASL Fas ligand

FBS Fetal bovine serum

FDA Food and Drug Administration

FGF-2 Basic fibroblast growth factor

FTY720 Fingolimod

FTY720-p Fingolimod fosforilado

GAPDH Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GMCSF Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

HNSCC Head and neck squamous cell carcinoma

HGF Hepatocyte growth factor

HPV Human Papiloma Virus

I2PP2A Inhibitor 2 Protein Phosphatase 2A

LC/MS/MS Liquid chromatography tandem-mass spectrometry

LC3 Microtubule-Associated Protein 1A/1B-Light Chain 3

LDH Lactato desidrogenase

LOH Loss of heterozygosity

MAPK MAP quinase

MCL1 Induced myeloid leukemia cell differentiation protein

MLKL Mixed lineage kinase domain-like protein

MMP13 Matrix metalloproteinase 13MMP2 Matrix metalloproteinase-2

MMP9 Matrix metalloproteinase-9

MOMP Major outer membrane protein

NEC1 Necrostatina 1

NOK-SI Normal Oral Keratinocyte- spontaneously immortalized

NFκβ Nuclear Factor kappa beta

P62/ SQSTM1 Sequestosome-1

PARP Poly (ADP-ribose) polymerase

PBS Phosphate buffered saline

PDG Platelet derived growth factor

PI lodeto de propídeo

PI3K Fosfatidilinositol 3'- quinase

PP2A Proteína fosfatase 2A

PVDF Fluoreto de Polivinilideno

qPCR PCR quantitativa em tempo real

QVD Q-VD-OPh hydrate

Rb Retinoblastoma protein

Rho/ROCK1 Rho-associated kinase

RIP1 Receptor Interacting Protein 1
RIP3 Receptor Interacting Protein 3

RNA Ácido ribonucléico

RNAm Ácido ribonucléico mensageiro

ROS Reactive oxygen species

S1P Esfingosina-1-fosfato

SAPK Stress-activated protein kinase

SDS-PAGE Sodium Dodecyl Sulfate- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

SEM Standard error of mean

shCtrl Short hairpin RNA ou silenciamentocontrole negativo

shRNA Short hairpin RNA

shSET Short hairpin RNA ou silenciamentoda proteína SET

siRNA Small interfering RNA

SMAC/DIABLO Second mitochondria-derived activator of caspases

SPHK1 Esfingosina Quinase 1

STAT3 Signal transducer and activator of transcription 3

TA Temperatura ambiente

TBS Tris-Buffered Saline

TGF-β Transforming growth factor beta

TNF-α Tumor Necrosis Factor Alpha

tBID Truncated p15 BID

TNFR1 Tumor necrosis factor receptor 1

TP53 Tumor protein p53

TRAIL TNF-related apoptosis-inducing ligand

TRAILR TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor

UCSD University of California San Diego

UK Reino Unido

UVA Ultra violeta A

VEGF Vascular Endothelial Growth Factor

XIAP X-linked inhibitor of apoptosis protein

WHO World Health Organization

α**-SMA** Alpha-actin-2

SÍMBOLOS

% porcentagem

= igual

cm centímetro

g grama

h horas

kDa quilo Daltons

L litro

mA miliAmpere

min minutos

mL mililitro

nm nanômetro

nM nanomolar

°C graus Celsius

g aceleração da gravidade

rpm Rotações por minuto

μg micrograma

μL microlitro

µm micrômetro

μ**M** micromolar

SUMÁRIO

RESUMO
ABSTRACT
LISTA DE FIGURAS
LISTA DE TABELAS
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS
1- Introdução
1.1- Câncer de cabeça e pescoço
1.2- SET (I2PP2A)
1.3- SphK1 (Esfingosina quinase 1)
1.4- Morte celular: apoptose, necrose e autofagia
1.5- FTY720 (Fingolimod)
2-Objetivos
2.1– Objetivo geral
2.2- Objetivos específicos
3-Materiais e Métodos
3.1-Linhagens celulares
3.1.1 – HN6, HN12 e HN13
3.1.2 – SCC9
3.1.3 – NOK-SI
3.2- Cultivo celular
3.3 - Outros reagentes utilizados
4- Procedimentos Experimentais
4.1 - Atividade de fosfatase serina / treonina – Atividade de PP2A
4.2-Silenciamento por Short hairpin RNA (shRNA) – SET e SphK1
4.3-Western blotting
4.4-Ensaio de viabilidade celular
4.5-Ensaio de atividade da lactato desidrogenase
4.6-Microscopia óptica e Microscopia eletrônica de transmissão
4.7-Imunofluorescência
4.8-Superexpressão de SphK1 e Reverse transcription polymerase chain
reaction quantitative real time (qPCR)
4.9-Alamar Blue (ensaio da resazurina) e coeficiente de interação
medicamentosa (CID)
4.10 – Análise esfingolipídica por cromatografia líquida - ionização por
eletrospray - espectrometria de massa (LC/MS/MS)
4.11 Ensaio de formação de tumores xenográficos
4.12 Análise Estatística
5- Resultados e interpretações5.1- Atividade de PP2A
5.1.1 - Atividade de PP2A em linhagens celulares
5.1.2- Atividade de PP2A em células tratadas com FTY720
5.1.2- Atividade de PPZA em celulas tratadas com P11720
5.3 -Morte celular por apoptose em células HN12 e SCC9 após incubação
com FTY720
5.4- Morte celular por necrose em células HN12 e SCC9 após incubação
com FTY720

5.5 - Autofagia induzida por FTY720	39
5.6 -Ensaio funcional de vias potencialmente ativadas (apoptose, autofagia,	
necroptose) por FTY720 em células CECP	43
5.7- FTY720 e shSET reduzem os níveis da proteína SphK1	46
5.8- Níveis de SphK1 e efeito de FTY720 em células CECP	50
5.9- Efeito sinérgico da combinação de FTY720 e 3-MA em CECP in vitro e	
in vivo	54
6- Discussão	64
7- Conclusão	67
8- Referências	68

1. Introdução

1.1- Câncer de cabeça e pescoço ou Câncer Oral

A palavra "câncer" designa o conjunto de mais de 100 tipos de doenças que se caracterizam pelo crescimento desordenado de células anormais que podem ou não invadir os tecidos (INCA, 2018). Esse potencial invasivo proporciona a disseminação das células neoplásicas pelo organismo, caracterizando a ocorrência de metástases que são as responsáveis por cerca de 90% das mortes. Entretanto, a mortalidade também pode ser resultante do tumor primário (Weinberg *et al.*, 2007). Para o ano de 2018 é previsto a ocorrência de 18.1 milhões de novos casos e 9.6 milhões de mortes ocasionadas por câncer (Bray *et al.*, 2018).

Carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECP) é a denominação das neoplasias malignas que se originam do epitélio de revestimento estratificado escamoso – também chamado de epidermóide ou espinocelular. Ocupando a décima posição mundial dentre os tipos de neoplasias mais comuns, o CECP é caracterizado pelas malignidades que acometem as estruturas anatômicas do trato aereo-digestivo superior, sendo orofaringe, nasofaringe, hipofaringe e laringe, segundo a American Joint Committee on Cancer (AJCC) e a Organizção Mundial de Saúde (WHO – World Health Organization) (Edge e Compton, 2010; Rivera, 2015; Chan et al., 2017; John et al., 2017). Dentre as neoplasias derivadas do epitélio espinocelular da região da cabeça e pescoço, aquelas que ocorrem na cavidade oral e orofaringe representam cerca de 90-95% dos casos. Com relação aos sítios de acometimento, as neoplasias que se desenvolvem em borda lateral de língua, assoalho bucal e orofaringe são os mais frequentes além de estarem também associados a um pior prognóstico (Tshering Vogel et al., 2010; Marur e Forastiere, 2016). Desse modo, adotaremos a nomenclatura câncer oral ao longo do texto para nos referirmos ao CECP. A alta mortalidade em decorrência deste tipo de câncer se deve a diagnósticos tardios, recorrência, e à elevada capacidade invasiva do tumor primário para tecidos adjacentes devido ao seu fenótipo altamente maligno, caracterizado pela invasão extensa dos tecidos circundantes (linfonodos) e metástases para órgãos distantes(Pulte e Brenner, 2010; Marur e Forastiere, 2016).

A estimativa nacional para 2018/2019 prevê uma incidência de 11.200 casos de câncer oral acometendo indivíduos do gênero masculino e 3.500 casos acometendo mulheres para cada ano do biênio (INCA, 2018). Com relação à mortalidade, em 2012 foram relatados cerca de 145.353 óbitos no mundo em decorrência do câncer de boca. No Brasil, em 2015, o índice de óbitos em decorrência do câncer de boca apresentou uma taxa de 4.672casos em homens e 1.226 casos em mulheres (INCA, 2018). Esses valores correspondem a um risco estimado de 2,1 óbitos para cada 100 mil habitantes acometidos, representando, assim, um problema de saúde pública (Petti e Scully, 2010; Ferlay *et al.*, 2015).

Há grandes esforços da comunidade científica direcionados à melhoria dos métodos diagnósticos do câncer bem como de seu tratamento devido aos quais demonstra-se um aumento do número de sobreviventes ao câncer (Arteaga et al., 2014).

Como é característico das neoplasias, o câncer oral é uma doença heterogênea de etiologia multifatorial. O tabaco e o consumo excessivo de álcool representam os principais fatores de risco descritos na literatura. Além disso, a associação desses dois fatores é considerada a responsável por mais de 80% dos casos de carcinoma espinocelular de boca (Petti e Scully, 2010; Boing *et al.*, 2011; Rivera, 2015). Além dos dois fatores de risco supracitados, a literatura científica tem destacado a infecção viral pelo Papilomavírus humano (HPV – Human Papiloma Virus) é como um fator de risco associado principalmente aos acometimentos em orofaringe, o que tem sido associado também a mudanças no comportamento sexual da população, (D'souza *et al.*, 2007). Outros fatores etiológicos vêm sendo explorados no câncer oral tais como, a exposição à radiação solar do tipo UVA (Ultra violeta A) – principalmente em casos de câncer de lábio, deficiência nutricional em decorrência de dieta pobre em frutas e vegetais, má higiene bucal, refluxo gastroesofágico (Van Cauwenberge *et al.*, 1992; Andreotti *et al.*,2006; Oliveira *et al.*, 2009; American cancer society, 2017).

O comportamento do CECP é diferenciado dependendo do seu estadiamento clínico e sítio anatômico de acometimento. O diagnóstico em estágio inicial da doença está intimamente relacionado a melhores chances de cura e sobrevida. Essa característica fica evidente devido à elevada taxa de mortalidade em decorrência da doença mesmo após o tratamento, em casos onde o diagnóstico tenha ocorrido em

estágios mais avançados do câncer (Ferlay *et al.*, 2015). O tempo de sobrevida de pacientes acometidos por CECP é de ± 5 anos em aproximadamente 60% dos casos. Entretanto, observa-se uma redução deste tempo quando o diagnóstico é realizado tardiamente, o que está intimamente relacionado com estágios mais avançados da doença (Pai e Westra, 2009; INCA, 2018).

Remoção cirúrgica do tumor associada ou não à radioterapia e quimioterapia em várias combinações são as abordagens terapêuticas usuais para tratamento do câncer oral. A escolha para associação de procedimento cirúrgico à terapia antitumoral baseia-se principalmente na extensão e localização tumoral (Tshering Vogel et al., 2010). Além disso, a presença de metástase e a possibilidade de recidivas, que ocorrem tipicamente quando há apenas abordagem cirúrgica e radioterápica, são consideradas para determinar o uso de quimioterapia (Marur e Forastiere, 2016). Uma das abordagens com quimioterápicos mais utilizada é a de altas doses de agentes contendo platina, como por exemplo a cisplatina. A cisplatina liga na fita dupla do DNA tumoral formando um *crosslink*, inibindo a transcrição, além de sensibilizar as células à radioterapia, aumentando, assim, a sua eficiência (Pignon et al., 2000). Novas drogas e alvos intracelulares tem sido estudados e caracterizados, visando aumento nas taxas de sobrevida tais como os Anti-EGFR, cetuximab e panitumumab (Jouan-Hureaux et al., 2012; Ang et al., 2014), porém ainda há desafios relacionados a citotoxicidade, em especial em casos de tumores com amplificação de EGFR, destas drogas bem como de sua eficiência quando em associações terapêuticas.

As células neoplásicas no câncer oral possuem diversas alterações moleculares que resultam em mudanças no seu comportamento proliferativo, de diferenciação e de sobrevivência celular (Martin *et al.*, 2014). Além disso, essas células também apresentam alterações em diferentes vias de sinalização celular, tais como de controle de proliferação e morte que contribuem para o desenvolvimento e progressão da doença (Molinolo *et al.*, 2009; Rivera, 2015). Em células não tumorais os processos de proliferação e morte celular são finamente controlados por vias de sinalização que tem por objetivo a manutenção da homeostase tecidual. O início e a progressão tumoral representam um complexo processo que se caracteriza pela aquisição progressiva de alterações genéticas e epigenéticas das células tumorais, bem como alterações no microambiente tumoral. Tais modificações foram descritas por Hanahan e Weinberg como "*hallmarks*" do câncer. Essas alterações acarretam

proliferação desordenada, devido à manutenção do sinal proliferativo, evasão dos supressores de crescimento, resistência à morte celular, indução de angiogênese, escape da resposta imune, promoção de perfil inflamatório, instabilidade genômica e mutação, alteração no metabolismo celular energético e aumento da capacidade invasiva e metástase(Hanahan e Weinberg, 2000; 2011).

A etiopatogênese do câncer oral ainda não está totalmente elucidada, o que limita e dificulta a inserção de novas abordagens terapêuticas. Resumidamente, as células normais (queratinócitos) recebem estímulos genéticos ou estímulos externos como consumo de álcool e cigarro que originam células com alterações em uma série de membros de vias de sinalização celular (TP53, NOTCH1, EGFR, CDKN2a, STAT3, Cyclin D1, Rb, LOH) encaminhando essas células a desordens orais potencialmente malignas classificadas como hiperplasia, e graus leves, moderados e severos de displasia (*Rivera, 2015*). Em estágios mais tardios, como após a invasão de tecidos conjuntivos adjacentes e com o avanço e acúmulo de alterações, essas células passam a produzir uma série de proteínas e fatores, como os citados anteriormente, que possibilitam que essas células, de perfil epitelial, desenvolvam características mesenquimais, ou seja, se tornam células com capacidade de romper a membrana basal e assim invadindo o tecido subjacente e/ou alcançando a via linfática ou sanguínea. Desse modo, temos o carcinoma oral invasivo (*Rivera, 2015*).

1.2 - SET (I2PP2A)

Em geral, são necessárias ativação desenfreada de proteínas oncogênicas conjuntamente com a inibição de supressores tumorais para o desenvolvimento do câncer.

Dentre diversos fatores e proteínas que participam do crescimento tumoral, destacamos a proteína SET (I2PP2A; Inibidor 2 de PP2A): proteína localizada no núcleo e no citoplasma, que foi primeiramente descrita como produto de fusão SET-CAN em leucemia mielóide aguda indiferenciada (Von Lindern *et al.*, 1992). Altos níveis dessa proteína tem sido encontrados em diversas doenças além da leucemia mielóide aguda tais como, câncer de mama (Switzer *et al.*, 2011), tumor de Wilms (Carlson *et al.*, 1998), Alzheimer (Madeira *et al.*, 2005) e em CECP (Leopoldino, A. M. *et al.*, 2012). O mecanismo de atuação da proteína SET, também conhecida como

I2PP2A, é caracterizado por inibir potente e seletivamente a proteína fosfatase 2 A (PP2A) (Li *et al.*, 1996). A PP2A é uma fosfatase que controla a fosforilação de diversas outras proteínas envolvidas na sinalização celular e que tem grande importância na regulação da proliferação celular, crescimento, diferenciação e apoptose(Janssens e Goris, 2001). Essas funções são exercidas por meio da desfosforilação de proteínas, como ERK (extracellular signal-regulated kinase) e Akt (protein kinase B)(Li *et al.*, 1996). Através da regulação destas vias a atividade de PP2A exerce papel na supressão tumoral, porém tem sido relatado a inibição de PP2A em neoplasias de pulmão e leucemias e sua ativação após interferências farmacológicas (Oaks e Ogretmen, 2014).

Estudos de nosso grupo demonstram que a proteína SET está superexpressa e contribui para a sobrevivência celular e resistência ao estresse oxidativo em CECP (Leopoldino, A. M. et al., 2012). Além disso, ela participa no fenômeno de transição epitélio-mesenguimal, no qual células epiteliais adquirem fenótipo mesenguimal e perfil metastático (Sobral, L. M. et al., 2014). No trabalho publicado por Sobral et al. em 2014, observou-se que o silenciamento estável da proteína SET utilizando-se a técnica de short-harpin levou à diminuição da proliferação celular e à sensibilidade a morte pelo tratamento com cisplatina in vivo em modelo de xenoenxerto gerados a partir da linhagem HN12. Por outro lado, observou-se que essa redução da proteína SET estimulou o aumento da migração, invasão e metástase. Esses achados evidenciam que há potencial atuação da SET na prevenção de metástases em CECP. Não somente, em 2017 Sobral et al. demonstraram que o aumento dos níveis proteicos de SET contribuem para a transformação maligna de queratinócitos orais normais e imortalizados em queratinócitos com características neoplásicas em decorrência do aumento da fosforilação de Akt e c-Myc além da capacidade tumorigênica em modelo de xenoenxerto utilizando camundongos Balb-C nude (Sobral et al., 2017). Portanto, a funcionalidade da SET em CECP requer mais investigações uma vez que os mecanismos moleculares e as vias de sinalização necessitam serem amplamente identificados.

1.3-SphK1 (Esfingosina quinase 1)

Dentre os lipídios presentes nas membranas celulares, os esfingolipídios representam a classe que promove sustentação estrutural, formando uma barreira protetora e é sítio de adesão de proteínas extracelulares. Porém, além de desempenharem papel na estrutura das membranas celulares, os esfingolipídios também modulam redes de sinalizações intracelulares que influenciam na senescência, na diferenciação, na apoptose, na migração, na proliferação e na angiogênese (Hannun e Obeid, 2018).

As múltiplas faces dos mecanismos dos esfingolipídios faz do estudo de sua regulação algo complexo, já que estão interconectados entre si em uma rede de sinalização. Dada a sua posição privilegiada no metabolismo dos esfingolípidos, a expressão da proteína esfingosina quinase 1 (SphK1) afeta o equilíbrio entre os esfingolípidos envolvidos nos mecanismos de ativação da apoptose e da sobrevivência celular determinando o destino das células, o que caracteriza essa enzima em uma posição reguladora principal para um potencial oncogene (Heffernan-Stroud e Obeid, 2013).

Estudos observaram maiores níveis de SphK1 em vários tipos de tumores sólidos, incluindo mama(Maczis et al., 2016), ovário(Yang et al., 2012), colorretal (Long et al., 2016), além do pulmão(Johnson et al., 2005), fígado (Wang e Wu, 2018) e câncer oral (Facchinetti et al., 2010). No câncer oral, o aumento da expressão de SphK1 resulta na alteração no balanço entre os esfingolipídios, ocasionando o aumento de S1P, que é responsável pela ativação de diversas vias de sobrevivência, dentre elas: PI3K/Akt, MAPK, NFκβ, Bcl-2, entre outras(Takabe et al., 2008; Facchinetti et al., 2010; Tamashiro et al., 2013). Ainda, a maior expressão de SphK1 em câncer oral está correlacionada com estágio avançado do tumor e recidiva(Sinha et al., 2011). Camundongos atímicos Balb-C nude que receberam células de câncer oral com redução de SphK1, por small interference RNA (siRNA), foram mais sensíveis à radiação e tiveram maior redução tumoral em comparação aos grupos com níveis normais de SphK1 (Sinha et al., 2011; Tamashiro et al., 2013). Estes estudos sugerem a SphK1 como potencial alvo e com ações importantes em câncer oral, onde sua inibição ou redução pode contribuir para a regressão tumoral (White et al., 2016). Entretanto, faz-se necessária uma investigação mais ampla da SphK1 e

sua correlação com outras proteínas sabidamente alteradas em CECP, tais como SET e PP2A.

1.4- Morte celular: apoptose, necrose e autofagia

A busca por fármacos e compostos que atuem de maneira eficaz e com mínimos efeitos colaterais no tratamento do CECP é uma constante das pesquisas científicas. Observando-se melhor eficácia desses agentes no tratamento das neoplasias, tem-se então a necessidade de compreender os mecanismos envolvidos na indução da morte celular para que assim novos agentes possam ser desenvolvidos para atuarem sinergicamente nessas vias.

