



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo de novas alternativas terapêuticas para superar a
resistência a cisplatina no carcinoma espinocelular de
cavidade oral**

Lizeth Andrea Torres Torres

**Ribeirão Preto
2021**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo de novas alternativas terapêuticas para superar a
resistência a cisplatina no carcinoma espinocelular de
cavidade oral**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia.

Orientada: Lizeth Andrea Torres Torres

Orientadora: Profa. Dra. Andréia Machado Leopoldino

Ribeirão Preto
2021

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

Torres, Lizeth Andrea Torres

Estudo de novas alternativas terapêuticas para superar a resistência a cisplatina
no carcinoma espinocelular de cavidade oral.
Ribeirão Preto, 2021.
107 p.: il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Ribeirão Preto/ USP. Área de concentração: Imunologia e Fisiopatologia.

Orientadora: Leopoldino, Andréia Machado.

1. Carcinoma oral. 2. Autofagia. 3. Quimiorresistência. 4. Terapia combinada.
5. Paclitaxel.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Lizeth Andrea Torres Torres

Título do trabalho: **Estudo de novas alternativas terapêuticas para superar a resistência a cisplatina no carcinoma espinocelular de cavidade oral.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia.

Orientadora: Prof. Dra. Andréia Machado Leopoldino

Aprovado em: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho aos meus pais, pela constante motivação para alcançar meus sonhos, todas as minhas realizações devo a vocês.

AGRADECIMENTOS

À minha família, por ser meu maior incentivo porque apesar de estar longe, estiveram sempre presente com seus conselhos e apoio constante ao longo dessa caminhada, expresso toda a minha gratidão e admiração.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFRP-USP) pela oportunidade de ter realizado o curso de mestrado.

À Prof. Dra. Andréia Machado Leopoldino, pela oportunidade de trabalho no Laboratório de Marcadores e Sinalização Celular no Câncer (LMSCC), pelo auxílio em todos os momentos da realização desse trabalho, pelos ensinamentos e apoio constante.

À Dra. Luciana Oliveira Almeida, pela ajuda no desenvolvimento do projeto, por todas as correções e sugestões ao longo desse trabalho.

Aos Prof. Dr. Sergio Akira, Prof. Dr. José Clóvis do Prado, Prof. Dr. Sérgio Alburqueque e técnicos dos seus laboratórios pela disponibilização do espaço físico e equipamentos indispensáveis no desenvolvimento do projeto.

Aos meus colegas do Laboratório LMSCC, Lucas, Cristiana, Fernanda, Gabriel, Laís, Raquel e Ana pela ajuda intelectual e técnica durante a realização desse trabalho.

Aos amigos brasileiros e peruanos em Ribeirão Preto por todos os bons momentos compartilhados e por fazerem minha estadia mais leve e prazerosa.

A todos os funcionários da pós-graduação em Biociências e Biotecnologia, em especial a Ana Turatti, pela ajuda em cada fase durante a minha permanência na faculdade.

Aos professores integrantes da banca examinadora, por disponibilizarem parte de seu tempo na revisão e avaliação desse trabalho.

A todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho, meu sincero agradecimento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro temático (processo 2016/19103-2). Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (processo 169303/2018-7) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida.

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

RESUMO

Torres Torres, Lizeth. Estudo de novas alternativas terapêuticas para superar a resistência a cisplatina no carcinoma espinocelular de cavidade oral. 2021. 107f. Dissertação (mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

O carcinoma espinocelular da cavidade oral (CECO) é um dos tipos de câncer com prognóstico desfavorável. A cisplatina é um dos quimioterápicos pós-operatórios mais utilizados nesta neoplasia. No entanto, a baixa resposta e a recidiva devido à aquisição de quimiorresistência, tem sido associada com a presença das células-tronco tumorais (CTT), visto que há aumento dessa subpopulação após o tratamento. A autofagia tem sido associada à resistência a terapias antitumorais e estudada como um alvo terapêutico promissor no tratamento de câncer. Nesse contexto, é necessário buscar novas estratégias terapêuticas mais eficazes, com menos efeitos colaterais e capazes de eliminar as CTT. O objetivo desse estudo foi investigar os efeitos antitumorais de novas combinações terapêuticas com foco na autofagia frente a resistência à cisplatina e as CTT em CECO. Selecionamos três fármacos: paclitaxel, cloroquina e FTY720 para testes *in vitro* de viabilidade usando quatro linhagens celulares de CECO: Cal27 e SCC9 selvagens (WT) e Cal27 e SCC9 resistentes à cisplatina (CisR), e posteriormente, foi determinado o índice de interação de drogas (CID) entre os fármacos nas linhagens CisR. As linhagens CisR apresentaram queda drástica da viabilidade celular quando expostas às combinações testadas e os fármacos tiveram sinergismo significativo ($CID < 0.7$). Sendo assim, três combinações com maior sinergismo para cada linhagem resistente foram escolhidas para os testes de clonalidade, formação de esferas (cultura 3D), e análise de proteínas envolvidas em autofagia e em vias de sinalização de proliferação e sobrevivência celular por Western blotting, assim como a expressão de genes de quimiorresistência por PCR quantitativo em tempo real. Nossos resultados indicaram que a aquisição de quimiorresistência à cisplatina está associada com aumento de autofagia, onde a inibição do mecanismo autofágico reverteu a resistência e permitiu elevada eficiência de resposta aos fármacos combinados. Houve perda total da capacidade clonogênica, diminuição significativa de células com características de CTT, assim como redução de vias associadas a carcinogênese, proliferação e sobrevivência (SET, c-Myc, Stat3, NFkB, Akt). Portanto, as combinações de fármacos propostas neste trabalho sugerem a autofagia como um alvo estratégico para evitar a quimiorresistência a cisplatina e eliminar as CTT no câncer oral.

Palavras-chave: Carcinoma oral, autofagia, quimiorresistência, terapia combinada, paclitaxel.

ABSTRACT

Torres Torres, Lizeth. Study of new therapeutic alternatives to overcome cisplatin resistance in squamous cell carcinoma of the oral cavity. 2021. 107f. Thesis (Master's degree). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Squamous cell carcinoma of the oral cavity (OSCC) is one of the types of cancer with an unfavourable prognosis. Cisplatin is one of the most used postoperative chemotherapy agents for this neoplasm. However, the low response and relapse due to the acquisition of chemoresistance have been associated with the presence of tumour stem cells (TCC), since there is an increase in this subpopulation after treatment. Autophagy has been linked to resistance to antitumor therapies and studied as a promising therapeutic target in cancer treatment. In this context, it is necessary to seek new, more effective therapeutic strategies, with fewer side effects and capable of eliminating CTT. This study aimed to investigate the antitumor effects of new therapeutic combinations focusing on autophagy against cisplatin resistance and CTT in CECO. We selected three drugs: paclitaxel, chloroquine and FTY720 for in vitro viability tests using four CECO cell lines: wild type Cal27 and SCC9 (WT) and cisplatin-resistant Cal27 and SCC9 (CisR), and subsequently, the interaction index of drugs (CID) among the drugs in the CisR strains. The CisR strains showed a drastic drop in cell viability when exposed to the tested combinations and the drugs had significant synergism ($CID < 0.7$). Thus, three combinations with greater synergism for each resistant strain were chosen for clonality tests, sphere formation (3D culture), and analysis of proteins involved in autophagy and cell proliferation and survival signalling pathways by Western blotting, as well as the expression of chemoresistance genes by quantitative real-time PCR. Our results indicated that the acquisition of cisplatin chemoresistance is associated with an increase in autophagy, where the inhibition of the autophagic mechanism reversed the resistance and allowed a high efficiency of response to the combined drugs. There was a total loss of clonogenic capacity, a significant decrease in cells with CTT characteristics, as well as a reduction in pathways associated with carcinogenesis, proliferation and survival (SET, c-Myc, Stat3, NFkB, Akt). Therefore, the drug combinations proposed in this work suggest autophagy as a strategic target to avoid cisplatin chemoresistance and eliminate CTT in oral cancer.

