



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Júlia Pertschy

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DOSE-RESPOSTA DO INIBIDOR
SELETIVO PIMOZIDA SOBRE CÉLULAS DE CARCINOMA
EPIDERMÓIDE BUCAL HUMANO**

Florianópolis

2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

Júlia Pertschy

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DOSE-REPOSTA DO INIBIDOR
SELETIVO PIMOZIDA SOBRE CÉLULAS DE CARCINOMA
EPIDERMÓIDE BUCAL HUMANO**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao Curso de Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Cirurgiã-Dentista.

Orientadora: Profa. Dra. Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro

Coorientadora: MSc. Jussara Maria Gonçalves

Florianópolis

2018

Júlia Pertschy

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DOSE-RESPOSTA DO INIBIDOR SELETIVO
PIMOZIDA SOBRE CÉLULAS DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE BUCAL
HUMANO**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Cirurgião-Dentista e aprovado em sua forma final pelo Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 01 de outubro de 2018.

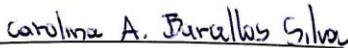
Banca Examinadora:



Profa. Dra. Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro

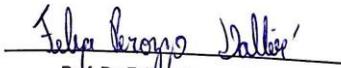
Orientadora

Universidade Federal de Santa Catarina



Profa. Dra. Carolina Amália Barcellos Silva

Universidade Federal de Santa Catarina



Prof. Dr. Felipe Perazzo Daltoé

Universidade Federal de Santa Catarina

Àqueles que me deram o maior dom: a vida! Àqueles que sempre estiveram do meu lado torcendo pelo meu sucesso, que são o meu maior porto seguro, que nunca mediram esforços e que me apoiaram incondicionalmente: meus pais!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à **Deus** por ter me presenteado com todas as oportunidades que desfrutei! É Ele que me fortalece, me proporciona paz e me concede saúde para que, dia após dia, eu continue correndo atrás dos meus sonhos. Foi o Senhor que me conduziu até aqui!

Agradeço aos meus pais, **Eunice M. dos Santos Pertschy** e **Günther Lothar Pertschy**, por serem os pais maravilhosos que são! Por todo amor, paciência e dedicação dirigidos a mim. Por me guiarem, desde cedo, para o caminho correto a seguir. E, também, por me incentivarem sempre a ser uma pessoa melhor! Agradeço por vocês existirem em minha vida e serem os melhores pais que alguém poderia ter!! Palavras são insuficientes para demonstrar todo meu amor e gratidão por vocês! Obrigada por sempre estenderem as mãos e enxugarem as minhas lágrimas quando eu caí e, ainda, muito obrigada por aplaudirem de pé na primeira fileira quando eu venci! Agradeço por sempre me apoiarem, independentemente da minha decisão. Vocês me dão forças para continuar! Só cheguei aqui por causa de vocês! Eu amo vocês incondicionalmente!!

À toda minha **família**, que me apoiou e acreditou que eu era capaz de enfrentar os desafios! Mesmo de longe, vibraram com as minhas vitórias e me incentivaram a continuar em busca do meu sonho. Agradeço a compreensão de todos vocês pelas minhas ausências em encontros da família por conta de estudos, agora podemos dizer que valeu a pena!

Ao **André Luiz Monguilhott Dresch**, que não mediu esforços para me ver feliz! Muito obrigada pelo teu carinho, atenção e, principalmente, compreensão nessa fase da minha vida! És admirável, com um coração gigante e eu sou eternamente grata por todo teu apoio e companheirismo. Eu te amo muito!

Agradeço à minha dupla de alma **Caroline Machado Gregorini**, que esteve ao meu lado desde o primeiro dia da graduação. Foi contigo a minha primeira anestesia, primeira cirurgia, primeira restauração e, também, primeira endodontia. Como eu sempre digo: és a minha família de Florianópolis! Juntas crescemos, amadurecemos, aprendemos, nos fortalecemos, rimos e choramos, mas a cima de tudo, fomos muito felizes!! Agradeço à Deus por ter me presenteado com a oportunidade de encontrar na faculdade alguém tão meiga e doce, com o coração enorme e sempre pronta para ajudar os outros! Tão diferente e ao mesmo tempo tão parecida comigo! Obrigada por sempre me compreender, me aconselhar, me apoiar e por torcer tanto por mim. Sem você eu não teria chego até aqui! És uma das principais pessoas responsáveis por eu não ter desistido do meu sonho! Obrigada por tudo, estarás para sempre em meu coração! Amo muitíssimo você, minha duplinha gêmea!!

A todos os meus amigos da **turma 14.1**, muito obrigada! Foi com vocês que eu passei os melhores cinco anos da minha vida. Sempre lembrarei de cada um de vocês! Um agradecimento especial às minhas **amigas de graduação** que compartilharam tantos momentos maravilhosos comigo! Vocês estavam presentes quando eu mais precisei! Tornaram meus dias mais leves, deram

os abraços mais aconchegantes e mostraram que um sorriso no rosto consegue transformar o dia de alguém. Vocês ficarão para sempre em minha memória! Amo todas vocês!

Agradeço, também, todas as minhas **amigas de Brusque!** Muito obrigada por terem me encorajado e me incentivado durante toda essa caminhada! Sempre muito compreensíveis com as minhas ausências e, apesar do meu distanciamento, principalmente nessa reta final, vocês sempre estavam aí! Amo vocês!

Agradeço imensamente a minha querida orientadora, **Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro**, por essa oportunidade incrível! Participar dessa pesquisa foi uma das melhores coisas da minha vida! É a realização de um sonho! Sou eternamente grata por poder, através desse estudo, deixar a minha contribuição para a população. Todas as vezes que falo sobre esse trabalho, meus olhos brilham, expressando a minha felicidade. Obrigada por ter confiado tanto em mim e acreditado no meu potencial! Nem eu acreditava que podia tanto! És inspiração de profissional, de pesquisadora e de ser humano, com quem aprendi muito e nunca vou esquecer! Serei eternamente grata!

À minha coorientadora admirável, **Jussara Maria Gonçalves**, que com toda a sua calma e delicadeza me ensinou tudo que sei sobre cultura celular! Fosse essencial para a realização do trabalho! Nossas noites e finais de semanas juntas realizando a pesquisa, foram além do laboratório. Criamos um laço de amizade que eu quero manter para sempre! Me ensinasse sobre valores e respeito ao próximo! És um exemplo de pessoa e

de orientadora, sempre muito prestativa e presente! Tenho um carinho imenso por você! Muito obrigada por sempre me socorrer, me ouvir, me acalmar e não me deixar fraquejar, mesmo quando tudo estava dando errado... Obrigada por compartilhar tantos momentos extraordinários comigo! Estarás para sempre em meu coração!

A todos os **professores** que tive durante a minha vida! Vocês foram muito importantes para eu me tornar quem sou e chegar onde cheguei. Meus grandes exemplos, verdadeiros mestres, que me possibilitaram enxergar o mundo de outra maneira. Se hoje estou a um passo de me tornar cirurgiã-dentista, isso se deve à presença de vocês em minha vida! Muito obrigada!!

Aos **funcionários da UFSC**, por sempre terem me ajudado quando precisei! Constantemente solícitos, vocês foram essenciais para a minha trajetória no curso. O trabalho de vocês é fundamental para o funcionamento da Odontologia UFSC. Sou extremamente grata!

À **UFSC** e ao **CNPq**, pela bolsa recebida por meio do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq), Edital 2017/2018. Esse programa contribuiu na realização de um sonho pessoal: executar uma pesquisa inédita e que trouxesse ganhos para a população!

E por fim, mas não menos importante, aos **meus pacientes**, que tornaram possível meu aprendizado e crescimento dentro do curso! Confiaram em mim e na minha competência, algo muitas vezes tão íntimo, permitindo que meu trabalho fosse realizado. Os ensinamentos e histórias de vocês me

transformaram também. Cada sorriso novo me fez ver o mundo melhor e me deu forças para continuar, me impulsionando na busca por mais conhecimento. Desta forma, vocês contribuíram para que a cada dia eu me apaixonasse ainda mais pela profissão! Eternamente agradecida!

“Não existem sonhos impossíveis para aqueles que realmente acreditam que o poder realizador reside no interior de cada ser humano. Sempre que alguém descobre esse poder, algo antes considerado impossível, torna-se realidade.”

Albert Einstein

RESUMO

INTRODUÇÃO: Dentre os vários tipos de câncer de cabeça e pescoço, o mais prevalente é o Carcinoma Epidermoide Bucal (CEB). Acredita-se que o comportamento dessa lesão esteja relacionado à presença das células-tronco neoplásicas (CTN), onde este grupo celular seria o responsável pela resistência à múltiplas drogas, metástase e recidivas. Atualmente, estudos têm analisado moléculas inibidoras seletivas como Pimozida. Esse medicamento atua sobre o complexo USP1/WDR48, o qual é um dos responsáveis por manter as CTN em estado proliferativo e indiferenciado. **OBJETIVO:** Avaliar o efeito dose-resposta do inibidor seletivo Pimozida sobre as células de CEB humano. **METODOLOGIA:** Realizou-se a cultura celular no meio de Eagle modificado por Dulbecco de uma linhagem de células de CEB humano. A linhagem foi plaqueada em placas de 96 poços na concentração de 4.000 células por poço e mantida em incubadora, em condições ideais, por 24 horas para a aderência. Após, realizou-se curvas dose-resposta de citotoxicidade de células tratadas com Pimozida nos tempos de 12, 24, 48 e 72 horas e em concentrações de 0, 1, 5, 10 e 15 μ M. Um grupo de células recebeu o Pimozida adicionado ao meio de cultura padrão, enquanto no outro grupo o medicamento foi incorporado ao meio sem adição de soro fetal bovino (SFB). Posteriormente, a citotoxicidade foi aferida pelo teste de viabilidade celular através da atividade mitocondrial das células no espectrofotômetro (MTT). **RESULTADOS:** Observou-se que quanto maior o tempo de

contato do medicamento com as células, maior é a sua efetividade. Isso porque no resultado do grupo de 72 horas de tratamento com 15 μ M de concentração, observou-se uma diminuição da viabilidade celular de 55,3% ($p=0,000^*$) no grupo com SFB e 33,7% ($p=0,004^*$) no grupo sem SFB quando comparados aos seus controles negativos. Já no grupo de 12 horas essa redução foi de apenas 34,8% ($p=0.066$) no grupo com SFB e 1,6% ($p=0.911$) sem SFB. CONCLUSÃO: A partir desses resultados pode-se concluir que este medicamento é capaz de promover a diminuição da viabilidade celular de células neoplásicas e, por essa razão, tem potencial para ser um novo agente terapêutico.

