

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LUDMILA MADEIRA CARDOSO PAVAN

EFEITOS *IN VITRO* DAS ESTATINAS EM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO.

BRASÍLIA

2015

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LUDMILA MADEIRA CARDOSO PAVAN

EFEITOS *IN VITRO* DAS ESTATINAS EM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO.

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Eliete Neves da Silva Guerra.

BRASÍLIA

2015

LUDMILA MADEIRA CARDOSO PAVAN

EFEITOS *IN VITRO* DAS ESTATINAS EM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO.

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovada em: 17 de agosto de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Eliete Neves da Silva Guerra (FCS/UnB)
(Presidente)

Profa. Dra. Graziela de Luca Canto (UFSC)
(Membro Efetivo)

Profa. Dra. Angélica Amorim Amato (FCS/UnB)
(Membro Efetivo)

Prof. Dr. Paulo Tadeu Souza Figueiredo (FCS/UnB)
(Membro Suplente)

Dedico este trabalho ao meu marido pelo amor que tem por mim. E por todo o seu cuidado. Sem você todas as minhas conquistas seriam impossíveis. Obrigada por todo o apoio nesses últimos anos e pelo nosso anjinho em forma de bebê. Te amo!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida. A Ti ofereço todos os dias o meu respirar e o meu ser. Obrigada por me proporcionar realizações de sonhos. Obrigada por Sua graça em minha vida.

Minha princesa Manuela obrigada por me ensinar a ser uma pessoa melhor e por me fazer sentir tão amada. Minha filha, minha vida só vale a pena porque você faz parte dela.

Aos meus pais Edmir e Suely por acreditarem em mim, mesmo quando eu mesmo não acreditei. Obrigada pelo incentivo e pelo amor que me dedicam.

Aos meus irmãos Aline, Maria Vitória e Gabriel. Aline pela cumplicidade e amizade de todos os dias. Mavi e Gabriel pelo amor que me demonstram, pelos sorrisos e carinho.

À Professora Dra. Eliete Neves da Silva Guerra pela confiança que depositou em mim. Por me incentivar em todas as vezes que tropecei. Pelo carinho e dedicação com que faz o seu trabalho. E pela orientadora exemplar que é. Obrigada por tudo e por ser parte da realização desse sonho.

À Professora Dra. Graziela de Luca Canto pelos seus ensinamentos e pela prontidão de sempre. Nossa revisão sistemática só foi possível porque temos a senhora como mentora.

Ao Professor Paulo Tadeu, por me inserir nas clínicas no CACON e pelo aprendizado do dia a dia.

À Dra. Silvia Taveira Elias, obrigada pela sua paciência e por sua dedicação. Obrigada pelos auxílios com experimentos e artigo e por todo o seu incentivo.

Aos colegas do laboratório de Histologia Bucal, pelo companheirismo e amizade de todos os dias. Pelas risadas e trocas de experiência. Pela equipe que formam e por me integrarem com tanto carinho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento proporcionado a minha pesquisa laboratorial.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PGCS) da Faculdade de Ciências da Saúde (FCS) da Universidade de Brasília (UnB).

Ao Decanato de Pesquisa e Pós-Graduação (DPP) pelo apoio e financiamento destinado ao meu trabalho e publicação desta revisão sistemática na Revista *Plos One*.

Ao colega Gabriel Álvares Borges, o anjo Gabriel. Sempre pronto e solícito a me ajudar. Obrigada por caminhar comigo, pelas noites não dormidas da disciplina de Farmacologia e pela ajuda de sempre.

À Daniela Rêgo Fortunato pelos fins de semana no laboratório e por ter quebrado a cabeça comigo para as nossas revisões sistemáticas saírem. Obrigada pela sua amizade.

À Daniela Xavier Assad pela sua amizade infinita. Muito obrigada por me ouvir, por me ajudar sempre, pelas risadas, pela parceria nas lavagens da salinha e por me entender em todos os momentos. Levarei sua amizade sempre no meu coração.

Ao meu marido, Carlos Eduardo, meu grande amor, pelo apoio e incentivo diário e pelo amor que me concede.

“O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes.”

Cora Coralina

RESUMO

As estatinas são comumente utilizadas para tratar doenças cardiovasculares, porém estudos mais recentes destacaram seus potenciais efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos nas células neoplásicas. Assim, o objetivo desta revisão sistemática foi verificar os efeitos antitumorais *in vitro* das estatinas nos carcinomas de cabeça e pescoço. Uma busca criteriosa foi realizada nas bases de dados Cochrane, MEDLINE, EMBASE, LILACS, e PUBMED, em 30 de junho de 2014 e atualizada em 09 de maio de 2015. Nenhuma restrição de idioma ou período foi utilizada. Para elaboração e planejamento desta revisão sistemática foi utilizada uma lista de verificação, o PRISMA *checklist*. Somente artigos que utilizaram as estatinas para tratamento de carcinoma de cabeça e pescoço (HNSCC) foram incluídos. Os critérios de exclusão consideraram: (1) Artigos que não verificaram associação entre as estatinas e este tipo de câncer; (2) revisões de literatura, cartas, relatos de casos clínicos, resumos, opiniões pessoais, resumos em conferências, cartas ao editor, teses e capítulos de livro; (3) estudos clínicos. Assim, foram selecionados somente estudos *in vitro* que discutiram os efeitos da estatinas no carcinoma de cabeça e pescoço, já que foi encontrado somente um estudo clínico após levantamento bibliográfico. Dos 153 artigos selecionados, 14 deles se enquadraram nos critérios de inclusão e exclusão. Para análise da qualidade de evidências dos estudos incluídos o método GRADE foi utilizado. Seis estudos foram classificados com qualidade de evidência moderada e os outros oito considerados de alta qualidade. Os estudos incluídos demonstraram que as estatinas têm um significativo efeito em carcinomas de cabeça e pescoço e pode influenciar a viabilidade celular, ciclo celular, morte celular, além de regular os níveis de expressão das proteínas que participam das vias da carcinogênese. Estes achados indicam que as estatinas são medicamentos promissores se utilizadas sozinha ou associadas a outros quimioterápicos tradicionais. Mesmo com poucos estudos disponíveis, as evidências encontradas sugerem que as estatinas demonstram ser potenciais agentes coadjuvantes aos tratamentos tradicionais utilizados para o carcinoma de cabeça e pescoço. Porém pesquisas clínicas são necessárias para confirmar estes resultados *in vitro*.

Palavras-chave: Carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. Estatinas. Revisão sistemática.

ABSTRACT

Statins are commonly used against arteriosclerotic disease, but recent retrospective analyses have suggested that statins also prevent cancer. The aim of this systematic review is to verify the *in vitro* anti-tumor effects of statins on head and neck squamous cell carcinoma. Studies were gathered by searching Cochrane, MEDLINE, EMBASE, LILACS, and PubMed, up until June, 30, 2014 and uploaded until May 9, 2015, with no time or language restrictions. The Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis (PRISMA) Checklist was followed in this systematic review. We have excluded studies: 1) Articles with different target condition, such as studies that did not verify the association between statin and HNSCC; 2) Reviews of the literature, letters, personal opinions and conference abstracts; 3) Clinical Trial. Therefore, only *in vitro* studies that discuss the effect of statins on head and neck carcinoma were selected, because only one clinical Trial study was found. Of 153 identified papers, 14 studies met the inclusion criteria. The GRADE method was used to analyze the quality of evidence of the studies included. Six studies were classified as moderate and eight as high quality of evidence. These studies demonstrated that statins had a significant effect on head and neck squamous cell carcinoma cell lines and influenced cell viability, cell cycle, cell death, and protein expression levels involved in pathways of carcinogenesis, which corroborates with the potential *in vitro* anti-tumor effects. It provides highlights about the biological mechanisms of statins used alone or associated with traditional therapy for cancer. Though there are few studies on the topic, currently available evidence suggests that statins shows that preclinical experiments supports the potentiality of statin as an adjuvant agent in chemotherapy and/or radiotherapy approaches routinely used in the management of HNSCC and should undergo further clinical assessment.

Keywords: Evidence-based medicine. Head and neck. Statin. Squamous cell carcinoma. Systematic review.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química das estatinas.....	21
Figura 2 – Via do Mevalonato.....	22
Figura 3 – Mecanismos antitumorais propostos pelo uso de inibidores.....	25
Figura 4 – Via PI3K/AKT/mTOR.....	28
Figura 5 – Fluxograma.....	39

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Critérios de inclusão e exclusão com base na estratégia PICOS.....	32
Quadro 2 -	Estratégias de buscas.....	34
Quadro 3 -	Critérios para o método GRADE.....	36
Quadro 4 -	Avaliações padrões para estudos básicos <i>in animal</i> e <i>in vitro</i>	36
Quadro 5 -	Resumo das características descritivas dos artigos inclusos (n=14).....	41
Quadro 6 -	Intervenções utilizadas para testar a viabilidade celular de HNSCC.....	44
Quadro 7 -	Qualidade de evidência das intervenções.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{mol/L}$	- Micromolar por Litro
293T	- Células Embrionárias de Rim
5-FU	- Fluorouracil
A549	- Células de Carcinoma de Pulmão
AKT	- Proteína Quinase/Serina Treonina
AMPK	- Adenosina Monofosfato Ativada por Proteína Quinase
C15	- Células de Carcinoma de Nasofaringe
C17	- Células de Carcinoma de Nasofaringe
CAL27	- Células de Carcinoma Escamoso Oral
CC	- Carcinoma de Colo de Útero
CCL-30	- Células de Carcinoma de Nasofaringe
CDC	- Centro de Controle de Doenças
CDK2	- Ciclina Quinase dependente 2
CDK4	- Ciclina Quinase dependente 4
CDK6	- Ciclina Quinase dependente 6
CNPq	- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Cos-7	- Células de Rins de Macaco
DeCS	- Descritores em Ciências da Saúde
DMSO	- Dimethyl Sulfoxide
DPP	- Decanato de Pesquisa e Pós-Graduação
EGF	- Fator de Crescimento Epidérmico
EGFR	- Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
E.N.S.G.	- Eliete Neves da Silva Guerra
ERK 1/2	- Quinases Reguladas por Sinais Extracelulares
FaDu	- Carcinoma Escamoso de Faringe
Fase S	- Período entre G1 e G2
G0	- Fase G0 - a célula permanece em repouso (intérfase)
G1	- Fase G1 – Período no ciclo celular durante a interfase, após citocinese e antes da Fase S

GGPP	- Pirofosfato de geranyl
GM-38	- Fibroblastos de Pulmão
GRADE	- <i>Grading of Recommendations, Assessment, Development and Evaluation</i>
GTP-	- Guanosina-5' Trifosfato
Gy	- Gray
HeLa	- Células de Carcinoma Cervical
HMG-CoA	- 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA
HMG-CoA <i>reductase</i>	- 3-hydroxy-3-methylglutaryl reductase A
HNSCC	- Carcinoma Espinocelular de Cabeça e Pescoço
HPV	- Papilomavirus humano
INCA	- Instituto Nacional do Câncer
JMAR	- Células Escamosas de Carcinoma de Assoalho de Boca
L.M.C.P	- Ludmila Madeira Cardoso Pavan
LDLS	- Lipoproteínas de Baixa Densidade
LKB1	- Proteína Quinase B1
MEFs	- Fibroblastos de Camundongos
mRNA	- RNA Mensageiro
mTOR	- <i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
MTT	- brometo de 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-il)-2,5-difenil) tetrazólio)
NPC	- Células de Carcinoma de Nasofaringe
P13K	- Phosphoinositide 3-Kinase
p21	- Proteína Supressora de Tumor
p27	- Proteína Supressora de Tumor
p53	- Proteína Supressora de Tumor
PDK1	- 3- fosfatotidilinositol- 4, 5- bifosfato 3 – quinase
PGCS	- Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

PRISMA	-	<i>Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis</i>
PROSPERO	-	<i>International Prospective Register of Systematic Reviews</i>
Rab	-	Proteína Pertencente a Família das GTPs
Rac	-	Proteína Pertencente a Família das GTPs
Ras	-	Proteína Pertencente a Família das GTPs
RCT	-	Estudos Randomizados
Rho	-	Proteína Pertencente a Família das GTPs
RT PCR	-	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
S.T.E.	-	Silvia Taveira Elias
SCC 4	-	Célula do Epitélio Oral
SCC15	-	Célula do Epitélio Oral
SCC25	-	Células de Carcinoma Escamoso de Língua
SCC9	-	Células de Carcinoma Escamoso de Língua
SIHA	-	Células de Carcinoma Cervical
STAT3	-	Transdutor e Ativador de Transcrição 3
tRNAs	-	RNA Transportador
Tu167	-	Células Escamosas de Carcinoma de Assoalho de Boca
U87MG	-	Célula de Glioblastoma
UM-SCC-1	-	Célula de Carcinoma de Células Escamosas Derivada de Assoalho de Boca
UM-SCC-47	-	Célula de Carcinoma de Células Escamosas Derivada de Assoalho de Língua
UnB	-	Universidade de Brasília

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 ESTATINAS	19
2.1.1 Histórico e mecanismo de ação	19
2.3 CARCINOMA ESPINOCELULAR DE CABEÇA E PESCOÇO	26
2.4 ESTATINAS E CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO	28
3 OBJETIVOS.....	30
3.1 GERAL	30
3.2 ESPECÍFICOS.....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 PROTOCOLO E REGISTRO.....	31
4.2 CRITÉRIO DE ELIGIBILIDADE	31
4.2.1 Critério de inclusão e exclusão.....	31
4.3 FONTE DE INFORMAÇÕES E ESTRATÉGIAS DE BUSCA.....	32
4.3.1 Cochrane	32
4.3.2 Medline.....	33
4.3.3 Lilacs	33
4.3.4 PubMed.....	33
4.3.5 Embase.....	33
4.4 SELEÇÃO DOS ESTUDOS	34
4.5 PROCESSO DE COLETA DE DADOS	34
4.6 RISCO DE VIÉS	35
4.7 MEDIDAS DE SUMARIZAÇÃO	37
4.8 SÍNTESE DOS RESULTADOS	37
4.9 RISCO DE VIÉS ENTRE OS ESTUDOS	37
5 RESULTADOS.....	38
5.1 SELEÇÃO DOS ESTUDOS	38
5.2 CARACTERÍSTICAS DOS ESTUDOS	38
5.3 RISCO DE VIÉS	45
5.4.1 Viabilidade celular.....	47
5.4.2 Ciclo celular e apoptose.....	48
5.4.3 Regulação da expressão de proteínas	48
5.5 RISCO DE VIÉS ENTRE OS ESTUDOS	50
6 DISCUSSÃO.....	51
6.1 LIMITAÇÕES.....	55
7 CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS.....	57

ANEXOS	62
ANEXO “B” – E-mail PROSPERO	64
APÊNDICES.....	65
APÊNDICE “A” – Artigos Excluídos e Razões de Exclusão (n=4)	65
APÊNDICE “B” – Artigo Científico Publicado.....	66

1 INTRODUÇÃO

A busca por tratamentos oncológicos com maior seletividade celular e menores efeitos adversos fundamentam diversas pesquisas com o objetivo de alcançar novas alternativas terapêuticas (FREUDLSPERGER *et al.*, 2011). A inibição do crescimento tumoral e do aparecimento de metástases têm sido alvo de novas abordagens de pesquisadores que centralizam seus esforços no estudo de moléculas específicas ou nas vias de transdução de sinais, principalmente as envolvidas no processo de indução de apoptose (KUNDU *et al.*, 2012). Desta forma, pesquisas recentes apontam que o emprego de medicações utilizadas para tratar distúrbios sistêmicos específicos pode proporcionar a inibição de algumas vias de indução tumoral (KUNDU *et al.*, 2012).

As estatinas são drogas que possuem efeitos terapêuticos e preventivos no tratamento das doenças cardiovasculares ateroscleróticas (ENDO, 2010). Estes fármacos são inibidores da enzima HMG-CoA *redutase*, que é responsável pela síntese do colesterol nas células. E possuem o potencial de reduzir os níveis de lipídios e colesterol no sangue, aumentando significativamente a sobrevida dos pacientes que os utilizam (ENDO, 1992; BUCHWALD, 1992; CHAN *et al.*, 2003; WONG *et al.*, 2002). O tratamento com estatinas pode bloquear o crescimento, a invasão e a formação de metástases pelas células tumorais, o que resulta em inibição dos efeitos antiproliferativos dessas células (NIKNEJAD *et al.*, 2007; NIELSEN *et al.*, 2012). O potencial efeito das estatinas na indução da morte celular em diferentes tipos de câncer, inclusive HNSCC (DIMITROULAKOS *et al.*, 2002; KNOX *et al.*, 2005).

As estatinas demonstraram habilidade de atingir diversas vias de indução tumoral, mediadas por estresses metabólicos, que regulam a apoptose de células tumorais. Ao inibir a via do mevalonato, as estatinas podem inibir a função dos receptores de fator de crescimento epidérmico (EGFR) que por sua vez podem inibir a cascata da via P13K/AKT (phosphoinositide 3-kinase) e a via do mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*) (MANTHA *et al.*, 2005; MA *et al.*, 2012). Além disso, esses medicamentos regulam a tradução do mRNA de genes que codificam a proteínas pró-oncogênicas, ocasionando assim a inibição da proliferação e sobrevivência de células malignas (ALTMAN *et al.*, 2010).

O carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (HNSCC) é o sexto tipo de câncer mais comum no mundo e a incidência de novos casos têm apresentado aumento considerável a cada ano. Os riscos de desenvolvimento deste tipo de câncer aumentam com a idade, sendo que a maioria dos casos ocorre em pessoas com 50 anos de idade ou mais. Em muitos países, a sobrevida dos pacientes com carcinoma de língua, cavidade oral e orofaringe está em torno

de 50% em 5 anos. Porém muitos pacientes que obtêm sucesso em seu tratamento são impelidos a conviver com as consequências drásticas de seus tratamentos (WARNAKULASURIYA, 2009). Sendo assim, o uso de medicamentos com o intuito de quimioprevenção, para controlar a progressão da doença é extremamente promissor (BLAIS; DESGAGNE; LELORIER, 2000; GRAAF M. *et al.*, 2004). Muitos estudos têm demonstrado que as estatinas têm um papel significativamente importante na prevenção do câncer (BUCHWALD, 1992; DIMITROULAKOS *et al.*, 2002; KNOX *et al.*, 2005; MANTHA *et al.*, 2005; MA *et al.*, 2012; ISLAM *et al.*, 2013; NIKNEJAD *et al.*, 2014).

Em busca de evidências científicas que possam confirmar o potencial terapêutico das estatinas no carcinoma de cabeça e pescoço, o objetivo do presente trabalho é realizar um estudo de revisão sistemática para verificar na literatura vigente quais os efeitos das estatinas nas células de HNSCC.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESTATINAS

2.1.1 Histórico e mecanismo de ação

O colesterol é parte essencial para o organismo e participa dos seguintes processos: (1) manutenção da integridade das membranas celulares; (2) regulação do ambiente celular interno (BLAU; BITTMAN, 1978); (3) produção de hormônios esteroides e (4) formação de ácidos biliares (BROWN; GOLDSTEIN, 1990). A maior parte deste colesterol é encontrada na membrana celular externa e é distribuído de forma simétrica entre o interior e o exterior da bicamada lipídica (BLAU; BITTMAN, 1978). Nas células, o colesterol está ativamente envolvido na organização e no funcionamento do retículo endoplasmático, local em que o colesterol é sintetizado (REINHART *et al.*, 1987). Muito embora o colesterol tenha papel fundamental nos processos celulares, a hipercolesterolemia está relacionada ao aumento do risco de doenças cardiovasculares (GRUNDY, 1988; THE SCANDINAVAM STATIN SURVIVAL STUDY GROUP, 2004; BAINGENT *et al.*, 2005). Os riscos de doença cardiovascular coronariana aumentam progressivamente com o aumento dos níveis de colesterol, particularmente acima de 200 mg/dL (ENDO, 1992).

A hipercolesterolemia e suas consequências podem ser inibidas pela conversão de HMG-CoA (3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA) em mevalonato, que ocorre por intermédio da enzima HMG-CoA *reductase*. Os inibidores de HMG-CoA *reductase* são uma classe de medicamentos que limitam os produtos da via do mevalonato que são essenciais para a síntese de vários compostos, incluindo o colesterol (GRUNDY, 1988). A descoberta do primeiro inibidor de HMG-CoA *reductase* ocorreu em 1976 (ENDO, 1976), este composto identificado como mevastatina, foi isolado de um fungo: o *Penicillium citrinium*. Seus resultados eram promissores, mas este medicamento demonstrou toxicidade elevada em estudos com animais (ENDO, 1992). A partir deste composto, Alberts *et al.* (1980) isolaram o fungo *Aspergillus terreus* que deu origem a lovastatina, que se diferencia da mevastatina por ser um inibidor mais potente da enzima HMG-CoA *reductase* e por não provocar efeitos citotóxicos *in vitro*. A lovastatina foi o primeiro composto a ter uso aprovado em humanos (GRUNDY, 1988). As estatinas são os fármacos mais utilizados em todo o mundo devido a sua eficácia comprovada para tratamento da hipercolesterolemia (BAINGENT *et al.*, 2005), e os seus baixos índices de efeitos colaterais (GRUNDY, 1988).