Key words: Oral cancer, autophagy, chemoresistance, combined therapy, paclitaxel.

RESUMEN

Torres Torres, Lizeth. Estudio de nuevas alternativas terapéuticas para superar la resistencia al cisplatino en el carcinoma epidermoide de cavidad oral. 2021. 107f. Tesis (Grado de Maestría). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

El carcinoma epidermoide de cavidad oral (CECO) es uno de los tipos de cáncer con pronóstico desfavorable. El cisplatino es uno de los agentes quimioterápicos posoperatorios más utilizados para esta neoplasia. Sin embargo, la baja respuesta y la recaída por adquisición de quimiorresistencia se han asociado con la presencia de células madre tumorales (CMT), ya que existe un aumento de esta subpoblación después del tratamiento. La autofagia se ha relacionado con la resistencia a las terapias antitumorales, y se ha estudiado como un objetivo terapéutico prometedor en el tratamiento del cáncer. En este contexto, es necesario buscar nuevas estrategias terapéuticas más efectivas, con menos efectos secundarios y capaces de eliminar la CMT. Este estudio tuvo como objetivo investigar los efectos antitumorales de nuevas combinaciones terapéuticas centradas en la autofagia contra la resistencia al cisplatino y CMT en CECO. Seleccionamos tres fármacos: Paclitaxel, Cloroquina y FTY720 para pruebas de viabilidad *in vitro* utilizando cuatro líneas celulares CECO: Cal27 y SCC9 (WT) de tipo salvaje y Cal27 y SCC9 (CisR) resistentes al cisplatino, y posteriormente, el índice de interacción de fármacos (CID) entre los fármacos de las líneas CisR. Las líneas CisR mostraron una caída drástica en la viabilidad celular cuando se expusieron a las combinaciones analizadas y los fármacos tuvieron un sinergismo significativo (CID <0,7). De esta forma, se eligieron tres combinaciones con mayor sinergismo para cada línea resistente para los ensayos de clonalidad, formación de esferas (cultivo 3D) y análisis de proteínas implicadas en la autofagia, proliferación celular y las vías de señalización de supervivencia mediante Western blot, así como la expresión de genes de quimiorresistencia mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Nuestros resultados indicaron que la adquisición de quimiorresistencia al cisplatino se asocia con un aumento de la autofagia, donde la inhibición del mecanismo autofágico revirtió la resistencia y permitió una alta eficiencia de respuesta a los fármacos combinados. Hubo una pérdida total de capacidad clonogénica, una disminución significativa de las células con características CMT, así como una reducción de las vías asociadas a la carcinogénesis, proliferación y supervivencia (SET, c-Myc, Stat3, NFkB, Akt). Por tanto, las combinaciones de fármacos propuestas en este trabajo, sugieren la autofagia como un objetivo estratégico para evitar la quimiorresistencia al cisplatino y eliminar la CMT en el cáncer oral.

Palabras clave: Carcinoma oral, autofagia, quimiorresistencia, terapia combinada, paclitaxel.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Participação das células tronco tumorais na progressão do câncer.....	29
Figura 2: Mecanismos moleculares das células tronco-tumorais na resistência a fármacos.....	30
Figura 3: Esquema ilustrativo das abordagens terapêuticas visando células da massa tumoral e populações de células-tronco tumorais.....	31
Figura 4: Regulação da autofagia no câncer.....	33
Figura 5: Avaliação da autofagia e oncogênese das linhagens CECO selvagens e resistentes a cisplatina.....	48
Figura 6: Inibição do crescimento celular por CDDP e FTY720 em linhagens CECO.....	50
Figura 7: Redução da capacidade clonogênica na linhagem Cal27 _{CisR} após exposição a combinação de fármacos.....	57
Figura 8: Redução da capacidade clonogênica na linhagem SCC9 _{CisR} após exposição a combinação de fármacos.....	58
Figura 9: Avaliação da morfologia celular de linhagens CECO após tratamento com as combinações de fármacos selecionadas.....	60
Figura 10: Detecção da autofagia pela coloração com acridina orange	62
Figura 11: Análise de vias de sinalização para apoptose, sobrevivência e proliferação em células Cal27 _{CisR} após exposição aos fármacos combinados.....	64
Figura 12: Análise de vias de sinalização para apoptose, sobrevivência e proliferação em células SCC9 _{CisR} após exposição aos fármacos combinados.....	65
Figura 13: Perfis de RNAm de marcadores de quimiorresistência e SPHK2 nas linhagens Cal27 _{CisR} e SCC9 _{CisR} após exposição a combinação dos fármacos.....	69
Figura 14: Efeito da combinação de fármacos na geração de esferas tumorais de células Cal27 _{CisR}	72
Figura 15: Efeito da combinação de fármacos na geração de esferas tumorais de células SCC9 _{CisR}	73
Figura 16: Efeito da combinação de fármacos na aderência de esferas tumorais de Cal27 _{CisR}	75
Figura 17: Efeito da combinação de fármacos na aderência de esferas tumorais de SCC9 _{CisR}	76
Figura 18: Esquema representativo dos efeitos da terapia combinada em linhagens CECO CisR <i>in vitro</i> .	77