Palavras-chave: Técnicas de Cultura de Células; Células Tronco Neoplásicas; Carcinoma de Células Escamosas; USP 1; WDR48; Pimozida.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Among the various types of cancer of the head and neck, the most prevalent is Squamous Cell Carcinoma (SCC). The OSCC behaviour may be related to presence of cancer stem cells, which are responsible for chemotherapy resistance, metastasis and recidive. Currently, studies have analyzed selective inhibitory molecules such as Pimozide. This drug acts on the complex USP1/WDR48, which is responsible for the CSC proliferative and undifferentiated state maintenance. **OBJECTIVE:** The purpose of this study was to evaluate the dose-response effect of the selective inhibitor Pimozide on SCC human cells SCC. **METHODS:** Cell culture from a line cell human SCC was performed using Dulbecco's modified Eagle's media. The lineage was plated in 96-well plates at the concentration of 4,000 cells per well and incubated under ideal conditions for 24 hours for adherence. After that, dose-response cytotoxicity curves of Pimozide-treated cells were performed at 12, 24, 48 and 72 hours at concentrations of 0, 1, 5, 10 and 15 μ M. One group received Pimozide and standard culture media, while in the other one the drug was added to media without fetal bovine serum (FBS). Subsequently, the cytotoxicity was measured by the cell viability test through mitochondrial cell activity in the microplate reader/spectrophotometer (MTT). **RESULTS:** Longer intervals provide more contact time between the drug and cells, consequently, more effectiveness can be observed. Using 15 μ M concentration for 72 hours, the cell viability decreased 55,3% ($p = 0.000$ *) in the group with FBS and 33,7% ($p = 0.004$ *) in the group

without FBS when compared to their negative controls. In the 12-hour group, this reduction was only 34,8% ($p = 0.066$) in the SFB group and 1.6% ($p = 0.911$) without SFB. **CONCLUSIONS:** This drug is able to promote the reduction of the cellular viability of neoplastic cells and, therefore, has potential to be a new therapeutic target.

Keywords: Cell Culture Techniques,; Neoplastic Stem Cell; Squamous Cell Carcinoma; USP1; WDR48, Pimozide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmula estrutural do medicamento Pimozida.....	32
Figura 2 – Mecanismo regulatório de diferenciação e proliferação das células-tronco neoplásicas (CTN) com o uso do Pimozida....	35
Figura 3 – Via de ativação da STAT e a ação do Pimozida inibindo-a.....	38
Figura 4 – Linhagem celular CAL27 oriunda de Carcinoma Epidermoide Bucal humano.....	43
Figura 5 – Distribuição em grupos dos tempos e concentrações de Pimozida que foram avaliados para estabelecer a curva dose-resposta ideal.....	46

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Comparação da viabilidade celular entre as diferentes dosagens no tempo de 12 horas, tanto para o grupo com SFB quanto para o grupo sem SFB.....	50
Gráfico 2 – Comparação da viabilidade celular entre as diferentes dosagens no tempo de 24 horas, tanto para o grupo com SFB quanto para o grupo sem SFB.....	51
Gráfico 3 – Comparação da viabilidade celular entre as diferentes dosagens no tempo de 48 horas, tanto para o grupo com SFB quanto para o grupo sem SFB.....	52
Gráfico 4 – Comparação da viabilidade celular entre as diferentes dosagens no tempo de 72 horas, tanto para o grupo com SFB quanto para o grupo sem SFB.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Informações sobre a linhagem de células que será utilizada nesse estudo.....	43
Tabela 2 – Média, juntamente com o desvio padrão, da viabilidade celular de cada grupo em diferentes concentrações e intervalos de tempo.....	49
Tabela 3 – Valores de p nas diferentes dosagens no tempo de 12 horas, tanto para o grupo com SFB quanto para o grupo sem SFB.....	50
Tabela 4 – Valores de p nas diferentes dosagens no tempo de 24 horas, tanto para o grupo com SFB quanto para o grupo sem SFB.....	51
Tabela 5 – Valores de p nas diferentes dosagens no tempo de 48 horas, tanto para o grupo com SFB quanto para o grupo sem SFB.....	52
Tabela 6 – Valores de p nas diferentes dosagens no tempo de 72 horas, tanto para o grupo com SFB quanto para o grupo sem SFB.....	53
Tabela 7 – Comparação entre os grupos com e sem SFB, nas diferentes dosagens, durante o mesmo período de tempo (12 horas).....	56
Tabela 8 – Comparação entre os grupos com e sem SFB, nas diferentes dosagens, durante o mesmo período de tempo (24 horas).....	56
Tabela 9 – Comparação entre os grupos com e sem SFB, nas diferentes dosagens, durante o mesmo período de tempo (48	

horas).....	56
Tabela 10 – Comparação entre os grupos com e sem SFB, nas diferentes dosagens, durante o mesmo período de tempo (72 horas).....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

bHLH – *Basic-Helix-Loop-Helix*

C – Celsius

CEB – Carcinoma Epidermoide Bucal

CEPSH – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

CSC – *Cancer stem cell*

CTN – Células-tronco neoplásicas

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)

CO₂ – Dióxido de carbono

CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

DP – Desvio padrão

et al. – E colaboradores

EUA – Estados Unidos da América

FBS – *Fetal bovine serum*

FDA – *Food and Drug Administration*

FGs – Fatores de crescimento

G₀ – Estágio de repouso celular (Ciclo celular)

G₁ – Estágio de crescimento celular (Ciclo celular)

h – Horas

HCC – Carcinoma hepatocelular

ID – Inibidor da Ligação de DNA (*Inhibitor of DNA binding*)

ID1 – Inibidor da Ligação de DNA 1

LMA – Leucemia mielóide aguda

M – Presença de metástase (Estadiamento)

MDR – Resistência a múltiplas drogas

MO - Missouri

MTT – Sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio

N – Disseminação para linfonodos (Estadiamento)

P – Valor de p

PA – Pensilvânia

PI – Iodeto de Propídeo

S – Estágio de duplicação do material genético (Ciclo celular)

SCC – *Squamous Cell Carcinoma*

SFB – Soro Fetal Bovino

SNC – Sistema Nervoso Central

SPSS – *Statistical Package for the Social Sciences*

STAT – Transdutor de sinal e ativador da via de transcrição

STAT1 – Transdutor de sinal e ativador da via de transcrição 1

STAT5 – Transdutor de sinal e ativador da via de transcrição 5

T – Tamanho do tumor e disseminação para outras áreas (Estadiamento)

TEM – Transição epitelial-mesenquimatosa

USPs – Proteases ubiquitina-específica

USP 1 – Protease ubiquitina-específica 1

WDR48 – *WD repeat-containing protein 48*

LISTA DE SÍMBOLOS

% – Por cento

cm – Centímetro

mg – Miligrama

μM – Micromolar

$^{\circ}$ – Graus

nm – Nanômetro

+ – Mais

\pm – Mais ou menos

< - Menor que

μL – Microlitro

= – Igual a

® – Marca registrada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
2. REVISÃO DE LITERATURA	28
2.1 Carcinoma Epidermoide Bucal.....	28
2.2 Pimozida.....	31
2.2.1 Ação farmacodinâmica.....	32
2.2.2 Metabolismo e farmacocinética.....	32
2.2.3 Indicações e uso.....	33
2.2.4 Contraindicações.....	33
2.3 Pimozida como possível agente antineoplásico.....	34
3. JUSTIFICATIVA	39
4. OBJETIVOS	41
4.1 Objetivo geral.....	41
4.2 Objetivos específicos	41
5. MATERIAIS E MÉTODOS	42
5.1 Delineamento do estudo	42
5.2 Aspectos éticos e legais	42
5.3 Procedimentos experimentais	42
5.3.1 Linhagem celular	42
5.3.2 Cultivo celular	43
5.3.3 Curva dose-resposta	44
5.3.4 Teste de viabilidade celular usando MTT.....	45
5.4 Análise estatística	47
6. RESULTADOS	48
7. DISCUSSÃO	58
8. CONCLUSÃO	64

REFERÊNCIAS.....	65
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC.....	71
ANEXO B – Ata de Apresentação do Trabalho de Conclusão de Curso.....	77

1. INTRODUÇÃO

O câncer foi responsável por 8 milhões de mortes em 2012, podendo ser considerado a maior causa de morbidade e mortalidade do mundo, afetando todos os países e regiões (STEWART, WILD, 2014). Quando a incidência do câncer de cabeça e pescoço é avaliada individualmente, observam-se 550.000 novos casos por ano, sendo que destes, 300.000 pessoas morrem em todo o mundo. Dentre os vários tipos de câncer de cabeça e pescoço, o mais prevalente é o Carcinoma Epidermoide Bucal (CEB) (UICC, 2014). Este tipo de carcinoma representa mais de 90% de todas as neoplasias malignas da cavidade oral e orofaringe (BARNES *et al.*, 2005).

Conceitualmente, o câncer é uma doença do genoma. Mutações nas células de tecidos normais têm importantes efeitos sobre a sua etiologia, pois são capazes de levar a formação do tumor. Algumas mutações podem inativar genes que protegem células de proliferação anormal ou podem resultar em proteínas com funções oncogênicas. Essas alterações estimulam o crescimento celular e provêm outras vantagens para as células tumorais, favorecendo a transformação de células normais em células neoplásicas. As alterações genéticas são capazes de controlar o crescimento, diferenciação e morte celular durante a progressão do CEB (HANAHAN, WEINBERG, 2000).

Baixos índices de sobrevida e grave comprometimento funcional em pacientes que apresentam CEB localmente invasivo são observados depois da cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Essa última é um tratamento consolidado para uma variedade de

cânceres. Entretanto, a resistência à múltiplas drogas (MDR) diminui a efetividade desse tratamento sobre as células neoplásicas. Essas células adquirem insensibilidade para drogas citostáticas primárias e, posteriormente, para outros medicamentos estruturalmente distantes (GOTTESMAN, 2002). Acredita-se que este comportamento tumoral esteja relacionado à teoria das células-tronco neoplásicas (CTN), em que este grupo celular é o responsável pela MDR e, conseqüentemente, pelas metástases e recidivas (DONNENBERG; DONNENBERG, 2005). Além disso, a hipótese das CTN indica que essas células possuem potencial indefinido de proliferação e são as responsáveis por conduzir a formação e crescimento dos tumores (REYA *et al.*, 2001).

Atualmente, alguns autores têm pesquisado o mecanismo regulatório de diferenciação e proliferação das CTN. Tem-se observado que o fator de transcrição *Basic-Helix-Loop-Helix* (bHLH), responsável pela regulação da diferenciação e proliferação celular, é um importante regulador durante o desenvolvimento de neoplasias (GONÇALVES, CORDEIRO, RIVERO, 2017). A ligação entre o bHLH e o ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*) (DNA) é impedida pelos Inibidores da Ligação de DNA (*Inhibitors of DNA binding*) (ID) (LASORELLA *et al.*, 2006). Na tentativa de retornar o ciclo celular ao padrão de normalidade, a ubiquitina é programada para degradar a proteína ID, porém a enzima protease ubiquitina-específica (USP1), juntamente com a proteína WDR48 (*WD repeat-containing protein 48*), desubiquitina e estabiliza as IDs.

Sendo assim, este complexo favorece o permanecimento do estado indiferenciado e proliferativo, categorizando a célula como uma CTN (WILLIAMS *et al.*, 2011).

Conseqüentemente, este complexo tem um importante papel durante o processo oncogênico e está diretamente relacionado com a teoria das CTN, principalmente, pela inibição de diferenciação e manutenção do estado *stemness* (WILLIAMS *et al.*, 2011).

A principal vantagem de inibir USPs, em casos de intervenção terapêutica, é melhorar a eficácia do tratamento e diminuir os efeitos colaterais não específicos. Por essa razão, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o manejo de pacientes com CEB é extremamente necessário (ZHAO *et al.*, 2013). Dessa forma, fármacos inibidoras de doenças malignas e pré-malignas devem ser criados para regular o crescimento e diferenciação celular (NISHIMINE *et al.*, 2003).