A apoptose é um tipo de morte celular programada que possui uma via de sinalização finamente controlada como uma de suas funções primárias a eliminação de células e organelas danosas ao organismo sejam elas infectadas por patógenos, danificadas (Adams, 2003). A apoptose é caracterizada pela ativação das caspases, que são proteínas de classificação cisteína protease responsáveis pela iniciação, execução e regulação do processo apoptótico (Thornberry, 1998; Thornberry e Lazebnik, 1998). As caspases têm ação proteolítica nos resíduos de aspartato das proteínas alvo e são sintetizadas nas formas de zimogênios inativos, que são ativados após clivagem. Assim, as caspases são classificadas, de acordo com a fase do processo que estão atuantes, em caspases iniciadoras (caspases 2,8,9 e 10), caspases efetoras (caspases 3,6 e 7). As iniciadoras são ativadas por clivagem em seu pró-domínio após estimulo apoptótico externo, clivam as caspaes efetoras tornando estas também ativas, as quais, por sua vez, são responsáveis por agir sobre substratos celulares ocasionando colapso intracelular por meio da desintegração do citoesqueleto, desarranjo metabólico e fragmentação genômica (Thornberry, 1998; Adams, 2003; Riedl e Shi, 2004; Li e Yuan, 2008). Além disso, essa ativação em cascata gera nas células ativação de endonucleases, rompimento da membrana celular, condensação nuclear, formação de blebs na membrana e corpos apoptóticos e a exposição do resíduo de fosfatidilserina na membrana plasmática para reconhecimento por fagocóticos. (Eguchi et al., 1997).

Este tipo de morte celular ocorre por duas vias principais: a extrínseca e a intrínseca, ambas ativadas por caspases e interconectadas, sendo que as proteínas

da via extrínseca podem influenciar a via intrínseca (Fulda e Debatin, 2006; Elmore, 2007). A via intrínseca, resumidamente, é desencadeada em resposta a estímulos de morte gerados intracelularmente, tais como ativação de oncogenes, danos genéticos irreparáveis, altas concentrações de cálcio no citosol, hipóxia e estresse oxidativo.

Neste tipo de via a mitocôndria das células sinaliza o estímulo de morte liberando do espaço intermembrana mitocondrial para o citoplasma diversas proteínas, como por exemplo o citocromo c, Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspases / direct inhibitor of apoptosis (IAP)-binding protein with low pl) entre outras, o que culmina na ligação destas com fatores anti-apoptóticos como XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein), um inibidor de caspases 3 e 9, e APAF1 que após ligação com citocromo c muda de conformação permitindo que APAF1 se ligue ao ATP/dATP e forme o apoptossomo, mediando a ativação de caspase 9, o que desencadeia a cascata de ativação de caspases culminando no processo de morte por apoptose (Jiang e Wang, 2000; Riedl e Salvesen, 2007; Tait e Green, 2010).

A via extrínseca, resumidamente, é iniciada pela interação de ligantes extracelulares indutores de morte como FasL, TRAIL e TNF, aos seus receptores, Fas, TRAILR e TNFR1. Os receptores de morte possuem um domínio de morte, que quando há interação de ligante e receptor há a formação de um complexo que expõe seu domínio de morte recrutando proteínas adaptadoras que sequestram as caspases inciadoras 8 e 10 para formar um complexo denominado de DISC (*Death-Inducing Signalling complex*) levando a clivagem e ativação da caspase efetora 3 (Boatright e Salvesen, 2003). A função do complexo DISC na ativação da caspase 8 é homóloga a função do apoptossomo na ativação da caspase 9, embora os mecanismos moleculares deste complexo não estejam bem estabelecidos (Boatright e Salvesen, 2003).

Em certas condições a apotose pode não ser eficiente para eliminar uma célula que tenha sofrido algum dano, sendo então ativada a via de morte denominada necrose. A necrose é caracterizada por alterações metabólicas que causam grave depleção de ATP, quebra do equilíbrio iônico, inchamento mitocondrial e celular, ação de enzimas degenerativas o que resulta em ruptura da membrana plasmática, perda de proteínas, metabólitos e íons intracelulares no meio extracelular (Danial e Korsmeyer, 2004; Linkermann e Green, 2014). Neste tipo de morte não há o

envolvimento de caspases, e frequentemente acontecem simultaneamente reações inflamatórias após estímulos de dano celular agudos ou acidentais (químicos ou físicos), ocorrendo então de forma não programada. Entretanto estudos têm demonstrado que a morte por necrose pode ser de certa forma coordenada ou programada possuindo uma via de sinalização finamente regulada.

Desta forma para diferenciar os dois tipos, é utilizado o termo necroptose que significa em termos o processo de morte celular necrótico que possui um mecanismo de regulação molecular (Degterev *et al.*, 2005; Jain *et al.*, 2013). A necroptose é ativada por estímulos semelhantes ao da via extrínseca da apoptose, entretanto, não possui os reguladores chaves como as caspases. A característica da célula em necroptose é de perda da integridade da membrana plasmática, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e ausência de fragmentação nuclear as quais são caracteristiscas semelhantes ao processo de necrose. A via necroptótica em síntese, envolve especialmente a proteína RIP1 quinase que ativada gera uma cascata de eventos e por fim se liga a RIP3, recrutando a proteína MLKL (Mixed lineage kinase domain-like protein) e levando aos sinais característicos deste tipo de morte celular (Galluzzi e Kroemer, 2008; Kroemer e Pouyssegur, 2008; Ofengeim e Yuan, 2013).

As células neoplásicas podem ser resistentes aos tratamentos. Hu e Xuan descreveram que quando o tratamento é baseado na indução de apoptose, algumas células podem se tornar resistentes (Hu e Xuan, 2008). Isto também pode ocorrer com tratamentos baseados na indução de necrose. Desse modo, é necessário o uso de tratamentos baseados na indução de apoptose, de necrose e de outra via de morte celular para inibir a indução de células resistentes à terapia .

Por outro lado temos a autofagia, que é um processo conservado durante a evolução que ocorre em células eucarióticas caracterizado pela degradação de componentes celulares nos lisossomos (Dice, 1987; Kondo *et al.*, 2005). Esse processo é utilizado pelas células para adaptação às flutuações de condições externas e metabólicas que as células podem ser expostas, visando a manutenção da homeostase celular, incluindo temperatura, substancias químicas, pH, concentrações de metabólitos, hormônios, citocinas, infecção por patógenos, privação nutricional, stress metabólico, hipóxia, e crescimento celular desordenado, tal como ocorre no câncer (Ohsumi, 2014; Ndoye e Weeraratna, 2016). Até certo limiar as flutuações podem ser consideradas como estresses, pois durante a resposta a um estresse subletal as células se modificam rapidamente e adaptam seu metabolismo conseguindo

se protegerem, sendo assim neste contexto um mecanismo de defesa da célula a situações não homeostáticas (Mortimore *et al.*, 1989; Kroemer *et al.*, 2010). Na autofagia temos um processo em massa com capacidade de degradar proteínas e organelas (retículo endoplasmático, mitocôndrias, peroxissomos e ribossomos, além do núcleo) diferindo do do sistema ubiquitina-proteassoma, que é responsável pela degradação de proteínas de curto tempo de meia-vida apenas. No processo autofágico após degradação das proteínas e organelas não funcionais tem os produtos da degradação utilizados pelas próprias células na biossíntese de novas estruturas, o que garante a sobrevivência e homeostase celular (Kaur e Debnath, 2015).

A autofagia é dividida em três tipos de processos: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas. A macroautofagia é caracterizada pela formação de uma vesícula de dupla-membrana denominada "autofagossomo", neste processo de formação da carga autofágica e maturação do autofagossomo é imprescindível a participação da proteína LC3 e p62 que se liga a proteínas ubiquitinadas e as entrega aos autofagossomos por meio do seu domínio de interação com LC3. O autofagossomo então engloba o conteúdo a ser degradado, e posteriormente tem sua membrana externa fusionada à membrana dos lisossomos para adquirir atividade hidrolítica, formando os "autolisossomos", onde ocorre a degradação pelas enzimas lisossomais do conteúdo agrupado para reciclagem (Lin e Baehrecke, 2015). A microautofagia refere-se ao processo de invaginação da membrana lisossomal ou endossomal, resultando em englobamento direto do substrato e posterior degradação via proteases lisossomais (Komatsu e Ichimura, 2010). Na autofagia mediada por chaperonas, o conteúdo (proteínas) a ser degradado não é sequestrado em autofagossomo. As proteínas a serem degradadas possuem um domínio reconhecido por chaperonas citosólicas, que por sua vez promovem a translocação do conteúdo reconhecido diretamente ao lúmen dos lisossomos(Kaur e Debnath, 2015). No presente trabalho, o fenômeno relevante é a macroautofagia, que será denominada simplesmente autofagia.

Imperfeições no processo autofágico têm sido associadas ao acúmulo de macromoléculas e organelas, principalmente mitocôndrias, defeituosas ou danificadas, favorecendo o estresse oxidativo, danos ao DNA e instabilidade da cromatina. Essas condições, associadas ao acúmulo de mutações em oncogenes, aumentam a suscetibilidade ao desenvolvimento de neoplasias (Choi, 2012).A

autofagia em células tumorais já estabelecidas em condições como o estresse metabólico (resultante de oxigenação insuficiente, privação de nutrientes e/ou aumento da demanda energética) tem sido associada como forma de obtenção de nutrientes e energia. Além disso, a autofagia pode ser utilizada como mecanismo de escape aos tratamentos quimioterápicos, resultando em sobrevivência da célula tumoral (Zhang et al., 2010; Choi, 2012). Por outro lado, o restabelecimento da autofagia em células de câncer de mama bloqueou o processo tumorigênico (Liang et al., 1999). Embora a autofagia seja primordialmente um mecanismo de proteção, o seu papel na morte celular é altamente dependente do contexto celular. Se as condições metabólicas desfavoráveis avançam além do necessário, o consumo autofágico excede a capacidade celular de síntese e promove a morte celular. Esse tipo de morte, classificado como "morte celular programada do tipo II" ou "morte celular autofágica", ocorre principalmente em células submetidas a quimio ou radioterapia (Tsuchihara et al., 2009; Choi, 2012). Sendo a conexão entre autofagia e o metabolismo tumoral de grande interesse e alto potencial na pesquisa clínica em câncer.

1.5 - FTY720 (Fingolimod)

A terapia usual contra o câncer permanece sendo a ressecção cirúrgica associada ou não à radioterapia. Entretanto, quando há o espalhamento do tumor primário para outros órgãos, extravassavento capsular, tumores não operáveis e em casos de recorrência faz-se necessário a utilização de quimioterapia. A quimioterapia age sistemicamente e de maneira não seletiva somente nas células neoplásicas. Por esse motivo, esses medicamentos devem ser usados em doses sub-ótimas com o intuito de reduzir a citotoxicidade e os efeitos colaterais decorrentes do tratamento. As altas taxas de recidiva e de mortalidade em casos que apresentam metástase estimulam a busca por novos agentes quimioterápicos contra o câncer oral.

Compostos que ativam a PP2A ou que atuam inibindo a SET, têm sido discutidos como potenciais drogas para o tratamento de câncer, pois são compostos que efetivamente antagonizam o desenvolvimento e progressão neoplásica(Cristóbal et al., 2015; Arriazu et al., 2016). Um novo composto que têm sido alvo de estudos pré-clínicos, em alguns tipos de câncer, é o fingolimod (FTY720) que apresenta analogia estrutural com o lipídeo bioativo esfingosina (White et al., 2016). O FTY720

é uma droga aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para uso no tratamento de pacientes com esclerose múltipla. Ele é administrado por via oral e possui alta biodisponibilidade, atoxicidade e não tumorigenicidade em ensaios com animais (Brunkhorst *et al.*, 2014). Tem sido demonstrado seu uso como potente inibidor do crescimento tumoral e angiogênese(Lamontagne *et al.*, 2006) em vários tipos de neoplasias como por exemplo, cancer de próstata (Tonelli *et al.*, 2013), mama (Lim *et al.*, 2011), pulmão (Saddoughi *et al.*, 2013), fígado (Ho *et al.*, 2005), pâncreas (Shen *et al.*, 2007), bexiga (Azuma *et al.*, 2003), rim (Thangada *et al.*, 2014), cólon (Xing *et al.*, 2014),ovário(Zhang *et al.*, 2013), diferentes formas de leucemia e linfoma (Neviani *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008) e, mais recentemente , em câncer oral (Velmurugan *et al.*, 2018). O FTY720 tem sido proposto como droga antitumoral por apresentar-se como indutor de morte celular, inibidor da transição epitéliomesênquima, atenuação da metástase e redução da inflamação tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Patmanathan *et al.*, 2015).

Estudos demonstraram que o FTY720 induz tanto apoptose quanto necroptose, bem como autofagia. (Zhang et al., 2010; Estrada-Bernal et al., 2012; Saddoughi et al., 2013; Zhang et al., 2013; Zhang et al., 2015). Em linhagens de glioblastoma que tiveram o processo autofágico inibido, a ação do FTY720 como indutor de morte celular foi reduzida. Isto indica que a autofagia é um coadjuvante importante no processo de morte celular ativado por este composto neste tipo tumoral (Zhang et al., 2015).

Em termos de mecanismo de ação, é proposto que o FTY720 rompe a interação SET-PP2A seguida pela ativação da PP2A, permitindo assim que a fosfatase exerça suas funções na célula (Neviani *et al.*, 2007). Além dos efeitos na ativação de PP2A, FTY720 também vêm sido estudado como um mimético de esfingosina inibindo sua fosforilação para esfingosina-1-fosfato (S1P)(Takabe *et al.*, 2008; Maczis *et al.*, 2016). Para exercer tal efeito, o FTY720 inibe a esfingosinaquinase 1 (SphK1 – *sphingosine kinase 1*), resultando na diminuição de S1P seguida da diminuição da viabilidade e proliferação celular em câncer intestinal, de próstata e mama por exemplo (White *et al.*, 2016).

No câncer oral há alterações da relação entre de ceramidas e S1P que resultam na sustentação do sinal proliferativo principalmente pela atividade de SphK1 (Heffernan-Stroud e Obeid, 2013). Além dessa via, há também a super expressão da

proteína SET, inibindo a atividade supressora tumoral de PP2A o que caracteriza alvos importantes do FTY720 neste tipo de câncer. Assim, dado os efeitos descritos por FTY720 em outros tipos tumorais e, recentemente, em câncer oral, há relevância no estudo desse composto em CECP e uma compreensão aprofundada do seu mecanismo de ação. Para tanto, a abordagem inicial é identificar em quais mecanismos moleculares sofrem interferências após o tratamento com FTY720.

Com base em estudos prévios de nosso grupo que mostraram acúmulo da SET no CECP e em trabalhos recentes que mostram o efeito antitumoral de FTY720 em outros tipos de câncer que também tem a SET acumulada, temos como hipótese, nesse contexto, que, como entre os efeitos descritos por FTY720, um deles é a ativação de PP2A e no CECP temos uma inibição desta pelo aumento da I2PP2A ou SET, o tratamento com este composto nestas células iria reverter essa inibição ativando PP2A e promovendo a morte celular assim como os efeitos sobre os esfingolipídeos ativados pela inibição de SphK1, gerando aumento da apoptose e redução tumoral em animais com tumores xenoenxerto de linhagem de CECP.

2. Objetivos

2.1- Objetivo geral

➤ Investigar o potencial efeito antitumoral do FTY720 em CECP e o seu mecanismo de ação com avaliação do envolvimento da proteína SET.

2.2-Objetivos específicos:

- Determinar a atividade da fosfatase PP2A em linhagens CECP com e sem exposição ao FTY720 utilizando ensaio enzimático específico;
- Determinar a citotoxicidade do FTY720 em linhagens celulares de CECP com e sem redução da proteína SET;
- Analisar as vias de sinalização de resposta ao FTY720 em linhagens CECP in vitro e possível tipo de morte celular ativada;
- Avaliar a resposta ao tratamento com FTY720 no desenvolvimento dos tumores xenoenxerto subcutâneo no dorso de camundongos BALB/c nude a partir de linhagem de CECP.

3. Materiais e Métodos

3.1-Linhagens celulares

Foram utilizadas as linhagens celulares humanas de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço HN6, HN12, HN13(Cardinali *et al.*, 1995) e SCC9 (ATCC) e uma linhagem celular de queratinócito oral normal espontaneamente imortalizado (NOK-SI, normal oral keratinocyte spontaneuosly immortalized) (Martin *et al.*, 2014) .As linhagens HN6, HN12, HN13 e NOK-SI foram doadas pelo Prof. Dr. Silvio Gutkind, *University of California San Diego (UCSD) Department of Pharmacology and Moores Cancer Center, San Diego, CA*, Estados Unidos da América (EUA). Todas as linhagens utilizadas são HPV negativas (Martin *et al.*, 2014).

3.1.1 – HN6, HN12 e HN13

- 3.1.1.1 HN6 é uma linhagem celular estabelecida a partir de células neoplásicas na língua advindas de paciente do sexo masculino, cujo tumor apresentava classificação T3N2bM0 (T3: Tumor com mais de 4 cm em seu maior eixo; N2b: Metástase em múltiplos linfonodos isolaterais, porém nenhum com mais que 6 cm em seu maior longo eixo; M0: Ausência de metástase à distância)(Cardinali *et al.*, 1995).
- 3.1.1.2 HN12 é uma linhagem celular tumorigênica e metastática derivada de células metastáticas linfonodais de um paciente do sexo masculino com tumor primário presente na língua. O tumor primário apresentava classificação T4N1M0 (T4: Tumor com alta capacidade invasiva; N1: Metástase em um único linfonodo isolateral, com 3 cm ou menos na maior dimensão; M0: Ausência de metástase à distância)(Cardinali *et al.*, 1995).
- 3.1.1.3- HN13 é uma linhagem celular derivada de células neoplásicas na língua de um paciente do sexo feminino, classificada como T2N2M0 (T2: Tumor com mais de 2 cm mas não mais de 4 cm em sua maior dimensão; N2: Metástase em um

único linfonodo isolateral, com mais de 3 cm, mas não mais de 6 cm em sua maior dimensão; M0: Ausência de metástase à distância (Cardinali *et al.*, 1995).

3.1.2 - SCC9

SCC9, obtida comercialmente da American Type Culture Collection (ATCC), é uma linhagem celular tumorigênica derivada de células neoplásicas de língua de um paciente do sexo masculino, classificada como T2N1M0 (T2: Tumor com mais de 2 cm mas não mais de 4 cm em maior dimensão; N1:Metástase em um único linfonodo isolateral, com 3 cm ou menos na maior dimensão; M0: Ausência de metástase à distância)(Rivera, 2015).

3.1.3 - NOK-SI

NOK-SI (*Normal Oral Keratinocytes-Spontaneously Immortalized*) é uma linhagem celular que apresenta características de queratinócito oral normal e foi obtida a partir do epitélio de revestimento de gengiva normale espontaneamente imortalizadas (Castilho *et al.*, 2010).

3.2 - Cultivo celular

As células foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Media*(DMEM, D5648; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), penicilina (10.000 Ul/mL), estreptomicina (10 mg/mL) e anfotericina B (25 μg/mL) (A59555, Sigma-Aldrich) formando a solução de "DMEM completo". A linhagem celular SCC9 foi cultivada utilizando-se meio de cultura DMEM/F-12(51445C, Sigma Aldrich) suplementado com todos os compostos supracitados para DMEM, adicionalmente à solução de HEPES (15 mM) (H0887, Sigma)e hidrocortisona (400 ng/mL) (H4001, Sigma). Todas as células foram mantidas em condições assépticas em incubadora com atmosfera úmida de 5% de CO₂ a 37°C e entre 2 a 10 passagens durante todos experimentos.

As alíquotas congeladas em nitrogênio líquido, obtidas para todos os experimentos, foram descongeladas em banho-maria à 37°C, diluídas em uma proporção de 1:10 de meio de congelamento (FBS + 5% Dimetilsulfóxido[DMSO]) e meio DMEM completo, centrifugadas à 161 g em temperatura ambiente (TA) por 5 minutos e então semeadas em garrafas médias de 75 cm² para expansão. Após atingir confluência de 70% ou mais, as células foram submetidas à lavagem com salina tamponada com fosfato (Phosphate-buffered saline, PBS) (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 9,1 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,4; Sigma Aldrich) e posteriormente incubadas à 37°C com solução de Tripsina-EDTA (T4174, Sigma Aldrich). Cada linhagem utilizada apresenta tempo diferente para ação da tripsina, variando entre 8 a 15 minutos. Após esse período, no qual as células se soltam do fundo da garrafa, realiza-se a inativação da tripsina utilizando-se DMEM completo. Após inativação seguida da coleta em tubos cônicos, as células são centrifugadas nas condições supracitadas e nova solução de DMEM completo é adicionado para posterior contagem em câmara de Neubauer seguida de acondicionamento em determinadas concentrações celular em novas placas de cultura (100 mm de diâmetro ou, 6, 12, 24 e 96 poços) de acordo com o experimento a ser realizado. Salienta-se ainda que as células são mantidas em incubadora por pelo menos 24 h antes de qualquer manipulação experimental. As células foram mantidas em condições isentas de soro durante 16 h (Martin et al., 2014) previamente à adição de FTY720 e/ou outros reagentes e mantidas durante o período indicado em cada experimento.