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Taxas de sobrevivência relativa de 5 anos para CECO e câncer orofaríngeo.....	22
Tabela 2: Anticorpos primários e secundários utilizados nas técnicas de Western Blotting e Imunofluorescência.....	45
Tabela 3: Viabilidade celular da linhagem Cal27 _{WT} após incubação com as diferentes combinações dos fármacos: FTY720, CDDP, CQ e PTX.....	53
Tabela 4: Viabilidade celular da linhagem Cal27 _{CisR} após incubação com as diferentes combinações dos fármacos: FTY720, CDDP, CQ e PTX.....	53
Tabela 5: Análise da viabilidade celular na linhagem SCC9 _{WT} após incubação com as diferentes combinações dos fármacos: FTY720, CDDP, CQ e PTX.....	54
Tabela 6: Análise da viabilidade celular na linhagem SCC9 _{CisR} após incubação com as diferentes combinações dos fármacos: FTY720, CDDP, CQ e PTX.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3-MA	3-Metil-Adenina
ABC	Transportadores de cassetes de ligação ao ATP
Akt	Proteína quinase B
ALDH1	Aldeído desidrogenase 1
AMPK	Proteína quinase activada por AMP
AO	Acridina Orange
AVO	Acidic vacuolar organelles
ATCC	American Type Culture Collection
ATG4	Gene 4 relacionado à autofagia
ATG5	Gene 5 relacionado à autofagia
ATG7	Gene 7 relacionado à autofagia
ATP	Adenosin trifosfato
AVO	Acidic vacuolar organelles
BAF	Bafilomicina
BCRP	Proteína de resistência ao câncer de mama
BCL-1	B-cell lymphoma 1
BCL-2	B-cell lymphoma 2
CECO	Carcinoma espinocelular de câncer oral
CD117	<i>Cluster differentiation 133</i> ou grupo de diferenciação 117
CD133	<i>Cluster differentiation 133</i> ou grupo de diferenciação 133
CD24	<i>Cluster differentiation 24</i> ou grupo de diferenciação 24
CD44	<i>Cluster differentiation 44</i> ou grupo de diferenciação 44
CID	Cálculo de interação de compostos
CDDP	Cisplatina ou cis-diaminodicloroplatina (II)
CDKN2a	Cyclin-dependent kinase 2A
CisR	Linhagem resistente a cisplatina
CMA	Autofagia mediada por chaperonas
CNX	Calnexina
CQ	Cloroquina
CTN	Células tronco-normais

CTT	Células tronco-tumorales
CXCL1	Chemokine ligand 1
DCLK1	Doublecortin like kinase 1
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal
EMT	Transição epitelial mesenquimal
ER	Reticulo endoplasmático
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FBS	Soro fetal bovino
FCFRP-USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo
FDA	Food and Drug Administration
FGF-2	Fibroblast Growth Factor 2
FORP-USP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo
FTY720	Fingolimod
FTY720-p	Fingolimod fosforilado
5-FU	5-fluorouracil
GMCSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HEK293	Human embryonic kidney 293 cells
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma
HPV	Human papillomavirus
HQ	Hidroxicloroquina
I2PP2A	Inibidor da proteína PP2A
IAP	Inibidores de apoptose
IC ₅₀	Concentração inibitória máxima
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
KFL4	Kruppel-like factor 4
LC3-I	Cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos
LC3-II	LC3-I conjugada com fosfatidiletanolamina ou LC3B

MAPK	MAP quinase
MDA-9	Melanoma differentiation associated protein-9
MDR1	Gene de resistência a múltiplas drogas
mi-RNAs	MicroRnas
MMP-1	Matrix metalloproteinase 1
MMP-2	Matrix metalloproteinase 2
MMP-9	Matrix metalloproteinase 9
MMP-13	Matrix metalloproteinase 13
MRP1	Proteína 1 associada a resistência de múltiplas drogas
NRF2	Nuclear factor-erythroid factor 2-related factor 2
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide
NSCLC	Non-small cell lung cancer
mTOR	Mammalian target of <i>rapamycin</i>
NF-Kb	Nuclear factor kappa beta
Oct4	Octamer-binding transcription factor 4
PARP-1	Poly [ADP-ribose] polymerase 1
PBS	Tampão fosfato salino
PDGF	Platelet-derived growth factor
P-gp	Glucoproteína P
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PP2A	Proteína fosfatase 2A
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatase
PTX	Paclitaxel
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativo
RAB5	Ras-related protein Rab-5A
RAB7	Ras-related protein Rab-7A
Rb	Retinoblastoma protein
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Reactive oxygen species
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro

S1P	Esfingosina-1-fosfato
S1PR	Receptor da esfingosina-1-fosfato
SDCBP	Syndecan Binding Protein
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Small interference RNA
SPHK1	Esfingosina quinase 1
SPHK2	Esfingosina quinase 2
SQSTM1	Sequestosome 1
STAT3	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3
TGF- β	Fator de crescimento transformante β
TP53	Tumor protein 53
TME	Microambiente tumoral
TNBC	Câncer de mama triplo negativo
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
ULA	Ultrabaixa adesão
UVB	Radiação ultravioleta
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organization
WT	Linhagem selvagem

LISTA DE SIMBOLOS

~	Aproximadamente
Cm	Centímetro
°C	Grau Celsius
h	Hora
=	Igual
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
mg/ml	Miligrama por mililitro
mg/Kg	Miligrama por quilograma
mm	Milímetro
min	Minuto
%	Porcentagem
pH	Potencial hidrogeniônico
kDa	Quilo daltons

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT.....	9
RESUMEN.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	13
LISTA DE SÍMBOLOS.....	17
1. Introdução.....	21
1.1. Carcinoma epidermoide de cavidade oral	21
1.2. Cisplatina.....	23
1.3. Fingolimod (FTY720).....	25
1.4. Células Tronco Tumorais.....	27
1.5. Autofagia.....	32
1.5.1. Autofagia no câncer.....	32
1.5.2. Autofagia e as células-tronco tumorais.....	33
1.5.3. Autofagia na quimiorresistência tumoral.....	34
2. Objetivos.....	37
2.1. Objetivo geral.....	37
2.2. Objetivos específicos.....	37
3. Materiais e métodos.....	39
3.1. Linhagens celulares.....	39
3.1.1. Cal27.....	39
3.1.2. SCC9.....	39
3.2. Cultivo celular.....	40
3.3. Ensaio de Resazurina (Alamar Blue)	40
3.4. Cálculo do coeficiente de interação de compostos (CID)	41
3.5. Ensaio de formação de esferas tumorais.....	42
3.6. Avaliação de viabilidade de esferas tumorais.....	42
3.7. Ensaio clonogênico.....	42
3.8. Ensaio da marcação com acridina orange.....	43
3.9. Análise de RNAm por qRT-PCR.....	43
3.10. Análise de proteínas por Western blot.....	44

3.11. Análises Estatísticas.....	45
4. Resultados e discussões.....	47
4.1. Análise da resistência a cisplatina em linhagens celulares CECO....	47
4.2. Padronização de fármacos nas linhagens celulares CECO.....	49
4.3. Avaliação da citotoxicidade e sinergismo de compostos quimioterápicos nas linhagens celulares CECO <i>in vitro</i>	51
4.4. Efeito quimioterápico combinado na capacidade clonogênica e proliferação celular.....	56
4.5. Indução a morte celular pelo efeito inibitório dos quimioterápicos combinados.....	58
4.6. Avaliação do fluxo autofágico após tratamento com a combinação de fármacos.....	61
4.7. Efeito da combinação de fármacos em principais vias que promovem a tumorigenicidade.....	63
4.8. Expressão genica nas linhagens CECO após tratamento com os fármacos.....	67
4.9. Efeito das combinações de fármacos selecionadas na subpopulação de células tronco-tumorais.....	71
5. Conclusão.....	79
6. Referências bibliográficas.....	81

I. INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Carcinoma epidermoide de cavidade oral

Câncer é a denominação das doenças caracterizadas pelo crescimento descontrolado de células anormais com capacidade de invasão nos tecidos circundantes, podendo se espalhar por meio do sistema sanguíneo ou linfático a outras partes do corpo segundo o *National Cancer Institute, NIH* e a *American Cancer Society, ACS*.