Atualmente, estudos têm analisado moléculas inibidoras seletivas que atuam sobre o complexo USP1/WDR48 como, por exemplo, ML323 (DEXHEIMER *et al.*, 2012, 2014; LIANG *et al.*, 2014), C527 (MISTRY *et al.*, 2013) e GW7647 (CHEN *et al.*, 2011). Além desses, o inibidor Pimozida tem sido estudado (CHEN *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2015; MISTRY *et al.*, 2013). Todos os estudos (*in vitro* e *in vivo*) que usaram esse medicamento como uma alternativa de tratamento antineoplásico, até o presente momento, observaram resultados promissores e significativo potencial para ser um possível agente terapêutico.

O Pimozida é um agente antipsicótico oral usado para

tratar a Síndrome de Tourette, psicose crônica de tiques motores e fonéticos resistentes (PHARMACEUTICALS, 2008). Além disso, está sendo amplamente indicado como potencial agente antineoplásico (BERTOLESI *et al.*, 2002; CAI *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2011, 2015; FAKO *et al.*, 2016; LEE† *et al.*, 2015; MAPES *et al.*, 2018; MISTRY *et al.*, 2014; MOHANTY *et al.*, 2017; NELSON *et al.*, 2012; SIMPSON *et al.*, 2018; STROBL *et al.*, 1990; STROBL, PETERSON, 1992; TAUB, ROBERT, BAKER, 1979; WIKLUND *et al.*, 2010; ZHOU *et al.*, 2016), principalmente, contra células-tronco neoplásicas (CTN) (CHEN *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2015).

Foi reportado que o Pimozida inibe o complexo USP1/WDR48 e, conseqüentemente, o crescimento e a proliferação celular em leucemia (MISTRY *et al.*, 2013), câncer de pulmão, (CHEN *et al.*, 2011) e glioblastoma (LEE *et al.*, 2015). Contudo, embora esse medicamento tenha apresentado resultados promissores no controle da proliferação das células neoplásicas e progressão tumoral, não há estudos sobre os efeitos do Pimozida em carcinoma de cabeça e pescoço, especificamente em CEB.

Baseando-se nesta perspectiva, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito dose-resposta do inibidor seletivo Pimozida sobre células neoplásicas oriundas de uma linhagem celular de CEB.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Carcinoma Epidermoide Bucal

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2017), o câncer é uma das principais causas de morbidade e mortalidade, podendo ser considerado a segunda maior causa de mortes em todo o mundo. No ano de 2012 foram reportados cerca de 14 milhões de novos casos da doença. Já em 2015, 8,8 milhões de indivíduos faleceram devido a tumores malignos. Globalmente, uma a cada seis mortes é causada por câncer.

Observando a incidência anual de câncer de cabeça e pescoço isoladamente, tem-se mais de 550.000 casos em todo o mundo com cerca de 300 mil mortes por ano. O CEB é o câncer com a sexta maior incidência em todo o mundo e é o responsável por 90% das neoplasias de cabeça e pescoço (UICC, 2014).

Conforme Barnes *et al.* (2005), cerca de 389.650 casos ocorreram no ano 2000, sendo 266.672 na cavidade oral e 122.978 na orofaringe, representando 5% de todos os cânceres para homens e 2% para as mulheres. Porém, é complicado realizar a avaliação separada das taxas de incidência para a cavidade oral e orofaringe devido à dificuldade de discernimento do local de origem dos tumores, pois, quando descobertos, muitas vezes, já estão em fases avançadas. Os locais mais acometidos da cavidade oral são o assoalho bucal, ventre da língua e palato duro. Já na região da orofaringe os locais mais atingidos são amígdala, palato mole, úvula e base da língua, sendo esse último o que apresenta maior incidência (BARNES *et al.*, 2005).

O CEB é considerado uma neoplasia epitelial invasiva com variáveis graus de diferenciação celular e com grande propensão a metástase em linfonodos. Atinge em maior número adultos nas 5ª e 6ª décadas de vida e é mais frequente em homens, visto que esses possuem mais hábitos deletérios (BARNES *et al.*, 2005). Segundo El-Naggar *et al.* (2017), essa neoplasia está intimamente ligada a fatores de risco ambientais e de estilo de vida, como o alto consumo de tabaco, etilismo e mascar betel.

A apresentação clínica do CEB também é variável, podendo ser uma lesão leuco a eritematosa, com alterações nodulares a ulceradas. Quando presentes, as alterações ulceradas costumam ter as margens elevadas e endurecidas e o fato da úlcera não regredir é uma característica sugestiva de malignidade. Quando em lábio inferior, apresenta-se tipicamente como uma lesão em crostas, muitas vezes precedida por queilite actínica (EI-NAGGAR *et al.*, 2017).

O carcinoma pode ser detectado clinicamente por inspeção visual e palpação, mas a confirmação do diagnóstico se dá por meio de biópsia e exame histopatológico. Na palpação, a lesão apresenta-se endurecida. Infelizmente, cânceres em estágio inicial muitas vezes não são percebidos tanto por pacientes como por profissionais de saúde, resultando em atraso no diagnóstico. Isso porque eles são assintomáticos e podem aparentar outras lesões comumente vistas na cavidade bucal. Além disso, a avaliação do pescoço também é importante. Ainda, as lesões pequenas podem ser assintomáticas, enquanto os tumores

avançados dão origem a vários sintomas e sinais, tais como desconforto, dor, mobilidade reduzida da língua e irritação causada pelo uso de dentaduras (EI-NAGGAR *et al.*, 2017).

Ademais, segundo Barnes *et al.* (2005), quando em estágio avançado, a doença pode causar mau odor, dificuldade na fala, abertura de boca e mastigação, além de dificuldade e dor na deglutição, sangramento e inchaço no pescoço. Em casos extremamente avançados, há crescimento de úlceras com áreas de necrose e extensão às estruturas vizinhas como ossos, músculos e pele, e o paciente pode apresentar anemia grave e caquexia.

A escolha do tratamento do CEB depende do local e extensão do tumor primário e, também, do *status* dos linfonodos cervicais. Ele pode ser cirúrgico, radioterápico e/ou quimioterápico, ou uma combinação de ambos. A cirurgia de ressecção das lesões deve incluir sempre uma margem de segurança em todas as dimensões, ou seja, de tecido livre de tumor, além da lesão tumoral em si. Ainda, a radioterapia deve sempre abranger as cadeias linfáticas, mesmo quando elas não estejam afetadas clinicamente (INCA, 2001).

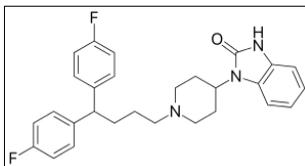
No estágio I (T1 N0 M0) assim como no estágio II (T2 N0 M0) faz-se, preferencialmente, a cirurgia, a qual corresponde à ressecção da lesão com margens de pelo menos 1 cm. Caso o paciente possua metástase cervical com apenas 1 linfonodo metastático e sem extravasamento capsular, deve-se associar o esvaziamento cervical radical modificado. Para os casos com mais de 1 linfonodo metastático ou extravasamento capsular, proceder

com o esvaziamento cervical radical. Já no estágio III (T3 N0 M0 / T1, 2, 3 N1 M0) além da cirurgia, deve-se realizar o esvaziamento cervical supra-omohioideo em casos de pescoço clinicamente negativo. Nos casos de pescoço clinicamente positivo deve-se realizar a radioterapia como tratamento complementar, além do esvaziamento cervical já citado para o estágio I e II. Para o estágio IV (T4 N0, 1 M0 / T qualquer N2, 3 M0 / T qualquer N qualquer M1) deve-se realizar a mesma abordagem do estágio III, sempre utilizando a radioterapia como tratamento complementar. Também, pode-se indicar a radioterapia exclusiva para pacientes considerados inoperáveis, como tratamento paliativo. E a mandíbula pode ser ressecada parcialmente (mandibulectomia marginal), se a invasão for mínima. Além disso, na reabilitação pós-cirúrgica, o paciente deve ser assistido por fisioterapeuta, fonoaudiólogo e psicólogo (INCA, 2001).

2.2 Pimozida

Pimozida é um agente antipsicótico aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) da série difenil-butilpiperidina, cuja fórmula estrutural é 1-[1-[4,4-bis(4-fluorofenil)butil]-4-piperidinil]-1,3-dihidro-2H-benzimidazol-2-ona (Figura 1). Este medicamento é comercialmente disponível em forma de comprimidos com 1 mg ou 2 mg do princípio ativo (PHARMACEUTICALS, 2008).

Figura 1 – Fórmula estrutural do medicamento Pimozida.



Fonte: Pharmaceuticals (2008).

2.2.1 Ação farmacodinâmica

O Pimozida é um fármaco antipsicótico, que age bloqueando os receptores dopaminérgicos dos neurônios do Sistema Nervoso Central (SNC). Apesar do seu exato modo de ação não ter sido ainda estabelecido, acredita-se que a capacidade do Pimozida de suprimir tiques motores e fonéticos na Doença de Tourette é devido a sua função bloqueadora desses receptores. Porém, essa ação muitas vezes é acompanhada por uma série de alterações secundárias no metabolismo e função da dopamina central, as quais podem contribuir tanto para terapias com Pimozida quanto para efeitos adversos. Além disso, o Pimozida, assim como outras drogas psicóticas, possui vários efeitos em outros sistemas de receptores do SNC, os quais não estão totalmente elucidados (PHARMACEUTICALS, 2008).

2.2.2 Metabolismo e farmacocinética

Mais de 50% da dose de Pimozida é absorvida por meio da administração oral. Baseado no perfil metabólico e farmacocinético, o Pimozida parece ser submetido significativamente ao metabolismo de primeira passagem.

Geralmente os níveis séricos máximos ocorrem de seis a oito horas após a administração, variando de 4 a 12 horas (PHARMACEUTICALS, 2008).

O Pimozida é consideravelmente metabolizado, principalmente pelo fígado. Os dois principais metabólitos têm sido identificados como 1-(4-piperidil)-2-benzimidazolinona e ácido butírico 4,4-bis(4-fluorofenil), sendo a ação antipsicótica desses metabólitos indeterminada. A principal via de excreção do Pimozida e seus metabólitos é através do rim (PHARMACEUTICALS, 2008).

2.2.3 Indicações e uso

A indicação do Pimozida se faz para suprimir tiques motores e fonéticos em pacientes com a Doença de Tourette que não responderam satisfatoriamente ao tratamento padrão (PHARMACEUTICALS, 2008).

2.2.4 Contraindicações

Pimozida é contraindicado nas seguintes situações (PHARMACEUTICALS, 2008):

1. Tratamentos de tiques simples ou outros tiques que não estão associados à Doença de Tourette.
2. Uso simultâneo com medicamentos que podem, por si só, causar tiques motores e fonéticos.
3. Histórico de arritmias, hipocalcemia ou hipomagnesemia.