A família das estatinas é constituída por oito compostos naturais ou quimicamente sintetizados (CORSINI; MAGGI; CATAPANO, 1995). A Pravastatina, Sinvastatina e Lovastatina são derivadas de fungos (ENDO, 1992), enquanto a Fluvastatina, Atorvastatina, Cerivastatina, Rosuvastatina e Pitavastatina são compostos sintéticos (CORSINI; MAGGI; CATAPANO, 1995; ENDO, 2010). As características estruturais comuns às estatinas são divididas em três partes: um análogo do substrato da enzima HMG- CoA *redutase*; um complexo anel hidrofóbico, ligado por uma ligação covalente ao análogo substrato e que auxilia na ligação à enzima HMG-CoA *redutase* e cadeias laterais ao anéis que definem as propriedades de solubilidade das drogas e muitas de suas propriedades farmacocinéticas (DEISENHOFER; ISTVAN, 2001; SCHACHTER, 2004). As estatinas agem através de ligações à parte ativa da enzima HMG-CoA *redutase*, por meio de uma ligação ao análogo de HMG-CoA, inibindo competitivamente e reversivelmente a ação desta enzima e a formação do mevalonato. A Fluvastatina é a primeira droga completamente sintética. A configuração em anel aberto desta droga permite o bloqueio do domínio catalítico da HMG-CoA, funcionando como um simulador molecular de uma reação intermediária no interior do sítio ativo dessa enzima (Figura 1) (CORSINI; MAGGI; CATAPANO, 1995, ENDO, 2010). Cada fármaco pertencente à família das estatinas funciona com um mecanismo de ação similar, entretanto, mantêm diferentes afinidades de ligação, propriedades farmacocinéticas e níveis das doses (WONG *et al.*, 2002).

As estatinas possuem o potencial de reduzir os níveis de lipídios e colesterol (LDL) no sangue, que resultam na prevenção primária e secundária da morbidade e mortalidade cardiovascular, aumentando assim significativamente a sobrevida dos pacientes que as utilizam (ENDO, 1992; BUCHWALD, 1992; CHAN; OZA; SIU, 2003; WONG *et al.*, 2002). Além de diminuir a produção de colesterol, as estatinas aumentam o número de receptores hepáticos do LDL, com consequente aumento da absorção e do catabolismo do LDL (BROWN; GOLDSTEIN, 1990; SCHACHTER, 2004).

HMG-CoA analogue

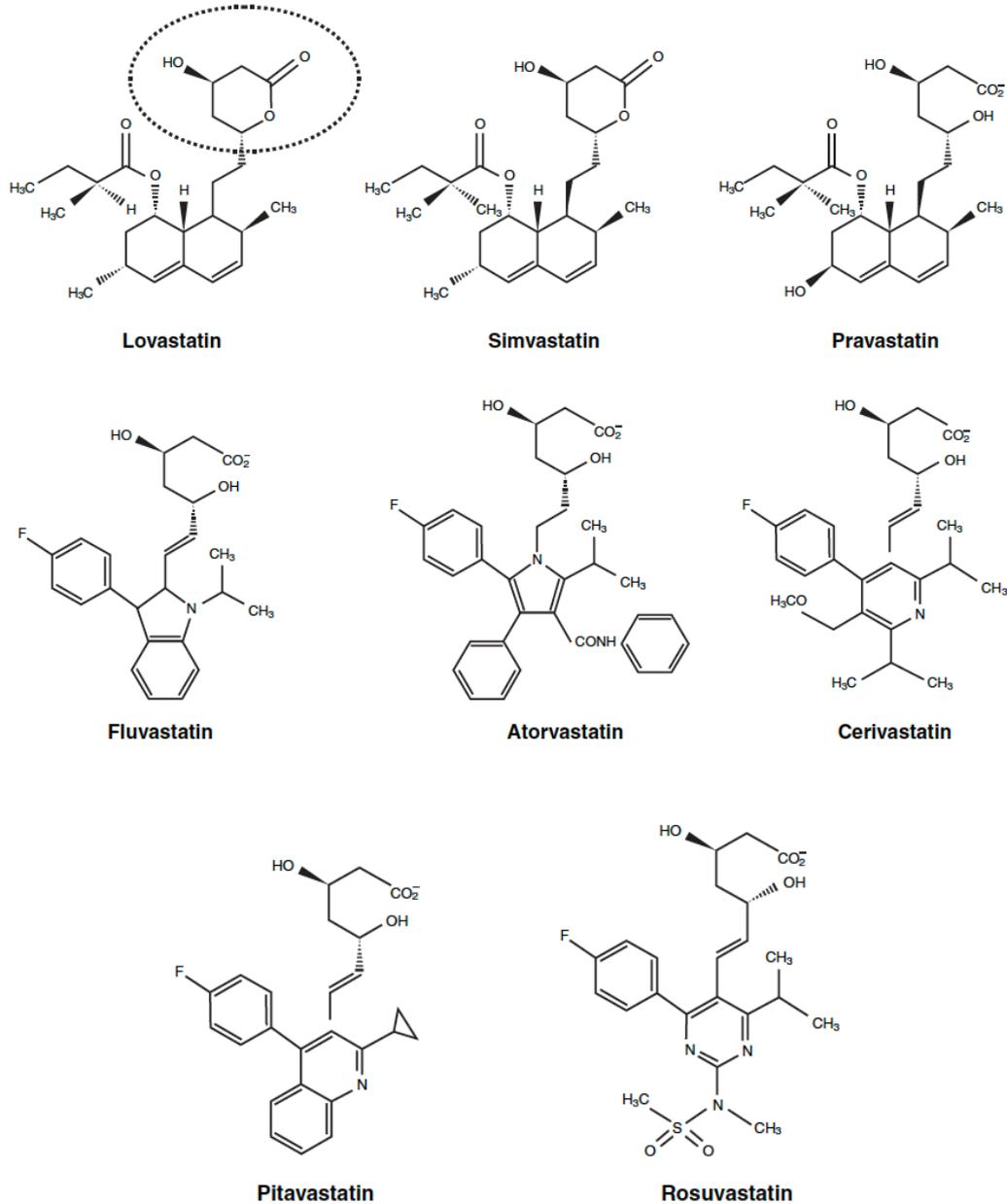


Figura 1 – Estrutura química das estatinas.

Fonte: Schachter (2005).

As drogas derivadas da estatina são potenciais inibidores da enzima HMG-CoA *reductase*, derivada da via do mevalonato (ENDO, 1992; BUCHWALD, 1992; CORSINI; MAGGI; CATAPANO, 1995). O bloqueio da via do mevalonato por inibidores de HMG-CoA *reductase* resulta em diminuição dos níveis de mevalonato e seus subprodutos com influência significativa em várias funções celulares (CHAN; OZA; SIU, 2003).

Os produtos finais desta via têm sua importância em diferentes funções celulares

(Figura 2). Estes produtos incluem o colesterol, dolicol, ubiquinona, isopenteniladenina, pirofosfato de geranil e pirofosfato de farnesil (GOLDSTEIN; BROWN, 1990; CHAN; OZA; SIU, 2003). O colesterol é essencial para a manutenção da integridade e estrutura da membrana celular. O dolicol age como um carreador de oligossacarídeos para a produção de glicoproteínas. A ubiquinona está envolvida na respiração mitocondrial. Isopenteniladenina é um substrato essencial para a modificação de certos tRNAs. O pirofosfato de geranil e de farnesil promovem a ativação de proteínas Ras e proteínas ligantes do GTP, como os membros das famílias Rab, Rac e Rho (CORSINI; MAGGI; CATAPANO; 1995; CHAN *et al.*, 2003; ISLAM *et al.*, 2013).

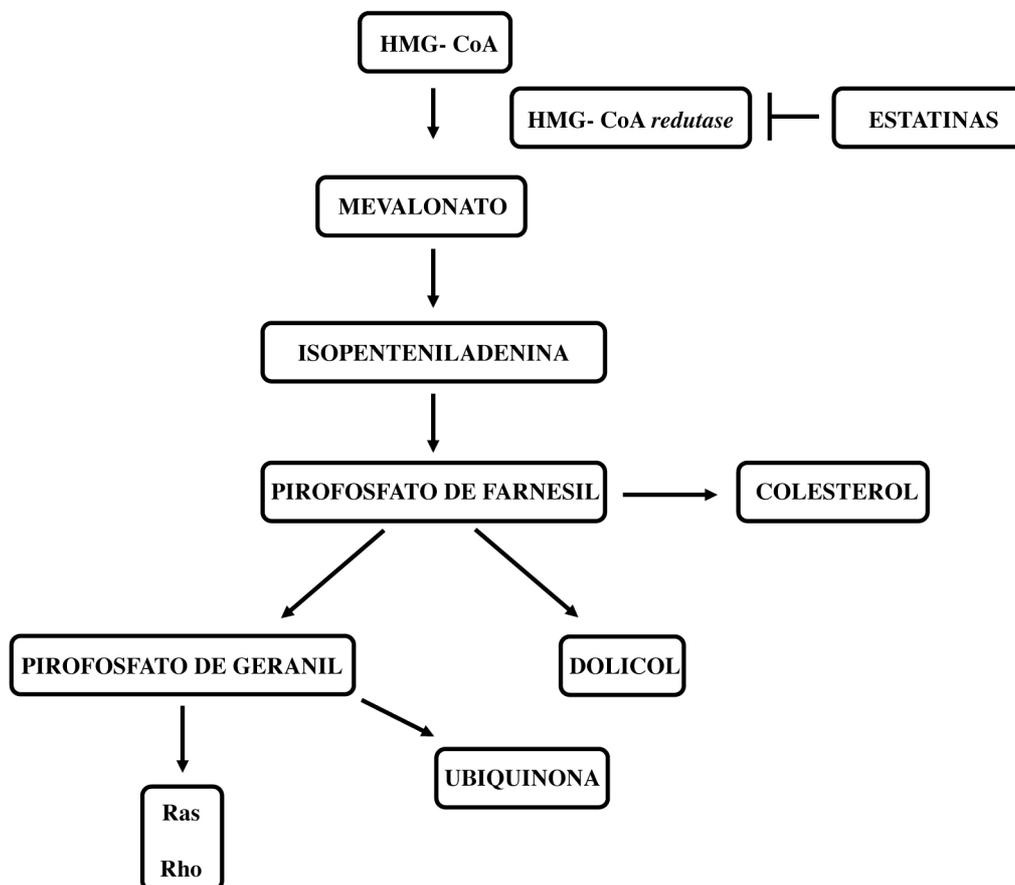


Figura 2 – Via do Mevalonato.

Fonte: Adaptado de Chan et al. (2003).

2.2 ESTATINAS E CÂNCER

Os quimioterápicos tradicionais promovem danos ao DNA celular, ao ciclo celular e apoptose das células tumorais (KAUFMANN; EARNSHAW, 2000). Este processo apoptótico é regulado em nível celular por múltiplas vias independentes e interdependentes. A desregulação da apoptose contribui para o desenvolvimento e crescimento tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2000). A aplicação clínica destes agentes é frequentemente limitada pela significativa toxicidade e falta de especificidade. Isto quer dizer que os quimioterápicos afetam também as células normais e acabam por prejudicar a qualidade de vida do paciente submetido ao tratamento (KAUFMANN; EARNSHAW, 2000).

O câncer ocorre devido ao acúmulo progressivo de modificações genéticas e epigenéticas que induzem as células normais a assumirem padrões extremamente específicos (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Estas células possuem a capacidade de controlar sua proliferação, diferenciação, sobrevivência e/ou apoptose, porém esses mecanismos celulares podem falhar, ocasionando uma transformação neoplásica dessas células (FISHER, 1994). As células tumorais se diferem das células normais por uma série de características como: a capacidade de produzir sinais de crescimento celular, a produção intensa de sinais anticrescimento para o tecido hospedeiro, a evasão dos sinais de morte celular programada e a capacidade ilimitada de proliferação, angiogênese, invasão tecidual e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2000). A apoptose, ou morte celular programada, é um processo celular altamente regulado que pode ocorrer em resposta a um dano celular ou pode ser ativado como resultado da proliferação ou diferenciação celular aberrante (FISHER, 1994). A expressão descontrolada de oncogenes e genes supressores tumorais e a mutação de genes envolvidos na via de apoptose celular acarretam uma instabilidade genômica que leva a tumorigênese (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Agentes quimioterápicos e a radiação são capazes de atingir essas alterações celulares, resultando na indução de uma resposta apoptótica (FISHER, 1994).

A maioria das mudanças genéticas observadas nas células envolve os genes que controlam a progressão da fase G1 do ciclo celular (KEYOMARSI *et al.*, 1991). Durante o curso do ciclo celular normal as células podem permanecer em repouso ou podem progredir para a fase S, o que implica em replicação do genoma e mitose. Os principais reguladores da progressão do ciclo celular são as ciclinas D e E, proteínas que interagem e ativam CDK4 ou CDK6 e CDK2, respectivamente. Estas ciclinas são suprimidas pelos genes p27 e p21 e

podem ser reguladas pela ativação das vias do mTOR, Ras-Raf-Mek e PI3K (FOSTER *et al.*, 2011).

Novas abordagens terapêuticas têm sido pesquisadas para desenvolver medicações seletivas e eficazes no tratamento do câncer. Com esta finalidade as estatinas vêm sendo estudadas, já que estudos comprovaram os seus efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos nas células de câncer (CHAN; OZA; SIU, 2005) e indicaram que o tratamento com este medicamento pode bloquear o crescimento tumoral, invasão celular e o surgimento de metástases, tanto em experimentos *in vitro* como *in vivo* (KUSAMA *et al.*, 2001).

Os inibidores de HMG-CoA *reductase* controlam a expressão de p21 e p27 (proteínas supressoras de tumor) bloqueando a transição das células tumorais da fase G1 para a fase S do ciclo celular (KEYOMARS *et al.*, 1991). Esses inibidores agem inativando a via do mevalonato e seus subprodutos. As células malignas parecem ser altamente dependentes dos produtos finais da via do mevalonato (BUCHWALD, 1992). Quando esta via é inativada ocorre uma regulação da apoptose das células tumorais (CORSINI; MAGGI; CATAPANO, 1995) e a desativação da proteína pirofosfato de geranyl, subproduto da via do mevalonato, que por sua vez inativam as proteínas Rho, que são responsáveis pelo controle, proliferação e migração celular. Desta forma o potencial de invasão e crescimento das células cancerígenas ficam reduzidos (ISLAM *et al.*, 2012).

A inativação da proteína Rho, por sua vez, pode desativar a AMPK, resultando em diminuição da invasão celular, e pode também regular os subprodutos das quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK1/2) e pelo transdutor e ativador de transcrição 3 (STAT3), que normalmente estão super expressos em muitas formas de metástases, incluindo as de HNSCC (ADACHI *et al.*, 2012). A via do mevalonato também é regulada pelo p53 (proteína supressora de tumor), que comumente se encontra super expresso nos casos de câncer (FEED-PASTOR WA, *et al.*, 2012) (Figura 3).

Alguns tipos de câncer como o carcinoma hepatocelular (KAWATA *et al.*, 1990), leucemia, linfoma (HARWOOD *et al.*, 1991), adenocarcinoma colorretal (CARUSO *et al.*, 1999) e pulmonar (BENNIS *et al.*, 1993) podem ocorrer quando a via do mevalonato encontra-se desregulada ou com atividade elevada da enzima HMG-CoA *reductase*. Com o objetivo de controlar estas alterações, as estatinas foram utilizadas em pacientes com câncer e ficou demonstrado que estes medicamentos podem reduzir a incidência desta doença em 28-33% dos casos (BLAIS; DESGAGNE; LELORIER, 2000).

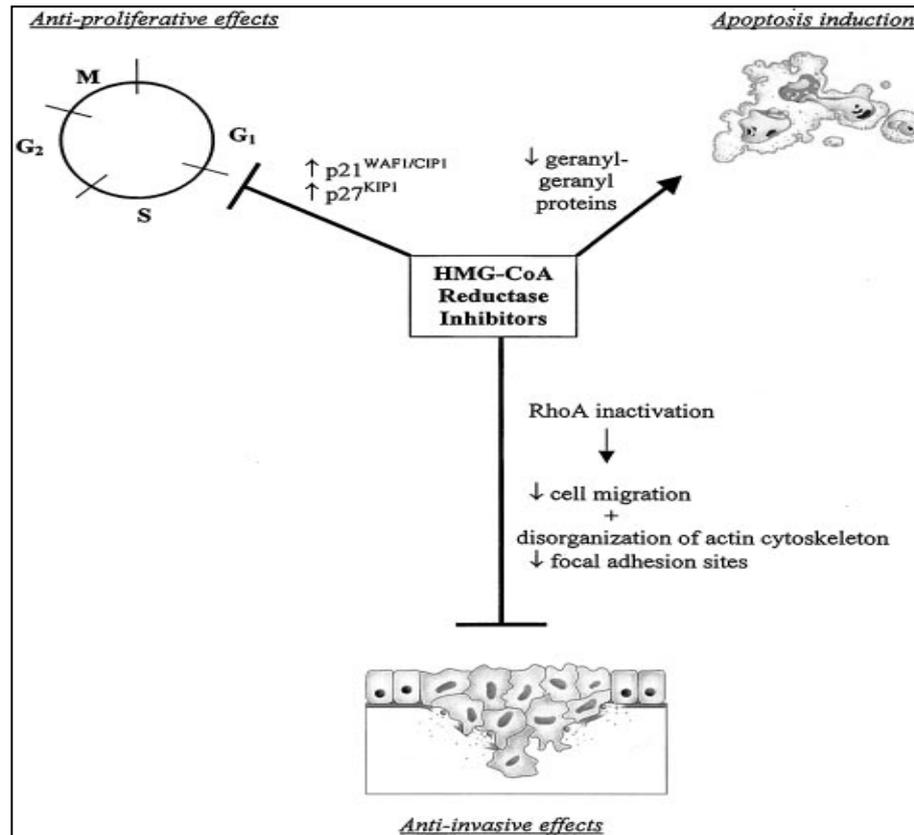


Figura 3 – Mecanismos antitumorais propostos pelo uso de inibidores de HMG-CoA redutase.

Fonte: Chan et al. (2003).

Buscando achados na literatura que pudessem elucidar a eficácia das estatinas em pacientes com câncer, Dale e colaboradores publicaram uma metanálise em que foram analisados vinte artigos que realizaram estudos clínicos randomizados em pacientes que faziam uso de estatinas e que já tinham algum tipo de câncer. Esse estudo revelou que as estatinas têm um efeito neutro sobre o câncer e sobre o risco de morte por câncer e descobriram que nenhum tipo de câncer foi influenciado quando os pacientes utilizaram a estatina, e que nenhum dos compostos deste fármaco quando utilizados afetaram o risco de câncer (colorretal, colo de útero, pulmão, próstata e mama) (DALE *et al.*, 2006). Em contra partida, Kuoppala, Lamminpaa e Pukkala (2008) analisaram dezessete estudos clínicos randomizados e vinte e cinco estudos observacionais para avaliar os efeitos das estatinas em pacientes adultos com câncer e relataram que não houve evidência clínica significativa de que as estatinas reduzem os efeitos de cânceres pulmonares, colorretal, de mama, gastrointestinal e de próstata. No entanto, em outro estudo de revisão sistemática os autores concluíram que as estatinas proporcionam a redução da incidência de câncer de pulmão e próstata (TAYLOR; WELLS; SMOLAK, 2008).

Em estudo realizado na Dinamarca em 2012, foi avaliada uma população de adultos com aproximadamente 40 anos de idade ou mais, que recebeu diagnóstico de câncer entre 1995 e 2007. Estes pacientes foram acompanhados até dezembro de 2009. Dentre esses, um grupo de pacientes usava a estatina regularmente antes de serem diagnosticados com câncer enquanto outro grupo nunca havia usado a estatina. Os autores concluíram que o grupo que foi diagnosticado com câncer e que utilizava a estatina corriqueiramente apresentou uma redução de mais de 15% de morte relacionada ao câncer (NIELSEN *et al.*, 2012).

Essas evidências sugerem que as estatinas possuem propriedades quimiopreventivas e indicam que estas podem controlar a carcinogênese e podem reduzir a incidência de diversos tipos de câncer (BLAIS; DESGAGNE; LELORIER, 2000; GRAAF *et al.*, 2004, DALE *et al.*, 2006; KUOPPALA; LAMMINPAA; PUKKALA, 2008; TAYLOR; WELLS, SMOLAK, 2008; ISLAM *et al.*, 2013).

2.3 CARCINOMA ESPINOCELULAR DE CABEÇA E PESCOÇO

O HNSCC é mundialmente considerado um problema de saúde pública. Este carcinoma abrange tumores da cavidade oral (lábio, rebordo alveolar, mucosa bucal, área retromolar, assoalho de boca e língua) faringe, laringe, cavidade nasal e seios paranasais (SOBIN; GOSPODAROWICZ; WITTEKIND, 2009). Dentre esses subtipos sabe-se que 48% dos casos ocorrem na cavidade oral (JEMAL *et al.*, 2009) e mais de 95% destes são classificados como carcinoma espinocelular. Contudo outras malignidades podem ocorrer no local, como neoplasias de glândulas salivares, sarcomas, tumores odontogênicos maligno, neoplasias hematopoiéticas e tumores metastáticos (LEEMANS *et al.*, 2011).

O câncer de boca e faringe juntos constituem no sexto tipo de câncer mais comum em todo o mundo. Sua incidência é maior no Sul da Ásia, nas regiões do Pacífico, na América Latina e em parte do Leste e Centro Europeu (WARNAKULASURIYA, 2009). No Brasil, estimou-se, para o biênio de 2014/ 2015, a incidência de 11.280 novos casos de câncer de cavidade oral em homens e 4.010 em mulheres. Esses valores compreendem um risco estimado de 11,54 novos casos a cada 100 mil homens e 3,92 a cada 100 mil mulheres. O câncer de laringe ocorre com menos frequência em relação ao câncer oral. Estimou-se 6.870 novos casos de câncer de laringe em homens e 770 em mulheres (INCA, 2014).

Os principais fatores de risco para o HNSCC são a ingestão de álcool e o tabagismo (WARNAKULASURIYA, 2009; BELCHER *et al.*, 2014). O *Papilomavirus humano* (HPV) tem sido etiologicamente associado a 20 -25% dos casos de HNSCC, especialmente em casos de câncer de orofaringe. Entre os carcinomas de alto risco, o subtipo 16 é frequentemente detectado em câncer de cabeça e pescoço, ocorrendo em 90-95% dos tumores relacionados ao HPV (MOLINOLO *et al.*, 2009; TRAVARAJ *et al.*, 2011).