O câncer da cabeça e pescoço compreende os tumores malignos que se desenvolvem no trato aerodigestivo superior (cavidade nasal e oral, faringe, laringe) (PERDOMO et al., 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION WHO, 2014). De acordo com sua histologia, essas neoplasias podem se dividir em: adenocarcinomas, tumores de tipo glandular e carcinomas (SCHLUMPF; HAERLE, 2015) e cerca de 40% destas neoplasias acometem a cavidade oral (ALVARENGA et al., 2008). Desses tumores, cerca de 90-95% são identificados como carcinoma do epitélio de revestimento estratificado (espinocelular, escamoso ou epidermoide) de cavidade oral (CECO) (CHI; DAY; NEVILLE, 2015; GOERTZEN et al., 2018; SUDHAKARA et al., 2016) envolvendo diferentes sítios anatômicos: língua, assoalho bucal, gengivas superior e inferior, glândulas parótidas e salivares, palato duro e mucosa bucal (OMURA, 2014; RIVERA, 2015; SASAHIRA; KIRITA, 2018). Sendo considerado o tumor epitelial mais prevalente e agressivo da região de cabeça e pescoço (PAPAGERAKIS et al., 2014).

O CECO apresenta variações na prevalência tanto geográficas quanto de gênero (maior morbidade e mortalidade no Sul da Ásia: Índia e Sri Lanka, com maior número de casos na população masculina) (BRAY et al., 2018). A última estatística realizada pelo GLOBOCAN no ano 2020, reportou um total de 377.713 novos casos e 177.757 mortes por CECO a nível mundial (SUNG et al., 2021). A estimativa nacional para o triênio 2020 – 2022 prevê uma incidência 15.190 de novos casos de câncer de cavidade oral, ocupando a quinta posição de incidência em homens (INCA, 2019).

Entre os principais fatores implicados no câncer oral estão: o consumo excessivo de tabaco (75% casos) e álcool; os quais atuam sinergicamente, potenciando o fator de risco (90% casos) (KUMAR et al., 2016; MARKOPOULOS, 2012; RIVERA, 2015), e presença de do vírus HPV (20% casos, 60 - 80% nos carcinomas escamosos, principalmente na orofaringe) (JELIHOVSCHI et al., 2015). Devido a etiologia multifatorial do CECO, outros fatores são considerados no desenvolvimento dessa doença, como: exposição à radiação ultravioleta (UVB), infecções crônicas virais

(Epstein-Barr, herpes simplex), deficiências nutricionais (vitamina A, C, E, carotenoides, selênio), alterações genéticas, exposições ocupacionais, má higiene bucal (ELKASHTY; ASHRY; TRAN, 2019; KUMAR et al., 2016).

A carcinogênese no CECO é um processo muito complexo que ainda não é totalmente conhecido. Pode ser resumido como, a exposição crônica de um número limitado de queratinócitos normais a agentes carcinogênicos, um ou vários fatores biológicos, químicos e/ou alterações genéticas em diferentes vias de sinalização (TP53, NOTCH, EGFR, CDKN2a, STAT3, Ciclina D1, Rb), os quais estimulam mutações aleatórias, modificando processos de progressão do ciclo celular, mecanismos de reparo do DNA, diferenciação celular e apoptose (RIVERA, 2015). A proliferação e o crescimento descontrolado desses queratinócitos instáveis (alterados) levam a formação de um campo pré-cancerizado, com maiores vantagens de adaptabilidade e sobrevivência em relação às células vizinhas normais. Neste contexto, originam-se as: hiperplasias epiteliais, displasias (leves, moderadas ou severas) até carcinomas in situ ou invasivos com presença de metástases loco regional e distante. Durante a transformação maligna ocorrem alterações que levam à perda de adesão celular e ativação da transição epitélio mesenquimal (EMT) (com alguns fatores envolvidos: MMP-2, MMP-9, MMP-13, ROS, VEGF, CXCL1, CXCL8, PDGF, IL-8, FGF-2, TGF- β , TNF- α , GMCSF, e redução da proteína E-caderina), chegando ao carcinoma oral invasivo (RIVERA, 2015).

As principais características da doença ligadas ao pior prognóstico são diagnóstico tardio, metástase linfonodal e frente invasiva profunda do tumor (FELLER; LEMMER, 2012). Apesar dos progressos no tratamento de CECO, a taxa de sobrevida em 5 anos não aumentou significativamente durante as últimas três décadas (Tabela 1) (ACS).

Tabela 1 - Taxas de sobrevida relativa de 5 anos para CECO e câncer orofaríngeo.

	Taxa de sobrevivência relativa de 5 anos segundo o estágio*			Todos os estágios combinados
	Localizado	Regional	Disseminada	
Língua	82%	68%	40%	67%
Assoalho da boca	76%	38%	20%	51%
Orofaringe	62%	57%	29%	49%

Fonte: American Cancer Society (ACS) (<https://www.cancer.org/cancer/oral-cavity-and-oropharyngeal-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html>). *Com base em pacientes com CECO ou orofaringe entre 2010 e 2016.

Estes dados estão relacionados à baixa resposta terapêutica causada pela alta heterogeneidade tumoral (fator importante na resistência), a qual tem sido associada a presença de células tumorais com características de células tronco, chamadas células tronco tumorais (CTT) (PEITZSCH et al., 2019).

A abordagem terapêutica utilizada no câncer oral é determinada de acordo com o estágio da doença, levando-se em consideração a qualidade de vida e sobrevida do paciente. A ressecção do tumor primário e linfonodos comprometidos no pescoço, além da braquiterapia, são os tratamentos padrão usados em estadiamento inicial (carcinoma *in situ* pequeno e acessível) (BESSELL et al., 2011; OMURA, 2014). Entretanto, esses procedimentos podem ser combinados ou seguidos de radioterapia, quimioterapia, imunoterapia / bioterapia no tratamento primário, e aplicados em estadiamentos avançados (maior crescimento tumoral, presença de metástase) ou em pacientes não adequados para intervenção cirúrgica (comorbidades médicas graves) (HARTNER, 2018; HUANG; O'SULLIVAN, 2013). A cisplatina é um dos quimioterápicos mais utilizados, inclusive como agente radio-sensibilizador, além de outros como 5-fluoracil (5-FU) e docetaxel, e com alvos específicos como o cetuximab (ANDREADIS et al., 2003; NARUSE et al., 2016; RAPIDIS et al., 2008), os quais apresentam um aumento da taxa de sobrevida dos pacientes. Porém, são necessários mais estudos sobre sua eficácia terapêutica e possíveis efeitos secundários.