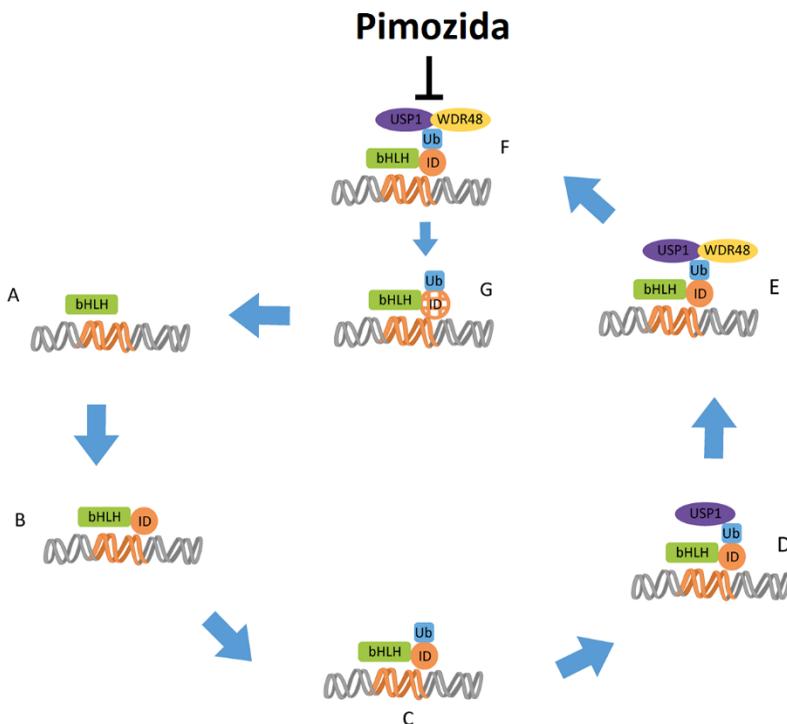
4. Depressão do Sistema Nervoso Central tóxica severa ou estado de coma.
5. Pacientes com hipersensibilidade/alérgicos ao medicamento.
6. Uso simultâneo com antibióticos macrolídeos como Claritromicina, Eritromicina, Azitromicina, Diritromicina e Troleandomicina.
7. Uso concomitante com antifúngicos como Itraconazol e Cetoconazol.

2.3 Pimozida como possível agente antineoplásico

Recentemente, o mecanismo regulatório de diferenciação e proliferação das CTN tem sido investigado (Figura 2). Alguns estudos identificaram o fator de transcrição *Basic-Helix-Loop-Helix* (bHLH) como um significativo regulador do desenvolvimento de neoplasias (GONÇALVES, CORDEIRO, RIVERO, 2017). A ligação entre as proteínas bHLH e o ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*) (DNA) é limitada pela heterodimerização com Inibidores da Ligação de DNA (*Inhibitors of DNA binding*) (ID) (LASORELLA *et al.*, 2006). IDs previnem a diferenciação celular, promovem crescimento e sustentam o desenvolvimento tumoral (CIARAPICA *et al.*, 2009). Contudo, a ubiquitina é programada para degradar esta proteína indesejada. A enzima protease ubiquitina-específica (USP1) é reportada por desubiquitinar e estabilizar as IDs. A USP1 é capaz de formar um complexo com WDR48 (*WD repeat-containing protein 48*) e tem, assim, a sua capacidade aumentada. Além disso,

considerando a ação das proteínas ID, a USP1 contribui para prevenir a diferenciação mediada por bHLH e também mantém as características originais das CTN (WILLIAMS *et al.*, 2011).

Figura 2 – Mecanismo regulatório de diferenciação e proliferação das células-tronco neoplásicas (CTN) com o uso do Pimozida. **A:** Ligação entre as proteínas bHLH e o DNA; **B:** ligação e heterodimerização dos IDs prevenindo a diferenciação celular e sustentando o desenvolvimento tumoral; **C:** Ligação da ubiquitina sinalizando a degradação da proteína; **D:** Ligação da enzima USP1 desubiquitinizando e estabilizando as IDs; **E:** Formação do complexo da USP1 com WDR48, tendo a sua capacidade aumentada; **F:** Ligação do Pimozida no complexo USP1/WDR48; **G:** Inibição do complexo USP1/WDR48 e, conseqüente, ubiquitinação da proteína.



Fonte: Gonçalves *et al.* (2018).

Através do rastreio quantitativo de alto rendimento contra uma coleção de 9.525 moléculas bioativas, Chen *et al.* (2011) identificaram inibidores de USP1/WDR48, como o Pimozida e GW7647. As análises cinéticas revelaram mecanismo não competitivo entre os dois inibidores. Afirmaram também que tanto o Pimozida quanto o GW7647 são inibidores reversíveis e se ligam ao complexo enzima-substrato e à enzima livre. Nesse estudo, mostrou-se que o Pimozida é um potente inibidor de um grupo de deubiquitinases humanas, USP1/WDR48.

Zhou *et al.* (2016) examinaram se o agente antipsicótico Pimozida tem efeito antiproliferativo em células de câncer de próstata usando o teste colorimétrico MTT. As células de câncer de próstata humana DU145, LNCaP, PC3M, 22RV1 e BHP-1 foram expostas a uma série de concentrações (0, 5, 10, 15 e 20 μM) de Pimozida durante 24, 48 e 72 horas. O Pimozida inibiu a proliferação desses cinco tipos de células de maneira dependente da dose e do tempo.

A observação morfológica celular usando microscopia de luz mostrou que, após o tratamento com Pimozida durante 24 h, as células DU145 e LNCaP de câncer de próstata apresentaram encolhimento citoplasmático e o número de células foi reduzido. Além disso, foi analisado o efeito do Pimozida na distribuição do ciclo celular usando a marcação Iodeto de Propídeo (PI). Após as células DU145 e LNCaP serem tratadas com 15 μM de Pimozida durante 24 h, a população de células na fase G0/G1 aumentou significativamente, enquanto que na fase S diminuiu na mesma intensidade. Os resultados indicaram que o Pimozida

diminuiu a viabilidade das células de câncer de próstata em associação com a parada do ciclo celular em fase G0/G1, além de regular negativamente a capacidade de formação de colônias e a formação de esferas, bem como a migração de células suprimidas (ZHOU *et al.*, 2016).

Zhou *et al.* (2016), também, realizaram um ensaio de formação de colônias e esferas, o qual revelou que o Pimozida inibe a capacidade de auto renovação das linhagens de células de câncer de próstata DU145 e LNCaP de forma dose-dependente. Ademais, os ensaios de *Western Blot*, apresentaram redução significativa no nível de expressão dos genes *stemness* Nanog e c-Myc quando as células de câncer de próstata DU145 e LNCaP foram tratadas com Pimozida durante 48 h. Esses resultados indicaram que o Pimozida inibiu a capacidade de formação de colônias e esferas em células de câncer de próstata.

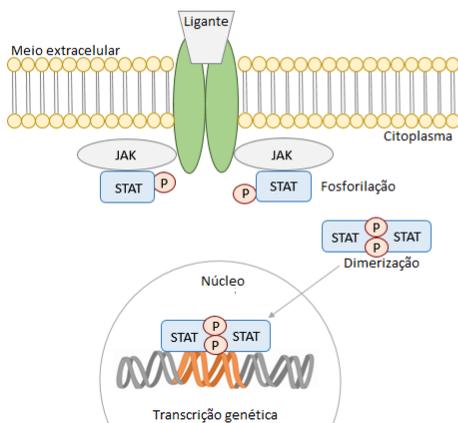
Utilizando o ensaio de migração de *Transwell*, Zhou *et al.* (2016) avaliaram por meio da manipulação do marcador relativo da transição epitelial-mesenquimatoso (TEM) a capacidade de migração das células após o tratamento com Pimozida. Os resultados demonstraram que as células DU145 e LNCaP tiveram a capacidade de migração celular suprimida após o tratamento com Pimozida nas concentrações de 7,5 e 15 μM se comparadas ao grupo controle (sem tratamento).

Visto que a sinalização STAT3 é de primordial importância para promover a progressão do tumor e a resistência aos medicamentos, Zhou *et al.* (2016) determinaram através da análise de *Western Blot* a validação da expressão de pY-STAT3.

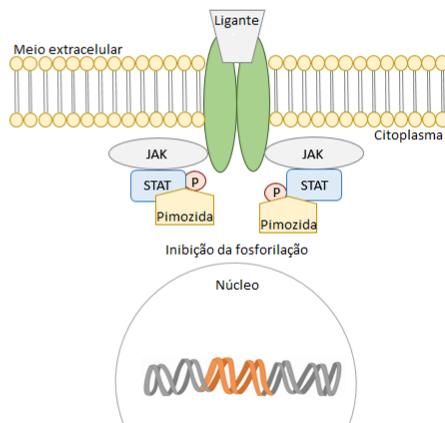
Os resultados mostraram que o Pimozida reduziu a expressão basal de pY-STAT3 nas células DU145 e LNCaP. A ativação da sinalização STAT3 foi referida com alta expressão da fosforilação STAT3 na tirosina 705 (pY-STAT3) (Figura 3). Outrossim, o tratamento com Pimozida reverteu o nível de expressão da fosforilação STAT3 na tirosina 705 induzida pela adição de IL-6 em células DU145 e LNCaP. Estes dados sugerem ainda que o Pimozida pode inibir a atividade de sinalização de STAT3 para suprimir o crescimento celular em células de câncer de próstata.

Figura 3 – Via de ativação da STAT e a ação do Pimozida inibindo-a.

Transdução de Sinal e Ativação da Via de Transcrição (STAT) normal



Ação do Pimozida na Transdução de Sinal e Ativação da Via de Transcrição (STAT)



Fonte: Gonçalves *et al.* (2018).

3. JUSTIFICATIVA

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2017), o câncer motivou 8,8 milhões de mortes em 2015, sendo considerada uma das maiores causas de morbidade e mortalidade do mundo. Dentre os vários tipos de câncer de cabeça e pescoço, o mais prevalente é o Carcinoma Epidermoide (UICC, 2014).

Pacientes que apresentam CEB localmente invasivo apresentam baixos índices de sobrevida e grave comprometimento funcional, mesmo após o tratamento com cirurgia, radioterapia e/ou quimioterapia.

Com o passar dos anos, os pesquisadores notaram que pacientes portadores de distúrbios psiquiátricos apresentavam baixos índices de prevalência de câncer e, então, começaram a estudar seus medicamentos. O Pimozida, um agente antipsicótico oral usado para tratar a síndrome de Tourette, psicose crônica e tiques motores e fonéticos resistentes (PHARMACEUTICALS, 2008), está sendo amplamente indicado como potencial alvo anticâncer (BERTOLESI *et al.*, 2002; CAI *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2011, 2015; FAKO *et al.*, 2016; LEE† *et al.*, 2015; MAPES *et al.*, 2018; MISTRY *et al.*, 2014; MOHANTY *et al.*, 2017; NELSON *et al.*, 2012; SIMPSON *et al.*, 2018; STROBL *et al.*, 1990; STROBL, PETERSON, 1992; TAUB, ROBERT, BAKER, 1979; WIKLUND *et al.*, 2010; ZHOU *et al.*, 2016), principalmente contra CTN (CHEN *et al.*, 2015; LEE† *et al.*, 2015).