Apesar dos recentes avanços nos protocolos de tratamento quimioterápico, radioterápico e cirúrgico a taxa de sobrevida dos pacientes com HNSCC é de aproximadamente cinco anos (VARGAS-FERREIRA *et al.*, 2012). A baixa expectativa de sobrevida desses pacientes ocorre devido ao atraso diagnóstico. A doença normalmente é detectada em estágios avançados o que proporciona prognósticos limitados, devido a elevada propensão para invasão local e disseminação regional à distância que este tipo de câncer possui (WARNAKULASURIYA, 2009; CLARK *et al.*, 2010). A inibição do crescimento tumoral e do aparecimento de metástases têm sido alvo de novas abordagens de pesquisadores que centralizam seus esforços no estudo de moléculas específicas ou nas vias de transdução de sinais, principalmente as envolvidas no processo de indução de apoptose (KUNDU *et al.*, 2012).

No HNSCC, os receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFR) estão super expressos em 95% dos casos, o que frequentemente está relacionado a prognósticos ruins e a resistência ao tratamento (FREUDLSPERGER *et al.*, 2011). O EGFR é um receptor transmembrana de superfície, e é um componente essencial das vias de transdução de sinais que regula o crescimento, a sobrevivência e a migração do tumor, e ainda a resistência ao tratamento quimioterápico (GRANDIS; TWEARDY, 1993). A ligação do EGF ao receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) promove sua autofosforilação e funciona como um gatilho bioquímico que ativa uma série de cascatas de sinalização que podem ativar as vias PI3K-AKT (responsável pela sobrevivência celular, apoptose e transcrição e síntese de proteínas), mTOR e Ras-Raf-MEK-AMPK (relacionada a proliferação celular) (MANTHA *et al.*, 2005; MA *et al.*, 2012). Além disso, a interação entre a expressão do EGFR e do transdutor de STAT3 desempenha um papel importante na regulação de transcrição de genes que estão envolvidos na progressão do ciclo celular tais como a ciclina-D e E e também regula positivamente genes anti-apoptóticos tais como o Bcl- 2 (KUNDU *et al.*, 2012). A via PI3K-AKT/ mTOR também pode ser ativada por outros receptores de tirosina quinase. Esta via é uma rede de cascata de sinalização nas células de mamíferos que coordena várias operações necessárias para regular e promover importantes atividades e funções celulares. O

controle da ativação dessas vias e seus produtos torna possível a organização da tradução do mRNA de genes que codificam proteínas pró- oncogênicas e o consequente crescimento de células malignas (MARTELLI *et al.*, 2010).

A via PI3K também pode ser ativada por meio da ativação dos receptores tirosina-quinase que promovem a fosforilação do PIP2 para PIP3 (fosfatidilinositol 3,4,5- trifosfato) e ativação de PDK1 que fosforila a proteína AKT serina/treonina e ativa os complexos mTOR (Figura 4).

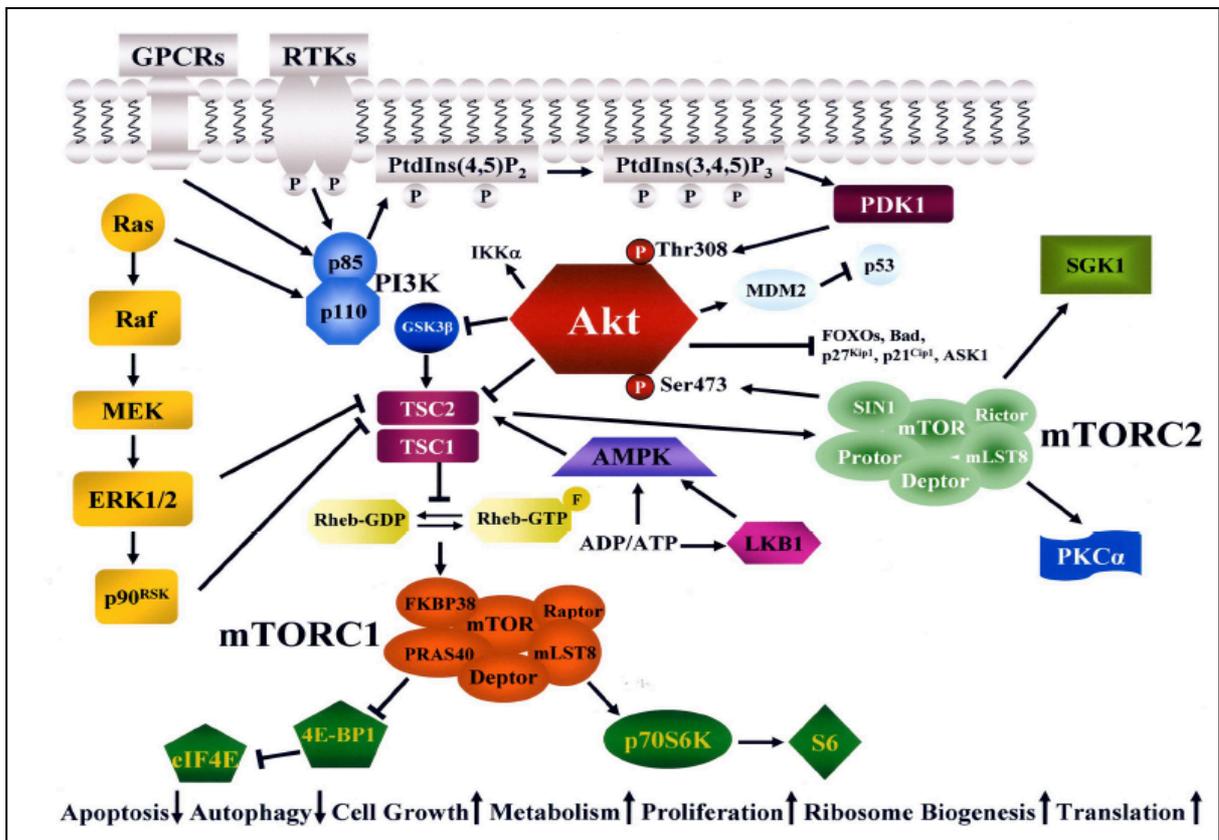


Figura 4 – Via PI3K/AKT/mTOR.

Fonte: Matelli et al. (2010).

2.4 ESTATINAS E CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO

As estatinas apresentam uma citotoxicidade específica para as células de HNSCC e têm propriedade de induzir resposta apoptótica e inibir o crescimento tumoral deste tipo de câncer. Além disso, possui comprovada habilidade em alcançar múltiplas vias metabólicas que regulam apoptose celular e assim pode inativar outras vias de carcinogênese (DIMITROULAKOS *et al.*, 2001; MANTHA *et al.*, 2003; MANTHA *et al.*, 2005; TAKEDA

et al., 2006; NIKNEJAD *et al.*, 2007; GABRY'S *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2011; MA *et al.*, 2012; DAYEKH *et al.*, 2014).

Os metabólitos da via do mevalonato desempenham um papel essencial na transdução de sinais de EGFR. Proteínas da família Ras, Rho e Rab são ativadas tanto pela autofosforilação de EGFR quanto pela via do mevalonato através da ativação do subproduto pirofosfato de geranyl (MANTHA *et al.*, 2005). O tratamento com a lovastatina demonstrou induzir múltiplas vias de indução, incluindo LKB1/AMPK (MA *et al.*, 2012), EGFR (MANTHA *et al.*, 2003; MANTHA *et al.*, 2005) e as vias AKT e ERK que foram desativadas após 24 horas de tratamento (MANTHA *et al.*, 2005). Da mesma forma, outros achados *in vitro* atestaram que a proteína Rho é regulada pelo tratamento das células de HNSCC com a lovastatina (DIMITROULAKOS *et al.*, 2002). A atorvastatina demonstrou reduzir a migração e invasão celular e formação de colônia. Além disso, provou desempenhar uma redução significativa dos níveis de Rho *in vitro* e inibir a ativação das proteínas ERK1/2 e STAT3. Em modelos animais, a inibição dos níveis de Rho resultaram em uma diminuição de metástase (ISLAM *et al.*, 2007).

A sinvastatina comprovou ser um tratamento de grande potencial, pois provou ser capaz de impedir o crescimento de células de HNSCC e prevenir metástase. Estudos afirmaram que a sinvastatina inibe a proliferação destas células e pode induzi-las a permanecer na fase G1 do ciclo celular, aumentando a expressão de p21, p27 e caspase-3 ativa (TAKEDA *et al.*, 2006). Todos esses resultados em experimentos *in vitro* corroboram com os achados do único estudo clínico, fase 1, disponível na literatura. Nesse, os autores relatam que trataram pacientes com recorrência ou metástase de HNSCC somente com a lovastatina e demonstram que 23% dos pacientes atingiram a estabilização da doença em 3 meses de uso (KNOX *et al.*, 2005).

Tem sido demonstrado que a via do mevalonato tem uma forte associação com o crescimento tumoral. Os compostos da estatina têm habilidade de modular a atividade de múltiplas vias metabólicas, induzir apoptose celular e diminuir a proliferação celular. Estes achados sugerem que estes medicamentos são promissores em potencial para ser utilizado como adjuntos a terapia convencional disponível para o tratamento do HNSCC (ISLAM *et al.*, 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Realizar um estudo do tipo revisão sistemática para avaliar os efeitos *in vitro* da estatina no carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço.

3.2 ESPECÍFICOS

Verificar a literatura vigente que possa:

- Identificar a citotoxicidade das estatinas em células de carcinoma de cabeça e pescoço;
- Verificar a intervenção das estatinas na distribuição no ciclo celular e morte celular em linhagens celulares de carcinoma de cabeça e pescoço;
- Conhecer as vias de sinalização relacionadas ao emprego das estatinas em células de carcinoma de cabeça e pescoço.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PROTOCOLO E REGISTRO

Esta revisão sistemática foi reportada de acordo com o *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis - PRISMA checklist* (MOHER *et al.*, 2009) (Anexo “A”). Este consiste de uma lista de verificação dos itens necessários para compor uma revisão sistemática e possui um modelo com vinte e sete itens que devem ser reportados em um fluxograma contendo quatro fases (MOHER *et al.*, 2009).

O protocolo desta revisão sistemática não foi registrado no *International Prospective Register of Systematic Reviews* (PROSPERO) por se tratar de estudos *in vitro*. (Anexo “B”).

4.2 CRITÉRIO DE ELIGIBILIDADE

Para estabelecer a questão principal desta revisão sistemática – “Quais os efeitos antitumorais das estatinas nas células de carcinoma de cabeça e pescoço?” - o método PICOS (população, intervenção, comparação, resultados (*outcome*) e tipo de estudo (*study design*)) foi utilizado, definindo as informações necessárias para realização da busca.

4.2.1 Critério de inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão e exclusão foram estabelecidos a partir da questão principal e orientados a partir da estratégia PICOS (Quadro 1).

Foram selecionados apenas artigos que apontaram o efeito das estatinas do HNSCC e que utilizaram substâncias controle específicas para cada tipo de composto da estatina. As linhagens celulares estudadas deveriam ser provenientes do HNSCC, abrangendo as células do lábio e/ou cavidade oral, faringe, laringe, cavidade nasal e seios paranasais (SOBIN *et al.*, 2009). Todos os artigos incluídos realizaram experimentos em estudos *in vitro* ou *in vivo* em modelo animal. Foram incluídas publicações em qualquer idioma, sem nenhum limite para período de publicação.

Os critérios de exclusão foram:

- 1) Estudos que não verificaram associação entre o uso das estatinas em HNSCC;

- 2) Revisões de literatura, cartas, relatos de casos clínicos, resumos, opiniões pessoais, resumos em conferências, cartas ao editor, teses e capítulos de livro;
- 3) Estudos clínicos.

Quadro 1 – Critérios de inclusão e exclusão com base na estratégia PICOS.

Sigla	Significado	Critérios de Inclusão	Critérios de Exclusão
P	População	(1) Linhagens celulares de câncer de cabeça e pescoço. (2) Estudos <i>in vivo</i> – Animal.	(1) Estudos clínicos.
I	Intervenção	(1) Utilização das estatinas para tratamento do HNSCC.	(1) Estatinas utilizada para outro fim que não tratamento do HNSCC
C	Comparação	(1) Grupo controle – outros medicamentos usados para tratamento do HNSCC ou substâncias utilizadas para controle (solventes).	(1) Experimentos sem grupo controle
O	Resultados (<i>Outcome</i>)	(1) Viabilidade celular. (2) Ciclo celular e apoptose. (3) Vias de sinalização.	Estudos que não avaliaram pelo menos um item de: viabilidade celular, ciclo celular e apoptose e expressão de proteínas.
S	Tipo de estudo (<i>Study Design</i>)	(1) Estudos comparativos (<i>in vitro</i>). (2) Estudos controlados randomizados (<i>in vivo</i>).	(1) Revisões de literatura, cartas, relatos de casos clínicos, resumos, opiniões pessoais, resumos em conferências, cartas ao editor, teses e capítulos de livro;

4.3 FONTE DE INFORMAÇÕES E ESTRATÉGIAS DE BUSCA

Uma busca criteriosa com estratégias individuais foi realizada utilizando as seguintes bases de dados eletrônicas: Cochrane, MEDLINE, EMBASE, LILACS e Pubmed. Maior detalhamento das buscas pode ser encontrado no Quadro 2, a seguir. As buscas foram conduzidas em 30 de junho de 2014 e, posteriormente, atualizadas em 09 de maio de 2015. Após conclusão das buscas foi realizada uma verificação minuciosa na lista de referências dos artigos selecionados, para certificar que nenhuma publicação havia sido negligenciada. O gerenciamento das referências foi feito manualmente e os estudos duplicados foram removidos.

4.3.1 Cochrane

O acesso a Cochrane pode ser realizado por meio da plataforma *Cochrane Library* no endereço: <<http://www.cochranelibrary.com/>>. Esta base apresenta estudos de revisão sistemática de ensaios clínicos randomizados. São apresentadas informações bibliográficas, como autor, título, fonte, ano e comumente os resumos dos estudos. Os textos na íntegra não estão disponíveis para acesso por esta base.

4.3.2 Medline

O MEDLINE Ovid cobre a literatura internacional de biomedicina incluindo os campos aliados da saúde e das ciências biológicas e físicas, ciência da informação, e seus relacionamentos com a medicina. Cerca de 5.600 revistas estão indexadas nesta plataforma. Os registros Pubmed não MEDLINE são registros de revistas encontradas no Pubmed, mas não selecionadas para MEDLINE. Estes registros estão mudando constantemente e não serão adicionados à base de dados MEDLINE.

4.3.3 Lilacs

O LILACS é uma base de dados que reúne referências bibliográficas publicadas na área de saúde. Seu acesso pode ser realizado através do portal da Biblioteca Regional de Medicina (BIREME) pelo endereço eletrônico: <<http://www.bireme.br/php/index.php>> ou por acesso direto pelo site: <<http://lilacs.bvsalud.org/>>. Para realizar a pesquisa é possível acessar os termos específicos através dos Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) que podem ser em português, espanhol e inglês.

4.3.4 PubMed

O PubMed inclui citações que abrangem as áreas de biomedicina, saúde, ciências químicas, comportamentais e bioengenharia. O seu acervo compreende em citações literárias do MEDLINE, que ultrapassa a 24 milhões, citações não indexadas ao MEDLINE, revistas de ciências da vida e livros online. Seu acesso é gratuito e está disponível no endereço: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>.

4.3.5 Embase

O Embase é uma base de dados europeia de acesso pago e por isso restrito. Pode ser acessado pelo site: <<https://www.elsevier.com/solutions/embase>>. Nessa base, é possível encontrar evidências biomédicas, revisões de literatura, publicações impressas e resumos em conferências.

Quadro 2 – Estratégias de buscas.

Base de Dados	Busca
Cochrane (9/05/2015)	# 1 ‘Statin and head and neck cancer’; #2 ‘Statin and squamous cell carcinoma; #3 Statin and squamous cell cancer; #1 or #2 or #3
EMBASE (9/05/2015)	#1 Statin.mp.; #2 oral cancer.mp.; #3 oral carcinoma.mp.; #4 head carcinoma.mp.; #5 neck carcinoma.mp.; #6 head cancer.mp.; #7 neck cancer.mp., squamous cell carcinoma.mp; #2 or #3 or #4 or #5 or #6 or #7 or #8; #1 and #9 [mp=title, abstract, subject headings, heading word, drug trade name, original title, device manufacturer, drug manufacturer, device trade name, keyword]
LILACS (9/05/2015)	#1 estatinas.mp.; #2 cancer.mp.; [mp=title, abstract, subject headings, heading word, drug trade name, original title, device manufacturer, drug manufacturer, device trade name, keyword] #1 and #2
MEDLINE (9/05/2015)	#1 Statin.mp.; #2 Cancer.mp.; #3 Carcinoma.mp.; #4 Oral .mp.; [mp=title, abstract, subject headings, heading word, drug trade name, original title, device manufacturer, drug manufacturer, device trade name, keyword] #2 or #3 or #4; #1 and #5
PubMed (9/05/2015)	#1 ‘Statin’; #2 ‘Neck cancer’; #3 ‘Head and neck cancer’; #4 ‘Squamous cell carcinoma’; #5 ‘Oral Squamous Cell Carcinoma; #6 - (#2 or #3 or #4 or #5); (#1) and #6

4.4 SELEÇÃO DOS ESTUDOS

Os estudos foram selecionados em duas fases. Na fase um, dois autores (L.M.C.P. e S.T.E) revisaram os títulos e os resumos, de todas as referências selecionadas, separadamente. Os resumos dos artigos que cumpriram os critérios de inclusão foram selecionados. Na fase dois, dois autores (L.M.C.P e S.T.E) leram separadamente todos os textos completos, referentes aos artigos que foram selecionados na fase anterior, e excluíram aqueles artigos que não concordavam com os critérios de inclusão estabelecidos. Quaisquer desacordos entre os autores, na primeira e segunda fase, foram resolvidos por discussões e concordância mútua. Quando os autores não obtiveram consenso, um terceiro autor (E.N.S.G) foi responsável pela decisão final.

4.5 PROCESSO DE COLETA DE DADOS

Um autor (L.M.C.P) coletou as informações relevantes necessárias de todos os artigos selecionados tais como: autores, ano de publicação, país, desenho do estudo, ensaios, tipo de tratamento, resultados e conclusões principais. Com base nos estudo *in vitro* encontrados nesta pesquisa, as evidências sobre a possível aplicação clínica das estatinas foram avaliadas e classificadas para cada artigo como: (1) efeito potencial no tratamento de carcinoma de cabeça e pescoço (2) inconclusivo e (3) a evidência não apoia o uso das estatinas para tratamento de carcinoma de cabeça e pescoço.

Após a coleta de dados um segundo autor (E.N.S.G) cruzou todas as informações apontadas. Novamente, qualquer desacordo foi resolvido através de discussão até alcançar uma concordância mútua entre os dois autores. Caso os autores não obtivessem consenso, um terceiro autor (S.T.E) foi responsável pela decisão final.

4.6 RISCO DE VIÉS

Os autores avaliaram todos os artigos selecionados de acordo com o método GRADE (*Grading of Recommendations, Assessment, Development and Evaluation*) para julgar a qualidade de evidências (GUYATT *et al.*, 2011). Dois autores (L.M.C.P e E.N.S.G) classificaram os artigos selecionados com qualidade “alta”, “moderada”, “baixa” e “muito baixa”, de acordo com suas análises em cada estudo. Não havendo consenso entre os dois autores, um terceiro autor (S.T.E) fora requisitado para decisão final.

O GRADE é um método que oferece um sistema de classificação da qualidade de evidências em revisões sistemáticas e outras formas de síntese de evidências. O método apresenta um processo detalhado de análise das evidências a partir dos desfechos avaliados. Assim é concebido para minimizar as fragilidades e inconsistências resultantes de outras formas de avaliação e classificação da qualidade dos estudos e suas evidências (SCHÜNEMANN *et al.*, 2013).

De acordo com a estratégia GRADE os estudos randomizados (RCT) já iniciam sua avaliação com “alta qualidade” por serem considerados como os mais adequados para avaliação de intervenções. A redução de sua qualidade poderá ocorrer após avaliação dos seguintes critérios: limitações do estudo/risco de viés, inconsistência dos resultados, evidência indireta, imprecisão e viés de publicação. Enquanto o aumento da qualidade poderá ocorrer após avaliação dos critérios de efeito e dose/resposta. O Quadro 3, a seguir, ilustra como é realizada a pontuação dos estudos (GUYATT *et al.*, 2011; SCHÜNEMANN *et al.*, 2013).

Quadro 3 – Critérios para o método GRADE.

Desenho do Estudo	Qualidade da Evidência	Diminuir se:	Aumentar se:
Estudo Randomizado	Alto	Limitação do estudo (-1) Sério (-2) Muito Sério Inconsistência (-1) Sério (-2) Muito Sério Evidência Indireta (-1) Sério (-2) Muito Sério	Efeito (+1) Grande (+2) Muito Grande Dose/ Resposta (+1) Se obteve efeito dose resposta
	Moderado	(-1) Sério (-2) Muito Sério Evidência Indireta (-1) Sério (-2) Muito Sério	
Estudo Observacional	Baixo	(-1) Sério (-2) Muito Sério Imprecisão (-1) Sério (-2) Muito Sério	
	Muito baixo	Viés de Publicação (-1) Sério (-2) Muito Sério	

Fonte: Adaptado de Schünemann *et al.* (2013).