3.3- Outros reagentes utilizados

Tabela 1: Reagentes utilizados durante o estudo.

Reagente	Abreviatura	Fabricante	Código
Ácido Ocadaico	AO	Sigma-Aldrich	O4511
Fingolimod	FTY720	Sigma-Aldrich	SML0700
3-Metiladenina	3-MA	Sigma-Aldrich	M9281
Q-VD-OPh	QVD	Sigma-Aldrich	SML0063
Necrostatina-1	NEC1	Sigma-Aldrich	N9037
MG132	MG132	Sigma-Aldrich	M7449

4. Procedimentos Experimentais

4.1 - Atividade de fosfatases serina/treonina incluindo PP2A

Para determinar a atividade da enzima PP2A, cuja inibição é realizada pela SET que está aumentada em CECP, realizamos este ensaio afim de analisar os níveis de atividade em linhagens de CECP e verificar se o FTY720 atua nesta enzima chave para o processo de supressão tumoral.

A atividade de treonina-fosfatase-2A (PP2A) foi quantificada utilizando o sistema de ensaio Serina / Treonina-Fosfatase (Promega; V2460) com o peptideo sintético Thr RRA(pT)VA (Promega). Para este ensaio, as células foram lisadas com Cellytic M (Sigma-Aldrich; C2978) contendo um coquetel inibidor de proteases (Sigma-Aldrich; P8340); o fosfato livre foi eliminado dos lisados utilizando uma resina Sephadex G-25 (Promega). Para as medidas da atividade da fosfatase, foi obtida uma curva padrão de fosfato com 0, 100, 200, 500, 1.000 e 2.000 pmol de fosfato. As amostras (2,5 µg de proteína total) foram incubadas com ou sem 12 nM de ácido ocadaico (AO, Sigma-Aldrich; O4511) por 15 minutos em temperatura ambiente. A reação foi realizada utilizando-se placa de 96 poços adicionando às amostras o tampão de reação PP2ase-2A 5 X (imidazole 250 mM, pH 7,2, EGTA 1 mM, βmercaptoetanol 0,1%, albumina sérica bovina 0,5 mg / mL); Sigma-Aldrich; I17525; E4378; M3148; A7906]) e o peptideo de fosfo-treonina durante 10 minutos a 30 °C. A reação foi interrompida por meio de incubação com corante de molibdato durante 15 minutos e a absorbância foi determinada em 595 nm utilizando um leitor de microplacas (Bio-Rad). Os cálculos foram realizados seguindo as especificações do fornecedor do kit.

4.2- Silenciamento por short hairpin RNA (shRNA)para SET e SphK1

Afim de avaliarmos a influência da SET e SphK1 nos tratamentos propostos realizamos uma técnica de *Knockdown* ou silenciamento desta proteína nas linhagens selecionadas e posteriormente o tratamento com FTY720. O silenciamento de RNA foi realizado em células HN12 e SCC9 utilizando-se plasmídeo previamente selecionado contendo shRNA para SET (TRCN0000063717; NM_003011.1-467s1c – Sigma-Aldrich) (Leopoldino, A. M. *et al.*, 2012) e para Sphk1. Foram testados cinco

plasmídeos com diferentes sequências de shRNA para SphK1 sendo selecionado àquele com maior eficiência (NM_182965.1-1779; Sigma-Aldrich) para os experimentos. Além disso, um shRNA para um alvo não-mamífero (shControl; pLKO.1puro; SHC002; Sigma-Aldrich) foi usado como controle negativo. As células foram selecionadas com adição de puromicina (1 μg/mL) no meio de cultura por 10 dias e a eficácia do silenciamento de RNA foi confirmada por Western blotting.

4.3 - Western blotting

Alterações em proteínas chaves podem disparar mecanismos celulares, de morte e autofagia, que são efeitos descritos para a ação de FTY720 em outras linhagens. As proteínas foram extraídas das células utilizando-se o tampão CelLytic M (Sigma-Aldrich) contendo coquetel de inibidores de proteases e fosfatases (Sigma-Aldrich; P8340; P0044) e centrifugação a 20.000 g durante 15 min a 4 °C. A concentração de proteínas foi determinada utilizando-se ensaio de Bradford (Bradford, 1976) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA)conforme as recomendações do fabricante. Quantidades iguais de proteína total (30 μg) de cada amostra foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio a 10% (SDS-PAGE) e transferidas para uma membrana de PVDF (GE HealthCare, Freiburg, Alemanha). Os sítios de ligação não específicos foram bloqueados utilizando-se leite em pó desnatado a 5% (p/v) (Bio-Rad) em solução salina tamponada com Tris (TBS) contendo Tween-20 a 0,1% (v/v) (Sigma-Aldrich; T9039).

A seguir estão listados os anticorpos utilizados no presente trabalho:

Tabela 2: Anticorpos primários e secundários utilizados nas técnicas de Western blotting e imunofluorescência.

Anticorpos	Origem	Diluição	Fabricante
primários			
Anti-LC3B	Coelho	1:1000	Cell signaling
Anti-Caspase-8	Camundongo	1:1000	Cell signaling
Anti-Caspase-3	Coelho	1:1000	Cell signaling
clivada			
Anti-Calnexina	Coelho	1:2000	Cell signaling
Anti-SphK1	Coelho	1:1000	Sigma Aldrich
Anti-p-62	Camundongo	1:1000	Santa Cruz
[SQSTM1 (D-3)]			
Anti-SET	Cabra	1:50000	Santa Cruz
Anticorpos	Origem	Diluição	Fabricante
secundários			
Anti-Coelho	Cabra	1:10000	KPL
Anti-Camundongo	Cabra	1:10000	KPL
Anti-Cabra	Coelho	1:10000	KPL

Foram utilizados anticorpos secundários (*rabbit, goat* e *mouse*) conjugados com *horsedish peroxidase*. Os imunocomplexos foram visualizados usando o sistema de ECL quimioluminescente (GE HealthCare) e filme de raios-X. Todos os géis/membranas (SDS-PAGE) continham marcadores de peso molecular de proteína (*ladder* de proteína) (Thermo Scientific; # 26619).

4.4 - Ensaio de viabilidade celular

Para determinar a citotoxicidade de FTY720 nas linhagens selecionadas realizamos o ensaio de viabilidade celular por citometria de fluxo usando o marcador iodeto de propídeo. A viabilidade celular foi analisada após incubação (24 h) com FTY720 (0, 4, 8, 12, 16 e 20 µM) em combinação ou não com inibidores específicos

para autofagia (3-MA, 5 mM), apoptose (QVD, 25 μ M) e necroptose (Necrostatina-1, 20 μ M). Todo o tratamento com inibidores foi iniciado 2 horas antes do tratamento com FTY720, o qual foi mantido durante 24 h, exceto quando o inibidor utilizado for 3-MA o qual foi mantido durante 6 h e, posteriormente, substituído por diluente e / ou outras combinações de tratamento. As células foram coletadas utilizando solução de tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich; T4174), lavadas e suspensas em solução tamponada com fosfato (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na2HPO4 10 mM e KH2PO4 2 mM, pH 7,4 [Sigma-Aldrich C31434; Merck # 1049361000 Sigma-Aldrich P31413; Sigma-Aldrich P5655]) (PBS) a 37°C. Solução de iodeto de propídeo (1 μ g/mL) (Sigma-Aldrich; P4170) foi adicionado e a viabilidade celular avaliada por citometria de fluxo utilizando-se equipamento BD FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA). Foram analisadas 10.000 células por grupo.

4.5 - Ensaio de atividade da lactato desidrogenase

A enzima lactato desidrogenase, quando presente no meio extracelular, é marcador de dano celular por necrose, afim de avaliarmos se este processo ocorre após o tratamento com FTY720 realizamos o ensaio enzimático desta proteína. Após incubação das células com FTY720 (0, 4, 8 e 12 µM) durante 24 horas, o meio de cultura celular (0,5 mL) foi coletado em tubo estéril e centrifugado a 1.000g durante 5 minutos em temperatura ambiente. Salienta-se que se manteve as condições de cultura previamente descritas, porém utilizou-se meio de cultura sem vermelho de fenol. Subsequentemente, 100 µL do sobrenadante foram transferidos para uma microplaca de 96 poços (BD Falcon; # 353219) e homogeneizadas com 50 µL de PBS pH 7,4 e mantido a 37°C. A monitorização cinética da atividade da lactato desidrogenase (LDH) foi realizada espectrofotometricamente a 340nm durante 10 minutos em intervalos de 40 segundos, imediatamente após a adição de 1,44 mM NADH (Sigma-Aldrich, N4505) e piruvato de sódio 4,8 mM (Sigma-Aldrich; S6422) (Haslam et al., 2000). Os valores foram determinados como: diferença da absorbância inicial subtraída da absorbância final e expressa como fold change. O grupo controle foi usado para normalização.

4.6- Microscopia óptica e Microscopia eletrônica de transmissão

A autofagia é um processo desencadeado após o tratamento com FTY720, para iniciarmos a avaliação deste processo analisamos as alterações morfológicas das células. Após seis horas de tratamento com FTY720, as células HN12 e SCC9 nas diferentes condições experimentais - foram fotografadas em microscópio óptico invertido (Zeiss Axiovert 40 inverted microscope). Em seguida, as células foram coletadas após tripsinização, centrifugadas a 1200 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente (T.A.) e submetidas a fixação(paraformaldeído4%, 0,5% de glutaraldeído em tampão de cacodilato de sódio a 0,1 M, pH 7,4) por 24 horas a 4 °C. Logo após, as células foram lavadas utilizando-se o mesmo tampão(3 vezes de 10 minutos cada), desidratadas em série crescentes de metanol (Merck-Alemanha) a 70%, 90% e 100% (2 vezes de 15 minutos cada), pré-incubadas em solução 1:1 de 100% de metanol e resina LRGold (London Resin Co., Reading, Berkshire, UK) e mantidas sob agitação durante 18 horas a -20 °C. Todas as trocas de solução foram realizadas após centrifugação das células a 600g durante 10 min. As células foram então incubadasdurante duas horas em LRGold e então transferidas para cápsulas de gelatina contendo LRGold, centrifugadas a 2300 rpm durante 15 min e polimerizadas sob luz UV durante 24 horas a -20 °C. Cortes ultrafinos (~70 nm) das células foram coletados em telas de níquel e contrastadas em acetato de uranila 2% e citrato de chumbo durante 15 minutos em cada (Mello et al., 2015). A análise ultraestrutural e aquisição das imagens das células foi realizadaem colaboração com a Professora Doutora Cristiana Damas Gil no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM900 (Carl Zeiss) do Departamento de Morfologia e Genética da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, SP.

4.7-Imunofluorescência

Após os resultados de microscopia e westernblotting, e possíveis alterações relacionadas à autofagia, realizamos a marcação fluorescente de proteínas que atuam em conjunto na formação de componentes chaves do processo autofágico para confirmação deste processo após o tratamento com FTY720. As células foram incubadas com anticorpos primários contra LC3B (LC3B (D11) XP) e P62 (SQSTM1) e anticorpo secundário contra Ig de coelho conjugado com Alexa 555 (Invitrogen) e de

camundongo conjugado com Dylight488 (ThermoFisher). O protocolo utilizado foi aquele descrito por Sobral e colaboradores (Sobral, L. M. *et al.*, 2014). Os núcleos foram corados utilizando-se Hoechest (Sigma-Aldrich; B1155). As células foram fotografadas em microscópio confocal de varredura a laser Leica TCS SP8 (Leica Microsystem, Alemanha) usando-se objetivas de 63x com zoom digital de 3x. A barra de escala foi definida como 20 µm.

4.8- Superexpressão de SphK1 em células HN12

A SphK1 é uma proteína modulada por FTY720, afim de avaliarmos o efeito desta após os tratamentos propostos, realizamos o aumento na expressão desta. Células HN12 (1 x 10⁵) foram plaqueadas em placa de seis poços e transfectadas com o vector pLenti6.3 / V5-DEST (Invitrogen) contendo a sequência de cDNA de SphK1 humana (NM_021972) e o vetor vazio como controle, utilizando o reagente de transfecção PolyJet™ (Sinagen®, Rockville, MD) de acordo com as instruções do fabricante. Após 48 horas de transfecção, as células contendo a construção de DNA com SphK1bem como as células contendo o vetor vazio foram mantidas sob 5 µg / mL de blasticidina (Sigma-Aldrich) para seleção.

Para confirmar a superexpressão de SphK1, assim como o silenciamento de RNA para SphK1, os níveis de RNA SphK1 foram quantificados por qPCR (*Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time*). As células foram submetidas a lise diretamente com TRIzol (Invitrogen, Life Technologies, NY, EUA) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Após tratamento do RNA total com RNAse I, este foi submetido a reação de transcrição reversa para obtenção do DNA complementar (cDNA) utilizando-seo kit Transcriptase Reversa SuperScript ™ II (Invitrogen). O qPCR foi processado usando ensaio SphK1 TaqMan® (Hs00184211_m1, Applied Biosystems) e GAPDH (Hs99999905_m1, Applied Biosystems) seguindo as condições recomendadas pelo fabricante no equipamento StepOne plus ™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

A determinação dos níveis de expressão do gene alvo foi realizada pela quantificação relativa (RQ), utilizando-se a equação RQ = $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001). Para a RQ de cada amostra, foi utilizado o valor de CT (*cicle threshold* ou ciclo limiar), definido após a reação, sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos onde a amplificação atingiu o limiar de detecção de fluorescência. O valor do

CT do gene alvo foi subtraído do valor do CT do normalizador (GAPDH; housekeeping gene) resultando no valor de Δ CT; o valor de Δ CT do gene alvo foi então subtraído do valor do Δ CT do calibrador (células com vetor vazio = controle), e assim foi determinado o valor de Δ ACT. Este valor foi utilizado na fórmula do nível de expressão FC = $2^{-\Delta\Delta$ Ct} (normalized fold change relative to calibrator), onde o número 2 representa a somatória da eficiência do gene alvo e do normalizador, considerando que ambos os genes possuem 100% de eficiência (Livak e Schmittgen, 2001). O controle negativo contendo água foi adicionado em todas as reações.

4.9- Alamar Blue (ensaio da resazurina) e coeficiente de interação de compostos (CID)

Afim de testarmos a possível atuação sinérgica de 3-MA com FTY720, com os dois compostos em conjunto. O realizamos testes de citotoxicidade coeficiente de interação entre compostos (CID) foi determinado para os tratamentos com FTY720 e 3-MA nas células HN12. Para tal, utilizou-se o método colorimétrico de Alamar Blue® em células plaqueadas em microplacas de 96 pocos e na confluência de 60%. Após o tratamento com diferentes concentrações de FTY720 durante 24 horas combinadas e não combinadas com 5 mM de 3-MA, a viabilidade celular foi determinada como descrito por O'brien e colaboradores(O'brien 2000). Resumidamente, o reagente colorimétrico foi adicionado na concentração final de 0,01 mg / mL e as células foram mantidas durante quatro horas nas condições de cultura padrão e protegidas da luz. A fluorescência do reagente Alamar Blue® reduzido foi medida utilizando um leitor de microplacas nos comprimentos de onda com 530/25 nm de emissão e 590/35 nm de excitação. Os resultados são apresentados como porcentagem de células viáveis em relação ao controle (veículo). O CID foi calculado para o tratamento combinado como descrito por Chou e colaboradores (Chou, 2010). As interações foram definidas como: efeito aditivo quando CID = 1, efeito antagônico quando CID> 1, efeito sinérgico quando CID <1 e efeito sinérgico significativo quando CID <0,7.

4.10- Análise de esfingosina-1-fosfato e ceramida por cromatografia líquida e espectrometria de massas (LC/MS/MS)

Para avaliar a efetividade do tratamento com FTY720 nos animais, e determinarmos os marcadores aos quais são alterados no sangue destes, realizamos o ensaio de LC/MS/MS. Imediatamente após o término dos tratamentos e eutanásia, o sangue total de cada animal foi coletado em metanol gelado e extraído conforme método descrito por (Shaner et al., 2009). Resumidamente, o método de extração e separação de lipídios utilizado foi baseado na adição de clorofórmio (MERCK) gelado nas amostras contendo metanol, e incubação à 48°C por 16 h. Após, foram adicionados 75 µL de hidróxido de potássio (1 M) às amostras, e estas incubadas a 37 °C por 2 horas. Após incubação, o pH foi ajustado para 7.0, com adição de ácido acético (Sigma-Adrilch) e as amostras submetidas a centrifugação. O sobrenadante foi transferido para tubo novo, e o precipitado foi submetido a nova extração conforme descrito acima. As amostras foram então submetidas à separação cromatográfica por LC/MS/MS no equipamento HPLC Shimadzu (LC-20AD) acoplado com um ESI espectrômetro de massa triplo quadrupolo (ABSciex API 3200)conforme protocolo descrito por Shaner et. al. 2009. As análises por espectrometria de massas foram realizadas em colaboração com o Professor Norberto Peporine Lopes, FCFRP-USP, e o doutorando, Daniel P. Demarque.

4.11-Ensaio de formação de tumores xenográficos

Afim de avaliar o FTY720 combinado com ao tratamento com 3-MA também foi realizado o ensaio de formação tumoral utilizando-se modelo de tumor xenoenxerto em camundongos. Foram utilizados camundongos Balb/c Nude machos, com 8 semanas, mantidos no biotério da FCFRP, USP, Ribeirão Preto, em mini-isoladores em cabine ventilada (quatro animais/caixa) com temperatura em 22 ± 2°C, com ciclo de luz controlada (12/12 h), ração comercial (Presence® Ratos e Camundongos) e água ad libitum, com limpeza realizada duas vezes na semana. Células da linhagem HN12 (1 x 106), após cultivo e expansão, foram injetadas subcutaneamente no dorso dos camundongos (Sobral, L. M. *et al.*, 2014). Após 7 dias, os animais receberam

diariamente administração oral, via gavagem, de FTY720 (1 mg/kg) (Hait *et al.*, 2015) e de 3-MA (24 mg/kg) a cada cinco dias (Li *et al.*, 2010). Todos os procedimentos de experimentação animal foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética noUso de Animais (CEUA) (protocolo: 14.1.1076.53.7, Anexo I), Campus de Ribeirão Preto, Brasil. No décimo sétimo dia de tratamento, os animais foram submetidos àeutanásia. Realizou-se a mensuração do volume e peso tumorais, os quais estão apresentados como média ± erro padrão da média.

4.12 Análise Estatística

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando-se o software Graph Pad Prism® (CA, EUA), versão 6.0, para Windows. Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média (SEM), e a significância foi determinada através do método de ANOVA two-way seguida dopós-teste deTukey's para atividade PP2A, curvas de viabilidade FTY720, LDH e resultados com animais. O pós-teste de Sidak's foi usado para comparações entre grupos controle versus silenciamento ou superexpressão em curvas de viabilidade FTY720 e na curva de viabilidade para CID. O teste T foi utilizado para comparações no ensaio de qPCR e alguns resultados de espectrofotometria de massas. O nível de significância foi estabelecido em 5% (p <0,05) para todas as comparações.

5. Resultados e interpretações

5.1-Atividade de PP2A

5.1-1. Atividade de PP2A em linhagens celulares

Inicialmente foi determinada a atividade de fosfatases num painel de linhagens de CECP e na linhagem NOK-SI (Figura 1). Nesta análise, verificou-se que as linhagens HN13, HN12 e SCC9 possuem os menores níveis de fosfatases ativas. Em seguida, foi determinada a atividade de PP2A, a partir da sua inibição especifica com ácido ocadaico (Figura 2). Sendo assim, as linhagens de CECP apresentaram menor atividade de fosfatases e também de atividade específica da fosfatase PP2A quando comparadas às células NOK-SI.