Já foi reportado que o Pimozida inibe o complexo USP1/WDR48 e, conseqüentemente, o crescimento e a

proliferação celular em leucemia (MISTRY *et al.*, 2014), câncer de pulmão, (CHEN *et al.*, 2011) e glioblastoma (LEE† *et al.*, 2015). Contudo, embora este medicamento tenha apresentado resultados promissores no controle da proliferação das células neoplásicas e progressão tumoral, não há estudos sobre os efeitos do Pimozida em carcinoma de cabeça e pescoço, especificamente em CEB.

Dessa forma, é muito importante o estudo deste fármaco, Pimozida, no desenvolvimento e progressão do CEB. E com isso, o mesmo pode ser utilizado como agente terapêutico, melhorando a efetividade do tratamento e a sobrevida dos pacientes.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar, *in vitro*, o efeito dose-resposta do inibidor seletivo Pimozida sobre a viabilidade celular do Carcinoma Epidermoide Bucal humano.

4.2 Objetivos Específicos

- Estabilizar a cultura de uma linhagem celular de Carcinoma Epidermoide Bucal humano obtida de um banco de células;
- Verificar o efeito do Pimozida sobre a viabilidade celular, considerando os intervalos de tempo de 12, 24, 48 e 72 horas para a exposição ao medicamento;
- Avaliar o efeito do Pimozida sobre a viabilidade celular em cinco pontos de concentração (0, 1, 5, 10, 15 μ M), a partir da solução mais concentrada (15 μ M) até o controle negativo (0 μ M);
- Avaliar a influência da presença de soro fetal bovino no meio de cultura sobre o efeito do Pimozida na cultura celular.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Delineamento do estudo

O estudo proposto é de natureza básica, intervencional, analítico e prospectivo. Os resultados serão avaliados de forma quantitativa e descritiva.

5.2 Aspectos éticos e legais

O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Universidade Federal de Santa Catarina foi consultado quanto à necessidade de submissão e apreciação deste projeto de pesquisa junto a esse órgão, o qual consultou também a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), sendo que o mesmo se manifestou indicando a não responsabilidade de submissão, visto que as células que foram utilizadas nesse projeto, embora humanas, estão comercialmente disponíveis em Banco de Células.

5.3 Procedimentos experimentais

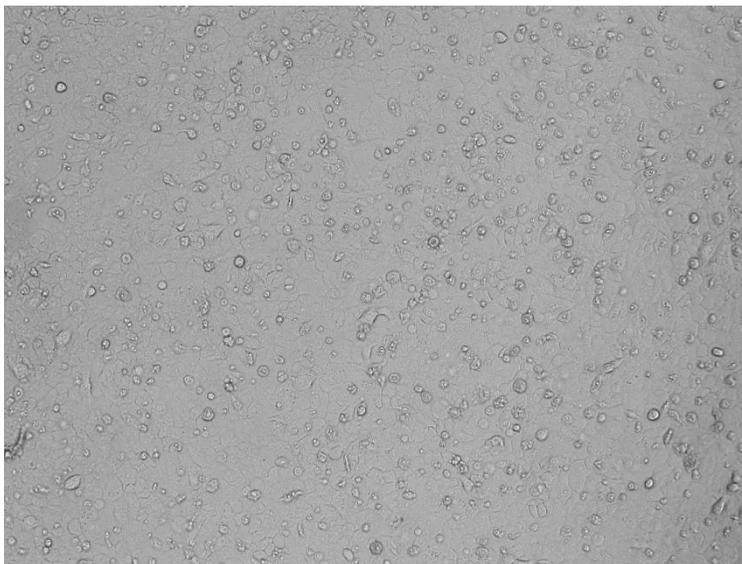
5.3.1 Linhagem celular

A linhagem de células de Carcinoma Epidermoide Bucal (CAL27) foi adquirida junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro (Tabela 1 e Figura 4).

Tabela 1 – Informações sobre a linhagem de células que será utilizada nesse estudo.

Sexo	Idade	Etnia	Localização
Masculino	56	Caucasiano	Língua

Figura 4 – Linhagem celular CAL27 oriunda de Carcinoma Epidermoide Bucal humano.



Fonte: Do autor.

5.3.2 Cultivo celular

As células foram cultivadas no meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas,

Brasil), 1% de penicilina e 1% de estreptomicina, sendo mantidas em estufa a 37°C, em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de dióxido de carbono (CO₂). O meio de cultura foi trocado a cada 2-3 dias e a progressão da cultura foi avaliada por microscopia de fase em culturas crescidas sobre poliestireno (plástico).

Para manutenção da viabilidade celular, todos os procedimentos foram realizados em cabine de segurança biológica para manutenção da esterilidade dos materiais e das substâncias utilizadas para o cultivo celular.

Após atingirem a subconfluência, que ocorre quando as células ocupam 70% da área cultivável do frasco, as células foram enzimaticamente removidas dos frascos de cultura, contadas em um hemocítômetro (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA) e plaqueadas para os experimentos seguintes.

5.3.3 Curva dose-resposta

A fim de determinar se a resposta citotóxica é dose e tempo-dependente, foram realizadas curvas dose-resposta de citotoxicidade de células tratadas com concentrações decrescentes de Pimozida nos tempos de 12, 24, 48 e 72 horas. Para isso, foram elencados cinco pontos de concentrações com intervalos (0, 1, 5, 10, 15µM), a partir da solução mais concentrada (15µM) até o controle negativo (0 µM). Após 24 horas de tratamento, as células viáveis remanescentes na placa de cultivo foram submetidas ao teste do MTT e a absorbância a 570nm aferida em leitora de microplaca. O controle negativo foi a cultura celular com meio de cultura convencional, sem adição de

medicamento ou solvente.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e em três repetições independentes.

5.3.4 Teste de viabilidade celular usando MTT

A citotoxicidade desencadeada pelo tratamento com Pimozida foi aferida pelo teste de avaliação da atividade mitocondrial das células. Esse teste avalia a capacidade das enzimas mitocondriais das células tratadas em reduzir o sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil) tetrazólio (MTT) em formazam. Dessa forma, somente as células viáveis tiveram a capacidade de promover essa redução. A absorbância representou a medida do número de células viáveis, ou seja, o número de células que não sofreram toxicidade suficiente para reduzir sua atividade mitocondrial. O produto de formazam apresenta uma coloração arroxeadada diferente da cor inicial dos sais de tetrazólio que, após serem diluídos em solvente de veículo alcoólico, podem ter sua absorbância aferida em uma leitora de microplacas (Thermo Plate TP reader) a 570 nm e comparada à absorbância dos controles.

Após um teste piloto para definição da densidade celular a ser utilizada, foram plaqueadas 4.000 células por poço em placas de 96 poços (TPP) e estas foram mantidas em incubadora em condições ideais por 24 horas para aderência. Após esse período, as células foram tratadas com Pimozida (SIGMA ALDRICH) diluído em DMSO (Dimetilsulfóxido) com as diferentes concentrações e durante diferentes intervalos de tempo (12, 24,

5.4 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo *software SPSS* (Statistical Package for the Social Sciences) utilizando-se o teste *t-Student de amostras independentes*. Os resultados foram expressos como média \pm os desvios padrão da média e porcentagem. Valores de P menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significantes.

6. RESULTADOS

Após a realização do teste de normalidade, observou-se que os valores de p foram superiores a 0,05. Desta forma pode-se inferir que os dados seguiam uma distribuição normal e um teste paramétrico foi recomendado.

Os resultados obtidos no teste de viabilidade celular através da atividade mitocondrial das células no espectrofotômetro estão representados na Tabela 2, juntamente com os seus desvios padrões (DP).

Tabela 2 – Média, juntamente com o desvio padrão, da viabilidade celular de cada grupo em diferentes concentrações e intervalos de tempo.

	SEM SFB	COM SFB
	Média (DP)	Média (DP)
T12D0	122.2 (±40.4)	175.7 (±66.8)
T12D1	136.7 (±54.7)	148.7 (±54.1)
T12D5	152.4 (±81.3)	153.4 (±63.8)
T12D10	113.2 (±33.8)	148.7 (±74.4)
T12D15	120.3 (±28.7)	120.4 (±50.9)
T24D0	149.6 (±47.8)	333.5 (±120.8)
T24D1	137.5 (±48.9)	298.4 (±74.53)
T24D5	158.5 (±53.0)	267.7 (±60.1)
T24D10	159.8 (±49.8)	256.5 (±106.5)
T24D15	147.1 (±59.8)	223.8 (±84.7)
T48D0	170.3 (±43.9)	286.0 (±49.0)
T48D1	158.7 (±53.6)	240.7 (±49.5)
T48D5	151.2 (±39.0)	265.2 (±72.4)
T48D10	165.5 (±44.7)	220.7 (±54.9)
T48D15	160.4 (±29.0)	186.5 (±51.8)
T72D0	214.8 (±24.8)	564.3 (±131.6)
T72D1	202.0 (±72.4)	566.0 (±112.8)
T72D5	185.4 (±64.7)	420.1 (±88.9)
T72D10	158.4 (±81.0)	349.7 (±77.8)
T72D15	142.5 (±60.2)	252.7 (±103.9)

Legenda:

T12: 12 horas	D0: 0 μ M
T24: 24 horas	D1: 1 μ M
T48: 48 horas	D5: 5 μ M
T72: 72 horas	D10: 10 μ M
	D15: 15 μ M

Em seguida, realizou-se o teste *t-Student* de amostras independentes e os resultados encontram-se nos gráficos 1, 2, 3 e 4 juntamente com os valores de p nas tabelas 3,4, 5 e 6.

Gráfico 1 – Comparação da viabilidade celular entre as diferentes dosagens no tempo de 12 horas, tanto para o grupo com SFB quanto para o grupo sem SFB.

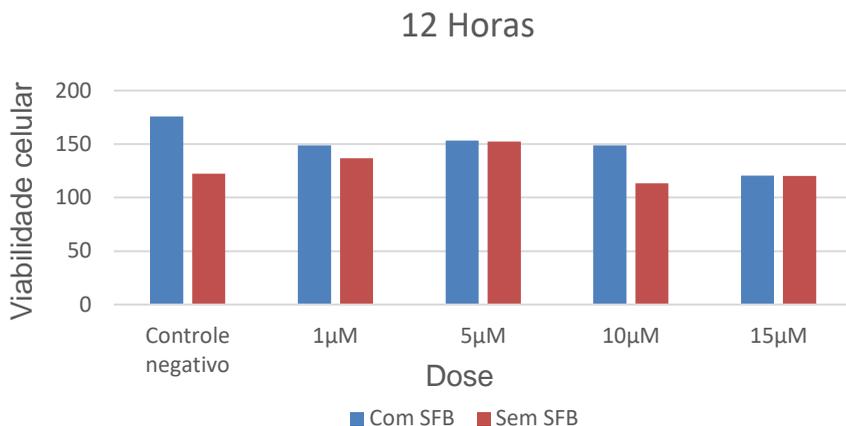


Tabela 3 – Valores de p nas diferentes dosagens no tempo de 12 horas, tanto para o grupo com SFB quanto para o grupo sem SFB.

		12 HORAS				
		Sem SFB				
		D0	D1	D5	D10	D15
Com SFB	D0		p=0.548	p=0.358	p=0.624	p=0.911
	D1	p=0.360		P=0.638	p=0.289	p=0.437
	D5	p=0.479	p=0.869		p=0.201	p=0.281
	D10	p=0.430	p=1.000	p=0.888		p=0.638
	D15	p=0.066	p=0.270	p=0.243	p=0.360	

Gráfico 2 – Comparação da viabilidade celular entre as diferentes dosagens no tempo de 24 horas, tanto para o grupo com SFB quanto para o grupo sem SFB.