1.2. Cisplatina

Dentre os agentes quimioterápicos mais utilizados no CECO estão aqueles que contêm altas doses de platina, como a cisplatina (CDDP: cis-diaminodicloroplatina, cis-[Pt(II)(NH₃)₂Cl₂] ([PtCl₂(NH₃)₂]), que foi sintetizada em 1845 pelo médico italiano Michele Peyrone (PERYONE, 1845) e aprovada pela FDA para uso clínico em 1978 (<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&arAppNo=018057>). A cisplatina é considerada um fármaco anticancerígeno potente e altamente tóxico utilizado em neoplasias hematológicas (VAN GELDER et al., 2016) e diversos tumores sólidos, tais como câncer de ovário (SUGIYAMA et al., 2000), testicular (KONDAGUNTA et al., 2005), bexiga (SHIPLEY, 1987), mama (VASSILOMANOLAKIS et al., 2000), entre outros.

Este fármaco apresenta maior eficácia nos tumores malignos com rápido crescimento (divisão celular constante). Seu mecanismo de ação está baseado na citotoxicidade induzida a partir das ligações de entrecruzamento irreversíveis com o

DNA. Quando a cisplatina entra na célula (sem os grupos cloreto) por difusão ou transporte ativo, ela se liga favoravelmente com o sítio N7 do resíduo da desoxiguanosina do DNA nuclear, produzindo apenas uma ligação covalente (aduto monofuncional). Posteriormente, o aduto com a segunda base de guanina (maior afinidade) ou desoxiadenina (menor afinidade) gera as ligações intra-strand (na mesma fita) ou inter-strand (entre as duas fitas) levando à quebra das fitas de DNA, seguido da inibição de síntese e replicação do DNA (WANG; ZHU, 2018). Entretanto, há trabalhos que mostram também uma possível interação e dano específico da cisplatina no DNA mitocondrial (WISNOVSKY et al., 2013; YANG et al., 2006).

A presença de danos no DNA, ativa os mecanismos de reparo (por excisão de nucleotídeos, excisão de base, recombinação ou mismatch), e as células eficientes no reparo, sofrem a parada no seu ciclo celular e morrem por apoptose (via p53, MAPK e p73) ou necrose (RIDDELL; LIPPARD, 2018). A concentração de cisplatina e o estado da célula são fatores determinantes envolvidos no tipo de morte celular (GONZALEZ et al., 2001). Quando o dano no DNA ativa a proteína PARP-1, leva a clivagem de NAD⁺, a qual inibe a glicólise (esgotamento de ATP) resultando no processo necrótico, o qual pode ser somado ao bloqueio de caspases pelas proteínas IAP. Porém, se os níveis de ATP são adequados para célula, o complexo de caspases ativadas 3-6-7 clivam o PARP-1, bloqueando a necrose e favorecendo a apoptose. Portanto, ambos os processos podem ocorrer, mas o estado energético da célula determina o tipo de morte celular (CEPEDA et al., 2007).

Embora o DNA seja o alvo específico para a cisplatina, a concentração do fármaco encontrada no material genético é de apenas o 5-10%, enquanto o 75-85% restante se liga a sítios nucleofílicos de peptídeos, proteínas, enzimas de replicação e RNA, o que poderia ser a causa da sua alta toxicidade e resistência (GÓMEZ-RUIZ et al., 2012), limitando sua eficácia.

Toxicidade em diferentes tecidos, tais como gastrointestinal (náuseas, vômitos), neuronal (neuropatia periférica), renal (insuficiência renal aguda), ocular (perda de visão), hematológica (mielosupressão), otorrinolaringológica (perda auditiva), gonadal (comprometimento da espermatogênese e menopausa prematura) são as mais frequentemente associadas ao uso da cisplatina (GOLD; RAJA, 2020). Por outro lado, a resistência definida como multifatorial, não apresenta um consenso ainda sobre os mecanismos de transporte envolvidos na concentração intracelular da cisplatina, a qual poderia ser determinada pela alteração de fluxo de entrada e/ou saída dos transportadores de membrana (RIDDELL; LIPPARD, 2018). Vários fatores associados com a resistência a este fármaco foram reportados, entre eles a função dos tióis na

glutathiona (CHEN; KUO, 2010) e metalotioneínas (SI; LANG, 2018) assim como a capacidade de tolerância ou reparo de danos por platina no DNA (ROCHA et al., 2018).

Devido a essa toxicidade, mecanismos de proteção celular como a autofagia podem ser ativados (JIANG et al., 2017; LIN et al., 2017a; SHI et al., 2016), onde a inibição específica da autofagia, poderia amplificar a efetividade da cisplatina.

1.3 FTY720

A resistência intrínseca ou adquirida a fármacos continua representando um grande desafio frente a limitação dos tratamentos no câncer oral, o que torna necessário e urgente o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Enzimas envolvidas no metabolismo de esfingolípídios tornaram-se alvos promissores no desenvolvimento terapêutico contra câncer, devido à capacidade de reverter processos de progressão de câncer, resposta ao tratamento como resistência a quimioterapia (CANALS; HANNUN, 2014; OGRETMEN, 2017).

O Fingolimod (FTY720) (2-amino-2-[2-(4-octilfenil) -1,3-propanodiol-hidrocloruro]) foi o primeiro medicamento oral aprovado pela FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) no 2010 para pacientes com esclerose múltipla (SHARMA et al., 2011). Esse fármaco imunomodulador resulta eficaz em doenças autoimunes, assim como em modelos de transplante, agindo como um composto sintético análogo a esfingosina (BRINKMANN et al., 2002). No entanto, além dos efeitos imunossupressores, foi demonstrado seu papel na inibição de vias de transdução de sinal associadas ao câncer (PATMANATHAN et al., 2015; ZHANG et al., 2013a), provando sua efetividade antineoplásica em tumores de câncer de mama (NAGAHASHI et al., 2016), ovário (KREITZBURG et al., 2018; LEE et al., 2015a), próstata (ALLAM et al., 2018; WANG et al., 2017), leucemia (WALLINGTON-BEDDOE et al., 2011), colorretal (LI et al., 2016) entre outros.

O mecanismo de ação do FTY720 não fosforilado é baseado principalmente na inibição da via de sinalização da esfingosina-1-fosfato (S1P) pela inibição da atividade quinase da SphK1 (esfingosina kinase 1). O FTY720 fosforilado (FTY720-p) é um potente inibidor funcional dos receptores da S1P (S1PR_{1,3,4,5}), reduz os níveis de S1P e bloqueia as vias de sinalização de viabilidade, proliferação e migração celular (TAKASAKI et al., 2018; WHITE et al., 2016).

A referida atividade citotóxica do FTY720 foi evidenciada a partir da indução de morte celular por autofagia, apoptose e necrose (ZHANG et al., 2013a, 2010a, 2013b), assim como na diminuição de metástase, redução de EMT (transição epitélio-mesenquimal), inibição de angiogênese e inflamação (promotor de tumorigênese) (PATMANATHAN et al., 2015). Outros mecanismos também foram descritos, tais como potencial agente sensibilizante à radioterapia e quimioterapias convencionais em tumores resistentes (MARVASO et al., 2014; WANG et al., 2017).

Particularmente no câncer de cabeça e pescoço, a sinalização de S1P regula alguns aspectos da carcinogênese, embora algumas vias associadas a S1P ainda são desconhecidas. A SphK1 modula o desenvolvimento tumoral, onde a superexpressão dessa proteína em estágios avançados da doença foi associada com baixa sobrevida, se tornando um potencial alvo em terapias combinadas (NEMA et al., 2016).

