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**

Leandro Figueiredo dos Santos

**Ribeirão Preto
2018**

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): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

edico este trabalho à base do meu crescimento,
amadurecimento e formação de ser humano que são meus pais João e Dilma.

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 auxílio 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.

***“Quanto maior o conhecimento, menor o ego,
quanto maior o ego, menor o conhecimento”.***

Albert Einstein

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 utilizando-se 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 (<i>knockdown</i>) 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: Níveis 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 <i>in vivo</i> 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	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
BAK	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCLxL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BH3 ou BID	<i>BH3 interacting-domain death agonist</i>
CA	Califórnia
CAF	<i>Cancer-associated fibroblast</i>
CDKN2A	<i>Cyclin-dependent kinase 2A</i>
CECP	Carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço
CID	Coeficiente de interação entre drogas
CNX	Calnexina
CXCL1 ou IL-1	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 1</i> ou Interleucina 1
CXCL8 ou IL-8	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 8</i> ou Interleucina 8
c-MET	<i>tyrosine-protein kinase Met</i>
dATP	<i>Deoxyadenosine triphosphate</i>
DISC	death-inducing signaling complex
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMEM/F-12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium- Nutrient Mixture F-12</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFR	<i>Receptor do Fator de Crescimento Epidermal</i>
EMT	<i>Epithelial–mesenchymal transition</i>
ERK	<i>Extracellular signal–regulated kinases</i>

ER	<i>Endoplasmic reticulum</i>
EUA	Estados Unidos da América
FADD	Proteína associada à Fas com domínio de morte
FASL	Fas ligand
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF-2	Basic fibroblast growth factor
FTY720	Fingolimod
FTY720-p	Fingolimod fosforilado
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GMCSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HNSCC	<i>Head and neck squamous cell carcinoma</i>
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HPV	<i>Human Papiloma Virus</i>
I2PP2A	<i>Inhibitor 2 Protein Phosphatase 2A</i>
LC/MS/MS	<i>Liquid chromatography tandem-mass spectrometry</i>
LC3	<i>Microtubule-Associated Protein 1A/1B-Light Chain 3</i>
LDH	Lactato desidrogenase
LOH	<i>Loss of heterozygosity</i>
MAPK	MAP quinase
MCL1	<i>Induced myeloid leukemia cell differentiation protein</i>
MLKL	<i>Mixed lineage kinase domain-like protein</i>
MMP13	<i>Matrix metalloproteinase 13</i>
MMP2	<i>Matrix metalloproteinase-2</i>
MMP9	<i>Matrix metalloproteinase-9</i>
MOMP	<i>Major outer membrane protein</i>
NEC1	Necrostatina 1
NOK-SI	<i>Normal Oral Keratinocyte- spontaneously immortalized</i>
NFκB	<i>Nuclear Factor kappa beta</i>
P62/ SQSTM1	<i>Sequestosome-1</i>
PARP	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDG	<i>Platelet derived growth factor</i>

PI	Iodeto de propídeo
PI3K	Fosfatidilinositol 3'-quinase
PP2A	Proteína fosfatase 2A
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno
qPCR	PCR quantitativa em tempo real
QVD	<i>Q-VD-OPh hydrate</i>
Rb	<i>Retinoblastoma protein</i>
Rho/ROCK1	Rho-associated kinase
RIP1	<i>Receptor Interacting Protein 1</i>
RIP3	<i>Receptor Interacting Protein 3</i>
RNA	Ácido ribonucléico
RNA^m	Ácido ribonucléico mensageiro
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
S1P	Esfingosina-1-fosfato
SAPK	<i>Stress-activated protein kinase</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
SEM	<i>Standard error of mean</i>
shCtrl	<i>Short hairpin</i> RNA ou silenciamentocontrolenegativo
shRNA	<i>Short hairpin</i> RNA
shSET	<i>Short hairpin</i> RNA ou silenciamentoda proteína SET
siRNA	<i>Small interfering</i> RNA
SMAC/DIABLO	<i>Second mitochondria-derived activator of caspases</i>
SPHK1	Esfingosina Quinase 1
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TA	Temperatura ambiente
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TGF-β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
tBID	<i>Truncated p15 BID</i>
TNFR1	<i>Tumor necrosis factor receptor 1</i>
TP53	<i>Tumor protein p53</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRAILR	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor</i>