Como não há nenhuma avaliação padrão consagrada para estudos *in vitro*, esta revisão baseou-se em uma revisão sistemática *in vitro* publicada por XIAO *et al.* 2013. Porém, diferentemente do proposto por XIAO *et al.* 2013, respeitamos integralmente todos os passos referentes ao PRISMA *Checklist* (MOHER *et al.*, 2009) e utilizamos o método GRADE para avaliar a qualidade das evidências dos estudos, por ser o mais apropriado, visto que os experimentos testaram uma série de intervenções e obtiveram resultados relativos a essas intervenções (SCHÜNEMANN *et al.*, 2013). Já que não existia classificação para estudos *in vitro*, estes receberam uma classificação particular. Foram classificados como comparativos ou não comparativos, correspondendo então aos estudos *in vivo* (animal) que foram devidamente classificados como randomizados ou estudos não controlados (Quadro 4) (XIAO *et al.*, 2013).

Quadro 4 – Avaliações padrões para estudos básicos *in animal* e *in vitro*.

In Animal	In vitro
Estudos Randomizados	Estudos comparativos
Estudos não controlados	Estudos não comparativos

Fonte: Adaptado de Xiao *et al.* (2013).

4.7 MEDIDAS DE SUMARIZAÇÃO

Para verificar o efeito das estatinas em células de HNSCC resolvemos avaliar os seguintes desfechos: (1) viabilidade celular; (2) apoptose; (3) ciclo celular e (4) as vias de sinalização relacionadas ao emprego das estatinas em células de carcinoma de cabeça e pescoço.

4.8 SÍNTESE DOS RESULTADOS

Uma metanálise foi planejada desde que os dados dos artigos incluídos fossem considerados homogêneos.

4.9 RISCO DE VIÉS ENTRE OS ESTUDOS

Aplicado apenas se uma metanálise for possível.

5 RESULTADOS

5.1 SELEÇÃO DOS ESTUDOS

Na fase 1, 153 artigos foram selecionados de cinco bases de dados diferentes. Após remover todos os estudos duplicados, restaram somente 119 citações. Subsequentemente, uma avaliação minuciosa dos resumos foi realizada e 101 artigos foram excluídos, resultando em 18 artigos ao final desta fase. Não foi identificado nenhum artigo sobressalente nas listas de referências destes estudos. Após a revisão dos dezoito artigos na íntegra, outros quatro artigos foram descartados (Apêndice “A”). Ao final, somente 14 estudos foram incluídos. Um fluxograma detalhando o processo de identificação, inclusão e exclusão dos artigos pode ser observado na Figura 5, a seguir.

5.2 CARACTERÍSTICAS DOS ESTUDOS

Os estudos foram publicados desde 2001 a 2014, e todos foram escritos em inglês. As pesquisas foram realizadas em cinco países diferentes: Canadá (DAYEKH *et al.*, 2014; DIMITROULAKOS *et al.*, 2001; DIMITROULAKOS *et al.*, 2002, MA *et al.*, 2012; MANTHA *et al.*, 2003; MANTHA *et al.*, 2005; NIKEJAD *et al.*, 2007; NIKEJAD *et al.*, 2014), França (PIOCHE-DURIEU *et al.*, 2005), Alemanha (GABRYŚ *et al.*, 2008), Espanha (LLOBET *et al.*, 2014) e Estados Unidos (ISLAM *et al.*, 2013; TAKEDA *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2011). Todos os estudos selecionados foram *in vitro*. No entanto, três deles também envolveram experimentos *in vivo* (GABRYŚ *et al.*, 2008; ISLAM *et al.*, 2013; LLOBET *et al.*, 2014). Um resumo das características dos estudos incluídos pode ser encontrado no Quadro 5 e uma síntese das intervenções que testaram a viabilidade das células de carcinoma de cabeça e pescoço pode ser demonstrada no Quadro 6, a seguir.

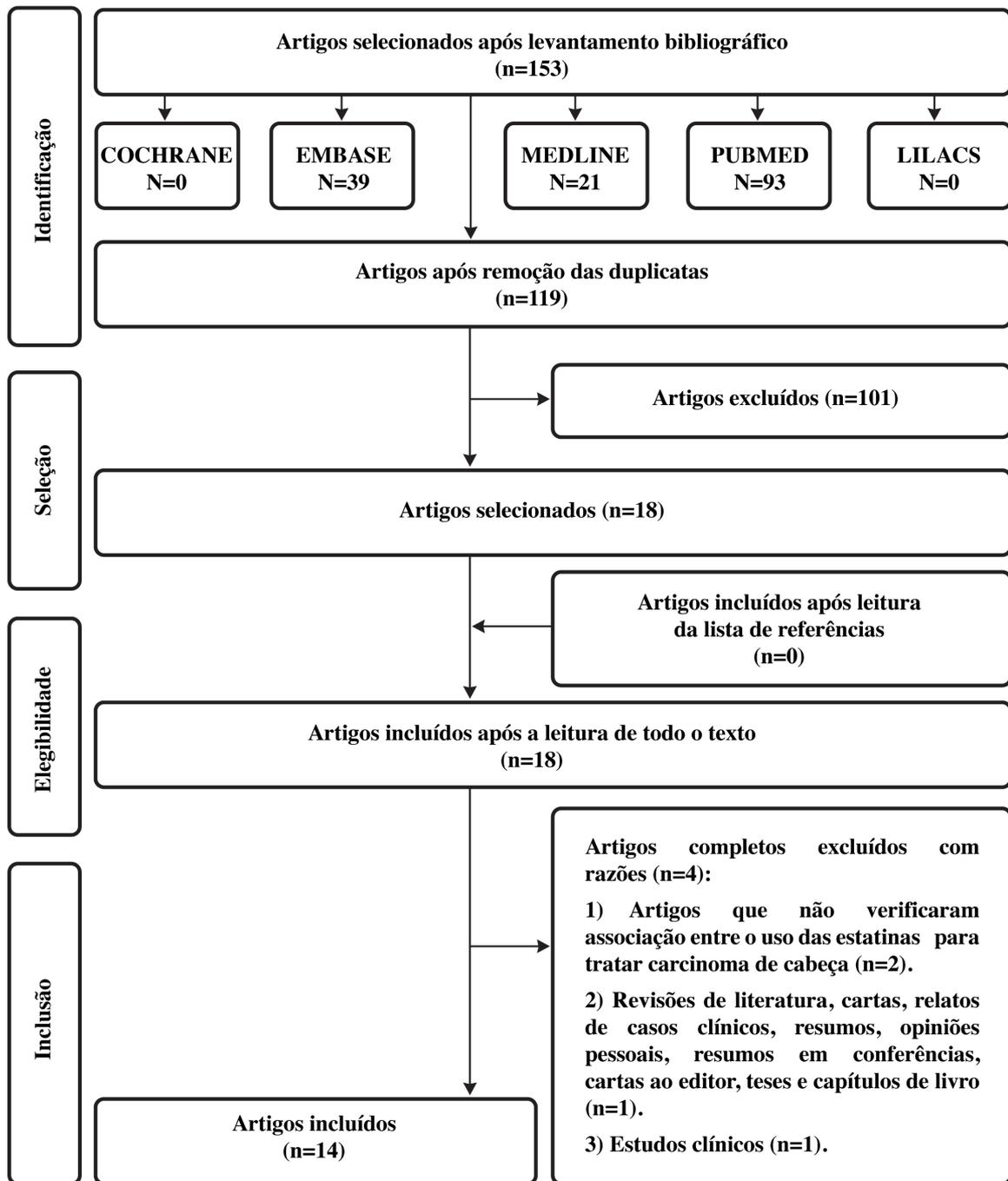


Figura 5 – Fluxograma (Moher *et al.*, 2009).

Quadro 5 – Resumo das características descritivas dos artigos inclusos (n=14)

Autor e Ano	País	Tipo de estudo	Métodos			Resultados	Conclusões	Aplicação Clínica
			Ensaio	Células	Tratamento			
Dayekh <i>et al.</i> (2014)	Canadá	<i>In vitro</i>	Ensaio MTT; Citometria de Fluxo; <i>Western blot</i> ; Análise do tumor <i>Ex vivo</i> .	SCC9; SCC25; GM-38.	Lovastatina; Erlotinib; Monensina + Erlotinib; Monensina + Lovastatina.	Monensina + lovastatina-90% de morte celular em 48 horas.	Monensina aumenta a ação citotóxica da lovastatina e erlotinib quando usadas em células SCC9 e SCC25.	1
Dimitroulakis <i>et al.</i> (2001)	Canadá	<i>In vitro</i>	MTT; Citometria de Fluxo;	SCC 4; SCC 25; SCC 15; SCC 9 FaDu;	Lovastatina; Ácido Mevalônico; Etanol (Controle)	Houve morte celular de cerca de 60-80% das células.	Ac. Mevalônico + lovastatina pode ser uma nova abordagem terapêutica.	1
Dimitroulakis <i>et al.</i> (2002)	Canadá	<i>In vitro</i>	Expressão de cDNA <i>Microarray</i> MTT <i>Western blot</i>	SCC9; SCC25 SIHA; Cos-7.	Lovastatina; Etanol (Controle).	50% de morte celular com efeito dose/dependente. Rho é potencialmente regulado pela lovastatina.	Inativação da proteína GGPP, pode ser responsável pela apoptose induzida por lovastatina em células de HNSCC.	1
Gabrys <i>et al.</i> (2008)	Alemanha	<i>In vitro</i> ; <i>In vivo</i> – animal	MTT; Citometria de Fluxo; <i>Western blot</i> ; Radiação	U87MG FaDu.	Lovastatina; Lovastatina + Radiação; Etanol (Controle).	Radiação + lovastatina vs. radiação somente (p<0,001).	Lovastatina não melhora o efeito da radiação nas células.	1
Islam <i>et al.</i> (2013)	EUA	<i>In vitro</i> ; <i>In vivo</i> – animal	Ensaio de mobilidade; invasão e de proliferação celular; Microscopia confocal; Ensaio de sobrevivência clonogênica; <i>Western blot</i>	UM-SCC1; UM-SCC47.	Atorvastatina; Etanol (Controle).	Atorvastatina reduz a invasão, a mobilidade, a proliferação e formação de colônia celular (p<0,05);	Atorvastatina diminui a ação da proteína RhoC e limita a ativação da cascata de sinalização de ERK1/2 e STAT3.	1
Llobet <i>et al.</i> (2014)	Espanha	<i>In vitro</i> ; <i>In vivo</i> – animal	Ensaio de proliferação celular; Ensaio de sobrevivência clonogênica; <i>Western blot</i> .	A431; FaDu.	Cetuximab; Sinvastatina; Radiação; Combinação dessas terapias; DMSO (Controle).	Sinvastatina: Diminui a proliferação celular (p<0,05 vs. controle - 72 horas); Induziu apoptose (p<0,05).	Sinvastatina + cetuximab aumentam resposta antitumoral Sinvastatina tem fraco efeito na ativação da AKT e STAT3.	1

Quadro 5 – Resumo das características descritivas dos artigos inclusos (n=14) (continuação)

Autor e Ano	País	Tipo de estudo	Métodos			Resultados	Conclusões	Aplicação Clínica
			Ensaio	Células	Tratamento			
Ma <i>et al.</i> (2012)	Canadá	<i>In vitro.</i>	Ensaio MTT; <i>Western blotting</i> ; Imuno-fluorescência;	SCC9; SCC 25; HeLa; A549.	Lovastatina; Metformina; Gefitinib; Lovastatina + Gefitinib; Etanol (Controle).	Lovastatina induz a ativação da via LKB1/AMPK em células de HNSCC;	Lovastatina induz múltiplas vias de estresses metabólicos, incluindo a via LKB1/AMPK.	1
Mantha <i>et al.</i> (2003)	Canadá	<i>In vitro.</i>	Ensaio MTT; Citometria de Fluxo; <i>Western blotting.</i>	SCC9; SCC25; MCF-7.	Lovastatina; Cisplatina; 5 FU; Paclitaxel; Carboplatina; Oxaliplatina Etanol (Controle).	Lovastatina reduz a viabilidade celular 30-35% / 50µM; SCC25 – Lovastatina induz apoptose em 20,4% (10µM) e 34% (50µM).	Lovastatina pode ativar a via do EGFR em células HNSCC e pode potencializar a apoptose. Combinações de cisplatina ou 5-FU não teve resultado significativo.	1
Mantha <i>et al.</i> (2005)	Canadá	<i>In vitro.</i>	Ensaio MTT; Citometria de Fluxo; <i>Western blotting.</i>	SCC9; SCC25; FADU; CAL27; MCF-7.	Lovastatina; Pravastatina; Gefitinib; Lovastatina + Gefitinib. Etanol (Controle).	Lovastatina pode ativar a via do EGFR em células HNSCC e pode potencializar a apoptose.	A combinação de estatinas e inibidores de EGFR têm se mostrado uma abordagem terapêutica atrativa.	1
Niknejad <i>et al.</i> (2007)	Canadá	<i>In vitro.</i>	<i>Western blotting</i> ; Real Time RT-PCR; Ensaio MTT; Citometria de Fluxo.	SCC25 ; HeLa; 293T ; MEFs WT; CHOP - /-.	Lovastatina; Lovastatina + Ácido Mevalônico; Etanol (Controle).	A expressão de ATF3 é regulada pela lovastatina; A expressão do gene CHOP é induzida pela lovastatina em células SCC25 (p<0,05).	Lovastatina ativa o ISR em células de HNSCC e controla o ciclo celular e os sinais de apoptose.	1
Nikejad <i>et al.</i> (2014)	Canadá	<i>In vitro.</i>	Ensaio MTT; Citometria de Fluxo; <i>Western blotting</i> ; Real time RT-PCR; Atividade de ATF3 e caspase 3.	MCF-7; SCC9; SCC25; HeLa; MEFs ATF3. -/-.	Lovastatina; Ácido Mevalônico; <i>Salubrinal</i> ; Lovastatina + <i>Salubrinal</i> ; Etanol (Controle).	Morte de 80% SCC 25 e HeLa; <i>Salubrinal</i> aumenta a indução de expressão de ATF3 e citotoxicidade.	Lovastatina + ativadores da proteína salubrinal aumenta a expressão de ATF3 e induz a apoptose em células SCCs. Lovastatina diminui os níveis de ciclina D1 e ativação de LKB1/AMPK;	1

Quadro 5– Resumo das características descritivas dos artigos incluídos (n=14) (continuação)

Autor e Ano	País	Tipo de estudo	Métodos			Resultados	Conclusões	Aplicação Clínica
			Ensaio	Células	Tratamento			
Pioche-Durieu <i>et al.</i> (2005)	França	<i>In vitro.</i>	Ensaio de Flotação; <i>Western blotting</i> ; Imunofluorescência;	Células NPC (C15, C17).	Sinvastatina; DMSO (Controle).	Sinvastatina é citotóxica para células NPC	Não há efeito significativo na distribuição de LMP1 e Galectina em células NPC tratadas com a Sinvastatina	1
Takeda <i>et al.</i> (2006)	EUA	<i>In vitro.</i>	Ensaio MTT; Citometria de Fluxo; RT PCR; Ensaio invasão em Matrigel; <i>Microarray.</i>	Tu-167; JMAR.	Sinvastatina; DMSO (Controle).	Sinvastatina: inibe a proliferação celular ($p<0,01$); a migração e invasão celular. Pode controlar o ciclo celular e sinais de apoptose ($p<0,01$).	Esses efeitos estão associados a regulação de $\beta 1$ - integrina e sinalização da proteína ERK. A Sinvastatina é efetiva na prevenção de crescimento e metástase do câncer.	1
Wang <i>et al.</i> (2011)	EUA	<i>In vitro.</i>	Ensaio MTT; atividade de Caspase- 3; Formação de colônia celular.	CCL-30.	Estatinas; Ácido Mevalônico; Cisplatina, estatinas +; DMSO (Controle).	As estatinas diminuem a proliferação ($p<0,01$ vs. controle) e a viabilidade das células NPC.	As estatinas podem ser utilizadas como preventivo em tratamento de NPC.	1

Obs.: A aplicação clínica da estatina foi assim classificada: (1) potencial efeito no tratamento de HNSCC; (2) inconclusivo, e (3) não deve ser utilizada como tratamento de HNSCC.

Quadro 6 – Intervenções utilizadas para testar a viabilidade celular de HNSCC

Estudos	P	I			C	O	S	%
	Células	Intervenções	Tratamento	Dose				
Dayekh <i>et al.</i> (2014)	SCC9; SCC25; GM-38	Lovastatina; Erlotinib;	24-48 horas	0 - 10 μ M Lovastatina 0 - 10 μ M Erlotinib	√	√	√	1
Dimitroulakos <i>et al.</i> (2001)	SCC4; 25; 9; 15 FaDu;	Lovastatina; Etanol (Controle).	24- 48 horas	1– 100 μ M Lovastatina	√	√	√	1
Dimitroulakos <i>et al.</i> (2002)	SCC9; SCC25	Lovastatina; Etanol (Controle);	24- 48 horas	0 -100 μ M Lovastatina	√	√	√	1
Gabryś <i>et al.</i> (2008)	U87MG; FaDu.	Lovastatina; Etanol (Controle).	24- 48-72 horas	0 – 50 μ M Lovastatina	√	√	√	1
Islam <i>et al.</i> (2013)	SCC-1 e 47;	-	-	-	-	-	-	-
Llobet <i>et al.</i> (2014)	A431; FaDu.	-	-	-	-	-	-	-
Ma <i>et al.</i> (2012)	SCC9; SCC 25; Hela; A549.	Lovastatina; Metformina; Gefitinib; Lovastatin + Gefitinib; Etanol (Controle).	24- 48-72 horas	0-100 μ M Lovastatina 0 - 20 mM Metformina 0 - 100 μ M Gefitinib	√	√	√	1
Mantha <i>et al.</i> (2003)	SCC9; SCC25; MCF-7.	Lovastatina; Cisplatina; 5 FU; Paclitaxel; Carboplatina;	24- 48 horas	0 - 100 μ M Lovastatina Lovastatina+ combinação 0-12 μ g/mL de cada droga	√	√	√	2
Mantha <i>et al.</i> (2005)	SCC9; SCC25; FADU;	Lovastatina; Lovastatina + Gefitinib.	24- 48-72 horas	0 - 100 μ M Lovastatina	√	√	√	2
Niknejad <i>et al.</i> (2007)	SCC9; SCC 25; Hela.	Lovastatina; <i>Salubrinal</i> ; Lovastatina + <i>Salubrinal</i> ;	24- 48 horas	0 - 50 μ M Lovastatina 10 μ M Lovastatina + 10- 75 μ M <i>Salubrinal</i>	√	√	√	2
Nikejad <i>et al.</i> (2014)	SCC25; Hela; 293T.	Lovastatina; Ácido Mevalônico; Etanol (Controle).	24-48 horas	0 - 50 μ M Lovastatina 0 - 50 μ M Lovastatina + 100 μ M Ácido Mevalônico	√	√	√	1
Pioche-Durieu <i>et al.</i> (2005)	C15; C17.	-	-	-	-	-	-	-
Takeda <i>et al.</i> (2006)	Tu-167; JMAR;	Sinvastatina; DMSO (Controle).	24-48 horas	0 - 10 μ M Sinvastatina	√	√	√	1
Wang <i>et al.</i> (2011)	CCL-30.	Estatinas; Cisplatina; DMSO (Controle).	24-48 horas	0 - 100 μ M Estatina 3.5 – 35 μ M Cisplatina	√	√	√	1

(P): Linhagens celulares HNSCC (C): Controle. (O): resultados S: Estudos RCT ou Estudos comparativos).

Sim- “√” ou Não “-” Porcentagem da viabilidade celular: 1 = 0 - 49% de células viáveis; 2= 50- 100% de células viáveis.

5.3 RISCO DE VIÉS

O método GRADE (GUYATT *et al.*, 2011; SCHÜNEMANN *et al.*, 2013) foi utilizado para verificar a qualidade de evidência dos estudos. Seis estudos foram categorizados com qualidade moderada. Um deles (DIMITROULAKOS *et al.*, 2001) não revelou os resultados para todas as células que demonstrou ter testado, assim não foi possível responder a pergunta principal desta revisão sistemática. Outro estudo (DIMITROULAKOS *et al.*, 2002) foi considerado incompreensível devido à dificuldade de entender os dados dos gráficos publicados, pois estão ilegíveis devido a má qualidade da imagem e impressão. (Quadro 7).

Os artigos publicados por Pioche-Durieu *et al.* (2005) e Islam *et al.* (2013), não responderam completamente a questão principal definida nesta revisão sistemática. Especificamente, o artigo de Pioche-Durieu *et al.* (2005) não quantificaram a viabilidade celular em seu estudo, e os artigos de Islam *et al.* (2013) e Llobet *et al.* (2014) não realizaram ensaios para verificar a viabilidade celular, mas demonstraram que as estatinas regulam a expressão do STAT3 e ERK 1/2 em linhagens celulares de carcinoma de cabeça e pescoço. Por fim, Wang *et al.* (2011) testaram somente uma linhagem celular e não realizaram comparação dos seus resultados com outras linhagens celulares (Quadro 7).

Quadro 7– Qualidade de evidência das intervenções (continua).