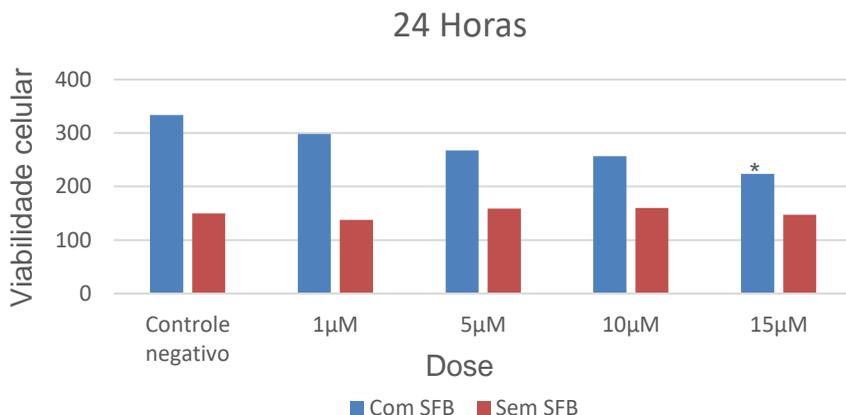


Tabela 4 – Valores de p nas diferentes dosagens no tempo de 24 horas, tanto para o grupo com SFB quanto para o grupo sem SFB.

24 HORAS
Sem SFB

	D0	D1	D5	D10	D15
D0		p=0.603	p=0.714	p=0.663	p=0.922
D1	p=0.469		p=0.396	p=0.352	p=0.716
D5	p=0.163	p=0.351		p=0.957	p=0.673
D10	p=0.171	p=0.348	p=0.787		p=0.629
D15	p=0,040*	p=0.065	p=0.223	p=0.482	

Gráfico 3 – Comparação da viabilidade celular entre as diferentes dosagens no tempo de 48 horas, tanto para o grupo com SFB quanto para o grupo sem SFB.

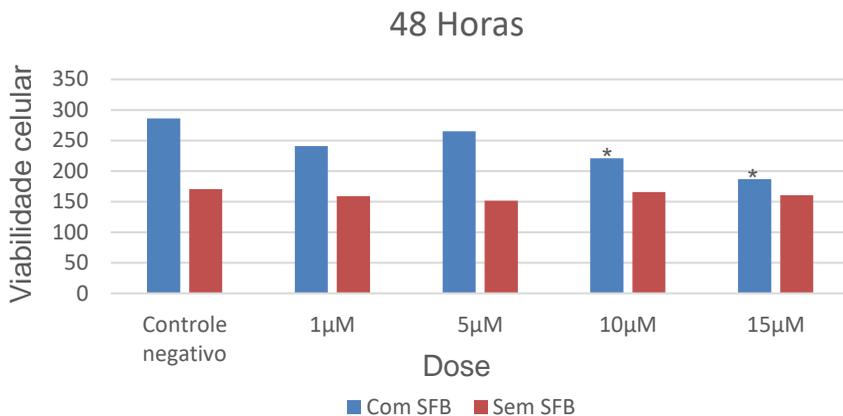


Tabela 5 –Valores de p nas diferentes dosagens no tempo de 48 horas, tanto para o grupo com SFB quanto para o grupo sem SFB.

		48 HORAS				
		Sem SFB				
		D0	D1	D5	D10	D15
Com SFB	D0		p=0.624	p=0.344	p=0.822	p=0.581
	D1	p=0.069		p=0.737	p=0.775	p=0.936
	D5	p=0.486	p=0.416		p=0.480	p=0.577
	D10	p=0,017*	p=0.430	p=0.162		p=0.777
	D15	p=0,001*	p=0,038*	p=0,017*	p=0.193	

Gráfico 4 – Comparação da viabilidade celular entre as diferentes dosagens no tempo de 72 horas, tanto para o grupo com SFB quanto para o grupo sem SFB.

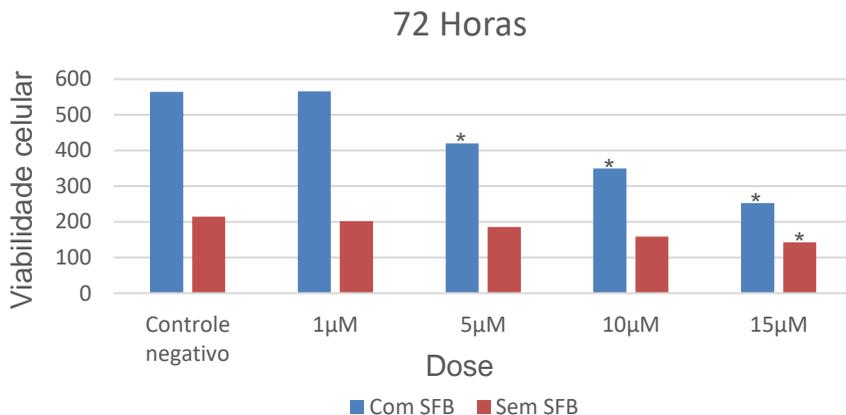


Tabela 6 – Valores de p nas diferentes dosagens no tempo de 72 horas, tanto para o grupo com SFB quanto para o grupo sem SFB.

72 HORAS
Sem SFB

	D0	D1	D5	D10	D155
D0		p=0.621	p=0,221	p=0.063	p=0,004*
D1	p= 0.977		P=0.616	p=0.247	p=0.077
D5	p=0,015*	p=0,008*		p=0.446	p=0.165
D10	p=0,001*	p=0,000*	p=0.093		p=0.643
D15	p=0,000*	p=0,000*	p=0,002*	p=0,040*	

Com SFB

No gráfico 1 e tabela 3, 12 horas, é possível observar uma pequena diminuição da viabilidade celular no grupo com SFB quando comparada a concentração de 15 μ M com o controle negativo, porém essa diferença não é estatisticamente significativa ($p=0,066$). Já o grupo sem SFB nota-se que é bastante instável e também não apresenta diferença estatisticamente significativa ($p=0,911$).

O gráfico 2 e tabela 4 apresenta os resultados do tempo de 24 horas. Nele, obteve-se diferença estatisticamente significativa no grupo com SFB comparada à concentração de 15 μ M com o controle negativo ($p=0,040^*$), porém o grupo sem SFB não apresentou diferença estatística significativa ($p=0,922$).

No gráfico 3 e tabela 5 de 48 horas de tratamento, os resultados do grupo com SFB de 10 μ M ($p=0,017^*$) e 15 μ M ($p=0,001^*$) são estatisticamente significantes. Mas, no grupo sem SFB não há resultados que apresentem diferenças estatísticas ($p=0,581$).

No tempo de 72 horas (Gráfico 4 e Tabela 6), o grupo com SFB apresenta diferença estatística nas concentrações de 5 μ M ($p=0,015^*$), 10 μ M ($p=0,001^*$) e 15 μ M ($p=0,000^*$) quando comparado com o controle negativo. E o grupo sem SFB apresenta diferença estatisticamente significativa entre a dosagem de 15 μ M ($p=0,004^*$) e o grupo controle

Observando esses dados é possível inferir que o controle negativo, ou seja, o grupo em que não foi aplicada a droga, possui uma alta viabilidade celular, mas que, à medida que se vai intensificando as dosagens, esta viabilidade vai decaindo

intensamente. Sendo que, quando comparam-se os valores relativos ao grupo controle e a dosagem de 15 μ M, observa-se uma diminuição de 31,5% em 12 horas, 32,9% em 24 horas, 34,8% em 48 horas e 55,3% em 72 horas (com SFB), sendo que nestes três últimos há uma diferença estatisticamente significativa. Portanto, além da importância da dosagem, é possível inferir que o tempo de aplicação também é um fator relevante para a resposta medicamentosa.

Já quando comparam-se os valores referentes ao grupo controle e a dosagem de 15 μ M no grupo sem soro fetal bovino, é possível verificar uma diminuição da densidade celular de 1,6% em 12 horas, 1,7% em 24 horas, 5,9% em 48 horas e 33,7% em 72 horas, sendo apenas o último estatisticamente significativo. Baseado nesses dados, é possível constatar que, apesar da heterogeneidade desses resultados, há uma tendência a diminuição da viabilidade celular. Esse fato demonstra a importância do SFB como nutriente para as células. Portanto, a ausência do SFB deixa as células mais instáveis.

Além disso, fez-se a comparação das viabilidades celulares dos grupos com SFB e sem SFB e os valores de p encontram-se nas tabelas 7, 8, 9 e 10.

Tabela 7 – Comparação entre os grupos com e sem SFB, nas diferentes dosagens, durante o mesmo período de tempo (12 horas).

12 HORAS

T12D0 $p=0,068$

T12D1 $p=0,647$

T12D5 $p=0,977$

T12D10 $p=0,211$

T12D15 $p=0,996$

Tabela 8 – Comparação entre os grupos com e sem SFB, nas diferentes dosagens, durante o mesmo período de tempo (24 horas).

24 HORAS

T24D0 $p=0,001^*$

T24D1 $p=0,000^*$

T24D5 $p=0,001^*$

T24D10 $p=0,025^*$

T24D15 $p=0,041^*$

Tabela 9 - Comparação entre os grupos com e sem SFB, nas diferentes dosagens, durante o mesmo período de tempo (48 horas).

48 HORAS

T48D0 $p=0,000^*$

T48D1 $p=0,004^*$

T48D5 $p=0,001^*$

T48D10 $p=0,033^*$

T48D15 $p=0,206$

Tabela 10 - Comparação entre os grupos com e sem SFB, nas diferentes dosagens, durante o mesmo período de tempo (72 horas).

72 HORAS

T72D0 p=0,000*

T72D1 p=0,000*

T72D5 p=0,000*

T72D10 p=0,000*

T72D15 p=0,014*

Na tabela 7 observa-se os valores de p nos grupos que permaneceram em contato com o medicamento por 12 horas. É possível observar que as diferenças de viabilidade celular entre os grupos com e sem SFB não são estatisticamente significantes.

Já no tempo de 24 horas (tabela 8), nota-se resultados com significância estatística em todos os grupos, independentemente da dosagem. Assim como os valores de p apresentados na tabela 10, 72 horas de contato com o remédio, também são todos estatisticamente significantes.

A tabela 9, com os resultados de 48 horas, demonstra os valores de p estatisticamente significante nas dosagens de 1 μ M (p=0,000*), 5 μ M (p=0,004*) e 10 μ M (p=0,033). Porém, os grupos que receberam 15 μ M de Pimozida não apresentaram diferenças estatísticas (p=0,206).

Por fim, cabe ressaltar que nos grupos em que não se aplicou o medicamento, ou seja, o controle negativo, as células demonstraram crescente expansão, sendo, inclusive, estatisticamente superior aos demais. Essa informação reitera que o medicamento foi aplicado em células completamente viáveis e que demonstravam abundante crescimento.