UCSD	<i>University of California San Diego</i>
UK	Reino Unido
UVA	Ultra violeta A
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
α-SMA	<i>Alpha-actin-2</i>

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
µM	micromolar

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	vii
1- Introdução.....	1
1.1- Câncer de cabeça e pescoço.....	1
1.2- SET (I2PP2A).....	4
1.3- SphK1 (Esfingosina quinase 1).....	6
1.4- Morte celular: apoptose, necrose e autofagia.....	7
1.5- FTY720 (Fingolimod).....	11
2-Objetivos.....	14
2.1- Objetivo geral.....	14
2.2- Objetivos específicos.....	14
3-Materiais e Métodos.....	15
3.1-Linhagens celulares.....	15
3.1.1 – HN6, HN12 e HN13.....	15
3.1.2 – SCC9.....	16
3.1.3 – NOK-SI.....	16
3.2- Cultivo celular.....	16
3.3 - Outros reagentes utilizados.....	17
4- Procedimentos Experimentais.....	18
4.1 - Atividade de fosfatase serina / treonina –Atividade de PP2A.....	18
4.2-Silenciamento por Short hairpin RNA (shRNA) – SET e SphK1.....	18
4.3-Western blotting.....	19
4.4-Ensaio de viabilidade celular.....	20
4.5-Ensaio de atividade da lactato desidrogenase.....	21
4.6-Microscopia óptica e Microscopia eletrônica de transmissão.....	22
4.7-Imunofluorescência.....	22
4.8-Superexpressão de SphK1 e <i>Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time</i> (qPCR).....	23
4.9-Alamar Blue (ensaio da resazurina) e coeficiente de interação medicamentosa (CID).....	24
4.10 – Análise esfingolípídica por cromatografia líquida - ionização por eletrospray - espectrometria de massa (LC/MS/MS).....	25
4.11 Ensaio de formação de tumores xenográficos.....	25
4.12 Análise Estatística.....	26
5- Resultados e interpretações.....	27
5.1- Atividade de PP2A.....	27
5.1.1 - Atividade de PP2A em linhagens celulares.....	27
5.1.2- Atividade de PP2A em células tratadas com FTY720.....	28
5.2- Efeito do FTY720 na viabilidade de células CECF.....	31
5.3 -Morte celular por apoptose em células HN12 e SCC9 após incubação com FTY720.....	34
5.4- Morte celular por necrose em células HN12 e SCC9 após incubação com FTY720.....	36

5.5 - Autofagia induzida por FTY720.....	39
5.6 -Ensaio funcional de vias potencialmente ativadas (apoptose, autofagia, necroptose) por FTY720 em células CECF.....	43
5.7- FTY720 e shSET reduzem os níveis da proteína SphK1.....	46
5.8- Níveis de SphK1 e efeito de FTY720 em células CECF.....	50
5.9- Efeito sinérgico da combinação de FTY720 e 3-MA em CECF <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	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 Organização 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 4.672 casos 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

l2PP2A, 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-mesenquimal, no qual células epiteliais adquirem fenótipo mesenquimal 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 esfingolipídios, a expressão da proteína esfingosina quinase 1 (SphK1) afeta o equilíbrio entre os esfingolipídios 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 (Maczys *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, NF κ B, 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 estímulo apoptótico externo, clivam as caspases 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 fagocíticos. (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 pI*) 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 iniciadoras 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 apoptose 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 características 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, substâncias 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 sub-letal 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, extravassamento 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 epitélio-mesênquima, 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 sendo estudado como um mimético de esfingosina inibindo sua fosforilação para esfingosina-1-fosfato (S1P) (Takabe *et al.*, 2008; Maczys *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 esfingolípídeos ativados pela inibição de SphK1, gerando aumento da apoptose e redução tumoral em animais com tumores xenoinxerto 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.

7. Conclusão

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho concluímos 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 esfingolipídios 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 importância analisar em estratégias que evadam ou que compensem sua ação imunodepressora, em testes clínicos. 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-statistics/annual-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>>.

BOATRIGT, 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 9789283224389 ISBN-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 9789283224389 ISBN-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> >.

SEGLE, 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.; DHOOGHE, 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 nº 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 da 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	Ambos
Origem	Biotério Central PUSP-RP

Ribeirão Preto, 11 de agosto de 2015

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