Estudos	GRADE								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Dayekh <i>et al.</i> (2014)	Estudos Comparativos	√	√	√	√	√	√	√	++++
Dimitroulakos <i>et al.</i> (2001)	Estudos Comparativos	√	√	X: Não há resultados para todas as células	√	√	√	√	+++
Dimitroulakos <i>et al.</i> (2002)	Estudos Comparativos	√	√	Incompreensível: Não é possível fazer análise dos gráficos.	√	√	√	√	+++
Gabryś <i>et al.</i> (2008)	Estudos Comparativos (<i>in vitro</i>) RCT (Animal)	√	√	√	√	√	√	√	++++
Islam <i>et al.</i> (2013)	Estudos Comparativos (<i>in vitro</i>) RCT (Animal)	√	√	X: A pergunta não foi totalmente respondida.	√	√	√	√	+++
Llobet <i>et al.</i> (2014)	Estudos Comparativos(<i>in vitro</i>) RCT (Animal)	√	√	X: A pergunta não foi totalmente respondida.	√	√	√	√	+++
Ma <i>et al.</i> (2012)	Estudos Comparativos	√	√	√	√	√	√	√	++++
Mantha <i>et al.</i> (2003)	Estudos Comparativos	√	√	√	√	√	√	√	++++
Mantha <i>et al.</i> (2005)	Estudos Comparativos	√	√	√	√	√	√	√	++++
Niknejad <i>et al.</i> (2007)	Estudos Comparativos	√	√	√	√	√	√	√	++++
Nikejad <i>et al.</i> (2014)	Estudos Comparativos	√	√	√	√	√	√	√	++++
Pioche- Durieu <i>et al.</i> (2005)	Estudos Comparativos	√	√	X: A pergunta não foi totalmente respondida	√	√	√	√	+++
Takeda <i>et al.</i> (2006)	Estudos Comparativos	√	√	√	√	√	√	√	++++
Wang <i>et al.</i> (2011)	Estudos Comparativos	√	√	√	X: Utilizou somente uma linhagem celular.	√	√	√	+++

1-Tipo de estudo; 2- Limitação do estudo; 3- Inconsistência; 4- Evidência Indireta; 5- Imprecisão; 6- Viés de Publicação; 7- Efeito: alto ou moderado; 8- Dose resposta; 9- Qualidade de Evidência.

√ - Nenhuma Limitação Séria; X- Limitação Séria ou não apresentada para 7 e 8; **Incompreensível**- Impossível avaliar o item baseado nas informações disponíveis. +, muito baixo ; ++, baixo; +++, moderado; +++++, alto.

5.4 SÍNTESE DOS RESULTADOS

5.4.1 Viabilidade celular

O teste de citotoxicidade celular –MTT consiste em um ensaio para avaliar a atividade mitocondrial das células. Esse teste avalia a capacidade das enzimas mitocondriais, das células tratadas, em reduzir o MTT (brometo de 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-il)-2,5-difenil) tetrazólio) em formazam. Somente as células viáveis são capazes de fazer essa redução. Por isso a medida da absorbância corresponde às células viáveis, aquelas que não sofreram toxicidade suficiente para reduzir sua atividade mitocondrial (MOSMANN, 1983). O teste azul de tripan também verifica viabilidade celular e permite diferenciar as células vivas das células mortas. O corante destaca somente as células mortas, pois a membrana celular das células viáveis é seletiva e não permite a incorporação do azul de tripan (ALTMAN; RANDERS; RAO, 1993).

Para avaliar a citotoxicidade das células de HNSCC tratadas com a estatina, alguns estudos utilizaram os ensaios de MTT (DIMITROULAKOS *et al.*, 2001; DIMITROULAKOS *et al.*, 2002; MANTHA *et al.*, 2003; MANTHA *et al.*, 2005; TAKEDA *et al.*, 2006; NIKNEJAD; MORLEY; DIMITROULAKOS, 2007; WANG *et al.*, 2011; NIKNEJAD *et al.*, 2014) e outro utilizou o ensaio azul de tripan (GABRYS *et al.*, 2008). As estatinas, quando utilizadas isoladamente, demonstraram ser citotóxicas para células de HNSCC e reduziram a viabilidade celular em menos de 50%, sendo que esses medicamentos atuaram através de um efeito dose dependente (DIMITROULAKOS *et al.*, 2001; DIMITROULAKOS *et al.*, 2002; MANTHA *et al.*, 2005; TAKEDA *et al.*, 2006; NIKNEJAD; MORLEY, 2007; WANG *et al.*, 2011; MA *et al.*, 2012; NIKNEJAD *et al.*, 2014). A co-administração das estatinas com medicações convencionais utilizadas no tratamento quimioterápico (Lovastatina, Cisplatina, 5 FU, Paclitaxel, carboplatina, oxaliplatina) e com radiação não mostrou diferenças significantes na resposta terapêutica (MANTHA *et al.*, 2003; GABRYS *et al.*, 2008). No entanto, quando a lovastatina foi utilizada com gefitinib (inibidor de EGFR) houve morte de mais de 90% das células SCC9, em relação aos resultados demonstrados para lovastatina ou gefitinib quando utilizados isoladamente. (MANTHA *et al.*, 2003; MA *et al.*, 2012). Resultados semelhantes foram encontrados quando a lovastatina foi utilizada em combinação com o erlotinib (inibidor de EGFR) e a monesina no tratamento de células SCC9 e SCC25 (DAYEKH *et al.*, 2014).

A lovastatina demonstrou ter um impacto significativo na viabilidade das células NPC, quando foi utilizada juntamente com a cisplatina. O uso da cisplatina (35 μM) e lovastatina (50 μM) por 24 e 48 horas resultou em 60-90% de morte celular ($p < 0,05$) (WANG *et al.*, 2011).

5.4.2 Ciclo celular e apoptose

Em ensaios de citometria de fluxo ficou comprovado que as estatinas inibem a proliferação de células de HNSCC e as induz a permanecer na fase G0/G1 do ciclo celular (DIMITROULAKOS *et al.*, 2001; MANTHA *et al.*, 2003; MANTHA *et al.*, 2005; Takeda *et al.*, 2006; NIKNEJAD; MORLEY; DIMITROULAKOS, 2007; GABRYS *et al.*, 2008; NIKNEJAD *et al.*, 2014). Gabrys *et al.* (2008) concluíram em seus experimentos que 55% das células FaDu estavam na fase G0/G1 após tratamento com 25 μM de lovastatina por 48 horas. Porém, quando utilizaram a mesma dosagem de lovastatina associada a 4 grays (Gy) de radiação não observou resultado muito diferente do anterior. Takeda *et al.* (2006) demonstraram que a sinvastatina quando utilizada em diferentes concentrações (0-10 μM) produz efeitos inibitórios e dose dependentes no crescimento e ciclo celular nas linhagens JMAR e Tu167.

Além de controlar o ciclo celular, a lovastatina demonstrou potente efeito apoptótico nas células SCC25. Mantha, *et al.*, 2003 relataram que o efeito é dose dependente, já que 20,4% das células entraram em apoptose com a dosagem de 10 μM e 34% com doses de 50 μM após 48 horas de tratamento. Observaram também que 68,4% das células permaneceram na fase G0/G1 quando tratadas com 10 μM de lovastatina e 74,2% após tratamento com 50 μM , após um período de 48 horas. Não houve resposta significativa quando a lovastatina foi associada com quimioterápicos convencionais, mesmo quando os medicamentos foram associados. As estatinas podem controlar o ciclo celular e os sinais de apoptose das células de HNSCC (MANTHA *et al.*, 2003).

5.4.3 Regulação da expressão de proteínas

A atorvastatina desempenhou um importante papel na modulação das funções da proteína Rho, *in vitro*, entre eles a diminuição da mobilidade e invasão celular em 60% e 42% em UM- SCC-1 e 47 respectivamente, e atenuou a fosforilação das proteínas ERK1/2 e

STAT3, que regulam a invasão celular e metástase. Nos experimentos em animais revelaram uma inibição da angiogênese e da metástase de câncer de pulmão ($p < 0,05$) (ISLAM *et al.*, 2012).

Ma *et al.* (2012) avaliaram o efeito da lovastatina em regular a ativação da via LKB1/AMPK. Um ensaio de MTT foi realizado utilizando o tipo selvagem de fibroblastos de camundongos (MEFs) LKB1^{+/+} como controle, que foi comparado com camundongos LKB1^{-/-} tratados com concentrações de lovastatina maiores que 25 μ M em 48 e 72 horas. Os dados demonstraram que as células LKB1^{+/+}, com 20% de células viáveis, foram significativamente mais sensíveis do que as células LKB1^{-/-}, com 90% de células viáveis, após 48 horas de tratamento. Ambas as células responderam com efeito dose resposta. Não houve diferença nos resultados quando as células foram tratadas por 72 horas. A lovastatina induziu a fosforilação de LKB1 e AMK que estava associada com mudanças na função mitocondrial da célula e a baixos níveis de ATP. Além disso, regulou subprodutos da via do EGFR (pAKT), reguladores do ciclo celular, ciclina D1 e p21.

A sinvastatina pode suprimir efetivamente a sobrevivência celular e a atividade de invasão das células de HNSCC. Essas atividades estão associadas com a inativação de moléculas de adesão celular, a transdução de sinais das vias metabólicas, e a ativação de inibidores de p21 e p27 e caspase-3. Esse composto quando utilizado para tratar células de HNSCC em doses de 5-10 μ M demonstrou regular a expressão de caspase-3 ativa, inibir a proliferação celular, mantendo as células na fase G0/G1 e ainda alterou a morfologia celular e diminuiu a viabilidade celular, em efeito dose dependente (TAKEDA *et al.*, 2006).

Llobet *et al.* (2014) apresentaram resultados satisfatórios em células de câncer de faringe (FaDu) tratadas com sinvastatina em combinação com radiação e cetuximab. Verificaram que esse tipo de terapêutica diminui a proliferação celular, retarda o crescimento tumoral e induz apoptose celular. A expressão de capsase- 3 foi demonstrada após o tratamento com a sinvastatina ($p < 0,05$) quando comparado com tratamento com radiação combinado com cetuximab somente. A sinvastatina em conjunto com a radiação não modificou os níveis de EGFR fosforilada e apresentou pouco efeito na ativação de AKT e STAT3 fosforilada.

Dayekh, *et al.*, 2014 utilizaram a monesina, lovastatina e erlotinib isoladamente e em conjunto para tratar SCC9, SCC25 e GM-38 (fibroblastos de pulmão). Eles confirmaram a habilidade da monensina de potencializar o efeito citotóxico do erlotinib e da lovastatina e mostraram que a combinação de 5 μ mol/L de monensina com 10 μ mol/L de erlotinib por 24 horas levou a 38,7% de apoptose em células SCC25. Não utilizaram a lovastatina no ensaio

de citometria de fluxo. Com o ensaio de *western blot* os autores encontraram que a monensina pode inibir a fosforilação do EGFR e regular as proteínas AKT e ERK em células SCC9 tratadas com 10 μ mol/L de lovastatina por 24 horas.

5.5 RISCO DE VIÉS ENTRE OS ESTUDOS

Os estudos selecionados para esta análise foram considerados heterogêneos, e não apresentaram compatibilidade de dados que permitiriam uma metanálise. Além disso não foi possível realizar metanálise pois somente estudos *in vitro* foram incluídos nesta revisão sistemática.

6 DISCUSSÃO

A incidência do HNSCC tem aumentado significativamente em todo o mundo e o seu tratamento tem se tornado um estímulo para a busca de novas alternativas terapêuticas, que sejam mais seletivas e eficazes (PETTI, 2009; WARNAKULASURIYA, 2009; KUNDU *et al.*, 2012).

Os principais fatores de risco para o HNSCC são o fumo e o álcool. No entanto, evidências têm demonstrado que este tipo de câncer pode ocorrer pela infecção com o vírus HPV, mais especificamente o subtipo 16 que atinge particularmente as tonsilas (THAVARAJ *et al.*, 2011). O índice de sobrevida destes pacientes é de aproximadamente cinco anos e pode ocorrer variavelmente em 50-60% dos acometidos com HNSCC. Isto ocorre devido ao diagnóstico da doença ser realizado em estágios avançados e pela elevada probabilidade de invasão local e metástase deste tipo de tumor (WARNAKULASURIYA, 2009; SCULLY; BAGAN, 2009). Tumores avançados e metástases são frequentemente tratados com terapias que combinam ressecção cirúrgica seguida de radioterapia ou quimioterapia (BELCHER *et al.*, 2014). Atualmente, o emprego dessas terapias tem conseguido controlar o avanço dos estágios do HNSCC, desde que o seu diagnóstico seja realizado no estágio inicial, o que proporciona ao paciente um aumento de sua sobrevida e melhores prognósticos (PSYRRI; FOUNTZILAS, 2006). Porém todos esses tratamentos estão associados a efeitos adversos expressivos como dermatite, mucosite e diarreia, que reduzem consideravelmente a qualidade de vida do paciente (SCLUMPF *et al.*, 2013). Desta forma, é necessário delinear a busca de novas perspectivas e abordagens terapêuticas que possam diminuir os efeitos citotóxicos dos medicamentos e aumentar as chances de sucesso do tratamento dos pacientes com HNSCC (KUNDU *et al.*, 2012).

As estatinas são drogas inibidoras da enzima HMG-CoA *reductase* e são utilizadas mundialmente com a finalidade de reduzir os níveis de colesterol no sangue e tratar doenças cardiovasculares (ENDO, 1992). Estes medicamento são utilizados com segurança pois reduzem a morbidade e mortalidade dos pacientes que os usam (ENDO, 1992). No entanto é notório na literatura que o tratamento com as estatinas pode ser favoravelmente promissor quando utilizado como coadjuvante às terapias convencionais, já que estas medicações possuem efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos nas células de câncer (CHAN; OZA; SIU, 2005).

Sendo assim, esta revisão sistemática foi realizada com o intuito de encontrar estudos que pudessem esclarecer o efeito das estatinas em células de HNSCC. Após realizar um

levantamento bibliográfico minucioso foram encontrados quatorze estudos *in vitro* (DIMITROULAKOS *et al.*, 2001; DIMITROULAKOS *et al.*, 2002; MANTHA *et al.*, 2003; MANTHA *et al.*, 2005; PIOCHE- DURIEU *et al.*, 2005; TAKEDA *et al.*, 2006; NIKNEJAD *et al.*, 2007; GABRYŚ *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2011; MA *et al.*, 2012; ISLAM *et al.*, 2013; DAYEKH *et al.*, 2014; LLOBET *et al.*, 2014; NIKEJAD *et al.*, 2014), que testaram os compostos derivados das estatinas (lovastatina, sinvastatina, atorvastatina e pravastatina) em linhagens celulares de HNSCC e confirmaram através de seus experimentos que estas drogas possuem efeitos antitumorais significativos. Para avaliar os efeitos *in vitro* das estatinas em HNSCC, a maioria dos autores iniciou suas pesquisas verificando os índices de viabilidade celular utilizando, para este fim, os ensaios de MTT (DIMITROULAKOS *et al.*, 2001; DIMITROULAKOS *et al.*, 2002; MANTHA *et al.*, 2003; MANTHA, *et al.*, 2005; TAKEDA *et al.*, 2006; NIKNEJAD; MORLEY; DIMITROULAKOS, 2007; WANG *et al.*, 2011; NIKNEJAD *et al.*, 2014) e azul de tripan (GABRYS *et al.*, 2008). Os resultados destes experimentos concluíram que as estatinas quando utilizadas sozinhas poderiam inviabilizar mais de 50% das células e inibir sua proliferação (Quadro 7). O efeito das estatinas também foi avaliado em combinação com radiação (GABRYS *et al.*, 2008) ou com outros quimioterápicos convencionais (cisplatina, 5-fluorouracil, paclitaxel, carboplatina, e oxaplatina) (MANTHA *et al.*, 2003). Essas terapias não aumentaram significativamente os efeitos apoptóticos da lovastatina nas células de HNSCC, quando utilizadas juntamente outras terapias. No entanto, quando a lovastatina foi utilizada em combinação com o gefitinib em células SCC9, houve um aumento de morte celular de 90% quando comparada com o tratamento de cada droga utilizada isoladamente (MANTHA *et al.*, 2003; MA *et al.*, 2012). Resultados semelhantes foram relatados por Dayekh *et al.* (2014) quando utilizaram a lovastatina combinada com a monensina e o erlotinib. Llobet *et al.* (2014) relataram que a sinvastatina pode sim aumentar a resposta antitumoral quando em combinação com radiação e cetuximab. Eles concluíram que a sinvastatina pode diminuir a proliferação celular, formação de colônia e podem induzir apoptose nas células FaDu.

Os compostos derivados das estatinas são potenciais inibidores da enzima HMG-CoA *reductase*, derivada da via do mevalonato (ENDO, 1992; MANTHA *et al.*, 2003; NIKNEJAD; MORLEY; DIMITROULAKOS, 2007; LEEMANS *et al.*, 1997). A via do mevalonato produz vários produtos finais que são extremamente críticos para diferentes funções celulares incluindo o colesterol, dolicol, ubiquinona, isopenteniladenina, pirofosfato de geranil e pirofosfato de farnesil (GOLDSTEIN; BROWN, 1990). O colesterol é essencial para manter a integridade da estrutura da membrana celular. O dolicol funciona como carreador de

oligossacarídeos. A ubiquinona está envolvida na respiração mitocondrial enquanto que a isopenteniladenina é um substrato essencial para a modificação de certos tRNAs (GOLDSTEIN; BROWN, 1990; CHAN; OZA; SIU, 2003). O pirofosfato de geranyl e farnesil promovem a ativação de proteínas da super família Ras e outras proteínas ligantes do GTP como os membros das famílias Rab, Rac e Rho (CORSINI; MAGGI; CATAPANO, 1995; CHAN; OZA; SIU, 2003; ISLAM *et al.*, 2013). Estas proteínas regulam a proliferação celular, o tráfico intracelular e a mobilidade celular. O bloqueio da via do mevalonato pela enzima HMG-CoA *reductase* resulta numa diminuição dos níveis de mevalonato e seus subprodutos. A inibição da HMG-CoA *reductase* tem sido considerada uma alternativa relevante para terapias de câncer devido a sua habilidade em inibir a proliferação e mobilidade celular e induzir apoptose e metástase tumoral (WONG *et al.*, 2002).

A sinvastatina pode regular a expressão de ERK1/2 e de p21 e p27, que são reguladores do ciclo celular, em células de HNSCC. A atorvastatina também demonstrou reduzir ERK1, assim como STAT3 e forma ativa da proteína Rho. E ainda diminui a mobilidade, proliferação e formação de colônia celular. Utilizando modelo animal implantado com células UM-SCC 47 e tratado com atorvastatina, obtiveram como resultado uma diminuição do crescimento tumoral. Por outro lado, Llobet *et al.* (2014) relataram que a sinvastatina não produziu efeito nos níveis totais de EGFR, ERK1/2 e STAT3 quando usaram combinação de tratamento com radiação e cetuximab para tratar FaDu.

As estatinas demonstraram inibir as vias do mevalonato, PI3K/AKT e mTOR. Além disso, elas podem inibir a função do EGFR e desta forma regular a via LKB1/AMPK (MANTHA *et al.*, 2003; MA *et al.*, 2012). Em estudo utilizando a lovastatina em combinação com o gefitinib, ficou comprovado que a lovastatina aumenta a citotoxicidade das células tumorais que expressam LKB1, porém a mesma situação ocorre naquelas células que não expressam a proteína LKB1. Esse fato sugere que enquanto a via LKB1/AMPK pode regular a citotoxicidade celular através do tratamento com lovastatina, outras vias de indução tumoral também podem ser reguladas pelo uso deste tipo de estatina (MA *et al.*, 2012). Estes achados reforçam a afirmação de que as estatinas possuem a capacidade de inibir a atividade de várias vias metabólicas de sinalização o que leva a considerar a potencial abrangência de suas propriedades terapêuticas.

As estatinas têm a habilidade de influenciar as vias de indução mediada pelo estresse metabólico (ISR) e pela expressão de ATF3, que regulam a apoptose celular no carcinoma de cabeça e pescoço. O Salubrinal, um agente que é capaz de prolongar a atividade do estresse induzido pela expressão de ATF3, quando usado em combinação com a lovastatina pode

aumentar a citotoxicidade celular e induzir apoptose. O estudo sugeriu que esta combinação pode ser utilizada clinicamente (NIKNEJAD; MORLEY; DIMITROULAKOS, 2007).

A proteína p21, demonstrou inibir a proliferação e a progressão do ciclo celular contribuindo para supressão tumoral (GARTEL; RADHASKRISHNAN, 1997). Estudos demonstraram que a sinvastatina pode regular a expressão de proteínas relacionadas com a progressão do ciclo celular (p21 e p27) em células de HNSCC (TAKEDA *et al.*, 2011; LLOBET *et al.*, 2014). Regulando a expressão de p21, a lovastatina mantém as células na fase G1 e impedem a proliferação celular (KEYOMARSI *et al.*, 1992). O tratamento com as estatinas em células de câncer oral demonstrou um pico pronunciado em G1, e diminuiu a população celular total na fase S, ocasionando apoptose celular (NIKNEJAD; MORLEY; DIMITROULAKOS, 2007; MANTHA *et al.*, 2003; GABRYS *et al.*, 2008; TAKEDA *et al.*, 2011).

Em síntese, esta é a primeira revisão sistemática que avaliou os efeitos *in vitro* das estatinas no tratamento de HNSCC e é a primeira revisão que apresenta evidências de que as estatinas podem diminuir a viabilidade celular do HNSCC. Uma revisão sistemática realizada por Dale *et al.*, em 2006, concluiu que o uso das estatinas não promove efeitos significantes nos casos de câncer. Os estudos revisados foram todos ensaios clínicos randomizados. Porém, os autores não encontraram estudos que relatassem os efeitos antitumorais no HNSCC. De fato somente um estudo clínico foi encontrado que utilizou uma administração prolongada de lovastatina em pacientes com casos de recorrência e metástases de HNSCC. Os autores afirmaram que a estabilização da doença ocorreu em 23% dos casos de HNSCC tratados (KNOX *et al.*, 2005).

Os estudos avaliados pela presente revisão sistemática confirmaram os efeitos antitumorais *in vitro* das estatinas e evidenciaram que os compostos derivados das estatinas possuem um potencial terapêutico promissor para serem adicionados à terapia padrão para o HNSCC. Assim, as estatinas podem representar uma nova abordagem terapêutica a ser utilizada no tratamento do HNSCC. Para isso estudos clínicos são necessários de forma que venham elucidar o efeito das estatinas como coadjuvante do tratamento convencional nos casos de carcinoma de cabeça e pescoço (KNOX *et al.*, 2005).