7. DISCUSSÃO

Alguns estudos têm avaliado moléculas inibidoras seletivas que atuam sobre o complexo USP1/WDR48 como, por exemplo, ML323 (DEXHEIMER *et al.*, 2012, 2014; LIANG *et al.*, 2014), C527 (MISTRY *et al.*, 2013) e GW7647 (CHEN *et al.*, 2011). Além destes, o inibidor Pimozida também tem sido estudado (CHEN *et al.*, 2011; FAKO *et al.*, 2016; LEE *et al.*, 2015; MISTRY *et al.*, 2013; NELSON *et al.*, 2012; STROBL *et al.*, 1990; STROBL, PETERSON, 1992; TAUB, BAKER, 1979; ZHOU *et al.*, 2016). Até o momento, todos os estudos (*in vitro* e *in vivo*) que utilizaram o Pimozida como um medicamento antitumoral obtiveram resultados promissores e significativo potencial para o mesmo ser um possível agente terapêutico.

No presente estudo, buscou-se avaliar a efetividade antineoplásica do Pimozida em células do Carcinoma Epidermoide Bucal humano. Além disso, avaliou-se o grau de dependência tempo e dose-resposta do medicamento.

Para isso, assim como Chen *et al* (2015); Strobl (1990); Strobl, Peterson (1992) e Zhou *et al.* (2016), as células foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com penicilina e estreptomicina, em incubadora com 5% de CO₂ a 37°C. Em concordância com CHEN *et al* (2015) e ZHOU *et al.* (2016), foram utilizadas placas de cultura de 96 poços. Porém, diferentemente dos autores, no presente estudo foram cultivadas 4.000 células por poço. Isso porque realizou-se, previamente, um teste de densidade celular, avaliando o

crescimento celular quando utilizadas 2.000, 3.000 e 4.000 células. Com esse teste observou-se que a densidade de 4.000 células era a mais apropriada, visto que proporciona maior quantidade de células em menor tempo. Assim, após 24 horas de cultura celular já havia a subconfluência, possibilitando a aplicação do Pimozida.

No estudo ainda, optou-se por realizar um grupo com adição de Soro Fetal Bovino e outro sem. Isso porque, segundo Saury *et al.* (2018), o soro tem sido muito utilizado em pesquisas *in vitro*, como uma fonte de fatores de crescimento (FGs) e outros elementos essenciais para a adesão e proliferação celular. Porém, o SFB não só é uma fonte potencial de contaminação por agentes patogênicos, tais como vírus, bactérias (micoplasmas) e príons, mas também pode aumentar a imunogenicidade celular, como resultado da internalização de proteínas animais durante a expansão *in vitro*. Como é a principal fonte de nutrientes das células, sendo suprimido, é capaz de diminuir a taxa de crescimento celular e tornar as células mais susceptíveis à morte. Esse fato foi observado nos resultados, que apresentaram-se bastante heterogêneos.

Ainda, pode-se notar que os valores de p não foram estatisticamente significantes quando compararam-se os valores da viabilidade celular entre os grupos com e sem SFB em 12 horas, mas esses valores foram significantes nos períodos de tempo subsequentes. Não há na literatura o embasamento desse fato, visto que essa comparação é inédita. Porém, acredita-se que inicialmente as células sentiram o impacto da ação do Pimozida,

independentemente da presença ou não do soro. Após, as células que estavam na presença do SFB tiveram mais condições de se recuperar e voltar a proliferar, mesmo que em uma taxa inferior ao grupo controle, do que o grupo em que esta substância foi suprimida.

Porém, independente da suplementação com SFB ou não, os resultados de 72 horas se mostraram efetivos e estatisticamente significativos, demonstrando mais uma vez que o efeito do medicamento é dose e tempo dependente. Por essa razão, constatou-se que o Pimozida realmente possui um efeito antitumoral, assim como Chen *et al* (2015); Fako *et al.* (2016); Nelson *et al.* (2012); Mistry *et al.* (2013) e Zhou *et al.* (2016). Ademais, notou-se que, quanto maior o tempo de contato da droga com as células, menor a viabilidade das mesmas, havendo um grande decréscimo na taxa de proliferação tal qual Mistry *et al.* (2013) e Zhou *et al.* (2016) reportaram.

Fako *et al.* (2016) comprovaram que o Pimozida inibe a proliferação celular de um modo dose e tempo dependente das células Hep3B, HepG2 e Sk-Hep-1 HHT4 de carcinoma hepatocelular. As células foram tratadas com várias concentrações de Pimozida, sendo a de 10uM considerada mais apropriada pelos autores, durante 48 horas. Foram feitas aferições antes do tempo completo, demonstrando que a partir de 6 horas o medicamento começa a fazer efeito, uma vez que a diminuição da viabilidade celular apresentou resultados estatisticamente significantes no tempo de 6, 12 e 24 horas para as células Hep3B, HepG2. Esses dados vão de acordo com o presente estudo, o qual

também apresentou resultados positivos para 12 e 24 horas, com diminuições de mais de 30% da viabilidade celular. Além disso, os autores concluíram que o Pimozida inibiu a proliferação celular em todas as linhagens após o tratamento de 48 horas, assim como esse estudo, evidenciando, mais uma vez, que o medicamento é dose e tempo dependente.

Mistry *et al.* (2013) demonstraram através do seu estudo de células leucêmicas, K562, MOLM14, osteossarcoma e leucemia mielóide aguda (LMA) expressando luciferase tratadas com inibidores em meio apropriado durante 24-72 horas, que o Pimozida promove a degradação de ID1, a diminuição dos níveis USP1 e provoca a inibição dose-dependente do crescimento das células K562 *in vitro* através da indução de apoptose.

Além disso, Nelson *et al.* (2012), através do estudo das células MOLM14 e PKC412, células de LMA contendo a mutação FLT3, observaram que o Pimozida reduz a fosforilação da tirosina de STAT5, induzindo a apoptose. Isso porque, após tratar as células com doses crescentes do medicamento durante 48 horas, obtiveram como resultado uma redução nítida do número de células viáveis.

Também utilizando o teste MTT, Chen *et al.* (2015) afirmaram que o Pimozida possui um efeito antiproliferativo nas células MHCC-97L, MHCC-97H, HEK293T, Huh7, Hep 3B, e Hep G2 de carcinoma hepatocelular (HCC) através da interrupção do ciclo celular. Os autores utilizaram doses variadas (0, 1, 5, 10, e 15 μ M), assim como esse estudo, e diferentes tempos (24, 48 e 72 h). Os resultados alcançados foram a diminuição de $21,57 \pm 3,16$,

15,97 ± 0,16 e 6,15 ± 0,48 para MHCC-97L; 44,37 ± 20,45, 5,29 ± 1,09 e 1,81 ± 0,51 para Hep 3B; 11,43 ± 0,55, 3,96 ± 0,62 e 1,14 ± 0,27 para Hep G2; e 20,87 ± 1,54, 20,23 ± 3,31 e 8,44 ± 0,91 para Huh7, respectivamente aos tempos de 24, 48 e 72 horas. Assim como essa pesquisa, nota-se uma pequena diferença quando realiza-se a comparação entre os grupos de 24 e 48 horas. Porém o grupo de 72 horas apresenta uma efetividade evidentemente maior, reafirmando que o Pimozida age de forma dependente da dose e do tempo.

Também, os resultados desse estudo vão ao encontro dos achados de Zhou *et al.* (2016), que demonstraram a efetividade do Pimozida sobre as células de câncer de próstata DU145, LNCaP, PC3M, 22RV1 e BHP-1. Os autores utilizaram diversas concentrações (0, 5, 10, 15 e 20 µM) de Pimozida e tempos variáveis (24, 48 e 72 horas) e constataram que o medicamento inibiu a viabilidade celular dos cinco tipos de células. Os resultados estatisticamente significantes encontrados com a concentração de 5 µM foram de 24 horas (PC3M), 48 horas (DU145, PC3M e BHP-1) e 72 horas (para todas as linhagens celulares). Para as demais concentrações, todos os resultados apresentaram significância estatística. Porém, os autores observaram uma maior diminuição na viabilidade celular no grupo de 72 horas, independente da concentração, validando o fato do Pimozida ser dose e tempo dependente tal qual o presente estudo.

Por conseguinte, é possível depreender que, além da importância da dosagem, o tempo de aplicação também é um fator relevante para a resposta medicamentosa.

Não foram encontrados na literatura estudos abordando o efeito do Pimozida sobre o CEB, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Assim, esse trabalho é inédito e os seus resultados promissores demonstram a relevância de se avaliar o Pimozida como possível agente terapêutico no tratamento de Carcinoma Epidermóide Bucal humano.

8. CONCLUSÃO

A partir dos resultados pode-se inferir que mesmo na presença de SFB, o qual proporciona um ambiente ideal para a adesão e crescimento celular, o Pimozida exerceu o efeito de diminuição da viabilidade das células. Em um estado de supressão de SFB, estas células ficaram instáveis, com uma menor taxa de crescimento, proliferação e adesão, e a aplicação do Pimozida as tornou ainda mais susceptíveis à morte. Portanto, o SFB não interfere na resposta do medicamento em cultura celular.

Além disso, notou-se, por meio dos diferentes grupos testados, que o tempo exerceu um papel determinante quanto à viabilidade celular, sugerindo que, quanto maior o tempo de exposição ao tratamento, maior a efetividade do medicamento. Por essa razão, é possível concluir que este medicamento tem potencial para ser um novo agente terapêutico e estudos suplementares, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, seriam de grande valia para verificar o efeito desta droga em Carcinoma Epidermoide Bucal humano.

REFERÊNCIAS

1. BARNES, L. *et al.* **Pathology & Genetics Head and Neck Tumours**. Lyon: World Health Organization, 2005.
2. BERTOLESI, G. E. *et al.* The Ca(2+) channel antagonists mibefradil and pimozide inhibit cell growth via different cytotoxic mechanisms. **Mol Pharmacol.**, v. 62, n. 2, p. 210-219, 2002.
3. CAI, N. *et al.* The STAT3 inhibitor pimozide impedes cell proliferation and induces ROS generation in human osteosarcoma by suppressing catalase expression. **Am J Transl Res.**, v. 9, n. 8, p. 3853-3866, 2017.
4. CHEN, J. *et al.* Selective and cell-active inhibitors of the USP1/UAF1 deubiquitinase complex reverse cisplatin resistance in non-small cell lung cancer cells. **Chem Biol.**, v. 23, n. 11, p. 1390-1400, 2011.
5. CHEN, J. J. *et al.* The neuroleptic drug pimozide inhibits stem-like cell maintenance and tumorigenicity in hepatocellular carcinoma. **Oncotarget**, 2015.
6. CIARAPICA, R. *et al.* Targeting Id protein interactions by an engineered HLH domain induces human neuroblastoma cell differentiation. **Oncogene**, v. 28, n. 17, p. 1881–91, 30 abr. 2009.