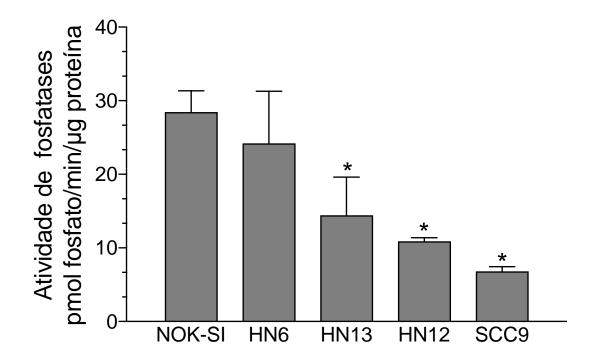


Figura 1: Atividade total de fosfatases em linhagem de queratinocito (NOK-SI) e de câncer de cabeça e pescoço (HN6, HN13, HN12, Cal27, SCC9).O símbolo asterisco (*) representa p< 0,05 em comparação a NOK-SI. Resultados são apresentados em pmol fosfato/min/µg proteína, como média e erro padrão representativos de dois experimentos independentes realizados em triplicata. O símbolo asterisco (*) representa p< 0,05 em comparação a 0 μM, teste two-way ANOVA e pós teste de Sidak's no GraphPad Prism 6.

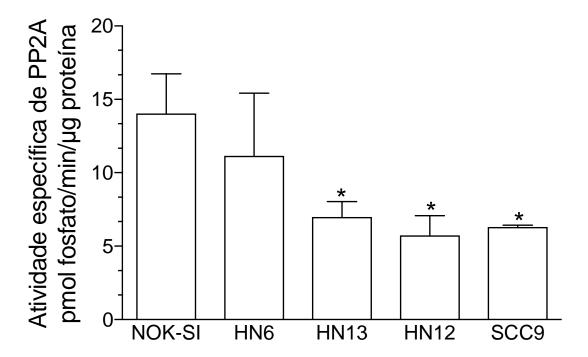


Figura 2: Atividade específica de PP2A em linhagem de queratinócito (NOK-SI) e de câncer de cabeça e pescoço (HN6, HN13, HN12, Cal27, SCC9).O extrato proteico das células foi utilizado para o ensaio de atividade de fosfatases na presença e ausência de ácido ocadaico (inibidor especifico de PP2A; 12 nM). A diferença entre a atividade total de fosfatases e os valores obtidos com o AO representam a atividade específica de PP2A. Resultados são apresentados em pmol fosfato/min/µg proteína. como média e erro padrão representativos de dois experimentos independentes realizados em triplicata. O símbolo asterisco (*) representa p< 0,05 em comparação a NOK-SI, teste two-way ANOVA e pós teste de Sidak's no GraphPad Prism 6.

5.1-2. Atividade de PP2A em células tratadas com FTY720

Tendo em vista que dentre as linhagens de CECP analisadas, a HN12 e a SCC9 apresentaram menor atividade de PP2A estas foram selecionadas para avaliar se o tratamento com FTY720 aumentaria a atividade da PP2A conforme descrito na literatura em outros tipos de câncer (Neviani et al., 2007; Liu et al., 2008; Neviani et al., 2013; Saddoughi et al., 2013; Liu et al., 2014; Cristóbal et al., 2015; Smith et al., 2016; Velmurugan et al., 2018). Nas figuras 3 e 4 demonstramos que o FTY720 aumentou a atividade de fosfatases e atividade especifica de PP2A nas linhagens CECP analisadas.

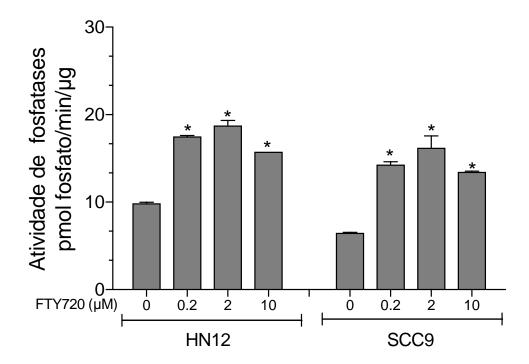


Figura 3: Atividade de fosfatases em linhagens de câncer de cabeça e pescoço (HN12 e SCC9) tratadas com FTY720. As células foram incubadas com FTY720 nas concentrações indicadas por 30 minutos e o extrato proteico foi utilizado para o ensaio de atividade de fosfatases. Resultados são apresentados em, como média e erro padrão representativos de dois experimentos independentes realizados em triplicata.O símbolo asterisco (*) representa p< 0,05 em comparação a 0 μM, teste two-way ANOVA e pós teste de Sidak's no GraphPad Prism 6.

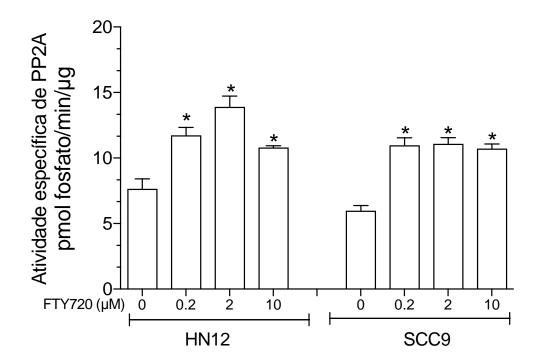


Figura 4: Atividade específica de PP2A em linhagens de câncer de cabeça e pescoço (HN12 e SCC9) tratadas com FTY720. As células foram incubadas com FTY720 nas concentrações indicadas por 30 minutos, o extrato proteico foi utilizado para o ensaio de atividade de fosfatases na presença e ausência de ácido ocadaico (inibidor especifico de PP2A; 12 nM). A diferença entre a atividade total de fosfatases e os valores obtidos com o AO representam a atividade específica de PP2A. Resultados são apresentados em pmol fosfato/min/µg proteína, como média e erro padrão representativos de dois experimentos independentes realizados em triplicata. O símbolo asterisco (*) representa p< 0,05 em comparação a 0 μM, teste two-way ANOVA e pós teste de Sidak's no GraphPad Prism 6.

Observou-se aumento significativo de atividade de fosfatasesnas linhagens HN12 e SCC9 (Figura 3) nas concentrações de 0.2, 2 e 10 µM de FTY720 após 30 minutos de incubação. Assim como aumento significativo nos níveis da atividade específica de PP2A (Figura 4). Estes resultados estão de acordo com o descrito na literatura para uma das ações propostas para FTY720, ativação de PP2A.

5.2-Efeito do FTY720 na viabilidade de células CECP

Mediante os resultados que demonstraram aumento na atividade das fosfatases (PP2A, PP2B e PP2C) e de PP2A em decorrência do tratamento com FTY720, decidimos avaliar se essa condição apresentaria algum efeito sobre a viabilidade de células CECP, HN12 e SCC9. Na tentativa de definir se a proteína SET é um alvo importante de FTY720 em CECP, realizamos o silenciamento estável da proteína SET nas linhagens HN12 e SCC9 (Figura 5). Após confirmado o knockdown da proteína SET (96%) por Western blotting, realizamos a análise de viabilidade das células HN12 (Figura 6) e SCC9 (Figura 7) na presença de FTY720 pelo método de citometria de fluxo utilizando-se marcação por iodeto de propídeo (PI) (Figura 6 e 7).

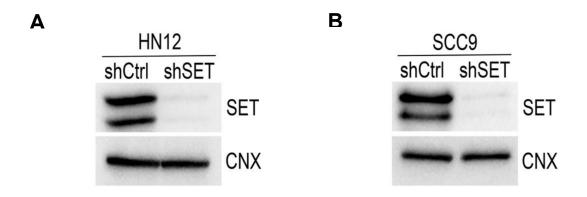


Figura 5: Silenciamento (knockdown) da proteína SET nas células HN12 e SCC9. A eficiência de silenciamento de RNA por short hairpin (shRNA) para SET nas células foi confirmado utilizando-se anticorpos primários para I2PP2A / SET e calnexina (CNX: como controle de carregamento de proteínas no gel), sendo (A) HN12 e (B) SCC9. Foi utilizado um shRNA controle negativo (shCtrl) e o específico para SET (shSET), previamente selecionado em outros trabalhos do grupo de pesquisa (Sobral, Lays M. et al., 2014).

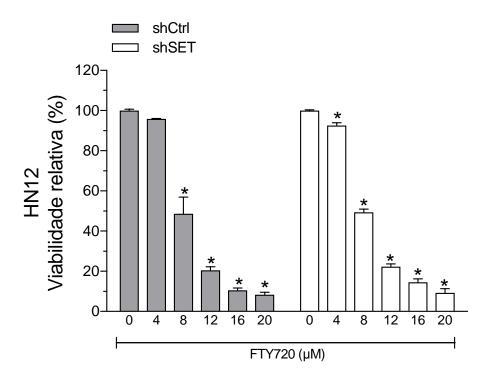


Figura 6: Redução da viabilidade celular por FTY720 em células HN12. As células HN12 sem (shCtrl, barras preenchidas) e com knockdown da SET (shSET, barras vazias) foram mantidas em cultura por 24 horas na presença de 4,8,12,16 e 20 µM de FTY720 e na ausência (controle). As células viáveis (células sem marcação) e com marcação (mortas) por iodeto de propídeo (PI) foram contadas por citometria de fluxo.O símbolo asterisco (*) representa p< 0,05 em comparação a 0 μM de cada grupo. Resultados normalizados pelo controle (0 μM, 100%). Os valores mostrados representam a média e erro padrão de um experimento realizado em triplicata, representativos de dois experimentos independentes realizados em triplicata analisados pelo teste two-way ANOVA e pós teste de Sidak's no GraphPad Prism 6.

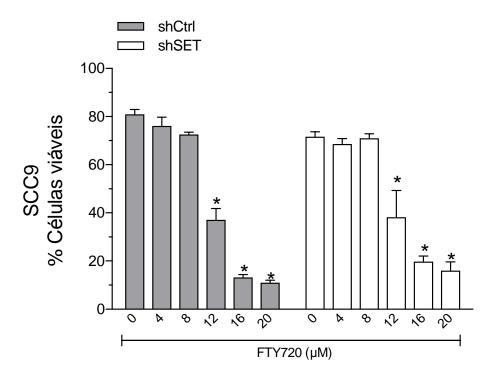


Figura 7: Redução da viabilidade celular por FTY720 em células SCC9. SCC9 sem (shCtrl, barras preenchidas) e com silenciamento da SET (shSET, barras vazias) após 24 horas de incubação com 4,8,12,16 e 20 µM de FTY720. A viabilidade celular foi determinada após o ensaio de viabilidade celular por citometria de fluxo com lodeto de propídeo (PI). O símbolo asterisco (*) representa p< 0,05 em comparação a 0 μΜ de cada grupo sh. Resultados normalizados pelo controle (0 μΜ, 100%). Os valores mostrados representam a média e erro padrão de um experimento realizado em triplicata, representativos de dois experimentos independentes realizados em triplicata analisados pelo teste two-way ANOVA e pós teste de Sidak's no GraphPad Prism 6.

A viabilidade celular determinada por citometria de fluxo de células marcadas por PI, mostra uma queda significativa de viabilidade a partir de 8 µM nas linhagens HN12shCtrl e HN12shSET e a partir de 12 µM nas linhagens SCC9shCtrl e SCC9shSET. Aparentemente, por este método a redução ou knockdown da proteína SET não interferiu na resposta ao FTY720. Cabe ressaltar que durante a execução da citometria de fluxo, a aquisição das células com shSET em ambas as linhagens era mais demorada, visto que existia um menor número total de células. Esta observação também era evidente quando as células eram analisadas por microscopia de campo claro. Sugerindo que nas células com shSET existia lise de células, potencialmente necrose. Inicialmente, foram realizadas análises de proteínas indicadoras de apoptose e depois de lactato desidrogenase (LDH) como indicador de necrose.

5.3- Morte celular por apoptose em células HN12 e SCC9 após incubação com **FTY720**

A apoptose dependente de caspase é um evento iniciado após sinalização de estresse celular que culmina numa cascata de clivagens ativadoras de caspases iniciadoras e efetoras, levando a morte celular (Danial e Korsmeyer, 2004). Mediante isso, analisamos uma caspase iniciadora, caspase-8 (pro-caspase e forma clivada), e a forma clivada de uma caspase efetora, caspase-3.

As células HN12 e SCC9 (shCtrl e shSET) foram incubadas com FTY720 nas concentrações de 8 e 12 µM, respectivamente, durante 24 horas. As proteínas caspase-8 e caspase-3 foram analisadas por WesternBlotting nas células HN12 (Figura 8) e SCC9 (Figura 9). A caspase-9 não foi analisada porque não tínhamos anticorpo disponível no laboratório no momento.

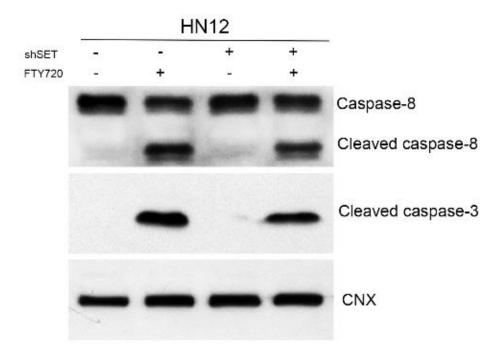


Figura 8: Clivagem de capsase-8 e caspase-3 em células HN12 incubadas com FTY720. As células HN12 sem (shCtrl) e com knockdown da SET (shSET) foram mantidas com FTY720 durante 24 horas. As proteínas foram extraídas para análise por Western blotting das caspase-8 (pro-caspase e forma clivada), caspase-3 clivada. A calnexina (CNX) foi utilizada como controle do experimento, por ser considerada uma proteína constitutiva. Resultados representativos de dois experimentos independentes.

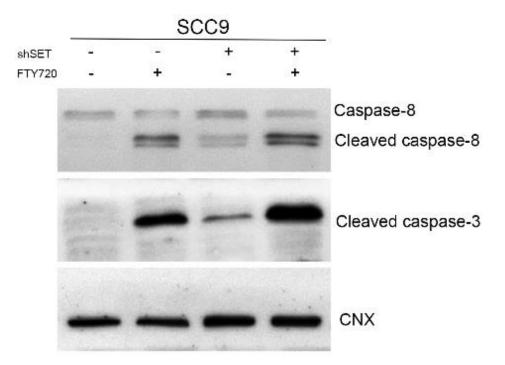


Figura 9: Clivagem de capsase-8 e caspase-3 em células SCC9 incubadas com FTY720. SCC9 sem (shCtrl) e com silenciamento da SET (shSET) foram mantidas com FTY720 por 24 horas e as proteínas foram extraídas para análise por Western blotting utilizando os anticorpos primários para caspase-8, caspase-3 clivada e CNX, utilizada como controle da corrida. Resultados representativos de dois experimentos independentes.

Observamos que há o mesmo perfil de ativação de caspases nas duas linhagens HN12 e SCC9 com e sem knockdown de SET sob ação do FTY720. Porém, há uma diferença nos níveis de caspase-8 e caspase-3 clivadas quando comparamos shCtrl e shSET: na HN12 observa-se menor níveis na shSET enquanto na SCC9 há maiores níveis das caspase-8 e caspase-3 clivadas, mostrando que o knockdown da SET deve interferir com a sinalização de morte nas duas células. Cabe ressaltar que na SCC9 shSET sem FTY720 foi observada a clivagem de caspase-8 e caspase-3, sugerindo uma apoptose basal, o que reforça o papel da SET como uma proteína importante para a viabilidade de células CECP.

5.4- Morte celular por necroseem células HN12 e SCC9 após incubação com **FTY720**

Alguns estudos citam o FTY720 como potente indutor de necrose, que é uma morte celular não programada. Um dos indicadores de necrose é a detecção de enzimas citoplasmáticas, no caso a lactato desidrogenase (LDH), que é liberada no meio de cultura após rompimento da membrana celular. Para tanto, as células de ambas as linhagens foram tratadas com FTY720 em concentrações de 4, 8 e 12µM durante 24 horas e os meios de cultura (sobrenadante) foram coletados e analisados em ensaio enzimático específico para LDH (Figura 10 e 11).

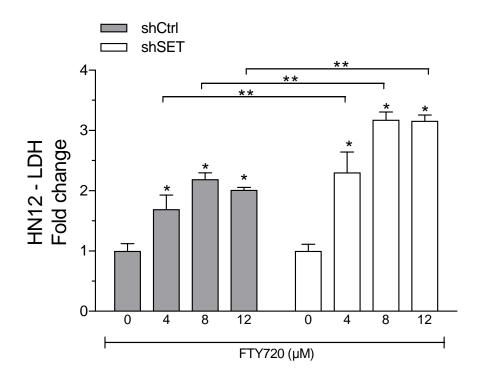


Figura 10: Liberação de lactato desidrogenase por células HN12 após exposição ao FTY720. A atividade de lactato desidrogenase (LDH) foi determinada no meio de cultura das células HN12 sem (shCtrl, barras preenchidas) e com knockdown da SET (shSET, barras vazias) após 24 horas de incubação com 4,8 e 12 µM de FTY720. Os resultados foram normalizados pelo controle e apresentados como "Fold change" em relação grupo controle (0 μM, igual a 1). O símbolo de um asterisco (*) representa p< 0,05 em comparação a 0 µM de cada grupo sh e dois asteriscos (**) representa p < 0,05 na comparação entre os grupos shCtrl e shSET. Os valores mostrados representam a média e erro padrão de um experimento realizado em triplicata, representativos de dois experimentos independentes realizados em triplicata analisados pelo teste two-way ANOVA e pós teste de Sidak's no GraphPad Prism 6.

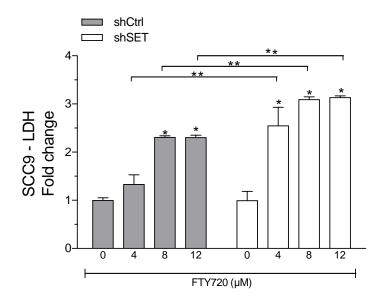


Figura 11: Liberação de lactato desidrogenase por células SCC9 após exposição ao FTY720. A atividade de lactato desidrogenase (LDH) foi determinada no meio de cultura das células SCC9 sem (shCtrl, barras preenchidas) e com knockdown da SET (shSET, barras vazias) após 24 horas de incubação com 4,8 e 12 µM de FTY720. Os resultados foram normalizados pelo controle e apresentados como "Fold change" em relação grupo controle (0 µM, igual a 1). O símbolo de um asterisco (*) representa p< 0,05 em comparação a 0 µM de cada grupo sh e dois asteriscos (**) representa p < 0,05 na comparação entre os grupos shCtrl e shSET. Os valores mostrados representam a média e erro padrão de um experimento realizado em triplicata, representativos de dois experimentos independentes realizados em triplicata analisados pelo teste two-way ANOVA e pós teste de Sidak's no GraphPad Prism 6.

Observamos que tanto em HN12shCtrl quanto HN12shSET foi detectada atividade de LDH após tratamento com FTY720 e em todas concentrações utilizadas mostrando a ocorrência do processo de necrose nessas células. Entretanto, observamos que as linhagens HN12shSET e SCC9 shSET apresentaram os maiores níveis de atividade de LDH quando comparado aos respectivos controles, mostrando que a ausência da SET está favorecendo o processo de morte por necrose induzido por FTY720 nestas linhagens. A atividade de LDH na linhagem SCC9shCtrl apresentou resultado estatisticamente significativo a partir da concentração de 8 µM enquanto a SCC9shSET apresentou aumento significativo dos níveis de LDH já na concentração de 4 µM de FTY720. Pode-se propor que a redução da proteína SET sensibiliza as linhagens CECP à necrose induzida pelo FTY720.

5.5- Análise por microscopia damorfologiadas células CECP tratadas com FTY720

Durante os experimentos com FTY720 nas linhagens de CECP, foram observadas algumas alterações morfológicas nas células. Utilizando-se microscopia óptica de campo claro, rotineiramente usada no laboratório, observou-se formação de vesículas (setas) nas células tratadas com FTY720 (Figura 12).

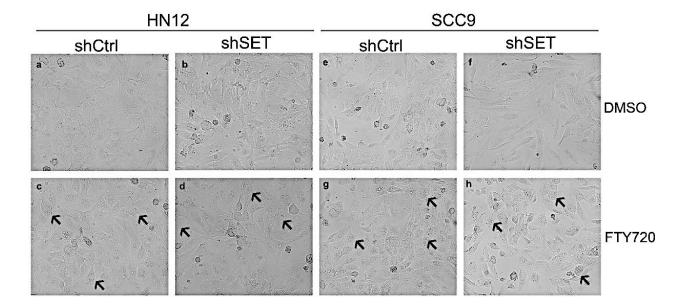


Figura 12: Microscopia de campo claro. Células HN12 (a-d) e SCC9 (e-h) sem (shCtrl) e com knockdown da SET (shSET) mantidas com FTY720 (8 [HN12] e 12 μΜ [SCC9]) por 6 horas (c, d, g, h) ou DMSO (a, b, e, f) como veículo. Setas indicam a formação vesículas nas células tratadas com FTY720. Dados representativos de dois experimentos independentes. Aumento de 400x em microscópio ótico.