O efeito antitumoral *in vitro* e *in vivo* do FTY720 tem sido associado com autofagia, apoptose (BAI et al., 2017; PATMANATHAN et al., 2016) e aumento da atividade da proteína fosfatase 2A (PP2A) mostrando redução do crescimento celular no câncer oral (SANTOS; LEOPOLDINO, 2018; VELMURUGAN et al., 2018). Embora os mecanismos que envolvem o efeito do FTY720 não estejam claros, a inibição da SPHK1 e / ou a ativação da PP2A seriam as vias de sinalização mais relevantes.

Por outro lado, o FTY720 apresentou toxicidade seletiva apenas nas células de CECO comparado com células normais (queratinócitos e fibroblastos), derivando em efeito sinérgico com a cisplatina na indução de morte celular (PATMANATHAN et al., 2016). O mesmo resultado foi observado em outras neoplasias epiteliais como câncer de pulmão (LI et al., 2017), ovário (ZHANG et al., 2013b) e melanoma (ISHITSUKA et al., 2014).

Recentemente, foi demonstrado que as células-tronco normais (LIDGERWOOD et al., 2018) e tumorais (MARFIA et al., 2014) são reguladas pela S1P. O eixo SphK1/S1P seria um mediador importante em processos de autorenovação e diferenciação das células-tronco, onde a inibição dessa via poderia ser considerada no tratamento do câncer (NG et al., 2018). Estudos realizados em câncer de mama apoiam esse mecanismo, devido ao aumento no desenvolvimento do tumor devido à superexpressão de Sphk1 por meio do S1PR3 em células-tronco tumorais (HIRATA et al., 2014; WANG et al., 2016). Com base nisso, propõe-se que a regulação dos referidos lipídios ativos possa ser um novo alvo terapêutico das células-tronco tumorais, portanto susceptível a ação de FTY720.

1.4 Células Tronco-Tumorais

O câncer de cabeça e pescoço é uma doença altamente heterogênea. Existem dois modelos de heterogeneidade que explicam o desenvolvimento do câncer nos tumores sólidos. O modelo estocástico afirma que a capacidade proliferativa nas células tumorais é homogênea, sendo produto do acúmulo de alterações genéticas devido a seu caráter instável, enquanto o modelo hierárquico, indica que as células tumorais estão organizadas numa hierarquia funcional, onde uma subpopulação de células do tumor, as células tronco-tumorais (CTT), apresentam o potencial tumorigênico (RICH, 2016). Entretanto, estudos ao longo das últimas décadas indicam que ambas as teorias não são excludentes; pelo contrário, são expressas de forma diferente em vários estágios da progressão do câncer, provando ser específico para cada tumor (KRISHNAMURTHY; NÖR, 2012).

Do mesmo jeito que as células tronco-normais (CTN), as CTT apresentam características de autorrenovação e diferenciação. Assim como, potencial tumorigênico e metastático, crescimento independente de ancoragem, expressão ativa da telomerase, bloqueio de senescência e detecção por meio de marcadores específicos (ALLEGRA; TRAPASSO, 2012; BOROVSKI et al., 2011; KOBAYASHI; DE NORONHA, 2015).

As CTT se localizam no nicho ou microambiente tumoral junto aos componentes celulares do estroma (células tronco mesenquimais, células endoteliais, imunes e fibroblastos), a matriz extracelular, fatores de crescimento e citocinas (PLAKS; KONG; WERB, 2016; YE et al., 2014). O nicho fornece sinais para sua funcionalidade, além de mantê-las no seu estado tronco, evitando a apoptose. Da mesma forma, o nicho regula a progressão do tumor primário pela desdiferenciação de células tumorais em CTT, induzindo a metástase por EMT. Onde a localização e crescimento desses tumores secundários, seria facilitado por meio da formação de nichos pre-metastáticos pelo tumor primário (BOROVSKI et al., 2011) (Figura 1). Outras funções do nicho estão ligadas a autorenovação das CTT, através das interações célula-célula e célula-matriz evitando a exposição à diferenciação e apoptose, e com a resistência à quimioterapia e radioterapia, que contribuem com a instabilidade genética das CTT (ALLEGRA; TRAPASSO, 2012).

A matriz extracelular constitui uma rede tridimensional de organização complexa e dinâmica, composta por colágeno, proteoglicanos, elastina, fibronectina e glicoproteínas, sujeita a remodelação contínua e controlada (THEOCHARIS et al., 2016). Essa regulação envolve a degradação da matriz por enzimas como as

metaloproteinases. Em doenças como o câncer, modificações na proteólise dessas proteínas podem mudar a estrutura da matriz, promovendo a invasão e metástase do tumor (KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010; KESSENBROCK; WANG; WERB, 2015).

No câncer de cabeça e pescoço, o 80% das CTT estariam localizadas em nichos perivasculares (frente invasiva do tumor perto dos vasos sanguíneos), onde os fatores secretados pelas células endoteliais associadas aos tumores, sinalizam vias ligadas à melhora da autorenovação e sobrevivência das CTT (KRISHNAMURTHY et al., 2010). Assim também, foram descritas algumas moléculas envolvidas na progressão do carcinoma oral, como a MMP-1 onde sua expressão foi dependente do grau do tumor (GEORGE; RANGANATHAN; KRISHNA, 2010) e as MMP-2 e MMP-9 estiveram associadas a um pior prognóstico (KATAYAMA et al., 2004; PATEL et al., 2005). Assim também, altos níveis de IL-6 nas células endoteliais associadas ao tumor definiram a tumorigenicidade, além de promover fenótipos de potência e a fosforilação da via STAT3 (KRISHNAMURTHY et al., 2015). E a superexpressão da proteína tirosina quinase (TrkB) alterou a expressão de mediadores moleculares de EMT, negativa (E-caderina) e positivamente (Twist e Snail), promovendo a migração e invasão de CECO (KUPFERMAN et al., 2010).