6.1 LIMITAÇÕES

Algumas limitações metodológicas para este estudo podem ser consideradas. Após levantamento bibliográfico, dos 153 artigos encontrados, somente 14 estudos atenderam os critérios de inclusão. Estes estudos são *in vitro* e *in vivo* (animal). Como não há nenhum método de avaliação padrão para estudo *in vitro*, nós adaptamos a estratégia PICOS para estes estudos e escolhemos o método *GRADE* para avaliar a qualidade das evidências destas pesquisas por serem estudos de intervenção. Seis estudos foram categorizados com qualidade moderada (DIMITROULAKOS *et al.*, 2001; DIMITROULAKOS *et al.*, 2002; PIOCHEDURIEU *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2011; ISLAM *et al.*, 2013; LLOBET *et al.* 2014), já que no geral, não responderam completamente a pergunta principal desta revisão sistemática.

Não é possível realizar análises clínicas a respeito do uso das estatinas no tratamento do carcinoma de cabeça e pescoço a partir desta revisão sistemática devido a falta de evidências clínicas reportadas, já que os estudos avaliados foram *in vitro*.

7 CONCLUSÕES

O presente estudo confirmou que as estatinas têm efeito significativo quando utilizadas como tratamento *in vitro* em células de carcinoma de cabeça e pescoço. As estatinas regulam a viabilidade, morte e ciclo celular, assim como regulam os níveis da expressão de proteínas envolvidas nas vias de carcinogênese. Embora exista poucos estudos sobre o tema, as evidências atuais sugerem que as estatinas são medicamentos com potencial efeito em células de HNSCC, podendo ser utilizada como agente adjuvante à quimioterapia e/ou radioterapia, tratamentos rotineiramente utilizados para o câncer. Futuras pesquisas clínicas são necessárias para confirmar esses efeitos em pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço.

REFERÊNCIAS

- Adachi MI, Cui C, Dodge CT, Bhayani MK, Lai SY. Targeting STAT3 inhibits growth and enhances radiosensitivity in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2012;48(12):1220-6.
- Alberts AW, et al. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 77:3957-61.
- Altman SA, Randers L, Rao G. Comparison of Trypan Blue Dye Exclusion and Fluorometric Assays for Mammalian Cell Viability Determinations. *Biotechnology Progress* 1993; 9(6): 671-674.
- Altman JK, Sassano A, Plataniak LC. Targeting mTOR for the treatment of AML. *New agents and new directions. Oncotarget* 2011; 2:510-07.
- Baigent, C; Keech, A, Kearney, PM et al. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90 056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* 2005; 366: 1267-78.
- Belcher R, Hayes K, Fedewa S, Chen AY. Current treatment of head and neck squamous cell cancer. *J Surg Oncol* 2014; 110:551-74.
- Bennis F, Favre G, Le Gaillard F, Soula G. Importance of mevalonate- derived products in the control of HMG-CoA reductase activity and growth of human lung adenocarcinoma cell line A549. *Int J Cancer* 1993; 55: 640-645.
- Blais L, Desgagne A, LeLorier J. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors and the risk of cancer: a nested case-control study. *Arch Intern Med* 2000; 160: 2363-68.
- Blau L, Bittman R. Cholesterol distribution between the two halves of the lipid bilayer of human erythrocyte ghost membranes. *J Biol Chem* 1978; 253: 8366-68.
- Brown MS, Goldstein JL. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990; 343:425-30.
- Buchwald H. Cholesterol inhibition, cancer, and chemotherapy. *Lancet* 1992; 339(8802):1154-06.
- Carnero A, Blanco-Aparicio C, Renner O, Link W, Leal JF. The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets* 2008;8:187-98.
- Caruso MG, Notarnicola M, Santillo M, Cavallini A, Di Leo A. Enhanced 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase activity in human colorectal cancer not expressing low density lipoprotein receptor. *Anticancer Res* 1999; 19: 451-454.
- Corsini A, Maggi FM, Catapano AL. Pharmacology of competitive inhibitors of HMG-CoA reductase. *Pharmacol Res* 1995; 31:9-27.
- Chan KK, Oza AM, Siu LL. The statins as anticancer agents. *Clin Cancer Res* 2003; 9:10-19.

- Dale KM, Coleman CI, Henyan NN, Kluger J, White CM. Statins and cancer risk: a meta-analysis. *JAMA* 2006; 295:74-80.
- Dayekh, K, Johnson-Obaseki, Corsten, M, Villeneuve, P, Sekhon, H, Weberpals, J et al. Monensin inhibits epidermal growth factor receptor trafficking and activation: Synergistic cytotoxicity in combination with EGFR inhibitors. *Mol Cancer Ther* 2014; 13:2559-71.
- Deisenhofer J, Istvan ES. Structural mechanism for statin inhibition of HMGCoA reductase. *Science* 2001; 292:1160–64.
- Dimitroulakos J, Marhin WH, Tokunaga J, Irish J, Gullane P, Penn LZ, et al. Microarray and biochemical analysis of lovastatin-induced apoptosis of squamous cell carcinomas. *Neoplasia* 2002; 4:337-46.
- Dimitroulakos J, Ye LY, Benzaquen M, Moore MJ, Kamel-Reid S, Freedman MH, et al. Differential sensitivity of various pediatric cancers and squamous cell carcinomas to lovastatin-induced apoptosis: therapeutic implications. *Clin Cancer Res* 2001; 7:158-67.
- Endo A. A historical perspective on the discovery of statins. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Bio Sci* 2010; 86:484-93.
- Endo A. The discovery special article and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *J Lip Res* 1992; 33:1569-82.
- Endo A. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinium*. *J Antibiot* 1976; 29:1346–48.
- Fisher DE. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell* 1994. 78: 539-542.
- Freed-Pastor WA, Mizuno H, Zhao X, et al. Mutant p53 disrupts mammary tissue architecture via the mevalonate pathway. *Cell* 2012;148:244-58.
- Gabry's D, Dörfler A, Yaromina A, Hessel F, Krause M, Oertel R, et al. Effects of lovastatin alone or combined with irradiation on tumor cells in vitro and in vivo. *Strahlenther Onkol* 2008; 184:48-53.
- Gartel AL, Radhaskrishnan SK. Lost in transcription: p21 repression, mechanisms and consequences. *Cancer Res* 2005; 65:3980-5.
- Graaf M, Beiderbeck A, Egberts A, et al. The risk of cancer in users of statins. *J Clin Oncol* 2004; 22: 2388–94.
- Grandis JR, Tweardy DJ. Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor Messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res.* 1993;53:3579–84.
- Guyatt, G, Oxman AD, Akl EA, Kunz R, Vist G, Brozek J, et al. GRADE guidelines: 1. Introduction - GRADE evidence profiles and summary of findings tables. *J Clin Epidemiol* 2011; 64:383-94.
- Grundy, S. M. HMG-CoA reductase inhibitors for treatment of hypercholesterolemia. *N. Engl. J Med* 1988; 319:(1):24-33.
- Hanahan D, Weinberg, RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 100. 2000; 57–70.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144(5):646-74.

- Harwood HJ Jr, Alvarez IM, Noyes WD, Stacpoole PW. In vivo regulation of human leukocyte 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: increased enzyme protein concentration and catalytic efficiency in human leukemia and lymphoma. *J Lipid Res* 1991; 32: 1237–1252.
- Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolaemia. *Hum Mutat.* 1992; (1): 445–466.
- Islam M, Sharma S, Kumar B, Teknos TN. Atorvastatin inhibits RhoC function and limits head and neck cancer metastasis. *Oral Oncol* 2013; 49:778-86.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer Journal for Clinicians* 2009;59:225-249.
- Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* 2000; 256: 42–49.
- Kawata S, Takaishi K, Nagase T, Ito N, Matsuda Y, Tamura S, Matsuzawa Y, Tarui S. Increase in the active form of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in human hepatocellular carcinoma: possible mechanism for alteration of cholesterol biosynthesis. *Cancer Res* 1990; 50: 3270–3273.
- Keyomarsi, K., Sandoval, L., Band, V., and Pardee, A. B. Synchronization of tumor and normal cells from G1 to multiple cell cycles by Lovastatin. *Cancer Res.* 1991; 51: 3602–3609.
- Knox JJ, Siu LL, Chen E, Dimitroulakos J, Kamel-Reid S, Moore MJ, et al. A Phase I trial of prolonged administration of lovastatin in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck or of the cervix. *Eur J Cancer* 2005; 41:523-30.
- Kundu SK, Nestor M. Targeted therapy in head and neck cancer. *Tumour Biol* 2012; 33:707-21.
- Kuoppala J, Lamminpää A, Pukkala E. Statins and cancer: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer.* 2008 ;44(15):2122-32.
- Kusama, T., Mukai, M., Iwasaki, T., Tatsuta, M., Matsumoto, Y., Akedo, H., and Nakamura, H. Inhibition of epidermal growth factor induced RhoA translocation and invasion of human pancreatic cancer cells by 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase inhibitors. *Cancer Res* 2001; 61: 4885–4891.
- Lennernäs H, Fager G. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors. Similarities and differences. *Clin Pharmacokinet* 1997; 32:403-25.
- Llobet, L, Baro , M, Mesia, R , Balart, J. Simvastatin enhances the effects of radiotherapy and cetuximab on a cell line (FaDu) derived from a squamous cell carcinoma of head and neck . *Transl Oncol* 2014; 7:513-22.
- Ma L, Niknejad N, Gorn-Hondermann I, Dayekh K, Dimitroulakos J. Lovastatin induces multiple stress pathways including LKB1/AMPK activation that regulate its cytotoxic effects in squamous cell carcinoma cells. *Plos One* 2012; 7: e46055.
- Mantha AJ, Hanson JE, Goss G, Lagarde AE, Lorimer IA, Dimitroulakos J. Targeting the mevalonate pathway inhibits the function of the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 2005; 11:2398-07.

- Mantha AJ, McFee KE, Niknejad N, Goss G, Lorimer IA, Dimitroulakos J. Epidermal growth factor receptor-targeted therapy potentiates lovastatin-induced apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003; 129:631-41.
- Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG; The PRISMA Group. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *Ann Intern Med* 2009; 151:264-69.
- Molinolo AA, Amornphimoltham P, Squarize CH, Castilho RM, Patel V, Gutkind JS. Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. *Oral Oncol* 2009;45:324-34.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.
- Niknejad N, Gorn-Hondermann I, Ma L, Zahr S, Johnson-Obeseki S, Corsten M, et al. Lovastatin-induced apoptosis is mediated by activating transcription factor 3 and enhanced in combination with salubrinal. *Int J Cancer* 2014; 134:268-79.
- Niknejad N, Morley M, Dimitroulakos J. Activation of the integrated stress response regulates lovastatin-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2007; 282:29748-56.
- Petti S. Lifestyle risk factors for oral cancer. *Oral Oncol* 2009; 45:340-50.
- Pioche-Durieu C, Keryer C, Souquöure S, Bosq J, Faigle W, Loew D, et al. In nasopharyngeal carcinoma cells, Epstein-Barr virus LMP1 interacts with galectin 9 in membrane raft elements resistant to simvastatin. *J Virol* 2005; 79:13326-37.
- Psyrris A, Fountzilias G. Advances in the treatment of locally advanced non-nasopharyngeal squamous cell carcinoma of the head and neck region. *Med Oncol* 2006; 23:1-15.
- Reinhart MP, Billheimer JT, Faust JR, Gaylor JL. Subcellular localization of the enzymes of cholesterol biosynthesis and metabolism in rat liver. *J Biol Chem* 1987; 262: 9649-55.
- Schachter M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundam Clin Pharmacol* 2005; 19(1):117-125.
- Schlumpf M, Fischer C, Naehrig D, Rochlitz C, Buen M. Results of concurrent radio-chemotherapy for the treatment of head and neck squamous cell carcinoma in everyday clinical practice with special reference to early mortality. *BMC Cancer* 2013; 13:610-17.
- Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. UICC TNM classification of malignant tumours. 7th ed. New York: Wiley-Liss, 2009.
- Sune F, Nielsen, Nordestgaard BG, Stig E. Bojesen. *N Engl J Med* 2012; 367:1792-802.
- Takeda I, Maruya S, Shirasaki T, Mizukami H, Takahata T, Myers JN, et al. Simvastatin inactivates beta1-integrin and extracellular signal-related kinase signaling and inhibits cell proliferation in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Cancer Sci* 2007; 98:890-9.
- Taylor ML, Wells BJ, Smolak MJ. Statins and cancer: a meta-analysis of case-control studies. *Eur J Cancer Prev*. 2008 Jun;17(3):259-68.

Thavaraj S, Stokes A, Guerra E, Bible J, Halligan E, Long A, et al. Evaluation of human papillomavirus testing for squamous cell carcinoma of the tonsil in clinical practice. *J Clin Pathol* 2011; 64:308-12.

The Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease. *Lancet* 1994; 344:1383–89.

Vargas-Ferreira F, Nedel F, Etges A, Gomes AP, Furuse C, Tarquinio SB. Etiologic factors associated with oral squamous cell carcinoma in non-smokers and non-alcoholic drinkers: a brief approach. *Braz Dent J.* 2012; 23(5): 586-90.

Wang W, Le W, Cho DY, Hwang PH, Upadhyay D. Novel effects of statins in enhancing efficacy of chemotherapy in vitro in nasopharyngeal carcinoma. *Int Forum Allergy Rhinol* 2011; 1:284-9.

Warnakulasuriya S. Causes of oral cancer – an appraisal of controversies. *Br. Dent. J.*, v. 207, n. 10, p. 471-5, nov. 2009.

Xiao Z, Li C, Shan J, Luo L, Feng L, Lu J, et al. Interventions to improve chronic cyclosporine. A nephrotoxicity through inhibiting renal cell apoptosis: a systematic review. *Chinese Med J.* 2013; 126:3767-7.

ANEXOS

ANEXO “A” - PRISMA CHECKLIST EM PORTUGUÊS

TÓPICOS	#	ITENS DA LISTA DE VERIFICAÇÃO	Página
TÍTULO			
Título	1	Identificar o artigo como revisão sistemática metanálise ou ambos.	1
RESUMO			
Sumário	2	Providenciar um sumário incluindo: resumo, fonte de dados, critério de elegibilidade, participantes, e intervenções; resultados, limitações, conclusões; número de registro da revisão sistemática.	8/9
INTRODUÇÃO			
Justificativa	3	Descrever a justificativa para revisão baseado no que já existe em literatura.	17
Objetivos	4	Fornecer uma declaração da questão norteadora a ser abordada em relação ao método PICOS (referência aos participantes, intervenções, as comparações, os resultados, e desenho do estudo).	30
MÉTODOS			
Protocolo e registro	5	Indicar se existe um protocolo de registro e onde é possível acessá-lo (ex. Endereço eletrônico) e se disponível incluir o número do protocolo de registro.	31
Critério de Elegibilidade	6	Especificar as características dos estudos (ex. PICOS) e fazer um relatório com essas características (ex. Ano do estudo, idioma, status de publicação) utilizadas para o critério de elegibilidade, justificando-as.	31
Fonte de informações	7	Descrever todas as fontes de informação da busca (ex. bancos de dados, o contato com autores do estudo) e última data de pesquisa.	33
Busca	8	Apresentar a estratégia completa de busca eletrônica de pelo menos uma base de dados, incluindo quaisquer limites utilizados.	33
Seleção dos estudos	9	Notificar todo o processo de seleção dos estudos (isto é, identificação, a elegibilidade, incluídas na revisão sistemática, e, se for o caso, incluídos na metanálise).	35
Processo de coleta de Dados	10	Descrever como foi realizado o processo de coleta dos dados dos artigos (por exemplo, somente um autor, ou mais) ou quaisquer processos seleção, sempre confirmando os dados que os investigadores descrevem.	35
Itens dos dados	11	Listar e definir todas as variáveis para as quais os dados foram procurados (por exemplo, PICOS, fontes de financiamento) e todos os pressupostos e simplificações feitas.	-
Risco de viés individual	12	Descrever os métodos utilizados para avaliar o risco de viés dos estudos (incluindo especificações se isso foi feito a nível de estudo ou resultado), e como utilizá-la.	36
Medidas de sumarização	13	Indicar as principais medidas de sumarização (ex. relação de risco, diferenças entre os estudos).	38
Síntese dos resultados	14	Descrever os métodos de manipulação de dados e combinação de resultados de estudos, se realizado, incluindo medidas de consistência (ex. I2) para cada metanálise.	38
Risco de viés entre os estudos	15	Especificar qualquer avaliação de risco de viés que pode afetar a evidência cumulativa (ex. viés de publicação, o relatório seletivo dentro dos estudos).	38
Análises adicionais	16	Descrever os métodos de análises adicionais (ex. sensibilidade ou análises de subgrupos, meta-regressão), se feito, indicando que foram pré-especificado.	-

TÓPICOS	#	ITENS DA LISTA DE VERIFICAÇÃO	Página
RESULTADOS			
Seleção dos estudos	17	Enumerar a quantidade de estudos selecionados, avaliados para elegibilidade, e incluídos na revisão, com razões de exclusão em cada fase, de preferência com um fluxograma.	39
Característica dos estudos	18	Para cada estudo, apresentar características para o qual os dados foram extraídos (por exemplo, o tamanho do estudo, PICOS) e fornecer as citações.	39
Risco de viés	19	Apresentar os dados sobre risco de viés de cada estudo e, se disponível, qualquer avaliação do resultado (veja o item 12).	52
Resultado do estudo individual	20	Para todos os resultados considerados (benefícios ou prejuízos), apresentar para cada estudo: (a) os dados de resumo simples para cada grupo de intervenção (b) pareceres de efeito e intervalos de confiança.	-
Síntese dos resultados	21	Apresentar resultados de cada meta-análise feita, incluindo intervalos de confiança e medidas de coerência.	56
Risco de viés entre os estudos	22	Apresentar resultados de qualquer avaliação de risco de viés entre os estudos (ver item 15).	59
Análises adicionais	23	Fornecer resultados de análises adicionais, se for feito (ex. sensibilidade ou análises de subgrupos, meta regressão [ver item 16]).	-
Resultado do estudo individual	20	Para todos os resultados considerados (benefícios ou prejuízos), apresentar, para cada estudo: (a) os dados de resumo simples para cada grupo de intervenção (b) estimativas de efeito e intervalos de confiança.	-
Síntese dos resultados	21	Apresentar resultados de cada meta-análise feita, incluindo intervalos de confiança e medidas de coerência.	56
Risco de viés entre os estudos	22	Apresentar resultados de qualquer avaliação de risco de viés entre os estudos (ver item 15).	59
Análises adicionais	23	Fornecer resultados de análises adicionais, se for feito (ex. sensibilidade ou análises de subgrupos, meta regressão [ver item 16]).	-
DISCUSSÃO			
Resumo de Evidências	24	Resumir as principais conclusões, incluindo a determinação da evidência para cada resultado principal; considerar a sua relevância para grupos-chave (ex. os profissionais de saúde, usuários e decisores políticos).	60
Limitações	25	Discutir limitações no estudo e nível de resultados (ex. risco de viés), e nível da avaliação (ex. recuperação incompleta de investigação identificada, relatando viés).	64
Conclusões	26	Fornecer uma interpretação geral dos resultados no contexto de outras provas e implicações para futuras pesquisas.	65
FINANCIAMENTO			
Financiamento	27	Descrever as fontes de financiamento para a revisão sistemática e outros tipos de apoio (ex. fornecimento de dados); papel dos financiadores para a revisão sistemática.	-

Fonte: Traduzido de Moher *et al.*, 2009.

ANEXO “B” – E-mail PROSPERO

Dear Mr Rodrigues Rezende Costa

Thank you for submitting details of your systematic review *In vitro effects of plants in the wound healing of the periodontal ligament: A Systematic Review*. to the PROSPERO register.

We regret that the information you have provided fails to meet the requirements for inclusion. Specifically, reviews of in-vitro studies are not eligible for inclusion in PROSPERO.

We hope that this will not discourage you from registering your next systematic review at the protocol stage, with PROSPERO.

Yours sincerely

PROSPERO Administrator

Centre for Reviews and Dissemination

University of York

York YO10 5DD

t: +44 (0) 1904 321040

f: +44 (0) 1904 321041

e: CRD-register@york.ac.uk

www.york.ac.uk/inst/crd

CRD is part of the National Institute for Health Research and is a department of the University of York.

Email disclaimer: <http://www.york.ac.uk/docs/disclaimer/email.htm>

APÊNDICES

APÊNDICE “A” – Artigos Excluídos e Razões de Exclusão (n=4)

Autor e ano	Razões para exclusão
Avgoustidis, <i>et al.</i> , 2012 [1]	1
Deng, <i>et al.</i> , 2011 [2]	1
Knox, <i>et al.</i> , 2005 [4]	3
Miglierini, <i>et al.</i> , 2013 [3]	2

Onde:

- 1- Artigos que não verificaram associação entre as estatinas e este tipo de câncer (n=2);
- 2- Revisões de literatura, cartas, relatos de casos clínicos, resumos, opiniões pessoais, resumos em conferências, cartas ao editor, teses e capítulos de livro (n=1);
- 3- Estudos clínicos (n=1).

REFERÊNCIAS

1. Avgoustidis D, Nisyrios T, Nkenke E, Lijnen R, Ragos V, Perrea D, Donta I, Vaena A, Yapijakis C, Vairaktaris E. Oral carcinogenesis is not achieved in different carcinogen-treated PAI-1 transgenic and wild-type mouse models. *In Vivo*. 2012 Nov-Dec; 26(6): 1001-5.
2. [Deng YT](#), [Chang JZ](#), [Yeh CC](#), [Cheng SJ](#), [Kuo MY](#). Arecoline stimulated Cyr61 production in human gingival epithelial cells: inhibition by lovastatin. *Oral Oncol*. 2011 Apr; 47(4):256-61.
3. Knox JJ, Siu LL, Chen E, Dimitroulakos J, Kamel-Reid S, Moore MJ, Chin S, Irish J, LaFramboise S, Oza AM. A Phase I trial of prolonged administration of lovastatin in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck or of the cervix. *Eur J Cancer*. 2005; 41 (4): 523.
4. Miglierini, P, Rave-Frank M, Wolff H, Pradier O. In vitro effects of the combination of Lovastatin and irradiation on human cell lines. Conference: 19. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie, DEGRO 2013, pg 189. Journal: Conference Abstract.