Para melhor visualização e confirmação da presença das vesículas nas células tratadas com FTY720 realizou-se análises em microscópio eletrônico de transmissão (Figura 13). A microscopia eletrônica de transmissão confirmou a presença de vesículas intracelulares após tratamento com FTY720 nas duas linhagens. Entretanto, a quantidade de vesículas formadas nas células com shSET (HN12 e SCC9) em comparação com as shCtrl era mais intensa. Como na literatura tem sido mostrado que o FTY720 induz a morte por autofagia (Zhang et al., 2015), procedemos a análise de marcador do processo autofágico.

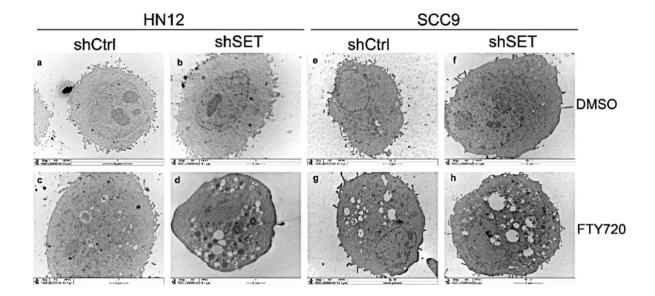


Figura 13: Microscopia Eletrônica de Transmissão. Linhagens HN12 (a, b, c, d) e SCC9 (e, f, g, h) sem (shCtrl) e com silenciamento da SET (shSET) foram mantidas com FTY720 (8 [HN12] e 12 μ M [SCC9]) por 6 horas (c, d, g, h) ou DMSO (a, b, e, f) como veículo. Dados representativos de dois experimentos independentes.

5.5 - Autofagia induzida por FTY720

O primeiro experimento realizado para analisar o processo autofágico foi Western blotting para LC3B ou LC3-II, que é a forma lipidada (conjugação lipídica de fosfoetanolamina) de LC3-I (Klionsky et al., 2016). O aumento de LC3-II sugere processo autofágico, já que a lipidação do LC3-I ocorre quando as vesículas autofágicas estão prestes a se conjugar com lisossomos, dando origem aos autofagolisossomos.

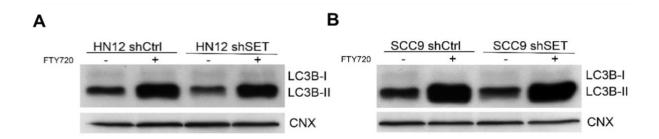


Figura 14: FTY720 promove aumento de LC3-II em células CECP. Células (A) HN12 e (B) SCC9 sem (shCtrl) e com knockdown da SET (shSET) foram mantidas com FTY720 p (8 [HN12] e 12 µM [SCC9]) or 6 horas e as proteínas foram extraídas para análise por Western blotting. Os anticorpos primários utilizados foram para LC3 (detecta tanto a banda maior LC3-I quanto a forma lipidada, LC3-II) e calnexina (CNX; proteína constitutiva e controle de carregamento de proteínas no gel). Dados representativos de dois experimentos independentes.

A lipidação de LC3 (Figura 14) foi observada em todas as células que apresentaram vesículas intracelulares (Figura 12 e 13), ou seja, nas células tratadas com FTY720, tanto nas linhagens HN12 e SCC9 (shCtrl e shSET). Outro indicador de autofagia que analisamos foi a proteína SQSTM1 (P62), quepode ser direcionada para degradação dentro do autofagolisossomo (Klionsky et al., 2016). As análises por microscopia confocal de fluorescência das células HN12 e SCC9 incubadas com condições experimentais FTY720 (nas mesmas descritas acima). após imunomarcação com anticorpos para LC3 (fluorescência verde) e P62 (fluorescência vermelha), mostram sobreposição de fluorescência (cor "amarelo") sugerindo mesma localização celular para as duas proteínas (Figura 15 e 16). As células HN12 e SCC9 apresentaram perfil de imunomarcação semelhante, confirmando a existência da autofagia após incubação com FTY720. Nota-se nas células com shSET uma maior densidade de pontos verdes (LC3), vermelhos (P62), quando fizemos a sobreposição (merge) das imagens de fluorescência, mais pontos amarelos, o que está de acordo com os resultados de MET (Figura 13).

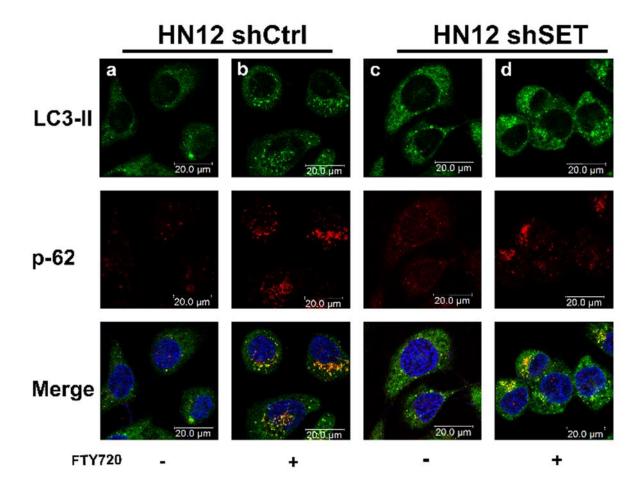


Figura 15: Microscopia confocal de fluorescência para LC3 e P62 em células HN12 após incubação com FTY720. Imunomarcação para LC3 e p-62 (SQSTM1) em HN12 sem (a,b - shCtrl) e com knockdown da SET (c, d - shSET) após tratamento com FTY720 (+; 8 µM) ou DMSO (-) por 6 horas. Imunofluorescência usando os anticorpos primários LC3 (verde) e p-62 (vermelho). Hoechest foi usado como marcador de núcleo (azul). As imagens são representativas de dois experimentos independentes. A barra indica 20 µm.

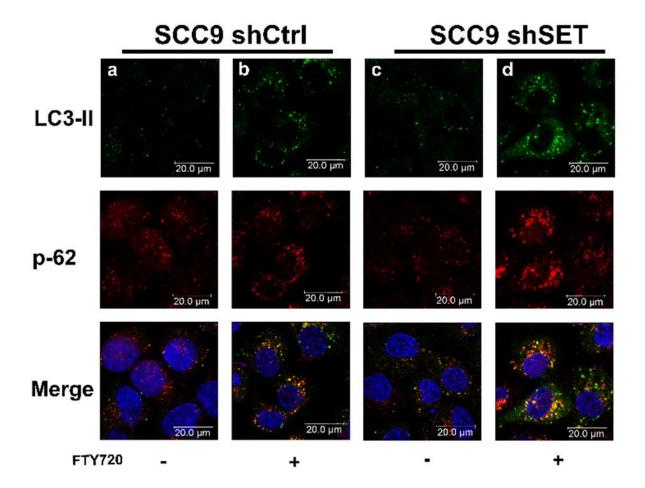


Figura 16: Microscopia confocal de fluorescência para LC3 e P62 em células SCC9 após incubação com FTY720. Imunomarcação para LC3 e p-62 (SOSTM1) em HN12 sem (a,b - shCtrl) e com knockdown da SET (c, d - shSET) após tratamento com FTY720 (+; 12 µM) ou DMSO (-) por 6 horas. Imunofluorescência usando os anticorpos primários LC3 (verde) e p-62 (vermelho). Hoechest foi usado como marcador de núcleo (azul). As imagens são representativas de dois experimentos independentes. A barra indica 20 µm.

Os nossos resultados mostraram que o FTY720 induz morte celular tanto por apoptose (Figura 8 e 9) quanto por necrose (Figura 10 e 11), e induz autofagia (Figuras 12-16) em CECP, o que está de acordo com alguns efeitos já descritos para o FTY720 em diferentes tipos de câncer (Azuma et al., 2003; Zhang et al., 2010; Zhang et al., 2015). Outro tipo de morte celular que foi descrito como ativado por FTY720 é a necroptose, que difere da necrose por apresentar sinalização celular definida que pode ser analisada por marcadores proteicos e pode ser inibida por compostos químicos (Zhang et al., 2015). Um dos compostos utilizados é o composto necrostatina-1 (NEC1) que inibe a formação do receptor de morte para necroptose.

Sendo assim, decidimos realizar ensaios funcionais com inibidores químicos das vias de sinalização de morte celular para apoptose, autofagia e necroptose para definir qual ou quais delas seria(m) a(s) mais importante(s) na ação do FTY720 em CECP.

5.6- Ensaio funcional de vias potencialmente ativadas (apoptose, autofagia, necroptose) por FTY720 em células CECP

As vias de sinalização ativadas por FTY720 representam a chave para descrição do seu efeito final nas células HN12 e SCC9. Dentre esses efeitos tem-se a apoptose, que se caracteriza pela ativação de clivagem de diversas caspases. Compostos, como o Q-VD-OPh, podem impedir essa clivagem. O Q-VD-OPh, é um composto inibidor de pan-caspase que age tanto em caspases iniciadoras quanto em efetoras(Caserta et al., 2003). Outra via é a autofagia, que também pode ser inibida utilizando-se diversos compostos químicos. Para tal, decidimos utilizar o composto 3-MA pois ele é um potente inibidor das etapas iniciais do processo autofágico(Seglen e Gordon, 1982; Zhang et al., 2013; Klionsky et al., 2016). Dessa maneira, as células tratadas com este composto não realizam a formação de vesículas autofágicas. Além destes dois inibidores, utilizamos um terceiro inibidor denominado necrostatina-1 (NEC1). Este composto é um inibidor alostérico específico para o ATP da quinase adaptadora associada ao receptor do domínio da morte (RIP1) 1Desse modo, NEC1 bloqueia seletivamente uma via de morte celular programada específica, a necroptose. A Necrostatina-1 não apresenta qualquer perturbação da cascata de apoptose, sendo especifica para a sinalização de necroptose (Degterev et al., 2005). Sendo assim, realizamos tratamento com os diferentes inibidores combinados ao FTY720 nas linhagens HN12 (Figura 17) e SCC9 (Figura 18) e avaliamos a viabilidade celular por citometria de células após marcação com PI.

Os inibidores isolados foram adicionados às células nas mesmas condições experimentais e não mostraram diferenças na viabilidade celular quando comparados ao controle, evidenciando a não citotoxicidade destes compostos nas concentrações e tempos de tratamento propostos.

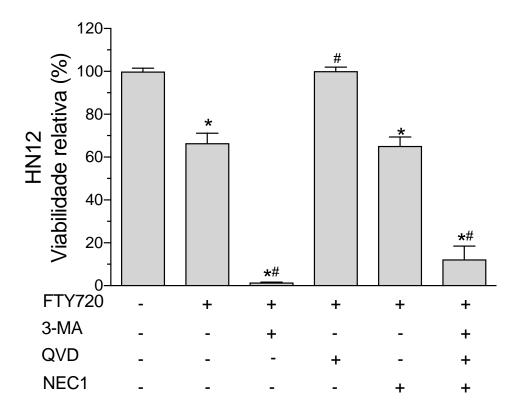


Figura 17: Ensaio funcional para identificação das vias de morte e sobrevivência celular em HN12 após incubação com FTY720. Células da linhagem HN12 foram tratadas com FTY720 isolado e combinado com os inibidores: 3-MA (autofagia), QVD (apoptose) e NEC1 (necroptose) por 24 horas. A viabilidade celular foi determinada por citometria de fluxo após marcação por PI. Os resultados foram normalizados pelo controle (sem tratamento, 100%). Os valores mostrados representam a média e erro padrão de um experimento realizado em triplicata, representativos de dois experimentos independentes realizados em triplicata. O símbolo asterisco (*) representa p< 0,05 comparação com nenhum tratamento, e o símbolo # indica comparação com FTY720 isolado. Testes: ANOVA two-way e pós teste de Tukey's no GraphPad Prism 6.

Podemos observar que o tratamento com FTY720 reduziu significativamente a viabilidade celular nas células HN12 em comparação com o controle. Surpreendentemente, a combinação 3-MA e FTY720 diminuiu de forma significativa a viabilidade celular em comparação ao controle (p<0,0001)e ao tratamento com FTY720 (p<0,0001). Em contraposição, a combinação de QVD e FTY720comparado ao tratamento apenas com FTY720, foi capaz de reestabelecer a viabilidade similar ao grupo controle. O inibidor de necroptose, NEC1, juntamente com FTY720, não foi capaz de reestabelecer a viabilidade, excluindo a necroptose como a via de morte. Já a combinação dos 3 inibidores com FTY720 reduziu a viabilidade celular em comparação ao controle e ao FTY720 (p<0,0001), sugerindo que a inibição da autofagia sensibiliza as células à morte. A diferença entre tratamento com3-MA+FTY720 e os três inibidores+FTY720 mostra uma viabilidade celular ligeiramente maior, talvez devido ao QVD (inibidor de apoptose), mas, de novo, confirmamos que o efeito do 3-MA junto ao FTY720 é predominante na indução da morte celular.

Os resultados na linhagem SCC9 foram similares aos observados na linhagem HN12: o tratamento com FTY720 reduziu significativamente a viabilidade celular em comparação ao controle (p<0,0001). A combinação 3-MA e FTY720 também diminuiu fortemente a viabilidade celular em comparação ao controle (p<0,0001) e ao FTY720 (p<0,0001). A combinação de FTY720 com QVD reestabeleceu a viabilidade celular para nível similar ao controle sem FTY720. O tratamento com NEC1 juntamente com FTY720 manteve a redução da viabilidade celular. Nas células SCC9a combinação dos 3 inibidores com FTY720 mostraram redução da viabilidade celular em níveis similares a combinação 3-MA com FTY720, o que ressalta a inibição da autofagia como mecanismo sensibilizador ao FTY720 nestas células.

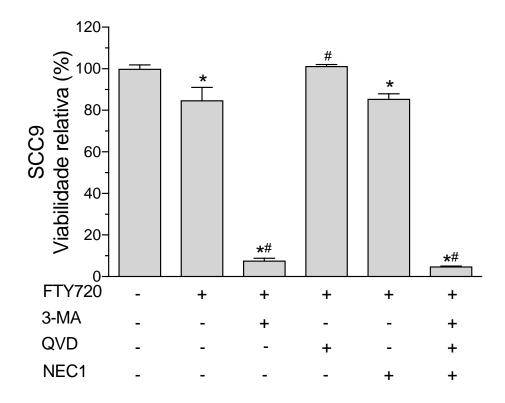


Figura 18: Ensaio funcional para identificação das vias de morte e sobrevivência celular em SCC9 após incubação com FTY720. Células da linhagem SCC9 foram tratadas com FTY720 isolado e combinado com os inibidores: 3-MA (autofagia), QVD (apoptose) e NEC1 (necroptose) por 24 horas. A viabilidade celular foi determinada por citometria de fluxo após marcação por PI. Os resultados foram normalizados pelo controle (sem tratamento, 100%). Os valores mostrados representam a média e erro padrão de um experimento realizado em triplicata, representativos de dois experimentos independentes realizados em triplicata. O gráfico inclui dados de dois experimentos independentes que foram realizados em triplicata. O símbolo asterisco (*) representa p< 0,05 comparação com nenhum tratamento, e o símbolo # indica comparação com FTY720 isolado. Testes: ANOVA two-way e pós teste de Tukey's no GraphPad Prism 6.

5.7-FTY720 e shSET reduzem os níveis da proteína SphK1

Mediante os resultados obtidos até aqui, observamos que a ação do FTY720 na indução de necrose foi maior quando os níveis da proteína SET foram reduzidos por RNA de interferência (Figuras 10 e 11). Com relação a apoptose, houveram pequenas diferençasnos níveis de caspase-8 e caspase-3 clivadas quando a célula tem shSET, sugerindo que as duas linhagens podem sinalizar de forma diferente a morte induzida por FTY720 (Figuras 8 e 9). Sendo assim, decidimos explorar outro alvo molecular do FTY720 já descrito na literatura, a SphK1 (Pchejetski et al., 2010;

White *et al.*, 2016), e avaliar se a redução da SET afetaria de alguma maneira a ação do FTY720 nesta proteína.

A SphK1é uma enzima que participa do balanço anti-apoptose e próapoptose, por participar da regulação dos níveis de ceramida, esfingosina e esfingosina 1 fosfato nas células e no microambiente tumoral(Spiegel e Merrill, 1996; Heffernan-Stroud e Obeid, 2013). Após tratamento por 6 horas com FTY720 nas linhagens HN12 e SCC9 com e sem knockdown da SET, realizamos ensaio de Western blotting para analisar os níveis de SphK1 (Figura 19), conforme descrito por Tonellie colaboradores em câncer de mama e próstata (Tonelli *et al.*, 2010).

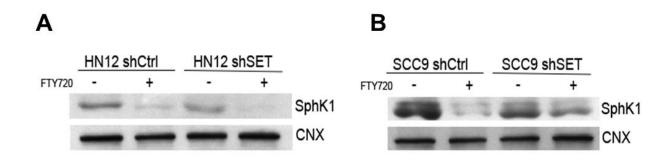


Figura 19: O FTY720 reduz os níveis de SphK1 em células HN12 e SCC9. As células (A) HN12 e (B) SCC9 sem (shCtrl) e com shSET foram mantidas com FTY720 por 6 horas e as proteínas extraídas para análise por Western blotting. Foram utilizados anticorpos primários para SPHK1 e CNX. Dados representativos de dois experimentos independentes.

Podemos observar que o tratamento com FTY720 foi efetivo na redução da SphK1 tanto na HN12 quanto da SCC9. Houve também redução de Sphk1 nas células com shSET nas duas linhagens. Estes resultados confirmam a SphK1 como alvo de FTY720 em CECP, e mostram pela primeira vez que a redução da proteína SET *per si* pode reduzir os níveis de SphK1. Este resultado sugere que a redução da SET, que leva ao aumento de atividade de PP2A (Sobral, L. M. *et al.*, 2014), tem efeito similar ao FTY720, que aumenta a atividade de PP2A (Figura 4), nos níveis de SphK1. A diminuição de SphK1 por FTY720 em outros tipos de câncer é descrita como degradação proteassomal (Tonelli *et al.*, 2010; Lim *et al.*, 2011). Sendo assim, para analisar se esta via de degradação está sendo ativada nas linhagens de CECP (HN12 e SCC9) realizamos tratamento com inibidor específico de proteassoma, o MG132 (Figura 20). Surpreendentemente, o inibidor de proteassoma reverteu a degradação

induzida por FTY720 e pelo knockdown da SET nas duas linhagens, confirmando ser a degradação via proteassoma.

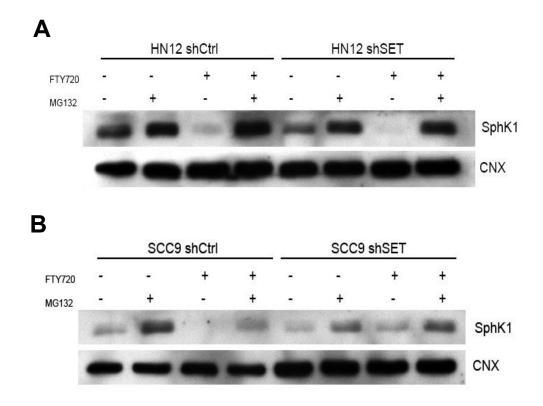


Figura 20: A degradação de SphK1 em células CECP com knockdown de SET e/ou com FTY720 é via proteassoma. As células (A) HN12 e (B) SCC9 sem (shCtrl) e com shSET foram mantidas com FTY720 por 6 horas e/ou MG132 por 8 horas (adicionado 2 horas antes do FTY720). As proteínas foram extraídas para análise por Western blotting utilizando os anticorpos primários para SPHK1 e CNX. Dados representativos de dois experimentos independentes.

Para entender a dinâmica do processo de degradação da SphK1 e se é dependente ou não da atividade (ou reativação) de PP2A, realizamos uma curva de tempo com FTY720 com e sem inibidor de PP2A (ácido ocadaico; AO) nas linhagens HN12shCtrl e HN12shSET (Figura 21A e 21B).