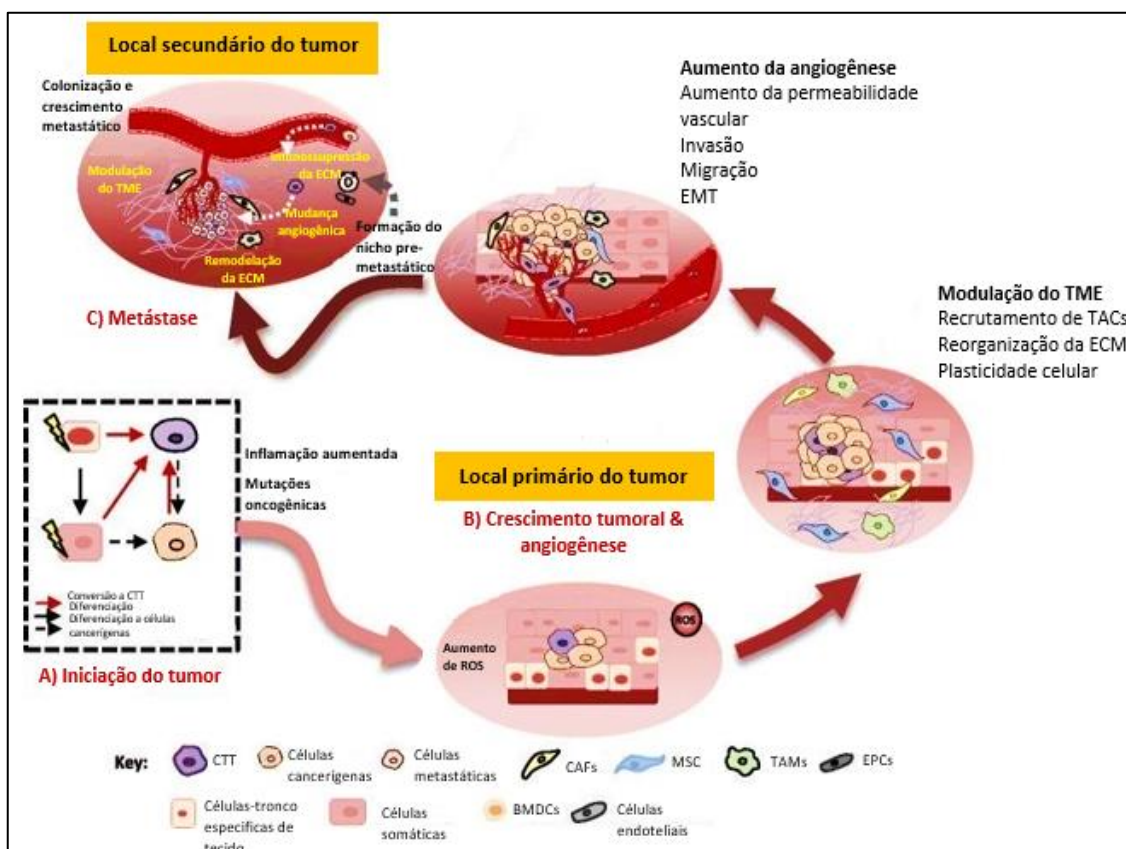
O isolamento das CTT de um tumor baseia-se na identificação de suas características únicas em relação à sua progênie diferenciada, bem como nas células-tronco normais. Esses marcadores são específicos e variam de acordo com o tipo de tumor. A identificação das CTT de câncer de cabeça e pescoço tem sido realizada por métodos que incluem: a análise de marcadores de superfície CD44 (PRINCE et al., 2007) e CD133 (ZHANG et al., 2010b), cujas células positivas demonstraram uma alta capacidade tumorigênica; a determinação da atividade enzimática do aldeído desidrogenase (ALDH), responsável pela oxidação de metabólitos tóxicos de aldeído (como algumas drogas quimioterapêuticas) (ZOU et al., 2012). A superexpressão da ALDH1 foi associada com a invasão angiolímfática e metástase linfonodal no câncer oral (MICHIFURI et al., 2012; ORTIZ et al., 2018).

Foi mostrado também que as células ALDH1⁺ incluem um subconjunto de células CD44⁺, ou seja, células com ambos os marcadores fenotípicos (CLAY et al., 2010). Esta dupla marcação ALDH1⁺/CD44⁺ evidenciou uma elevada expressão de genes relacionados com células tronco embrionárias, quimiorresistência e EMT no câncer de cabeça e pescoço (CHEN et al., 2009).

Outra característica importante é a capacidade de efluir um corante fluorescente (Hoechst 33342), que ocorre por meio da expressão de um grupo de

proteínas transportadoras transmembrana (ZHANG et al., 2009). As células cancerígenas que excluem o corante Hoechst são denominadas como SP (“side population”), as quais expressam genes do tipo CTTs e estão envolvidas na resistência a fármacos, recidiva e clonalidade no carcinoma oral (SHANG et al., 2016). Por fim, a formação de esferas tumorais em suspensão (estado indiferenciado) também tem sido considerada uma característica de CTT, pois permite identificar células com capacidade de proliferação sob condições de baixa adesão (cultura 3D)(DONTU et al., 2003).

Figura 1. Participação das células tronco tumorais na progressão do câncer.



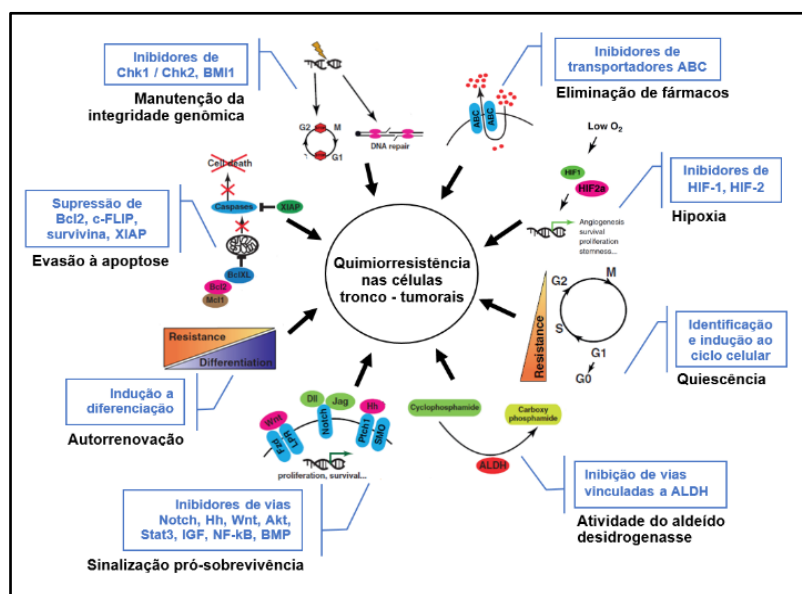
A) O desenvolvimento do tumor se inicia a partir da formação das CTT. Estas podem ser originadas por: 1. Alterações genéticas nas CTN, 2. Durante o estágio de desenvolvimento a partir dos precursores das CTT, 3. Ou mediante a desdiferenciação da célula madura normal ou tumoral a CTT. Esta fase está acompanhada por processos inflamatórios e aumento de ROS. **B)** O crescimento do tumor é facilitado pelo seu microambiente tumoral (TME), onde as CTT recrutam os componentes celulares do TME modelando sua matriz extracelular (ECM). O incremento do volume tumoral induz a angiogênese, o qual aumenta a permeabilidade vascular, promovendo a migração e invasão associado ao processo de EMT. **C)** As CTT orquestram a cascata de metástase para estabelecer novos nichos pre-metastáticos para sua chegada. Similar ao tumor primário, o TME nos locais metastáticos promove a disseminação de células malignas, criando um nicho de suporte ao crescimento, promovendo a angiogênese para apoiar o crescimento do tumor secundário (Modificado de AYOB; RAMASAMY, 2018).