APÊNDICE “B” – Artigo Científico Publicado

In vitro Anti-Tumor Effects of Statins on Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review

- Ludmila Madeira Cardoso Pavan,
- Daniela Fortunato Rêgo,
- Silvia Taveira Elias,
- Graziela De Luca Canto,
- Eliete Neves Silva Guerra



- Published: June 22, 2015
- DOI: 10.1371/journal.pone.0130476

Abstract

Background

Statins are commonly used against arteriosclerotic disease, but recent retrospective analyses have suggested that statins also prevent cancer. The aim of this systematic review is to verify the *in vitro* anti-tumor effects of statins on head and neck squamous cell carcinoma.

Methods

Studies were gathered by searching Cochrane, MEDLINE, EMBASE, LILACS, and PubMed, up until May 9, 2015, with no time or language restrictions. Only *in vitro* studies that discuss the effect of statins on head and neck carcinoma were selected.

Results

Of 153 identified papers, 14 studies met the inclusion criteria. These studies demonstrated that statins had a significant effect on head and neck squamous cell carcinoma cell lines and influenced cell viability, cell cycle, cell death, and protein expression levels involved in pathways of carcinogenesis, which corroborates with the potential *in vitro* anti-tumor effects. It provides highlights about the biological mechanisms of statins used alone or associated with traditional therapy for cancer.

Conclusions

Though there are few studies on the topic, currently available evidence suggests that statins shows that preclinical experiments supports the potentiality of statin as an adjuvant agent in chemotherapy and/or radiotherapy approaches routinely used in the management of HNSCC and should undergo further clinical assessment.

Citation: Pavan LMC, Rêgo DF, Elias ST, De Luca Canto G, Guerra ENS (2015) In vitro Anti-Tumor Effects of Statins on Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review. PLoS ONE 10(6): e0130476. doi:10.1371/journal.pone.0130476

Editor: Saeid Ghavami, University of Manitoba, CANADA

Received: March 25, 2015; **Accepted:** May 20, 2015; **Published:** June 22, 2015

Copyright: © 2015 Pavan et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

Data Availability: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The authors have no support or funding to report.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

The statin family of drugs is known worldwide as a safe and effective therapeutic agent for the treatment of arteriosclerotic cardiovascular disease [1]. Statins prevent the synthesis of cholesterol in the liver and reduce the levels of low-density lipoprotein (LDL), lipids, and blood cholesterol, which in turn significantly increases the survival of patients [2]. Statins are potential inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl reductase A (HMG-CoA), an enzyme involved in the mevalonate pathway [2, 3, 4]. The use of HMG-CoA reductase inhibitors to inhibit the rate-limiting step of the mevalonate pathway results in decreased levels of mevalonate and its downstream products; this may significantly influence many critical cellular functions [5]. Statins have the potential to exert pleiotropic cellular effects and can inhibit the growth, invasion, metastasis, cellular proliferation and differentiation, and cell cycle regulation of tumor cells [6, 7, 8]. These drugs also induce apoptosis, and when used alone can stabilize the disease especially in squamous cell carcinoma [9, 10].

Statins have demonstrated an ability to enable different tumor induction pathways, mediated by metabolic stress that regulates tumor cell apoptosis. By inhibiting the mevalonate pathway, statins can inhibit the function of epidermal growth receptor (EGFR), which inhibits the mammalian target of rapamycin (mTOR) cascade and the phosphoinositide 3-kinase (P13K/AKT) pathway [8, 11]. Additionally, they regulate

translation of mRNA that encodes pro-oncogene proteins, thereby inhibiting both proliferation and survival of malignant cells [12]. Oral and pharyngeal cancers are the sixth most common form of cancer in the world. The risk of developing oral cancer increases with age, and the majority of cases occur in people aged 50 or over. In most countries, five-year survival rates for cancers of the tongue, oral cavity, and oropharynx are around 50%, although many patients who are successfully treated for oral cancer have to cope with the devastating consequences of their treatment [13]. Thus, the concept of using statin as a chemopreventive agent to control carcinogenesis is promising [14,15]. Recent retrospective analyses have suggested that statins also prevent cancer [3, 6, 7, 8,9, 10, 11]. Therefore, the aim of this systematic review is to use the available literature to verify the *in vitro* anti-tumor effects of statins on head and neck squamous cell carcinoma.

Methods

Protocol and registration

The Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis (PRISMA) Checklist was followed in this systematic review [16]. We did not register a protocol.

Eligibility criteria

Inclusion criteria.

We selected only articles that compared the effect of statins to control substances in the context of squamous cell carcinoma treatment. The cell lines used should be from head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), such as cells from lip and/or oral cavity, pharynx, larynx, nasal cavity, and paranasal sinuses [17]. All of the included papers were *in vitro* or *in vivo* animal studies. The PICOS (population, intervention, comparison, outcome, study design) format was adapted to define a clinical question with the following inclusion criteria:

Population: Cells or animal.

Intervention: Statin use for prevention or treatment of HNSCC.

Comparison: Cells or animals that did not receive statin treatment but have received a control treatment.

Outcome: Cell viability, apoptosis, cell cycle arrest, and regulation of protein expression levels.

Study Design: Randomized or non-randomized controlled trials (*in vivo* animal studies) or studies with comparable or no comparable baseline (*in vitro* studies).

Exclusion criteria.

We have excluded: 1) Studies with different targets, such as ones that did not use statins to treat cancer or did not verify the association between statins and HNSCC; 2) Reviews of the literature, letters, case reports, personal opinions, conference abstracts, and book chapters; 3) Clinical studies.

Information sources and search strategies

A criteria search was performed using the following electronic bibliographic databases: Cochrane, MEDLINE, EMBASE, LILACS and PubMed. More information regarding the search strategies is provided in [S1 Table](#). The reference list was checked at the end of search. We conducted all searches across all databases from the earliest available date up May 9, 2105. We curated the references manually and removed duplicate hits.

Study selection.

We selected articles in two phases. In phase one, two authors (L.M.C.P, E.N.S.G) independently reviewed the titles and abstracts of all the references. The articles that appeared to meet the inclusion criteria based on their abstract were selected and collected. In phase two, two authors (L.M.C.P and E.N.S.G) read all the full-text articles and excluded those which were not in agreement with the inclusion criteria. The same two authors independently reviewed all full-text articles. Any disagreement between the authors in the first and second phases was resolved by means of discussion and mutual agreement. When they did not reach a consensus, a third author (S.T.E) intervened to make a final decision.

Data collection process and data items.

One author (L.M.C.P) collected the required information from the selected articles such as authors, year of publication, country, study design, assays, treatment used, results, and main conclusions ([Table 1](#)). A second author (E.N.S.) crosschecked all of the retrieved information. Again, any disagreement was resolved by means of discussion and mutual agreement between the two authors. When they did not reach a consensus, a third author (S.T.E.) intervened to make a final decision.

Table 1. Summary of descriptive characteristics of included articles (n = 14).

doi:10.1371/journal.pone.0130476.t001

Risk of bias in individual studies.

The authors methodically appraised all of the selected studies according to the GRADE method to judge the quality of evidence [18]. Two authors (L.M.C.P and E.N.S.G) categorized the included articles as “high”, “moderate”, “low” or “very low” quality, according to their analysis of each study. When they did not reach a consensus regarding the quality, a third author (S.T.E.) intervened to make a final decision. We classified studies with comparable baselines, which were compared as a Randomized Controlled Study (RCT), according to the work of Xiao et al. published in 2013 [19].

Summary measures.

Cell viability, apoptosis, and cell cycle arrest after statin treatment and regulation of protein expression level in HNSCC were the main evaluated outcomes.

Synthesis of results.

A meta-analysis was planned, since the data from the included studies was considered relatively homogeneous.

Risk of bias across studies.

Only to be applied if meta-analysis was possible.

Results

Study selection

In phase one, 153 papers were selected from five electronic databases. After the duplicates were removed, only 119 different citations remained. Subsequently, we conducted a comprehensive evaluation of the abstracts and excluded 101, resulting in 18 articles at the end of phase one. We did not identify any additional studies from the reference lists of these studies. Subsequently, we retrieved the 18 articles, and following a review of the texts, four more articles were discarded (S2 Table). A flow chart detailing the process of identification, inclusion, and exclusion of studies is shown in Fig 1.

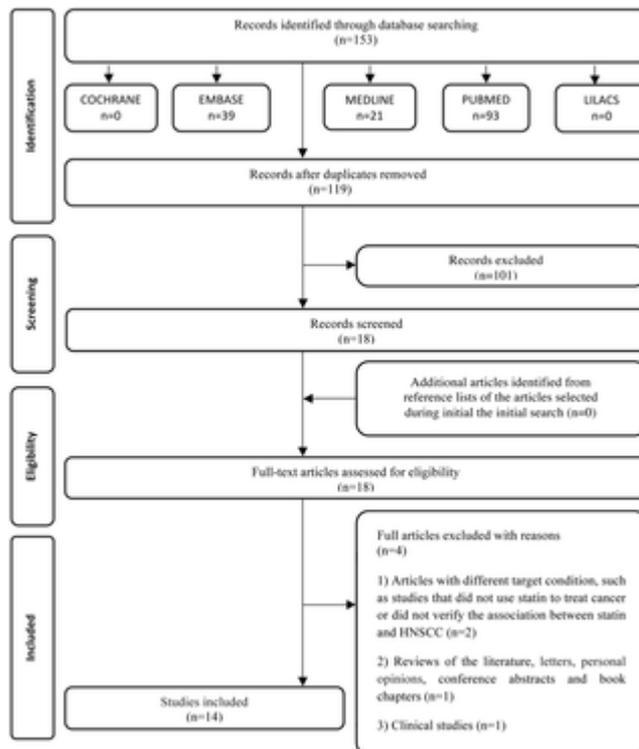


Fig 1. Flow Diagram of literature search and selection criteria adapted from PRISMA [16].

doi:10.1371/journal.pone.0130476.g001

Study characteristics

The studies were published from 2001 to 2014, and all of them were in English. They were conducted in five different countries: Canada [6, 8, 9, 11, 20–23], France [24], Germany [25], Spain [26] and the United States of America [7, 27, 28]. All of the selected studies were in vitro [6–9, 11, 20–27]; however, three of them also involved in vivo experiments [7, 25, 26]. A summary of the studies is presented in Table 1. A summary of interventions to test HNSCC cell viability in cultured cells is shown in Table 2.

Studies	P	I	T	D	C	O	S	%
	Cells	Interventions	Treatment time (hours)	Dose				
Dayekh et al. 2014 [21]	SCC9; SCC25; GM-36	Lovastatin; Erlotinib; Monensin + Erlotinib; Monensin + Lovastatin	24–48	0–10 μ M Lovastatin; 0–10 μ M Erlotinib; 0–2 μ M Monensin	✓	✓	✓	1
Dimiroulakis et al. 2001 [20]	SCCA; SCC25; SCC15; SCC9; FADU; CAL27	Lovastatin; Ethanol (Control)	24–48	1–100 μ M	✓	✓	✓	1
Dimiroulakos et al. 2002 [20]	SCC9; SCC25; SH4; Cos-7	Lovastatin; Ethanol (Control)	24–48	0–100 μ M	✓	✓	✓	1
Gabry et al. 2008 [25]	U87MG; Fadu	Lovastatin; Lovastatin + Radiation; Ethanol (Control)	24–48–72	0–50 μ M Lovastatin	✓	✓	✓	1
Islam et al. 2013 [7]	SCC-1; SCC-47	Atorvastatin; Ethanol (Control)	-	-	-	-	-	-
Liubet et al. 2014 [24]	A431; FADU	Cetuximab; Simvastatin; Radiation; Radiation + Simvastatin; Cetuximab + Simvastatin; Radiation + Cetuximab + Simvastatin; DMSO (Control)	-	-	-	-	-	-
Ma et al. 2012 [9]	SCC9; SCC 25; Hela; A549	Lovastatin; Melittarin; Gefitinib; Lovastatin + Gefitinib; Ethanol (Control)	24–48–72	0–100 μ M Lovastatin; 0–20 mM Melittarin; 0–100 μ M Gefitinib	✓	✓	✓	1
Mantha et al. 2003 [21]	SCC9; SCC25; MCF-7	Lovastatin; Cisplatin; 5-FU; Paclitaxel; Carboplatin; Oxaliplatin	24–48	0–100 μ M Lovastatin; Lovastatin + combination 0–12 μ g/mL of each drug	✓	✓	✓	2
Mantha et al. 2005 [11]	SCC9; SCC25; FADU; CAL27; MCF-7	Lovastatin; Pravastatin; Gefitinib; Lovastatin + Gefitinib	24–48–72	0–100 μ M Lovastatin	✓	✓	✓	2
Niknejad et al. 2007 [22]	SCC9; SCC 25; Hela	Lovastatin; Lovastatin + Salubrinal	24–48	0–50 μ M Lovastatin; 10 μ M Lovastatin + 10–75 μ M Salubrinal	✓	✓	✓	2
Niknejad et al. 2014 [9]	SCC25; Hela; 293T	Lovastatin; Lovastatin + Mevalonate; Ethanol (Control)	24–48	0–50 μ M Lovastatin; 0–50 μ M Lovastatin + 100 μ M Mevalonate	✓	✓	✓	1
Plocher-Durieu et al. 2005 [24]	C15; C17	Simvastatin; DMSO (Control)	-	-	-	-	-	-
Tajada et al. 2006 [27]	Tp-167; JMAR	Simvastatin; DMSO (Control)	24–48	0–10 μ M Simvastatin	✓	✓	✓	1
Wang et al. 2011 [28]	CCL-30	Statin; Mevalonate; Statin + Mevalonate; Cisplatin; Cisplatin + Statin; Ethanol (Control)	24–48	0–100 μ M Statin; 3.5–35 μ M Cisplatin	✓	✓	✓	1

Cells: Head and Neck Squamous Cell Carcinoma cell lines, (immortalized or primary cell lines); C: Control; O: Outcome; S: Study (RCT or Comparable baseline); Yes: ✓, No: ✗. Percentage of cell viability: 1 = 0 to 49% of viable cells; 2 = 50 to 100% of viable cells.

doi:10.1371/journal.pone.0130476.t002

Table 2. Interventions used to test head and neck carcinoma cell lines viability in cell culture.

doi:10.1371/journal.pone.0130476.t002

Risk of bias

We used the GRADE method [18] to assess the quality of the studies. Six studies were categorized as moderate quality [7, 9, 20, 24, 26, 28]. One of these [20] did not show results in all the tested cell lines, so the study could not answer all of our questions. Another study [9] was unclear because we were unable to extract precise data from the graphics as published; however, qualitatively it is clear that the statin has a positive effect on the cell line tested. The articles published by Pioche-Durieu et al. [24] in 2005 and by Islam et al. [7] in 2013 did not completely pertain to the review questions defined in this systematic review; therefore, we considered their usefulness to this work limited. Specifically, the article by Pioche-Durieu et al. [24] did not quantify cell viability, and the papers by Islam et al. [7] and Llobet, et al. [26] did not test cell viability, although they did show that statins regulated the expression of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and ERK 1/2 extracellular signal-regulated kinases (ERK 1/2) in HNSCCs. Lastly, the 2011 paper by Wang et al. [28] tested only one cell line and did not compare the results to another cell line (Table 3).

Authors	GRADE Factors								Overall quality	
	Study design	Study limitation	Inconsistency	Indirectness	Imprecision	Publication bias	Moderate/Large effect size	Dose effect		
Dayeesh et al. 2014 [23]	With Comparable Baseline	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	****
Dimitrakoulas et al. 2001 [20]	With Comparable Baseline	✓	✓	X: There are no results to all of the cell lines.	✓	✓	✓	✓	✓	***
Dimitrakoulas et al. 2002 [9]	With Comparable Baseline	✓	✓	Unclear: The graphic results are not viable to analyze.	✓	✓	✓	✓	✓	***
Galbraith et al. 2008 [21]	With Comparable Baseline (in vitro) RCT (Animal)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	****
Islam et al. 2013 [7]	With Comparable Baseline (in vitro) RCT (Animal)	✓	✓	X: The outcomes considered do not fully answer our questions.	✓	✓	✓	✓	✓	***
Llobet, et al. 2014 [26]	With Comparable Baseline (in vitro) RCT (Animal)	✓	✓	X: The outcomes considered do not fully answer our questions.	✓	✓	✓	✓	✓	***
Ma et al. 2012 [8]	With Comparable Baseline	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	****
Martha et al. 2003 [21]	With Comparable Baseline	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	****
Martha et al. 2005 [11]	With Comparable Baseline	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	****
Niknejad et al. 2007 [22]	With Comparable Baseline	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	****
Niknejad et al. 2014 [3]	With Comparable Baseline	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	****
Pioche-Durieu et al. 2005 [24]	With Comparable Baseline	✓	✓	X: The outcomes considered do not fully answer our questions.	✓	✓	✓	✓	✓	***
Talasila et al. 2006 [27]	With Comparable Baseline	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	****
Wang et al. 2011 [28]	With Comparable Baseline	✓	✓	✓	X: There is just one cell line, with no comparable.	✓	✓	✓	✓	***

Grade Factors: ✓, No Serious Limitations; X, Serious Limitations (or not present for moderate/large effects size, dose effect size; dose effect); Unclear, Unable to rate item based on available information. For Overall Quality of Evidence: +, very low; ++, low; +++, moderate; ****, high.

doi:10.1371/journal.pone.0130476.t003

Table 3. Judgment of the quality of evidence for intervention.

doi:10.1371/journal.pone.0130476.t003

We also evaluated the evidence regarding the possible clinical application of statins based on the in vitro studies found in this search and classified each paper as either: (1) showing a potential effect following HNSCC treatment; (2) inconclusive and (3) evidence not supportive of using statins to treat HNSCC (Table 1).

Synthesis of results

Cell viability.

The cytotoxicity of statins in HNSCC cells lines was evaluated using MTT [6–9, 11, 20–22, 27,28] and trypan blue assays [25]. Some studies [6, 8, 9, 11, 20, 22, 27, 28] showed that statins used alone are cytotoxic to HNSCC cells and reduced cell viability to less than 50% in a dose dependent manner. Some studies that involved co-administration with another drug showed no significant differences in response [21, 25]. However, when lovastatin was used with gefitinib in SCC9 cells (tongue squamous cell carcinoma), the authors concluded that this combination can enhance cell death to more than 90%, compared with each drug alone [8,11]. The same results were found with lovastatin combined with erlotinib and monensin in SCC9 and SCC25 cells [23]. Co-treatment of CCL-30 (nasopharyngeal carcinoma cells) using cisplatin and statins demonstrated that lovastatin has a significant impact on cell survival. Treating cells with cisplatin (35 μ M) and statins (50 μ M) together for 24 or 48 hours resulted in 60–90% cytotoxicity ($p < 0.05$) [24]. Pioche-Durieu et al. [21] found that simvastatin is cytotoxic to NPC cells (nasopharyngeal carcinoma) and it decreases cell viability and changes the cell morphology.

Cell cycle regulation and apoptosis.

Some studies [6, 11, 20–22, 25, 27] demonstrated accumulation of cells in the G0/G1 phase, as evidenced by flow cytometry assays, when HNSCC cell lines were treated with statins. A 2008 paper by Gabrys et al. [25] demonstrated that 55% of FaDu cells (pharyngeal squamous cell carcinoma) were in the G0/G1 phase following treatment with 25 μ M lovastatin for 48 hours, but this was not significantly different from the control (40%) or cells treated with 25 μ M lovastatin for 48 hours and 4 Gy (Grays) (55%). Takeda et al. [27] in 2006 showed the dose-dependent inhibitory effects of different concentrations of simvastatin (0–10 μ M) on the cell growth and cell cycle of oral squamous cell carcinoma cell lines (JMAR and Tu167) after 48 hours. They showed that statin can control the cell cycle and apoptotic signaling, and there was a statistically significant difference between the control and treated cells ($p < 0.01$). In 2003, Mantha et al. [21] found that lovastatin induced apoptosis in SCC25 cells (tongue squamous cell carcinoma), and the results were significant at doses of both 10 μ M (20.4% and 50 μ M (34%) after 48 hours of treatment. The cells in G0/G1 were 68.4% of the total 48 hours after treatment with a 10 μ M dose and 74.2% after treatment with a 50 μ M dose. No significant differences in response were evident between both lovastatin and chemotherapeutic treatments alone or in combinations. In 2005, Mantha et al. [11] confirmed this in an additional paper.

Regulation of protein expression level.

Islam et al. [7] in 2013 demonstrated in vitro (using UM-SCC-1 squamous cell carcinoma cells derived from floor of the mouth and UM-SCC-47 squamous cell carcinoma cells derived from floor of the tongue) and also in vivo that atorvastatin treatment reduces the activity of RhoC (a GTPase belonging to Ras superfamily, which is over-expressed in a wide range of invasive carcinomas) to 48% of control in UM-SCC-1 cells and to 52% in UM SCC-47 cells. They showed that RhoC activates the ERK1/2 and STAT3 pathways by regulating their phosphorylation in HNSCC. In

vivo animal experiments showed an inhibition of angiogenesis and lung metastasis after atorvastatin therapy ($p < 0.05$).