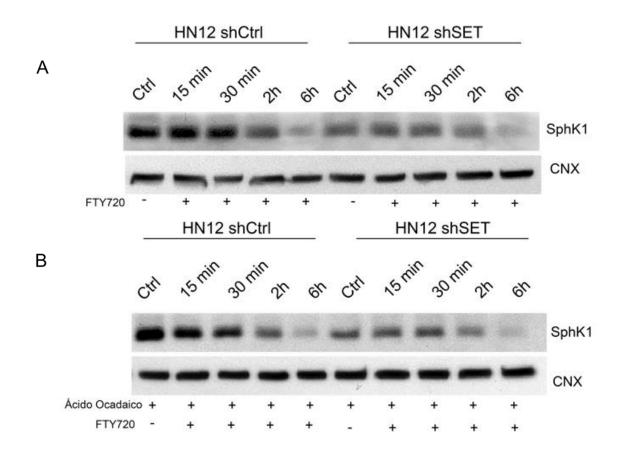


Figura 21: Efeito de FTY720 nos níveis de SphK1 em células HN12 com e sem tratamento com AO. As células (A) HN12 sem (shCtrl) e com knockdown da SET (shSET) foram mantidas com FTY720 e (B) com ácido ocadaico (AO; 12 nM) combinado ao FTY720 (8 μΜ) em diferentes tempos. As proteínas foram extraídas para análise por Western blotting utilizando os anticorpos primários para SPHK1 e CNX (controle de carregamento de proteínas no gel e constitutivo). O controle representa o veículo (Ctrl; DMSO 0,15%). Dados representativos de dois experimentos independentes.

As células sem (shCtrl) e com shSET na presença ou ausência de AO tiveram o mesmo perfil de redução de SphK1 quando incubadas com FTY720. Desta forma, propomos que a diminuição dos níveis de SphK1 induzida por FTY720 em células CECP não depende da atividade de PP2A. Além disto, mostramos pela primeira vez que os níveis da SET na célula, quando comparamos células shCtrl *vs.* shSET sem FTY720 (Figura 19-21), regulam de forma positiva os níveis de SphK1 em CECP.

5.8-Níveis de SphK1 e efeito de FTY720 em células CECP

Com base nos resultados anteriores, realizamos ensaios específicos com alterações dos níveis de SphK1, para mensurar seu papel na ação de FTY720 em células CECP (HN12). Inicialmente, a superexpressão da SphK1 (tanto RNAm quanto proteína) na linhagem HN12foi confirmada por gPCR e western blotting, respectivamente (Figura 22). Após essa confirmação, as células foram incubadas com FTY720 e a viabilidade celular analisada por citometria de fluxo e marcação com PI (Figura 23).

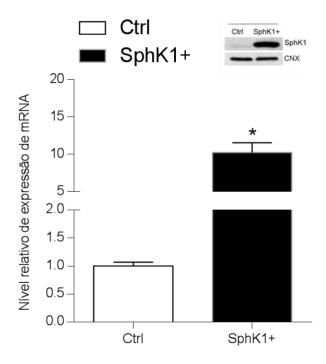


Figura 22: Aumento nos níveis da SphK1 em células HN12. Análise por qPCR em HN12 sem (shCtrl) e com superexpressão da SphK1 (SphK1+) e confirmação por Western blotting (imagem acima do gráfico) utilizando anticorpos primários para SphK1. Calnexina (CNX) foi usada como controle constitutivo e de carregamento de proteínas no gel. Os resultados foram apresentados como nível relativo de RNAm para SphK1 conforme descrito em métodos. Os valores são mostrados como média e erro padrão da média de um experimento representativo realizado em triplicata, analisados pelo teste two-way ANOVA e pós teste de Tukey's no GraphPad Prism 6.

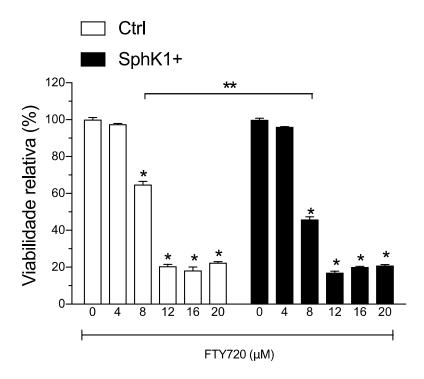


Figura 23: Aumento da SphK1 nas células HN12 sensibiliza ao FTY720. As células HN12 sem (shCtrl) e com superexpressão da SphK1 (SphK1+) após 24 horas de incubação com 4,8,12,16 e 20 µM de FTY720 foram submetidas a análise de viabilidade. A viabilidade celular foi determinada por citometria de fluxo após marcação com iodeto de propídeo (PI). * 0 µM como controle dentro de cada grupo; " entre os grupos Ctrl vs SphK1+. Os valores mostrados representam a média e erro padrão de um experimento realizado em triplicata, representativos de dois experimentos independentes realizados em triplicata analisados pelo teste two-way ANOVA e pós teste de Sidak's no GraphPad Prism 6.

O FTY720 foi mais eficiente em reduzir a viabilidade celular nas células com superexpressão de SphK1 (SphK1+) quando comparado às células controle na presença de 8 µM FTY720. Para confirmar se os níveis de SphK1 realmente são importantes para a ação do FTY720 em CECP, realizamos o knockdown da SphK1 na mesma linhagem (Figura 24).

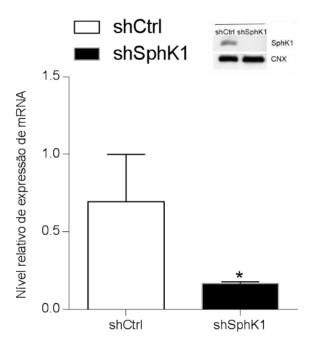


Figura 24: Redução dos níveis de SphK1 em células HN12. A eficiência de redução de SphK1 em HN12 por RNA de interferência foi confirmada por qPCR e por Western blotting (imagem acima do gráfico). Foram utilizados ensaios TagMan específicos para SPHK1 e anticorpos primários para SphK1. Calnexina (CNX) foi usada como controle no ensaio de WB. Os níveis relativos de RNAm foram calculados como níveis relativos usando a HN12 shCtrl como referência, conforme descrito em métodos. Os valores mostrados representam a média e erro padrão de um experimento representativo realizado em triplicata, analisados pelo teste two-way ANOVA e pós teste de Tukey's no GraphPad Prism 6.

Após confirmação da eficiência de redução de SphK1 (RNAm e proteína) nas células HN12 com RNA de interferência para SphK1, estas foram incubadas com FTY720 para análise de viabilidade celular por citometria de fluxo e marcação com PI (Figura 25).

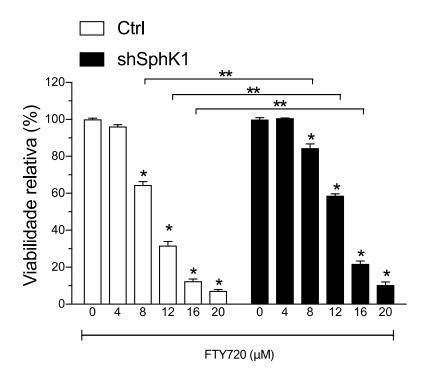


Figura 25: Redução dos níveis de SphK1 aumenta viabilidade após tratamento com FTY720.HN12 sem (shCtrl) e com silenciamento da SphK1 (shSphK1) após 24 horas de incubação com 4,8,12,16 e 20 µM de FTY720. A viabilidade celular foi determinada após o ensaio de viabilidade celular por citometria de fluxo com lodeto de propídeo (PI). * vs 0 µM de cada grupo sh; " vs shCtrl. Os valores mostrados representam a média e erro padrão de um experimento realizado em triplicata, representativos de dois experimentos independentes realizados em triplicata analisados pelo teste two-way ANOVA e pós teste de Sidak's no GraphPad Prism 6.

Diferente do observado com as células superexpressando SphK1, as células HN12 com knockdown de SphK1 mostraram maior viabilidade quando comparadas as células HN12shCtrl nas concentrações 8, 12, 16 e 20 µM, sugerindo que a proteína SphK1 tem um comportamento esperado de alvo molecular do FTY720 em CECP. Isto é, quando há aumento da proteína (alvo) as células morrem mais, e quando há redução no níveis as células ficam mais resistentes. Estes resultados são completamente, diferentes daqueles obtidos com o knockdown da proteína SET, visto que a redução da proteína SET nas mesmas células sensibilizou estas à morte induzida por FTY720, o que confirma a nossa hipótese de que a SET contribui para a sobrevivência celular (Leopoldino, Andreia M. et al., 2012; Sobral, L. M. et al., 2014) e pode ser um importante alvo terapêutico por sensibilizar as células tumorais a outros compostos.

Desse modo, temos as características in vitro da ação de FTY720 em CECP, sendo elas: (1) morte celular tanto por indução de apoptose quanto por necrose, (2) ativação da degradação de SphK1 por via proteassomal e (3) SphK1 representa um alvo importante para sua ação nestas células. Temos ainda (4) resultados que demonstram a indução da autofagia pelo FTY720 e (5) maior redução da viabilidade celular quando se realizou inibição da autofagia. Mediante o exposto, realizamos ensaios in vitro para avaliar se a combinação de FTY720 e 3-MA nas células tem efeito sinérgico e poderia ser uma possível combinação terapêutica para estudos in vivo.

5.9- Efeito sinérgico da combinação de FTY720 e 3-MA em CECP in vitro e in vivo

A interação entre dois compostos pode ser avaliada mediante uso de cálculo matemático denominado Coeficiente de Interação de Drogas (CID), por meio do qual determina-se: interações com efeitos aditivos (CID = 1), antagônicos (CID > 1), sinérgicos (CID < 1) ou com sinergismo significativo (CID < 0.7)(Chou, 2010). Utilizando-se FTY720 em diversas concentrações combinadas ou não com 3-MA (5 μM) em células HN12 realizamos o ensaio de viabilidade celular pelo método da resazurina após 24 h de incubação (Figura 26). Os valores obtidos da viabilidade foram utilizados para o cálculo de CID (Tabela 3).

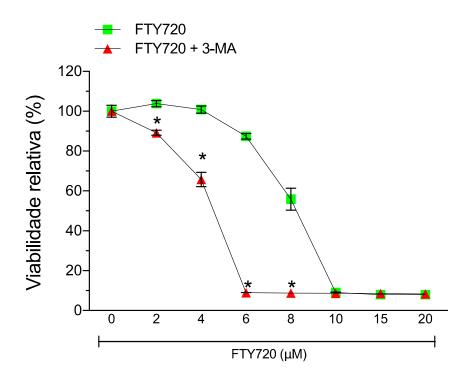


Figura 26: Viabilidade celular em células HN12 após incubação com FTY720 e 3-MA. As célulasHN12 após a incubação com FTY720 (nas concentrações indicadas em µM) sem e com 3-MA (5 mM) foram analisadas por resazurina para determinar a viabilidade. (A) Curva de viabilidade de FTY720 combinado com 3-MA em células HN12.* representa efeito sinérgico; Os valores mostrados representam a média e erro padrão de um experimento realizado em triplicata, representativos de dois experimentos independentes realizados em triplicata analisados pelo teste two-way ANOVA e pós teste de Sidak's no GraphPad Prism 6.

3-MA (5 mM)	FTY720 (μM)	CID
	0	
	2	0.86
	4	0.65
	6	0.10
	8	0.16
	10	0.96
	15	1.03
	20	1.02

Tabela 3: Coeficiente de interação de drogas em células HN12 após incubação com FTY720 e 3-MA. As célulasHN12 após a incubação com FTY720 (nas concentrações indicadas) sem e com 3-MA (5 mM) foram analisadas por resazurina para determinar a viabilidade, a partir dessa viabilidade o CID (coeficiente de interação de drogas) foi calculado. O CID para FTY720 e 3-MA foi determinado e os valores com efeito sinérgico significativo foram considerados como CID <0,7. Os valores mostrados representam a média e erro padrão de um experimento realizado em triplicata, representativos de dois experimentos independentes realizados em triplicata.dois experimentos independentes realizados em triplicata.

A interação entre FTY720 nas concentrações de 4, 6 e 8 μM e 3-MA (5 mM) tiveram efeito sinergico significativo, evidenciando o potencial dessa combinação na redução da viabilidade celular. Para confirmar se o uso dessa nova combinação (FTY720+3-MA) pode ter relevência terapêutica em CECP foram realizados os ensaios usando modelo *in vi*vo. O modelo utilizado foi o de formação de tumor HN12 xenoenxerto em camundongo nude, já utilizado em outros trabalhos do nosso grupo de pesquisa (Sobral, Lays M. *et al.*, 2014; Goto *et al.*, 2018) e aprovado pelo CEUA da USP (protocolo n. 14.1.1076.53.7, anexo I).

A progressão do crescimento tumoral ao longo dos dias foi acompanhada em todos os grupos experimentais: veiculo, FTY720, 3-MA, FTY720+3-MA. Os animais tratados com FTY720+3-MA (Figura 27) apresentaram redução significativa dos tumores (p=0,0122). Essa dimuição apresentou diferença significativa no 16 $^{\circ}$ dia no grupo tratado com FTY720+3-MA (235 ± 104 mm³) em comparação ao grupo controle (559 ± 508 mm³).

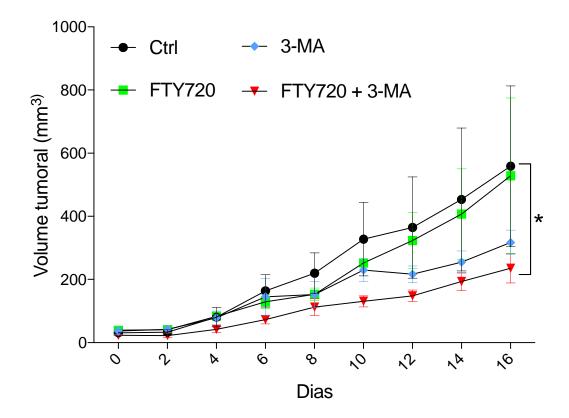


Figura 27: Curva de crescimento do tumor HN12 xenoenxerto. As medidas foram obtidas a cada 2 dias e apresentadas como volume (mm³) para os grupos: controle (Ctrl), tratados com FTY720 (FTY720), 3-MA (3-MA) e combinação FTY720 e 3-MA (FTY720+3-MA). Diferenças estatísticas (p <0,05) foram indicadas por * comparado ao grupo controle, analisado por ANOVA two way e teste de comparações múltiplas de Tukey's em GraphPad Prism 6. Resultados representativos de dois experimentos independentes apresentados como média ± erro padrão da média.

O peso do tumor (Figura 28) ao fim do experimento confirmou que houve redução significativa entre os grupos Ctrl (399 ± 225 mg) e FTY720 + 3-MA (121 ± 34 mg)(p=0,0236). Além disso em uma análise visual podemos observar os menores tamanhos de tumores quando tratados com a combinação FTY720+3-MA (Figura 29) Esses resultados in vivo evidenciam a efetividade antitumoral da combinação de FTY720 com 3-MA, abrindo novas perspectivas de estudos que explorem essa combinação de tratamento para terapia de neoplasias de cabeça e pescoço.

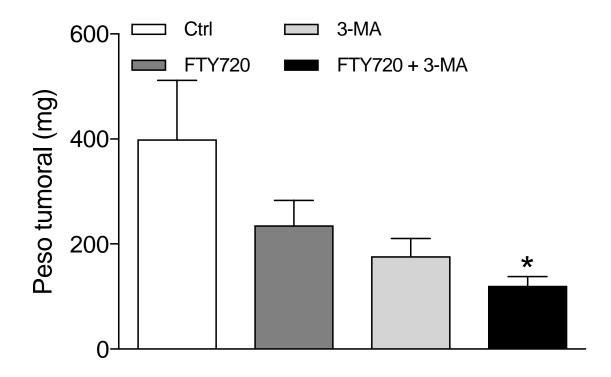


Figura 28: Peso dos tumores HN12 xenoenxerto. Pesos expressos em miligramas (mg) obtidos no fim do experimento animal para os grupos: controle (Ctrl), tratados com FTY720 (FTY720), 3-MA (3-MA) e combinação FTY720 e 3-MA (FTY720+3-MA). Diferenças estatísticas (p <0,05) foram indicadas por * comparado ao grupo controle, analisado por One way ANOVAem GraphPad Prism 6. Resultados representativos de dois experimentos independentes apresentados como média ± erro padrão da média.

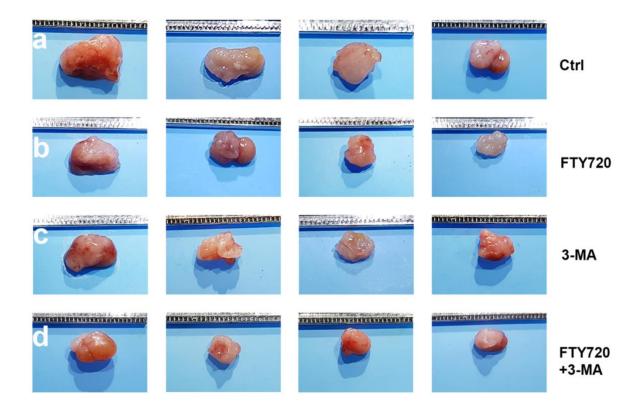


Figura 29: Imagens representativas do tumor HN12 xenoenxerto dos animais após tratamentos. Tumores xenográficos removidos no último dia experimental, sendo cada fileira representativa de um grupo: (a) Ctrl (controle); (b) FTY720; (c) 3-MA; (d) FTY720 + 3-MA.

Considerando que o tratamento dos animais com FTY720 isolado não teve efeito antitumoral significativo no nosso modelo in vivo, e que o FTY720 e FTY720fosforilado (FTY720-p) podem ser detectados no sangue por espectrometria de massas (LC/MS/MS)(Shaner et al., 2009), procedemos a análise no sangue dos animais submetidos aostratamentos com FTY720 e FTY720+3-MA (Figura 30). Foi possível confirmar que tanto os animais tratados com FTY720 isolado quanto aqueles que receberam a combinação FTY720+3-MA, tiveram as duas formas de FTY720 (fosforilado e não fosforilado) no sangue e em níveis similares.

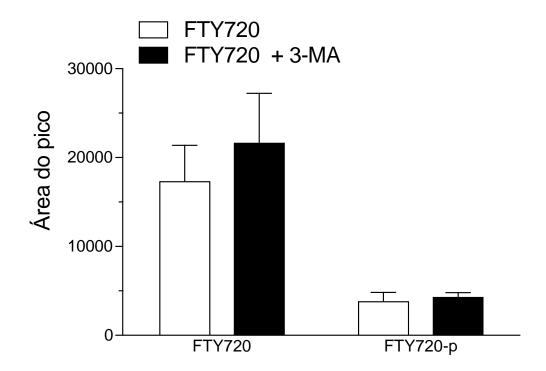


Figura 30: Níveis de FTY720 e FTY720-p no sangue dos animais após atratamento com FTY720. Análise de FTY720 e FTY720 fosforilado (FTY720-p) no sangue de animais tratados com FTY720 isolado ou FTY720 combinado com 3-MA por LC/MS/MS. Resultados representativos de dois experimentos independentes, apresentados como area do pico calculados no software do espectrometro de massas. Os valores são média ± erro padrão da média, analisados por t-test no GraphPad Prism 6.

Um dos efeitos descritos do FTY720 é alterar o metabolismo de esfingolipidios nas células, uma vez que a sua forma fosforilada atua como antagonista do receptor de S1P e no meio intracelular seu aumento gera um desbalanço dos esfingolipídios, tal como redução de S1P (Lamontagne et al., 2006; White et al., 2016). Além disto, para melhor compreender os efeitos dos tratamentos no metabolismo dos esfingolipídios, utilizamos também o sangue dos animais para análise por espectrometria de massas de dois esfingolipídios centrais: ceramida e S1P (Figura 31). O tratamento com FTY720 sozinho ou com 3-MA reduziu os niveis de S1P e a combinação do FTY+3-MA aumentou de forma significativa os niveis de ceramida no sangue. O aumento de ceramida tem sido associado ao aumento de apoptose e diminuição da sobrevivência celular (White et al., 2016). Este resultado émuito

importante, pois sugere a ceramida como um potencial marcador de resposta terapêutica antitumoral.

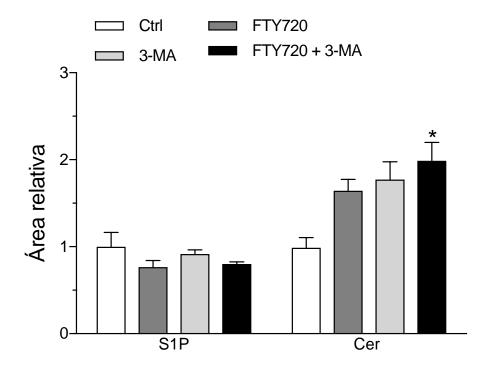


Figura 31: Níves deesfingosina-1-fosfato (S1P) e ceramidas no sangue dos animais com tumores HN12 xenoenxerto após tratamento com FTY720, 3-MA, FTY720+3-MA. Os resultados foram normalizados pelo controle (sem tratamento= 1)e apresentados como área relativa do pico obtida por análises de espectrometria de massas. O símbolo asterisco (*) representa p< 0,05. Os dados são representativos de dois experimentos independentes apresentados como média ± erro padrão, analisados por ANOVA two-way e pós testes de Tukey's no GraphPad Prism 6.