7. DEXHEIMER, T. *et al.* Discovery of ML323 as a Novel Inhibitor of the USP1/UAF1 Deubiquitinase Complex. **Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program**, 2012.
8. DEXHEIMER, T. *et al.* Synthesis and Structure – Activity Relationship Studies of N-Benzyl-2- phenylpyrimidin-4-amine derivatives as Potent USP1/UAF1 Deubiquitinase Inhibitors with Anticancer Activity against Nonsmall Cell Lung Cancer. **J. Med. Chem.**, v. 57, p. 8099–8110, 2014.
9. DONNENBERG, V.; DONNENBERG, A. Multiple drug resistance in cancer revisited: The cancer stem cell hypothesis. **Journal of clinical pharmacology**, v. 45, p. 872–877, 2005.
10. EI-NAGGAR, A. K., *et al.* **WHO Classification of Head and Neck Tumours**. 4 ed. Lyon: World Health Organization, 2017.
11. FAKO, V. *et al.* Inhibition of wnt/ β -catenin signaling in hepatocellular carcinoma by an antipsychotic drug pimozide. **International Journal of Biological Sciences**, v. 12, n. 7, p. 768–75, 2016.
12. GONÇALVES, J. M.; CORDEIRO, M. M. R.; RIVERO, E. R. C. The role of the complex USP1/WDR48 in differentiation and proliferation processes in cancer stem cells. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 12, n. 00, p. 1-7, 2017.

13. GONÇALVES, J. M.; SILVA, C. A. B.; RIVERO, E. R. C.; CORDEIRO, M. M. R. Inhibition of Cancer Stem Cells Promoted by Pimozide. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 2018. DOI:10.1111/1440-1681.13049
14. GOTTESMAN, M. M. Mechanisms of cancer Drug Resistance. **Annu. Rev. Med.**, v. 53, p. 615–627, 2002.
15. HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, p. 57–70, 2000.
16. Instituto Nacional de Câncer. **Carcinoma Epidermoide da Cabeça e Pescoço**. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/rbc/n_47/v04/pdf/normas.pdf> Acesso em: 07 de set de 2018, Dezenove horas: quarenta e sete minutos.
17. LASORELLA, A. *et al.* Degradation of Id2 by the anaphase-promoting complex couples cell cycle exit and axonal growth. **Nature**, v. 442, n. 7101, p. 471–4, 27 jul. 2006.
18. LEE, J. K. *et al.* USP1 targeting impedes GBM growth by inhibiting stem cell maintenance and radioresistance. **Neuro-Oncology**, v. 0, p. 1-11, 2015.
19. LIANG, Q. *et al.* A selective USP1-UAF1 inhibitor links deubiquitination to DNA damage responses. **Nature chemical biology**, v. 10, n. 4, p. 298–304, 2014.

20. MAPES, J. *et al.* Aberrantly high expression of the CUB and zona pellucida-like domain-containing protein 1 (CUZD1) in mammary epithelium leads to breast tumorigenesis. **J Biol Chem.**, v. 293, n. 8, p. 2850-2864, 2018.
21. MISTRY, H. *et al.* Small molecule inhibitors of USP1 target ID1 degradation in leukemic cells. **Mol Cancer Ther.**, v. 12, n. 12, p. 2651-62, 2013.
22. MOHANTY, S. K. *et al.* STAT3 and STAT5A are potential therapeutic targets in castration-resistant prostate cancer. **Oncotarget.**, v. 8, n. 49, p. 85997-86010, 2017.
23. NELSON, E. A. *et al.* The STAT5 inhibitor pimozide displays efficacy in models of acute myelogenous leukemia driven by FLT3 mutations. **Genes & Cancer**, v. 3, n. 7–8, p. 503-11, 2012.
24. NISHIMINE, M. *et al.* Id proteins are overexpressed in human oral squamous cell carcinomas. **Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology**, v. 32, n. 6, p. 350–7, jul. 2003.
25. PHARMACEUTICALS, G. Leaflet, ORAP® (Pimozide) Tablets. p. 1–15, 2008.

26. REYA, T. *et al.* Stem cells, cancer, and cancer stem cells. **Nature**, v. 414, n. 6859, p. 105–11, 1 nov. 2001.
27. SAURY, C. *et al.* Human serum and platelet lysate are appropriate ceno-free alternatives for clinical-grade production of human MuStem cell batches. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 9, n. 128, 2018.
28. SIMPSON, H. M. *et al.* STAT5 inhibition induces TRAIL / DR4 dependent apoptosis in peripheral T-cell lymphoma. **Oncotarget.**, v. 9, n. 24, p. 16792-16806, 2018.
29. STEWART, B. W., WILD, C. P. **World Cancer Report**. Lyon: World Health Organization, 2014.
30. STROBL, J. S. *et al.* Inhibition of human breast-cancer cell-proliferation in tissue-culture by the neuroleptic agents pimozide and thioridazine. **Cancer Research**, v. 50, p. 5399-5405, 1990.
31. STROBL, J. S.; PETERSON, V. A. Tamoxifen-resistant human breast cancer cell growth: inhibition by thioridazine, pimozide and the calmodulin antagonist, W-13. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 263, n. 1, p. 186-93, 1992.
32. TAUB, R., BAKER, M. Treatment of metastatic malignant melanoma with pimozide. **The Lancet**, v. 17, p. 605, 1979.

33. UICC. Locally advanced squamous carcinoma of the head and neck. **Review of Cancer Medicines on the WHO List of Essential Medicines**, p. 1–8, 2014.
34. WILLIAMS, S. A *et al.* USP1 deubiquitinates ID proteins to preserve a mesenchymal stem cell program in osteosarcoma. **Cell**, v. 146, n. 6, p. 918–30, 16 set. 2011.
35. WIKLUND, E. D. *et al.* Cytotoxic effects of antipsychotic drugs implicate cholesterol homeostasis as a novel chemotherapeutic target. **Int J Cancer.**, v. 126, n. 1, p. 28-40, 2010.
36. World Health Organization. **Cancer**: Key facts. Disponível em:< <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.> Acesso em: 14 de nov de 2017, Dezenove horas: trinta e cinco minutos.
37. ZHAO, J. *et al.* Correlation between the expression of Id-1 and hyperthermia-associated molecules in oral squamous cell carcinoma. **Journal of clinical pathology**, v. 66, n. 9, p. 758–63, set. 2013.
38. ZHOU, W. *et al.* The antipsychotic drug pimozide inhibits cell growth in prostate cancer through suppression of STAT3 activation. **International Journal of Oncology**, v. 48, p. 322-28, 2016.

**ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com
Seres Humanos da UFSC**

Assunto:	Re: Fwd: RES: Consulta - CEPESH/UFSC
De:	Jussara Maria Gonçalves (jussaramariagoncalves@yahoo.com.br)
Para:	filipedaniel06@gmail.com;
Data:	Segunda-feira, 8 de Maio de 2017 9:08

Bom dia, professor.

Muito obrigada pela ajuda!

Att,

Jussara

Em Sexta-feira, 5 de Maio de 2017 8:05, Filipe Daniel
<filipedaniel06@gmail.com> escreveu:

Bom dia,

segue a resposta da CONEP. Sugiro que guardes esse email.

Att,
Prof. Filipe.

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências da Saúde / Departamento de Patologia
Campus Universitário - Trindade - Florianópolis - SC/ Brasil
88040-900
+55 48 37213483
+55 48 37219473

----- Mensagem encaminhada -----

De: **CEPSH-UFSC** <cep.propesq@contato.ufsc.br>

Data: 4 de maio de 2017 15:31

Assunto: Fwd: RES: Consulta - CEPSH/UFSC

Para: Filipe CCS <filipe.daniel@ufsc.br>

Boa tarde, Filipe!

Depois de muita insistência, segue abaixo a resposta da CONEP.

Atenciosamente,

Angélica Puskás

----- Mensagem original -----

Assunto:RES: Consulta - CEP SH/UFSC

Data:04.05.2017 15:26

De: CONEP - COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM
PESQUISA <conep@saude.gov.br>

Para: CEP SH-UFSC <cep.propesq@contato.ufsc.br>

Prezados,

Pedimos desculpas pela demora.

A sua demanda foi encaminhada para a coordenação da CONEP que argumentou pela não responsabilidade do Sistema CEP/CONEP na análise desse tipo de pesquisa.

Atenciosamente,

Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP/CNS/MS

Tel.: (61) 3315-5879

Fax.: (61) 3315-5878

- Para suas respostas utilize sempre o endereço de correio conep@saude.gov.br. Nunca responda para o correioconep.respostas@saude.gov.br, pois suas mensagens serão redirecionadas e excluídas.

De: CEPESH-UFSC [mailto:cep.propesq@contato.ufsc.br]

Enviada em: quarta-feira, 3 de maio de 2017 11:49

Para: CONEP - COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

Assunto: Re: Consulta - CEPESH/UFSC

Prezados [Senhores!](#)

Encaminhamos este e-mail há quase 1 mês e não obtivemos resposta. Aguardamos as orientações acerca do assunto.

Atenciosamente,

Angélica Puskás

Em 10.04.2017 13:38, CEPESH-UFSC escreveu:

Prezados senhores!

Gostaríamos de saber se já há alguma resposta para o e-mail abaixo.

Atenciosamente,

Angélica Puskás

Em 06.04.2017 09:34, CEPESH-UFSC escreveu:

Prezados Senhores!

Recebemos um questionamento sobre a necessidade de submeter um projeto em que trabalharão com cultura de células de linhagens celulares comercializadas com esse fim. Este projeto deve ser submetido à análise do CEPESH?

Atenciosamente,

Angélica Puskás

CEPSH-UFSC

--

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

Universidade Federal de Santa Catarina

<http://cep.ufsc.br>

(48) 3721-6094

--

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

Universidade Federal de Santa Catarina

<http://cep.ufsc.br>

(48) 3721-6094

--

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

Universidade Federal de Santa Catarina

<http://cep.ufsc.br>

(48) 3721-6094

Esta mensagem pode conter informação confidencial e/ou privilegiada. Se você não for o destinatário ou a pessoa autorizada a receber esta mensagem, não pode usar, copiar ou divulgar as informações nela contidas ou tomar qualquer ação baseada nessas

informações. Se você recebeu esta mensagem por engano, por favor avise imediatamente o remetente, respondendo o e-mail e em seguida apague-o.

--

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

Universidade Federal de Santa Catarina

<http://cep.ufsc.br>

(48) 3721-6094

ANEXO B – Ata de Apresentação do Trabalho de Conclusão de Curso



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE ODONTOLOGIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE ODONTOLOGIA

ATA DE APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Ao 1º dia do mês de Outubro de 2018, às 09:00 horas, em sessão pública no Auditório da Graduação do CCS desta Universidade, na presença da Banca Examinadora presidida pela Profa. Dra. Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro e pelos examinadores:

- 1 - Profa. Dra. Carolina Amália Barcellos Silva,
- 2 - Prof. Dr. Felipe Perozzo Daltoé,

A aluna Júlia Pertschy apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação intitulado: Avaliação do Efeito Dose-Resposta do Inibidor Seletivo Pimozida Sobre Células de Carcinoma Epidermoide Bucal Humano como requisito curricular indispensável à aprovação na Disciplina de Defesa do TCC e a integralização do Curso de Graduação em Odontologia. A Banca Examinadora, após reunião em sessão reservada, deliberou e decidiu pela aprovação do referido Trabalho de Conclusão do Curso, divulgando o resultado formalmente ao aluno e aos demais presentes, e eu, na qualidade de presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais componentes da Banca Examinadora e pelo aluno orientando.

Profa. Dra. Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro

Profa. Dra. Carolina Amália Barcellos Silva

Prof. Dr. Felipe Perozzo Daltoé

Júlia Pertschy