Ma et al. [8] in 2012 evaluated the effect of lovastatin on the activity of the liver kinase B1 (LKB1)/AMP-activated protein kinase (AMPK) pathway. An MTT assay was carried out using wild type LKB1^{+/+} murine embryonic fibroblasts (MEFs) as a control, which was compared to LKB1^{-/-} treated with a range of lovastatin concentrations of up to 25 μ M for 48 and 72 hours. Their data showed that LKB1^{+/+} cells (20% cell viability after 25 μ M dose) were significantly more sensitive than LKB1^{-/-} cells (90% cell viability in 25 μ M) after 48 hours. After 72 hours, there was no appreciable difference in the cytotoxicity in these two sets of MEFs (20% cell viability after 25 μ M), and both cell lines responded in a dose dependent manner. Lovastatin-induced apoptosis is regulated in part by the inhibition of the EGFR. Western blot analysis of SCC25 cells treated for 24 hours showed that lovastatin regulates downstream targets of EGFR (pAKT), the Integrated Stress Response (ISR), and cell cycle regulators, cyclin D1 and p21, and eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (4EBP1).

In 2007, Niknejad, Morley, and Dimitroulakos [22] used a cell viability assay to compare the effect of lovastatin in CHOP (a member of the activating transcription factor (ATF) family)^{-/-} and CHOP^{+/+} MEFs after 0–25 μ M doses and 48 hours. Statistically significant differences were found according to a one-tailed t-test ($p < 0.05$). A significant difference was observed in the populations of sub G1 apoptotic cells in CHOP^{-/-} and CHOP^{+/+} MEFs that were treated with 10 μ M doses for 24 and 48 hours ($p < 0.05$).

The work of Takeda et al. [27], in 2006, showed that 5–10 μ M doses of simvastatin could induce upregulation of active caspase-3 expression after a 48-hour treatment. The influence of mevalonate on morphology, cell viability, and active caspase-3 expression were demonstrated after the treatment with simvastatin.

Llobet, et al, in 2014 [26] demonstrated that simvastatin, in treatment combined with radiation and cetuximab, can decrease wound healing, cell proliferation, slowed the growth of FADU xenografts and induce apoptosis. Pro caspase-3 expression was demonstrated after the treatment with simvastatin ($p < 0.05$ compared to radiation plus cetuximab without simvastatin). They also investigated whether simvastatin could affect crucial cellular signaling pathways involved in the malignant phenotype of cancers. They found the additions of simvastatin to radiation did not modify phosphorylated levels of EGFR, but they showed cetuximab had an inhibitory effect on the radiation induced p-EGFR (phosphorylation of EGFR), indicating that simvastatin had a little effect on EGFR. Simvastatin has a weak effect on the activation of phosphorylated AKT and phosphorylated STAT3.

Dayekh et al, [23] used monensin, lovastatin and erlotinib alone and in combination to treat SCC9, SCC25 and GM-38 (normal lung fibroblasts) cells. They confirmed the ability of monensin to potentiate the cytotoxicity of erlotinib and lovastatin and showed that combination of 5 μ mol/L of monensin with 10 μ mol/L erlotinib for 24 hours have 38.7% of apoptosis in SCC25 cells. They did not use lovastatin on flow-cytometry experiments. With the western blots assay they found that monensin can inhibits phosphorylation status of EGFR and its downstream targets AKT and ERK

proteins were assessed in SCC9 cells treated with 10 μ mol/L lovastatin for 24 hours. Both 10 μ mol/L lovastatin and 1 μ mol/L monensin for 24 hours treatments induced approximately a 50% inhibition of EGF- treated SCC9 cell with respect to pEGFR and its downstream targets pAKT and pERK (phosphorylated extracellular signal-regulated kinases).

Risk of bias across studies

The studies selected for this analysis were considered heterogenous, and they did not have compatible data that would allow a meta-analysis. In addition to the non-comparability of the results of each study, a meta-analysis could not be conducted due to lack of clinical studies on this subject.

Discussion

Summary of evidence

The incidence of HNSCC has been on the increase and has become an important issue [29]. Oral cancer is a serious and growing problem worldwide and new therapies are emerging [30,31]. The major risk factors for these cancers are smoking and alcohol, although, infection with human papillomavirus (HPV) virus—especially subtype 16—is also a risk factor, particularly for tonsil carcinoma [32]. The successful treatment of HNSCC is a challenge. Conventional approaches have allowed HNSCC to be controlled and improved the overall survival rate but only in the early stages of the disease [33]. Advanced tumors in the recurrent and distant metastases stages are often treated with combination therapy involving surgical resection followed by radiotherapy and sometimes chemotherapy [34]. All of these treatments are cytotoxic and are associated with many adverse effects that reduce the quality of life of patients. Therefore, new perspectives and therapeutic approaches are needed for successful and less cytotoxic HNSCC treatments [29].

The statins are a remarkably effective class of drugs that lower cholesterol levels in blood and reduce the frequency of heart attacks [1]. No major adverse effects resulting from the lowering of cholesterol have been noted in any studies. The remarkable safety of statins is derived from their unique mechanism of action. The statins are the largest selling class of drugs currently taken by patients worldwide [1].

There has been a growing interest in statins because of their anticancer effects [5]. A systematic review and meta-analysis performed by Dale et al. [35], in 2006, showed statins have a neutral effect on cancer and cancer death risk in randomized controlled trials [35]. They found that no type of cancer was affected by statin use, but they did not report any studies involving HNSCC. We only found a phase one clinical trial that involved prolonged administration of lovastatin to patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck [10]. The authors demonstrated that lovastatin stabilized the disease in 23% of the treated HNSCCs, and the authors concluded that further clinical evaluations of statins were required to evaluate their potential as part of combination therapy [10].

Furthermore, several studies have tested statin-derived drugs (lovastatin, simvastatin, atorvastatin, and pravastatin) on HNSCC cell lines [7, 8, 11, 20, 22, 27]. In this systematic review, we studied the effect of statins on head and neck cancer and found

14 relevant in vitro studies [6–9, 11, 20–28]. These in vitro studies supported the idea that statins have potential as a therapy for HNSCC. To evaluate the effect of statins on HNSCC cells, all the authors that used MTT assays or trypan blue assays [8, 11, 20–25] demonstrated that statins alone could effectively and dose dependently kill more than 50% of the cells and inhibit proliferation (Table 2). The effect of statins on HNSCC cells was also evaluated in combination with radiation [25] or with other chemotherapeutics (cisplatin, 5-fluorouracil, paclitaxel, carboplatin, and oxaplatin) [21], but in these cases, the statins had no significant differences. However, when a combination of gefitinib and lovastatin was tested in SCC9 cells, cell death was enhanced by more than 90% when compared to each drug alone [8, 11]. The same results were found by Dayekh et al. [23] when used lovastatin combined with monensin and erlotinib.

Llobet et al., in 2014, [26] showed that simvastatin might enhance antitumor response when in combination with radiation and cetuximab. They concluded that simvastatin can decrease wound healing, cell proliferation and colony formation and can induce apoptosis on FaDu cells.

Derivatives of the statin drugs are potential inhibitors of HMG-CoA reductase, an enzyme derived from the mevalonate pathway [6, 11, 36]. The viability of malignant cells is dependent on the final products of the mevalonate pathway that includes **de novo** cholesterol and isoprenoids [5, 6, 36]. Many of these products are used in cell proliferation and also required for critical cellular functions such as maintenance of cell membrane integrity, signaling, protein synthesis, and cell cycle progression. Interruption of this process in malignant cells results in inhibition of tumor growth and metastasis [9]. Simvastatin can regulate the expression of phosphorylated forms of ERK1/2 (extracellular-signal-regulated kinases) and the expression of cell cycle regulators, such as p21 and p27 in HNSCC cells [6, 27]. In vitro, atorvastatin treatment significantly reduces the active form of RhoC. In addition, atorvastatin induces a significant decrease in phosphorylated forms of ERK1/2 and STAT3, and reduces cell motility, invasion, proliferation, and colony formation. These in vitro results provide evidence that statin treatment can be a useful therapeutic for HNSCC. Using a murine flank model implanted with UM-SCC-47 (tongue squamous cells carcinoma) atorvastatin was shown to decrease tumor growth [7]. In contrast, Llobet et al. found that simvastatin had no effects on the levels of total EGFR, ERK1/2, AKT, and STAT3 when they used in combination with radiation and cetuximab to treat FaDu cells [26].

Statins have been shown to inhibit the mevalonate, PI3K/AKT, and mTOR pathways in oral cancer [6, 8, 29]. Additionally, they can inhibit the function of EGFR and induce the LKB1/AMPK pathway that is activated upon ATP depletion during metabolic stress [6, 8, 29]. This drug has the ability to influence different routes of tumor induction mediated by metabolic stresses (ISR), ATF3 expression, and CHOP, which regulates apoptosis of HNSCC cells [6, 8]. Salubrinal, an agent that is able to prolong the activity of stress-induced ATF3 expression, in combination with lovastatin could enhance cytotoxicity and induce apoptosis. These authors suggested that ATF3 inducers, in combination with agents such as lovastatin or salubrinal, could be clinically useful [6].

The tumor suppressor protein p21 has been shown to inhibit tumor proliferation and cell-cycle progression, which may contribute to tumor suppression [37]. One study has shown that simvastatin can regulate the expression of proteins related to cell cycle progression such as p21 and p27 in HNSCC cells [27]. Another study has shown that in HNSCC cells, lovastatin treatments alone can upregulate the expression of p21, while irradiation alone cannot [25]. It has been suggested that lovastatin is responsible for the upregulation of the cell cycle inhibitor p21, leading to G1 arrest [1]. The studies included in this review confirm this statement. Lovastatin treatment in oral cancer cells demonstrated a pronounced pre-G1 apoptotic peak, and simvastatin induced a dose-dependent accumulation of G1 phase cells and decreased the total S-phase population in an oral squamous cell carcinoma [6, 21, 27]. Gabry's et al. [25] confirmed in 2008 that lovastatin alone arrested HNSCC cells in G0/G1 phase and induced apoptosis.

In summary, this is the first systematic review of the effects of statins on HNSCC treatment and the first review to present evidence of a positive association between decrease of HNSCC cell viability and statin using in vitro assays. Although, in 2006, Dale et al. [35] performed a systematic review and meta-analysis of the relationship between statins and cancer risk in cancer patients who use statin drugs; they did not analyze head and neck cancer patients. Currently available evidence suggests that statins could be used to treat HNSCC, although this evidence comes from only a few studies. These studies prove that statins could inhibit the growth, invasion, and metastasis of tumor cells and reduce cellular proliferation and differentiation. In addition, statins regulate the cell cycle resulting in the inhibition of the proliferative effects of the malignant cells [6–9]. Furthermore, statins can induce apoptosis especially in squamous cell carcinoma [11, 21, 23–25, 27, 28].

These in vitro studies [6–9, 11, 20–27] confirmed the anticancer effects of the statin drugs and the potential promise of statin compounds as adjunct to standard therapies available for HNSCC [7]. It may represent a novel therapeutic approach in HNSCC. However, further clinical evaluation of statins should evaluate their potential as part of a combination of a target therapy, combining modality approach or as Phase II cytostatic agents [10].

Limitations

Some methodological limitations of this review should be considered. We found only one clinical study that used statins in patients with HNSCC. Of 153 papers, we selected 14 studies using our inclusion criteria and they were in vitro and in vivo animal studies. For the quality assessment of in vitro studies, we did not use any standard assessment for basic studies; however, we defined a method to assess the quality of all articles. Thereby, we have classified in vitro studies using comparable baselines, comparing them to the RCT studies published by Xiao et al. in 2013 [19] using the GRADE method [18]. Furthermore, we have categorized six studies as moderate quality [7, 9, 20, 22, 26, 28] because they did not fully answer the review questions defined in this systematic review. The insufficient reporting of clinical studies prohibits clinical analysis. We suggest future research to eliminate these limitations.

Conclusions

This study demonstrated that statins have a significant effect on HNSCC cell lines with respect to cell viability, cell cycle, cell death, and the regulation of protein expression levels involved in pathways of carcinogenesis, which corroborates with the potential in vitro anti-tumor effects. Though there are few studies on the topic, currently available evidence suggests that statins are potentially useful for HNSCC treatment, and their use requires further clinical analysis.

Supporting Information

S1_PRISMA_Checklist.doc

[S1 PRISMA Checklist.](#) PRISMA Checklist.

doi:10.1371/journal.pone.0130476.s001

(DOC)

[S1 Table.](#) Database Search.

doi:10.1371/journal.pone.0130476.s002

(DOC)

[S2 Table.](#) Excluded articles and reasons for exclusion (n = 4).

doi:10.1371/journal.pone.0130476.s003

(DOC)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LMCP GDLC ENSG. Analyzed the data: LMCP DFR STE. Contributed reagents/materials/analysis tools: LMCP DFR STE. Wrote the paper: LMCP GDLC ENSG. Drafted and revised the article critically for content: LMCP GDLC ENSG. Approved of the final version to be submitted: GDLC ENSG.

References

1. Endo A. A historical perspective on the discovery of statins. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Bio Sci* 2010; 86:484–93. pmid:20467214 doi: 10.2183/pjab.86.484
2. Endo A. The discovery special article and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *J Lip Res* 1992; 33:1569–82.
3. Buchwald H. Cholesterol inhibition, cancer, and chemotherapy. *Lancet* 1992; 339(8802):1154–06. pmid:1349377 doi: 10.1016/0140-6736(92)90744-n
4. Corsini A, Maggi FM, Catapano AL. Pharmacology of competitive inhibitors of HMG-CoA reductase. *Pharmacol Res* 1995; 31:9–27. pmid:7784310 doi: 10.1016/1043-6618(95)80042-5
5. Chan KK, Oza AM, Siu LL. The statins as anticancer agents. *Clin Cancer Res* 2003; 9:10–19. pmid:12538446
6. Niknejad N, Gorn-Hondermann I, Ma L, Zahr S, Johnson-Obeseki S, Corsten M, et al. Lovastatin-induced apoptosis is mediated by activating transcription

- factor 3 and enhanced in combination with salubrinal. *Int J Cancer* 2014; 134:268–79. doi: 10.1002/ijc.28369. pmid:23824972
7. Islam M, Sharma S, Kumar B, Teknos TN. Atorvastatin inhibits RhoC function and limits head and neck cancer metastasis. *Oral Oncol* 2013; 49:778–86. doi: 10.1016/j.oraloncology.2013.04.003. pmid:23648017
8. Ma L, Niknejad N, Gorn-Hondermann I, Dayekh K, Dimitroulakos J. Lovastatin induces multiple stress pathways including LKB1/AMPK activation that regulate its cytotoxic effects in squamous cell carcinoma cells. *Plos One* 2012; 7: e46055. doi: 10.1371/journal.pone.0046055. pmid:23029387
9. Dimitroulakos J, Marhin WH, Tokunaga J, Irish J, Gullane P, Penn LZ, et al. Microarray and biochemical analysis of lovastatin-induced apoptosis of squamous cell carcinomas. *Neoplasia* 2002; 4:337–46. pmid:12082550 doi: 10.1038/sj.neo.7900247
10. Knox JJ, Siu LL, Chen E, Dimitroulakos J, Kamel-Reid S, Moore MJ, et al. A Phase I trial of prolonged administration of lovastatin in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck or of the cervix. *Eur J Cancer* 2005; 41:523–30. pmid:15737556 doi: 10.1016/j.ejca.2004.12.013
11. Mantha AJ, Hanson JE, Goss G, Lagarde AE, Lorimer IA, Dimitroulakos J. Targeting the mevalonate pathway inhibits the function of the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 2005; 11:2398–07. pmid:15788691 doi: 10.1158/1078-0432.ccr-04-1951
12. Altman JK, Sassano A, Platanius LC. Targeting mTOR for the treatment of AML. New agents and new directions. *Oncotarget* 2011; 2:510–07. pmid:21680954
13. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2009; 45:309–16. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.06.002. pmid:18804401
14. Blais L, Desgagne A, LeLorier J. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors and the risk of cancer: a nested case-control study. *Arch Intern Med* 2000; 160: 2363–68. pmid:10927735 doi: 10.1001/archinte.160.15.2363
15. Graaf M, Beiderbeck A, Egberts A, et al. The risk of cancer in users of statins. *J Clin Oncol* 2004; 22: 2388–94. pmid:15197200
16. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG; The PRISMA Group. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *Ann Intern Med* 2009; 151:264–69. pmid:19622511 doi: 10.1371/journal.pmed.1000097
17. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. UICC TNM classification of malignant tumours. 7th ed. New York: Wiley-Liss, 2009.
18. Guyatt G, Oxman AD, Akl EA, Kunz R, Vist G, Brozek J, et al. GRADE guidelines: 1. Introduction—GRADE evidence profiles and summary of findings tables. *J Clin Epidemiol* 2011; 64:383–94. doi: 10.1016/j.jclinepi.2010.04.026. pmid:21195583

19. Xiao Z, Li C, Shan J, Luo L, Feng L, Lu J, et al. Interventions to improve chronic cyclosporine. A nephrotoxicity through inhibiting renal cell apoptosis: a systematic review. *Chinese Med J (Engl)* 2013; 126:3767–74
20. Dimitroulakos J, Ye LY, Benzaquen M, Moore MJ, Kamel-Reid S, Freedman MH, et al. Differential sensitivity of various pediatric cancers and squamous cell carcinomas to lovastatin-induced apoptosis: therapeutic implications. *Clin Cancer Res* 2001; 7:158–67. pmid:11205904
21. Mantha AJ, McFee KE, Niknejad N, Goss G, Lorimer IA, Dimitroulakos J. Epidermal growth factor receptor-targeted therapy potentiates lovastatin-induced apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003; 129:631–41. pmid:12942316 doi: 10.1007/s00432-003-0490-2
22. Niknejad N, Morley M, Dimitroulakos J. Activation of the integrated stress response regulates lovastatin-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2007; 282:29748–56. pmid:17699156 doi: 10.1074/jbc.m705859200
23. Dayekh K, Johnson-Obaseki , Corsten M, Villeneuve P, Sekhon H, Weberpals J et al. Monensin inhibits epidermal growth factor receptor trafficking and activation: Synergistic cytotoxicity in combination with EGFR inhibitors. *Mol Cancer Ther* 2014; 13:2559–71. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-1086. pmid:25189541
24. Pioche-Durieu C, Keryer C, Souquöure S, Bosq J, Faigle W, Loew D, et al. In nasopharyngeal carcinoma cells, Epstein-Barr virus LMP1 interacts with galectin 9 in membrane raft elements resistant to simvastatin. *J Virol* 2005; 79:13326–37. pmid:16227255 doi: 10.1128/jvi.79.21.13326-13337.2005
25. Gabry's D, Dörfler A, Yaromina A, Hessel F, Krause M, Oertel R, et al. Effects of lovastatin alone or combined with irradiation on tumor cells in vitro and in vivo. *Strahlenther Onkol* 2008; 184:48–53. doi: 10.1007/s00066-008-1805-7. pmid:18188523
26. Llobet L, Baro M, Mesia R, Balart J. Simvastatin enhances the effects of radiotherapy and cetuximab on a cell line (FaDu) derived from a squamous cell carcinoma of head and neck. *Transl Oncol* 2014; 7:513–22. doi: 10.1016/j.tranon.2014.02.008. pmid:25171892
27. Takeda I, Maruya S, Shirasaki T, Mizukami H, Takahata T, Myers JN, et al. Simvastatin inactivates beta1-integrin and extracellular signal-related kinase signaling and inhibits cell proliferation in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Cancer Sci* 2007; 98:890–9. pmid:17428261 doi: 10.1111/j.1349-7006.2007.00471.x
28. Wang W, Le W, Cho DY, Hwang PH, Upadhyay D. Novel effects of statins in enhancing efficacy of chemotherapy in vitro in nasopharyngeal carcinoma. *Int Forum Allergy Rhinol* 2011; 1:284–9. doi: 10.1002/alr.20039. pmid:22287433
29. Kundu SK, Nestor M. Targeted therapy in head and neck cancer. *Tumour Biol* 2012; 33:707–21. doi: 10.1007/s13277-012-0350-2. pmid:22373581
30. Warnakulasuriya S. Causes of oral cancer- an appraisal of controversies. *Br Dent J* 2009; 207:471–5. doi: 10.1038/sj.bdj.2009.1009. pmid:19946320
31. Petti S. Lifestyle risk factors for oral cancer. *Oral Oncol* 2009; 45:340–50. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.05.018. pmid:18674956

- 32.**Thavaraj S, Stokes A, Guerra E, Bible J, Halligan E, Long A, et al. Evaluation of human papillomavirus testing for squamous cell carcinoma of the tonsil in clinical practice. *J Clin Pathol* 2011; 64:308–12. doi: 10.1136/jcp.2010.088450. pmid:21345874
- 33.**Psyrris A, Fountzilas G. Advances in the treatment of locally advanced non-nasopharyngeal squamous cell carcinoma of the head and neck region. *Med Oncol* 2006; 23:1–15. pmid:16645225 doi: 10.1385/mo:23:1:1
- 34.**Belcher R, Hayes K, Fedewa S, Chen AY. Current treatment of head and neck squamous cell cancer. *J Surg Oncol* 2014; 110:551–74. doi: 10.1002/jso.23724. pmid:25053506
- 35.**Dale KM, Coleman CI, Henyan NN, Kluger J, White CM. Statins and cancer risk: a meta-analysis. *JAMA* 2006; 295:74–80. pmid:16391219 doi: 10.1001/jama.295.1.74
- 36.**Lennernäs H, Fager G. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors. Similarities and differences. *Clin Pharmacokinet* 1997; 32:403–25. pmid:9160173 doi: 10.2165/00003088-199732050-00005
- 37.**Gartel AL, Radhaskrishnan SK. Lost in transcription: p21 repression, mechanisms and consequences. *Cancer Res* 2005; 65:3980–5. pmid:15899785 doi: 10.1158/0008-5472.can-04-3995