Para uma visualização geral, preparamos um esquema resumido com os principais resultados obtidos neste trabalho tanto in vitro (Figura 32) quanto in vivo (Figura 33).

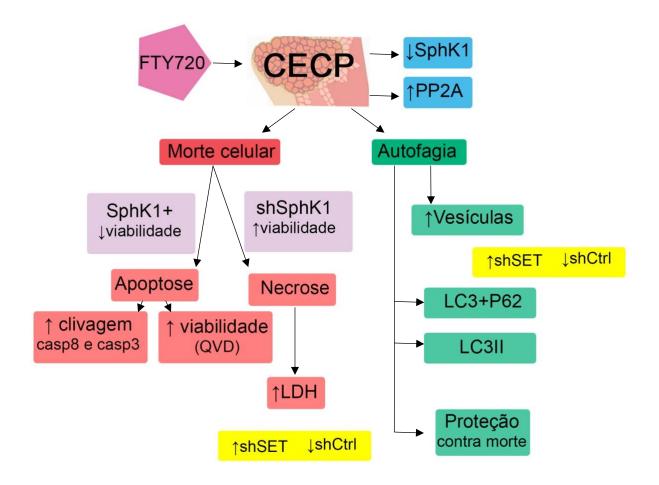


Figura 32: Esquema representativo dos principais resultados de FTY720 em CECP in vitro neste trabalho. FTY720 em CECP diminui as concentrações de SphK1 e aumenta atividade específica de PP2A. Gera morte celular, onde com superexpressão de Sphk1 (SphK1+) gera menor viabilidade do que quando temos redução da mesma proteína (shSphK1). As principais vias de morte identificadas são apoptose (clivagem de caspases e aumento de viabilidade com inibidor específico de apoptose QVD) e necrose (aumento de LDH no meio de cultura, sendo esse aumento mais expressivo em células com shSET). Outro mecanismo ativado por FTY720 é a autofagia onde foi observado um aumento de vesículas em maior intensidade em células com shSET, além de aumento da marcação dupla entre LC3 e p62 por imunofluorescencia e LC3II por westernblotting, após inibição da autofagia com o composto 3-MA foi observada intensificação da morte, caracterizando a autofagia como mecanismo de proteção à morte celular.

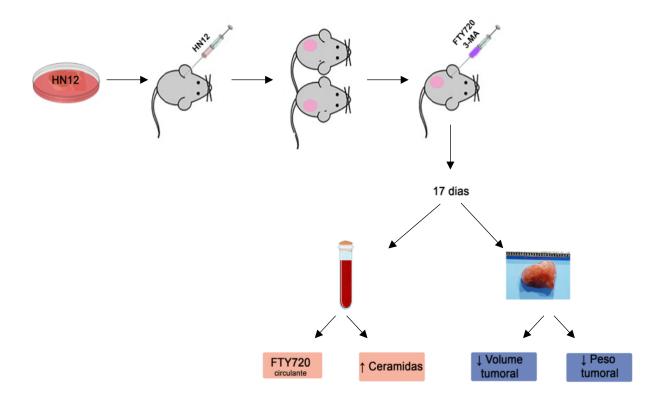


Figura 33: Esquema representativo dos principais resultados de FTY720 em CECP in vivo neste trabalho. Após cultivo e expansão celular de células de CECP da linhagem HN12, os camundongos Balb/C-nude receberam xenoenxerto dorsal destas e após estabelecimento do tumor receberam tratamento com FTY720 e 3-MA. Os efeitos foram observados principalmente nos grupos que receberam os dois tratamentos (FTY720+3-MA) em relação ao controle, após 17 dias experimentais onde o sangue coletado foi submetido à espectofotometria de massas e observado presença de FTY720 e aumento de ceramidas. Nos tumores observamos diminuição do volume tumoral e diminuição do peso dos tumores.

6. Discussão

Neste trabalho, o objetivo foi estudar o potencial antitumoral de FTY720 (Fingolimod), um pró-fármaco já aprovado para tratamento de indivíduos com esclerose múltipla, em células derivadas de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CECP) tanto in vitro quanto in vivo. A primeira etapabaseou-se em avaliara atividade da proteína supressora tumoral, fosfatase PP2A, que está envolvida na regulação da proliferação e sobrevivência celular (Janssens e Goris, 2001; Liu et al., 2008; Neviani et al., 2013; Cristóbal et al., 2015; Smith et al., 2016; Velmurugan et al., 2018). Essa fosfatase é endogenamente inibida por I2PP2A / SET(Li et al., 1996), cujo acúmulo em amostras e linhagens CECP já foi mostrado por nosso grupo de pesquisa(Leopoldino, A. M. et al., 2012). Nas linhagens de CECP, que tinham níveis baixos de atividade de fosfatases (PP2A, PP2B e PP2C) e, especificamente, de PP2A, o FTY720 possibilitou a reativação das fosfatases e daPP2A (Figuras 1,2,3 e 4), conforme esperado e descrito em outros tipos de células tumorais (Neviani et al., 2007; Liu et al., 2008; Neviani et al., 2013; Cristóbal et al., 2015; Smith et al., 2016; Velmurugan et al., 2018). Este efeito na atividade de PP2A foi descrito como associado a ligação de FTY720 na proteina SET e consequente bloqueio da interação da SET com PP2A, o que leva a reativação da PP2A(Saddoughi et al., 2013). Aparentemente, nas células CECP existe a reativação de PP2A que pode ser devido a esta ação do FTY720.

Entretanto, o mecanismo completo de ação do FTY720 em células de câncer de cabeça e pescoço ainda é desconhecido (Velmurugan *et al.*, 2018). Desta maneira, selecionamos duas linhagens de CECP (HN12 e SCC9) com e sem knockdown da proteína SET para investigarse a ação do FTY720 depende dos níveis da SET edeterminar as vias de sinalização de morte celular.

Ensaios de viabilidade celular mostraram que FTY720 possui capacidade de eliminar as células que apresentam tanto alto quanto baixo níveis da SET, confirmando o potencial antitumoral do FTY720 em CECP. Além disto, foi evidenciado maior sensibilidade à morte por necrose nas células com knockdown de SET, reforçando a nossa hipótese de que a SET tem um papel fundamental na sobrevivência/resistência das células a compostos antitumorais, como a cisplatina (Sobral, Lays M. et al., 2014) e a condição de estresse, como o estresse oxidativo (Leopoldino, Andreia M. et al., 2012).

Adicionalmente, esses resultados suscitaram o questionamentoem relação a outros mecanismos de morte celular desencadeados por FTY720 nessas células, tais como apoptose, autofagia e necroptose(Zhang et al., 2010; Zhang et al., 2015). A caspase-8 participa das etapas iniciais da apoptose por clivagem após o estresse celular pela ativação do receptor de morte e pode ativar a via apoptótica (Kang et al., 2011). Já a caspase-3 é ativada no estágio final do processo apoptótico iniciado com a caspase-8(Danial e Korsmeyer, 2004). Nossos resultados mostram que esse processo de morte ocorreuem células de CECP tratadas com FTY720, confirmando que há ativação de apoptose. Células SCC9 com silenciamento estável da SET (shSET) apresentaram clivagem de caspase-8 e caspase-3de forma mais intensa do que o controle, demonstrando que a SET exerceum papel protetor contra apoptose nas células de CECP (Figuras 8 e 9). A ocorrência de morte por indução de via de apoptose também foi confirmada no ensaio funcional utilizandoQVD (inibidor de caspases)junto com FTY720,o que impediu a morte celular quando comparadoao FTY720. A proteção ou não resposta ao uso de inibidor de necroptose associado ao FTY720 na viabilidade celular, a priori excluiu este tipo de morte nas células CECP (Figuras 17 e 18). Portanto, a indução de morte porFTY720 ocorre devido à sinalização por apoptose e por necrose, conforme evidenciado pelo aumento significativo de LDH no meio de cultura (Figuras 10 e 11).

Outro alvo do FTY720 descrito na literatura é a proteína SphK1(Azuma *et al.*, 2003; Pchejetski *et al.*, 2010; Lim *et al.*, 2011). Identificamos que essa proteínafoi diminuida drasticamente nas células de CECP após tratamento com FTY720, devido a ativação de degradação proteassomal(Tonelli *et al.*, 2010). Um resultado inédito foi a redução significativa da SphK1 nas células CECP com knockdown de SET, sugerindo que a SET regula positivamente os niveis de SphK1 (Figuras 20 e 21A). Ademais, evidenciamos uma independência da ação de PP2A na redução de SphK1, visto que a inibição quimica de PP2A por ácido ocadaico não impediu a degradação de SphK1 (Figura 21B). Isto sugere que o FTY720 pode agir via SET para diminuir SphK1, mas para estudar esta relação outros experimentos já estão em andamento no nosso grupo de pesquisa.

Tomado juntos nossos resultados sugerem que o FTY720 atua via ativação da PP2A (supressor tumoral) e redução da SphK1. Sendo assim,para definir a relevância de SphK1 como alvo de FTY720 em CECP foi realizado tanto a superexpressão (SphK1+) quanto o knockdown de SphK1 (shSphK1). Em

concordância com outros estudos, identificamos que células com Sphk1+ foram mais sensíveisa FTY720 e que as células com shSphK1 apresentaram maior resistênciaà morte por FTY720 confirmando, assim, a Sphk1 como um dos alvosde FTY720 em CECP (Figuras 31 e 33).

Além disso, em resposta ao FTY720 as células CECP ativaram o processo autofágico. Este mecanismo é descrito como indutor de morte por apoptose em células de câncer de próstataquando expostas ao FTY720(Zhang et al., 2015). Apesar de observar ativação do processo autofágico em nossos experimentos, a apoptose apresentou-se como principal mecanismo de morte induzida por FTY720 junto com a necrose. A autofagia induzida por FTY720 em CECP apresentou-se como mecanismo de proteção à morte celular (resistência), uma vez que a inibição da autofagia pelo 3-MA sensibilizouas células a morte por FTY720. Na literatura, foi descrito que células de câncer de ovário com taxas elevadas de atividade autofágica eram mais resistentes ao FTY720(Zhang et al., 2010). O nosso trabalho é o primero a testar a combinação de 3-MA e FTY720, e mostrar efeito sinérgico in vitroe potencial terapêutico in vivousando modelo de tumores HN12 xenoenxerto em camundongo nude (Figura 27). A melhor resposta a tratamento nos animais foi obtida com a esta combinação e foi a que levou a maiores níveis de ceramida no sangue dos animais (Figura 29), sugerindo este esfingolipídio como potencial marcador da resposta terapêutica.

7. Conclusão

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho concluimos que o FTY720 possui efeito antitumoral em CECP, sendo a apoptose e a necrose as principais vias de morte ativadas. O mecanismo de ação de FTY720 em CECP envolve reativação de PP2A e redução de SphK1 enquanto altos níveis de SET representam um mecanismo de resistência a morte celular. Por fim, outro mecanismo importante ativado por FTY720 é a autofagia, o que permitiu-nos testar e propor a combinação de FTY720 com inibidor de autofagia (3-MA), tanto *in vitro* quanto *in vivo*, como uma nova estratégia antitumoral em CECP além de evidenciarmos as ceramidas como marcador de resposta terapêutica ao tratamento em camundongos.

Levando em conta essas conclusões, podemos afirmar as vias estudadas como importantes alvos de ação antitumoral em CECP, evidenciando a via dos esfingolipidios como as ceramidas e SphK1 como proposta de maiores investigações nesses mecanismos descritos neste trabalho. O FTY720 é um composto utilizado na clínica apenas pela sua função imunodepressora, em esclerose múltipla principalmente. Pela sua ação sobre os linfócitos, impedindo a maturação destes pelo timo, é de suma importancia analisar em estratégias que evadam ou que compensem sua ação imunodepressora, em testes clinicos. Como sabemos, a associação de uma ou mais drogas no tratamento do câncer, visando duas vias de morte celular por exemplo, é uma estratégia que vem sendo defendida por inúmeros pesquisadores e clínicos, pelos seus efeitos antitumorais potencializados.

Portanto o FTY720 se mostra como potencial agente antitumoral, ativando vias de necrose e apoptose em CECP, combinados com inibidor de autofagia ainda tem seus efeitos antitumorais potencializados, o que pode ser uma nova estratégia para futuros estudos nesta área.

8. Referências

ANDREOTTI, M. et al. Ocupação e câncer da cavidade oral e orofaringe. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 22, n. 3, p. 543-552, 2006.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer facts & figures 2017. Atlanta, 2017a. Disponível em:https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-figures-2017/cancer-facts-and-figures-2017.pdf.

ADAMS, J. M. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. **Genes Dev**, v. 17, n. 20, p. 2481-95, Oct 2003. ISSN 0890-9369. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14561771>.

ANG, K. K. et al. Randomized phase III trial of concurrent accelerated radiation plus cisplatin with or without cetuximab for stage III to IV head and neck carcinoma: RTOG 0522. **J Clin Oncol**, v. 32, n. 27, p. 2940-50, Sep 2014. ISSN 1527-7755. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25154822 >.

ARRIAZU, E.; PIPPA, R.; ODERO, M. D. Protein Phosphatase 2A as a Therapeutic Target in Acute Myeloid Leukemia. **Front Oncol**, v. 6, p. 78, 2016. ISSN 2234-943X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27092295>.

ARTEAGA, C. L. et al. AACR Cancer Progress Report 2014. **Clin Cancer Res,** v. 20, n. 19 Suppl, p. S1-S112, Oct 2014. ISSN 1078-0432. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25228531>.

AZUMA, H. et al. Induction of apoptosis in human bladder cancer cells in vitro and in vivo caused by FTY720 treatment. **J Urol,** v. 169, n. 6, p. 2372-7, Jun 2003. ISSN 0022-5347. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12771800>.

BOATRIGHT, K. M.; SALVESEN, G. S. Mechanisms of caspase activation. **Curr Opin Cell Biol,** v. 15, n. 6, p. 725-31, Dec 2003. ISSN 0955-0674. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14644197>.

BOING, A. F. et al. How much do smoking and alcohol consumption explain socioeconomic inequalities in head and neck cancer risk? **J Epidemiol Community Health,** v. 65, n. 8, p. 709-14, Aug 2011. ISSN 1470-2738. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20724282>.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem,** v. 72, p. 248-54, May 1976. ISSN 0003-2697. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**, Sep 2018. ISSN 1542-4863. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30207593 >.

BRUNKHORST, R.; VUTUKURI, R.; PFEILSCHIFTER, W. Fingolimod for the treatment of neurological diseases-state of play and future perspectives. **Front Cell Neurosci**, v. 8, p. 283, 2014. ISSN 1662-5102. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25309325>.

CARDINALI, M. et al. Tyrosine phosphorylation as a marker for aberrantly regulated growth-promoting pathways in cell lines derived from head and neck malignancies. **Int J Cancer**, v. 61, n. 1, p. 98-103, Mar 1995. ISSN 0020-7136. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7705939>.

CARLSON, S. G. et al. Expression of SET, an inhibitor of protein phosphatase 2A, in renal development and Wilms' tumor. **J Am Soc Nephrol,** v. 9, n. 10, p. 1873-80, Oct 1998. ISSN 1046-6673. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9773788 >.

CASERTA, T. M. et al. Q-VD-OPh, a broad spectrum caspase inhibitor with potent antiapoptotic properties. **Apoptosis**, v. 8, n. 4, p. 345-52, Aug 2003. ISSN 1360-8185. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12815277 >.

CASTILHO, R. M. et al. Rac1 is required for epithelial stem cell function during dermal and oral mucosal wound healing but not for tissue homeostasis in mice. **PLoS One,** v. 5, n. 5, p. e10503, May 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20463891>.

CHAN et al. who classification of Head and Neck Tumours. 2017. 348 ISBN ISBN-13 9789283224389ISBN-10 9283224388. Disponível em: http://apps.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp?codlan=1&codcol=70&codcch=4009>.

CHOI, K. S. Autophagy and cancer. **Exp Mol Med,** v. 44, n. 2, p. 109-20, Feb 2012. ISSN 2092-6413. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22257886 >.

CHOU, T. C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. **Cancer Res,** v. 70, n. 2, p. 440-6, Jan 2010. ISSN 1538-7445. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20068163 >.

CRISTÓBAL, I. et al. Activation of the Tumor Suppressor PP2A Emerges as a Potential Therapeutic Strategy for Treating Prostate Cancer. **Mar Drugs,** v. 13, n. 6, p. 3276-86, Jun 2015. ISSN 1660-3397. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26023836 >.

D'SOUZA, G. et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. **N Engl J Med,** v. 356, n. 19, p. 1944-56, May 2007. ISSN 1533-4406. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17494927>.

DANIAL, N. N.; KORSMEYER, S. J. Cell death: critical control points. **Cell,** v. 116, n. 2, p. 205-19, Jan 2004. ISSN 0092-8674. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744432>.

DEGTEREV, A. et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. **Nat Chem Biol,** v. 1, n. 2, p. 112-9, Jul 2005. ISSN 1552-4450. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16408008 >.

DICE, J. F. Molecular determinants of protein half-lives in eukaryotic cells. **FASEB J**, v. 1, n. 5, p. 349-57, Nov 1987. ISSN 0892-6638. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2824267 >.

EDGE, S. B.; COMPTON, C. C. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. **Ann Surg Oncol**, v. 17, n. 6, p. 1471-4, Jun 2010. ISSN 1534-4681. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20180029>.

EGUCHI, Y.; SHIMIZU, S.; TSUJIMOTO, Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. **Cancer Res,** v. 57, n. 10, p. 1835-40, May 1997. ISSN 0008-5472. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9157970>.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol,** v. 35, n. 4, p. 495-516, Jun 2007. ISSN 0192-6233. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17562483>.

ESTRADA-BERNAL, A. et al. Induction of brain tumor stem cell apoptosis by FTY720: a potential therapeutic agent for glioblastoma. **Neuro Oncol,** v. 14, n. 4, p. 405-15, Apr 2012. ISSN 1523-5866. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22351749>.

FACCHINETTI, M. M. et al. The expression of sphingosine kinase-1 in head and neck carcinoma. **Cells Tissues Organs**, v. 192, n. 5, p. 314-24, 2010. ISSN 1422-6421. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20606403 >.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-86, Mar 2015. ISSN 1097-0215. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25220842>.

FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**, v. 25, n. 34, p. 4798-811, Aug 2006. ISSN 0950-9232. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16892092>.

GALLUZZI, L.; KROEMER, G. Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. **Cell,** v. 135, n. 7, p. 1161-3, Dec 2008. ISSN 1097-4172. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19109884 >.

GOTO, R. N. et al. Anti-cancer activity of a new dihydropyridine derivative, VdiE-2N, in head and neck squamous cell carcinoma. **Eur J Pharmacol**, v. 819, p. 198-206, Jan 2018. ISSN 1879-0712. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29221949>.

HAIT, N. C. et al. The phosphorylated prodrug FTY720 is a histone deacetylase inhibitor that reactivates ER α expression and enhances hormonal therapy for breast cancer. **Oncogenesis,** v. 4, p. e156, 2015. ISSN 2157-9024. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26053034 >.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 2000. ISSN 0092-8674. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931 >.

_____. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell,** v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 2011. ISSN 1097-4172. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230 >.

HANNUN, Y. A.; OBEID, L. M. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 19, n. 3, p. 175-191, Mar 2018. ISSN 1471-0080. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29165427>.

HASLAM, G.; WYATT, D.; KITOS, P. A. Estimating the number of viable animal cells in multi-well cultures based on their lactate dehydrogenase activities. **Cytotechnology**, v. 32, n. 1, p. 63-75, Jan 2000. ISSN 0920-9069. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19002967>.

HEFFERNAN-STROUD, L. A.; OBEID, L. M. Sphingosine kinase 1 in cancer. **Adv Cancer Res,** v. 117, p. 201-35, 2013. ISSN 2162-5557. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23290781 >.

HO, J. W. et al. Effects of a novel immunomodulating agent, FTY720, on tumor growth and angiogenesis in hepatocellular carcinoma. **Mol Cancer Ther,** v. 4, n. 9, p. 1430-8, Sep 2005. ISSN 1535-7163. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16170036 >.

- HU, X.; XUAN, Y. Bypassing cancer drug resistance by activating multiple death pathways--a proposal from the study of circumventing cancer drug resistance by induction of necroptosis. **Cancer Lett,** v. 259, n. 2, p. 127-37, Feb 2008. ISSN 0304-3835. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18082322>.
- ICHIM, G.; TAIT, S. W. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. **Nat Rev Cancer**, v. 16, n. 8, p. 539-48, 08 2016. ISSN 1474-1768. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27364482 >.
- INCA, INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2018 Incidência de Câncer no Brasil, Rio de Janeiro, 2018.
- JAIN, M. V. et al. Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. **J Cell Mol Med**, v. 17, n. 1, p. 12-29, Jan 2013. ISSN 1582-4934. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23301705 >.
- JANSSENS, V.; GORIS, J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. **Biochem J,** v. 353, n. Pt 3, p. 417-39, Feb 2001. ISSN 0264-6021. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11171037 >.
- JIANG, X.; WANG, X. Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. **J Biol Chem,** v. 275, n. 40, p. 31199-203, Oct 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10940292>.
- JOHN, C. K. et al. who classification of Head and Neck Tumours. 2017. 348 ISBN ISBN-13 9789283224389ISBN-10 9283224388. Disponível em: http://apps.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp?codlan=1&codcol=70&codcch=4009>.
- JOHNSON, K. R. et al. Immunohistochemical distribution of sphingosine kinase 1 in normal and tumor lung tissue. **J Histochem Cytochem,** v. 53, n. 9, p. 1159-66, Sep 2005. ISSN 0022-1554. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15923363 >.
- JOUAN-HUREAUX, V. et al. Modulation of endothelial cell network formation in vitro by molecular signaling of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) exposed to cetuximab. **Microvasc Res,** v. 83, n. 2, p. 131-7, Mar 2012. ISSN 1095-9319. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21820450>.
- KANG, R. et al. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. **Cell Death Differ,** v. 18, n. 4, p. 571-80, Apr 2011. ISSN 1476-5403. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21311563 >.

KAUR, J.; DEBNATH, J. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. **Nat Rev Mol Cell Biol,** v. 16, n. 8, p. 461-72, Aug 2015. ISSN 1471-0080. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26177004>.

KLIONSKY, D. J. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). **Autophagy**, v. 12, n. 1, p. 1-222, 2016. ISSN 1554-8635. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26799652 >.

KOMATSU, M.; ICHIMURA, Y. Selective autophagy regulates various cellular functions. **Genes Cells,** v. 15, n. 9, p. 923-33, Sep 2010. ISSN 1365-2443. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20670274 >.

KONDO, Y. et al. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 9, p. 726-34, Sep 2005. ISSN 1474-175X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16148885>.

KROEMER, G.; MARIÑO, G.; LEVINE, B. Autophagy and the integrated stress response. **Mol Cell,** v. 40, n. 2, p. 280-93, Oct 2010. ISSN 1097-4164. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20965422>.

KROEMER, G.; POUYSSEGUR, J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. **Cancer Cell,** v. 13, n. 6, p. 472-82, Jun 2008. ISSN 1878-3686. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18538731 >.

LAMONTAGNE, K. et al. Antagonism of sphingosine-1-phosphate receptors by FTY720 inhibits angiogenesis and tumor vascularization. **Cancer Res,** v. 66, n. 1, p. 221-31, Jan 2006. ISSN 0008-5472. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16397235 >.

LEOPOLDINO, A. M. et al. Accumulation of the SET protein in HEK293T cells and mild oxidative stress: cell survival or death signaling. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 363, n. 1-2, p. 65-74, APR 2012 2012.

_____. SET protein accumulates in HNSCC and contributes to cell survival: Antioxidant defense, Akt phosphorylation and AVOs acidification. **Oral Oncol,** v. 48, n. 11, p. 1106-13, Nov 2012. ISSN 1368-8375. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22739068 >.

LI, J. et al. Inhibition of autophagy augments 5-fluorouracil chemotherapy in human colon cancer in vitro and in vivo model. **Eur J Cancer**, v. 46, n. 10, p. 1900-9, Jul 2010. ISSN 1879-0852. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20231086 >.

- LI, J.; YUAN, J. Caspases in apoptosis and beyond. **Oncogene,** v. 27, n. 48, p. 6194-206, Oct 2008. ISSN 1476-5594. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18931687>.
- LI, M.; MAKKINJE, A.; DAMUNI, Z. The myeloid leukemia-associated protein SET is a potent inhibitor of protein phosphatase 2A. **J Biol Chem,** v. 271, n. 19, p. 11059-62, May 1996. ISSN 0021-9258. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8626647>.
- LIANG, X. H. et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. **Nature,** v. 402, n. 6762, p. 672-6, Dec 1999. ISSN 0028-0836. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10604474 >.
- LIM, K. G. et al. FTY720 analogues as sphingosine kinase 1 inhibitors: enzyme inhibition kinetics, allosterism, proteasomal degradation, and actin rearrangement in MCF-7 breast cancer cells. **J Biol Chem**, v. 286, n. 21, p. 18633-40, May 2011. ISSN 1083-351X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21464128 >.
- LIN, L.; BAEHRECKE, E. H. Autophagy, cell death, and cancer. **Mol Cell Oncol,** v. 2, n. 3, p. e985913, 2015 Jul-Sep 2015. ISSN 2372-3556. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27308466 >.
- LINKERMANN, A.; GREEN, D. R. Necroptosis. **N Engl J Med,** v. 370, n. 5, p. 455-65, Jan 2014. ISSN 1533-4406. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24476434>.
- LIU, H. et al. SET-mediated NDRG1 inhibition is involved in acquisition of epithelial-to-mesenchymal transition phenotype and cisplatin resistance in human lung cancer cell. **Cell Signal,** v. 26, n. 12, p. 2710-20, Dec 2014. ISSN 1873-3913. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25152373 >.
- LIU, Q. et al. FTY720 demonstrates promising preclinical activity for chronic lymphocytic leukemia and lymphoblastic leukemia/lymphoma. **Blood**, v. 111, n. 1, p. 275-84, Jan 2008. ISSN 0006-4971. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17761520 >.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods,** v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001. ISSN 1046-2023. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609 >.
- LONG, J. et al. SphK1 promotes tumor cell migration and invasion in colorectal cancer. **Tumour Biol,** v. 37, n. 5, p. 6831-6, May 2016. ISSN 1423-0380. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26662312>.

MACZIS, M.; MILSTIEN, S.; SPIEGEL, S. Sphingosine-1-phosphate and estrogen signaling in breast cancer. **Adv Biol Regul,** v. 60, p. 160-5, Jan 2016. ISSN 2212-4934. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26601898 >.

MADEIRA, A. et al. SET protein (TAF1beta, I2PP2A) is involved in neuronal apoptosis induced by an amyloid precursor protein cytoplasmic subdomain. **FASEB J,** v. 19, n. 13, p. 1905-7, Nov 2005. ISSN 1530-6860. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16162853>.

MARTIN, D. et al. The head and neck cancer cell oncogenome: a platform for the development of precision molecular therapies. **Oncotarget,** v. 5, n. 19, p. 8906-23, Oct 2014. ISSN 1949-2553. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25275298>.

MARUR, S.; FORASTIERE, A. A. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. **Mayo Clin Proc,** v. 91, n. 3, p. 386-96, Mar 2016. ISSN 1942-5546. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26944243 >.

MELLO, C. B. et al. Immunomodulatory effects of galectin-1 on an IgE-mediated allergic conjunctivitis model. **Invest Ophthalmol Vis Sci,** v. 56, n. 2, p. 693-704, Jan 2015. ISSN 1552-5783. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25574053>.

MOLINOLO, A. A. et al. Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. **Oral Oncol,** v. 45, n. 4-5, p. 324-34, 2009 Apr-May 2009. ISSN 1879-0593. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18805044 >.

MORTIMORE, G. E.; PÖSÖ, A. R.; LARDEUX, B. R. Mechanism and regulation of protein degradation in liver. **Diabetes Metab Rev,** v. 5, n. 1, p. 49-70, Feb 1989. ISSN 0742-4221. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2649336 >.

NDOYE, A.; WEERARATNA, A. T. Autophagy- An emerging target for melanoma therapy. **F1000Res,** v. 5, 2016. ISSN 2046-1402. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27583134>.

NEVIANI, P. et al. PP2A-activating drugs selectively eradicate TKI-resistant chronic myeloid leukemic stem cells. **J Clin Invest,** v. 123, n. 10, p. 4144-57, Oct 2013. ISSN 1558-8238. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23999433 >.

_____. FTY720, a new alternative for treating blast crisis chronic myelogenous leukemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia. **J Clin Invest,** v. 117, n. 9, p. 2408-21, Sep 2007. ISSN 0021-9738. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17717597 >.

O'BRIEN, J. et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur J Biochem,** v. 267, n. 17, p. 5421-6, Sep 2000. ISSN 0014-2956. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10951200 >.

OAKS, J.; OGRETMEN, B. Regulation of PP2A by Sphingolipid Metabolism and Signaling. **Front Oncol**, v. 4, p. 388, 2014. ISSN 2234-943X. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25642418>.

OFENGEIM, D.; YUAN, J. Regulation of RIP1 kinase signalling at the crossroads of inflammation and cell death. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 14, n. 11, p. 727-36, Nov 2013. ISSN 1471-0080. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24129419 >.

OHSUMI, Y. Historical landmarks of autophagy research. **Cell Res,** v. 24, n. 1, p. 9-23, Jan 2014. ISSN 1748-7838. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24366340>.

OLIVEIRA, M. C. et al. High-risk human papillomavirus (HPV) is not associated with p53 and bcl-2 expression in oral squamous cell carcinomas. **Auris Nasus Larynx**, v. 36, n. 4, p. 450-6, Aug 2009. ISSN 1879-1476. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19124208>.

PAI, S. I.; WESTRA, W. H. Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. **Annu Rev Pathol,** v. 4, p. 49-70, 2009. ISSN 1553-4014. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18729723 >.

PATMANATHAN, S. N. et al. The antineoplastic properties of FTY720: evidence for the repurposing of fingolimod. **J Cell Mol Med,** v. 19, n. 10, p. 2329-40, Oct 2015. ISSN 1582-4934. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26171944 >.

PCHEJETSKI, D. et al. FTY720 (fingolimod) sensitizes prostate cancer cells to radiotherapy by inhibition of sphingosine kinase-1. **Cancer Res,** v. 70, n. 21, p. 8651-61, Nov 2010. ISSN 1538-7445. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20959468 >.

PETTI, S.; SCULLY, C. Determinants of oral cancer at the national level: just a question of smoking and alcohol drinking prevalence? **Odontology,** v. 98, n. 2, p. 144-52, Jul 2010. ISSN 1618-1255. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20652793 >.

PIGNON, J. P. et al. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck

Cancer. **Lancet**, v. 355, n. 9208, p. 949-55, Mar 2000. ISSN 0140-6736. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10768432 >.

- PULTE, D.; BRENNER, H. Changes in survival in head and neck cancers in the late 20th and early 21st century: a period analysis. **Oncologist,** v. 15, n. 9, p. 994-1001, 2010. ISSN 1549-490X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20798198 >.
- RIEDL, S. J.; SALVESEN, G. S. The apoptosome: signalling platform of cell death. **Nat Rev Mol Cell Biol,** v. 8, n. 5, p. 405-13, May 2007. ISSN 1471-0072. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17377525 >.
- RIEDL, S. J.; SHI, Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. **Nat Rev Mol Cell Biol,** v. 5, n. 11, p. 897-907, Nov 2004. ISSN 1471-0072. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15520809>.
- RIVERA, C. Essentials of oral cancer. **Int J Clin Exp Pathol,** v. 8, n. 9, p. 11884-94, 2015. ISSN 1936-2625. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26617944>.
- SADDOUGHI, S. A. et al. Sphingosine analogue drug FTY720 targets I2PP2A/SET and mediates lung tumour suppression via activation of PP2A-RIPK1-dependent necroptosis. **EMBO Mol Med,** v. 5, n. 1, p. 105-21, Jan 2013. ISSN 1757-4684. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23180565 >.
- SEGLEN, P. O.; GORDON, P. B. 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 79, n. 6, p. 1889-92, Mar 1982. ISSN 0027-8424. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6952238 >.
- SHANER, R. L. et al. Quantitative analysis of sphingolipids for lipidomics using triple quadrupole and quadrupole linear ion trap mass spectrometers. **J Lipid Res**, v. 50, n. 8, p. 1692-707, Aug 2009. ISSN 1539-7262. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19036716 >.
- SHEN, Y. et al. FTY720, a synthetic compound from Isaria sinclairii, inhibits proliferation and induces apoptosis in pancreatic cancer cells. **Cancer Lett,** v. 254, n. 2, p. 288-97, Sep 2007. ISSN 0304-3835. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17462818 >.
- SINHA, U. K. et al. Increased radiation sensitivity of head and neck squamous cell carcinoma with sphingosine kinase 1 inhibition. **Head Neck**, v. 33, n. 2, p. 178-88, Feb 2011. ISSN 1097-0347. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20848438>.

SMITH, A. M. et al. Activation of protein phosphatase 2A in FLT3+ acute myeloid leukemia cells enhances the cytotoxicity of FLT3 tyrosine kinase inhibitors. **Oncotarget**, Jun 2016. ISSN 1949-2553. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27329844>.

SOBRAL, L. M. et al. SET/I2PP2A overexpression induces phenotypic, molecular, and metabolic alterations in an oral keratinocyte cell line. **FEBS J,** v. 284, n. 17, p. 2774-2785, 09 2017. ISSN 1742-4658. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28636114 >.

_____. Stable SET knockdown in head and neck squamous cell carcinoma promotes cell invasion and the mesenchymal-like phenotype in vitro, as well as necrosis, cisplatin sensitivity and lymph node metastasis in xenograft tumor models. **Molecular Cancer**, v. 13, FEB 20 2014 2014. ISSN 1476-4598.

_____. Stable SET knockdown in head and neck squamous cell carcinoma promotes cell invasion and the mesenchymal-like phenotype in vitro, as well as necrosis, cisplatin sensitivity and lymph node metastasis in xenograft tumor models. **Mol Cancer,** v. 13, p. 32, 2014. ISSN 1476-4598. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24555657 >.

SPIEGEL, S.; MERRILL, A. H. Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. **FASEB J,** v. 10, n. 12, p. 1388-97, Oct 1996. ISSN 0892-6638. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8903509>.

SWITZER, C. H. et al. Targeting SET/I(2)PP2A oncoprotein functions as a multi-pathway strategy for cancer therapy. **Oncogene**, v. 30, n. 22, p. 2504-13, Jun 2011. ISSN 1476-5594. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21297667>.

TAIT, S. W.; GREEN, D. R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. **Nat Rev Mol Cell Biol,** v. 11, n. 9, p. 621-32, Sep 2010. ISSN 1471-0080. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20683470 >.

TAKABE, K. et al. "Inside-out" signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets. **Pharmacol Rev,** v. 60, n. 2, p. 181-95, Jun 2008. ISSN 1521-0081. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18552276>.

TAMASHIRO, P. M. et al. The impact of sphingosine kinase-1 in head and neck cancer. **Biomolecules**, v. 3, n. 3, p. 481-513, Aug 2013. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24970177>.

THANGADA, S. et al. Treatment with the immunomodulator FTY720 (fingolimod) significantly reduces renal inflammation in murine unilateral ureteral obstruction. **J**

Urol, v. 191, n. 5 Suppl, p. 1508-16, May 2014. ISSN 1527-3792. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24679864 >.

THORNBERRY, N. A. Caspases: key mediators of apoptosis. **Chem Biol,** v. 5, n. 5, p. R97-103, May 1998. ISSN 1074-5521. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9578633 >.

THORNBERRY, N. A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. **Science,** v. 281, n. 5381, p. 1312-6, Aug 1998. ISSN 0036-8075. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9721091>.

TONELLI, F. et al. The roles of sphingosine kinase 1 and 2 in regulating the metabolome and survival of prostate cancer cells. **Biomolecules**, v. 3, n. 2, p. 316-33, Jun 2013. ISSN 2218-273X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24970170>.

_____. FTY720 and (S)-FTY720 vinylphosphonate inhibit sphingosine kinase 1 and promote its proteasomal degradation in human pulmonary artery smooth muscle, breast cancer and androgen-independent prostate cancer cells. **Cell Signal**, v. 22, n. 10, p. 1536-42, Oct 2010. ISSN 1873-3913. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20570726>.

TSHERING VOGEL, D. W.; ZBAEREN, P.; THOENY, H. C. Cancer of the oral cavity and oropharynx. **Cancer Imaging,** v. 10, p. 62-72, Mar 2010. ISSN 1470-7330. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20233682>.

TSUCHIHARA, K.; FUJII, S.; ESUMI, H. Autophagy and cancer: dynamism of the metabolism of tumor cells and tissues. **Cancer Lett,** v. 278, n. 2, p. 130-138, Jun 2009. ISSN 1872-7980. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19004545>.

VAN CAUWENBERGE, P.; DHOOGE, I.; INGELS, K. Epidemiology and etiological factors of laryngeal cancer. **Acta Otorhinolaryngol Belg,** v. 46, n. 2, p. 99-102, 1992. ISSN 0001-6497. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1605026 >.

VELMURUGAN, B. K. et al. PP2A deactivation is a common event in oral cancer and reactivation by FTY720 shows promising therapeutic potential. **J Cell Physiol**, v. 233, n. 2, p. 1300-1311, Feb 2018. ISSN 1097-4652. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28516459 >.

VON LINDERN, M. et al. Can, a putative oncogene associated with myeloid leukemogenesis, may be activated by fusion of its 3' half to different genes: characterization of the set gene. **Mol Cell Biol,** v. 12, n. 8, p. 3346-55, Aug 1992. ISSN 0270-7306. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1630450 >.

WANG, F.; WU, Z. Sphingosine kinase 1 overexpression is associated with poor prognosis and oxaliplatin resistance in hepatocellular carcinoma. **Exp Ther Med,** v. 15, n. 6, p. 5371-5376, Jun 2018. ISSN 1792-0981. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29844803>.

WEINBERG; ALLAN; ROBERT. **The Biology of Cancer**. 2007. 796 ISBN 0815340761.

WHITE, C. et al. The emerging role of FTY720 (Fingolimod) in cancer treatment. **Oncotarget**, Feb 2016. ISSN 1949-2553. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27036015 >.

XING, Y. et al. FTY720 enhances chemosensitivity of colon cancer cells to doxorubicin and etoposide via the modulation of P-glycoprotein and multidrug resistance protein 1. **J Dig Dis,** v. 15, n. 5, p. 246-59, May 2014. ISSN 1751-2980. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24868599>.

YANG, Y. L. et al. Sphingosine kinase-1 inhibition sensitizes curcumin-induced growth inhibition and apoptosis in ovarian cancer cells. **Cancer Sci,** v. 103, n. 8, p. 1538-45, Aug 2012. ISSN 1349-7006. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22594559>.

ZHANG, L. et al. FTY720 induces autophagy-related apoptosis and necroptosis in human glioblastoma cells. **Toxicol Lett,** v. 236, n. 1, p. 43-59, Jul 2015. ISSN 1879-3169. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25939952>.

ZHANG, N. et al. Combination of FTY720 with cisplatin exhibits antagonistic effects in ovarian cancer cells: role of autophagy. **Int J Oncol**, v. 42, n. 6, p. 2053-9, Jun 2013. ISSN 1791-2423. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23592281>.

_____. FTY720 induces necrotic cell death and autophagy in ovarian cancer cells: a protective role of autophagy. **Autophagy**, v. 6, n. 8, p. 1157-67, Nov 2010. ISSN 1554-8635. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20935520 >.

Anexo 1 - Aprovação do projeto pelo comitê de ética no uso de animais



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Campus de Ribeirão Preto Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Ativação da fosfatase 2A como alvo terapêutico no câncer espinocelular de cabeça e pescoço", protocolo nº 14.1.1076.53.7, sob a responsabilidade de Leandro Figueiredo do Santos e Andréia M. Leopoldino que envolve a manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto º 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Prefeitura de Campus de Ribeirão Preto (CEUA PUSP-RP) foi aprovado na Reunião Ordinária da CEUA de 31/07/2015.

Colaboradores: Tatiana Aparecida Pereira; Karina Dias; Camila Cubayachi

Vigência do Projeto	11/08/2015 a 02/03/2019
Espécie/Linhagem	Camundongo Balb/c NUDE
Nº de animais	40
Peso	6 a 14 semanas / 20g
Sexo	Ambas
Origem	Biolório Central PUSP-RP

Ribeirão Preto, 11 d e agosto de 2015

Profa. Dra. Cláudia Maria Padovan Presidente da CEUA PUSP-RP