A quantidade e velocidade de crescimento desses agregados ou esferoides ou esferas, induz a presença e capacidade de autorrenovação das CTT a partir da população heterogênea de células tumorais (LEE et al., 2015b). Uma maior capacidade de formação de esferas foi observada em populações ALDH1⁺ e CD44⁺ (KRISHNAMURTHY et al., 2010; OKAMOTO et al., 2009), expressando níveis altos de fatores de transcrição de pluripotência como Oct4, Nanog, Sox2, Sox9, CD117, CD133, Nestin, ABCG2, Lin28, KLF4 (CHIOU et al., 2008; LEE et al., 2016; MISUNO et al., 2013) no CECO, mostrando tumorigenicidade e capacidade metastática.

Contudo, a resistência aos fármacos pelo enriquecimento da subpopulação de CTT, leva a regeneração e desenvolvimento de novos tumores após tratamento, que por sua vez, prolonga o tempo da terapia, causando o fracasso do tratamento ou torna-se um tumor com fenótipo mais agressivo (ALBERS et al., 2011; KOUKOURAKIS et al., 2012).

Entre os mecanismos de resistência à terapia encontram-se: expressão anormal de bombas de efluxo de drogas pelos transportadores ABC (ATP-binding cassette), superexpressão de vias anti-apoptóticas, reparo efetivo no dano ao DNA, latência relativa / cinética do ciclo celular lento, ativação de vias pró-sobrevivência, presença de nichos hipóxicos, aumento da atividade de ALDH, resistência a diferenciação (Figura 2).

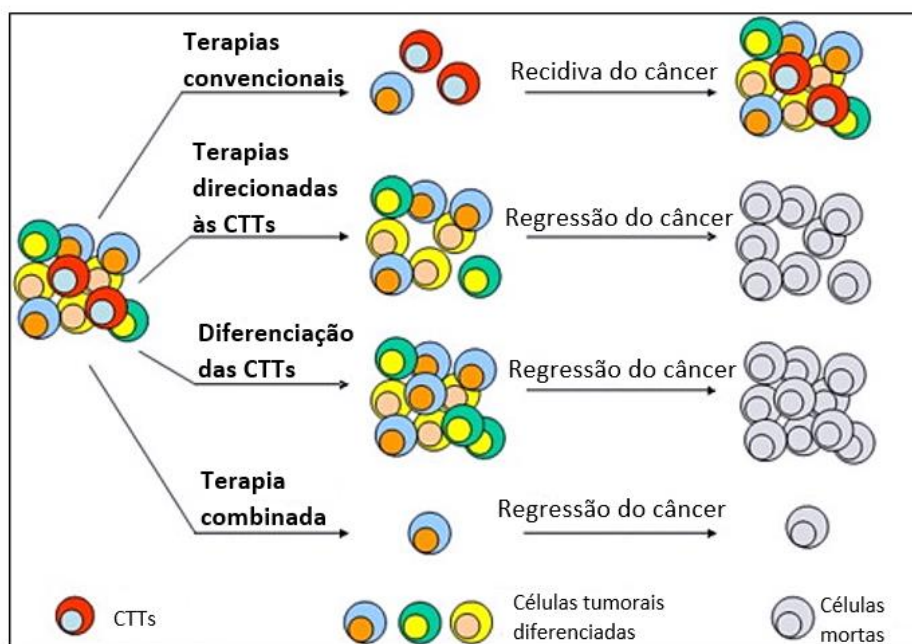
Figura 2. Mecanismos moleculares das células tronco-tumorais na resistência a fármacos.



Oito alvos biológicos relevantes (letras pretas) são os responsáveis do direcionamento a quimiorresistência em CTTs (setas pretas). Cada mecanismo celular representado em gráficos e acompanhado de sua possível forma de intervenção terapêutica (caixas azuis com linhas) (Modificado de SOTIROPOULOU et al., 2014).

Devido a isso, é possível explicar o papel das CTT na terapia. As estratégias terapêuticas que se concentram no direcionamento de CTT e seu nicho abordam a eficácia das terapias tradicionais do câncer para erradicar as CTT, que de outra forma resultariam em resistência à terapia. O uso combinado de terapias tradicionais com agentes específicos de CTT direcionados, pode ter como alvo todo o câncer e oferecer uma estratégia promissora para tratamento duradouro e até mesmo a cura. Estas estratégias poderiam melhorar o tratamento, impedindo a recidiva ou a progressão do câncer (Figura 3). Atualmente, existem vários estudos clínicos com diversas combinações de fármacos usados em terapias convencionais e terapias direcionadas as CTT, promovendo a morte das CTT e das células diferenciadas (HAN et al., 2013). Dessa forma, esta abordagem seria a mais benéfica, tanto pela sua eficácia quanto sua ação rápida.

Figura 3. Esquema ilustrativo das abordagens terapêuticas anticancerígenas visando as células da massa tumoral e populações células-tronco tumorais.



Os tratamentos convencionais são dirigidos contra as células cancerígenas diferenciadas em proliferação, não sendo capazes de atingir as CTTs, resultando em seleção das CTTs e recidiva do câncer. Por outro lado, o direcionamento de terapias mais eficazes para CTT (nos marcadores de superfície, nicho, mecanismos de sinalização na manutenção e sobrevivência ou nas vias metabólicas das CTT) pode eliminar ou induzir a diferenciação destas células, o que levaria as células remanescentes à morte (Modificado de HAN et al., 2013).

1.5 Autofagia

A autofagia é um processo celular responsável pela degradação e reciclagem de moléculas e organelas danificadas, que ocorre por diferentes vias de direcionamento de substratos citoplasmáticos aos autofagossomos/autofagolisossomos. Existem três tipos principais de autofagia: microautofagia, autofagia mediada por chaperonas (CMA) e macroautofagia. Sendo esta última desenvolvida a partir do envelope de componentes celulares pelos fagóforos (estruturas de membrana dupla), para formar o autofagossomo. O qual se ligará posteriormente ao lisossomo "autofagolisossomo" para degradação enzimática, fornecendo aminoácidos ou lipídios e ácidos nucleicos para o metabolismo celular. Esta maquinaria está desregulada em várias doenças neurodegenerativas, musculares, infecciosas, cardiovasculares, imunológicas, envelhecimento, bem como em vários tipos de câncer (LEI et al., 2017; OJHA; BHATTACHARYYA; SINGH, 2015).

1.5.1 Autofagia no câncer

A autofagia no câncer funciona como um mecanismo de sobrevivência, protegendo as células tumorais contra condições externas de estresse, como hipóxia, suprimento insuficiente de nutrientes e energia, e terapias antitumorais (Figura 4). A indução de autofagia foi descrita em diversas abordagens terapêuticas, promovendo a sobrevivência das células tumorais e contribuindo com a resistência. Entre elas destaca-se, as terapias genotóxicas convencionais (tais como radiação e cisplatina) (APEL et al., 2008; MA et al., 2013; OJHA; SINGH; BHATTACHARYYA, 2016a), não convencionais e as terapias baseadas na inibição de PI3K, AKT e mTOR (AMARAVADI et al., 2011). O aumento do fluxo autofágico no tumor traz como consequência o incremento na produção de EROs (devido a danos mitocondriais), redução na apoptose, resposta ao estresse no retículo endoplasmático (pelos agregados de proteínas) e a seleção do fenótipo de CTT (SMITH; MACLEOD, 2019).

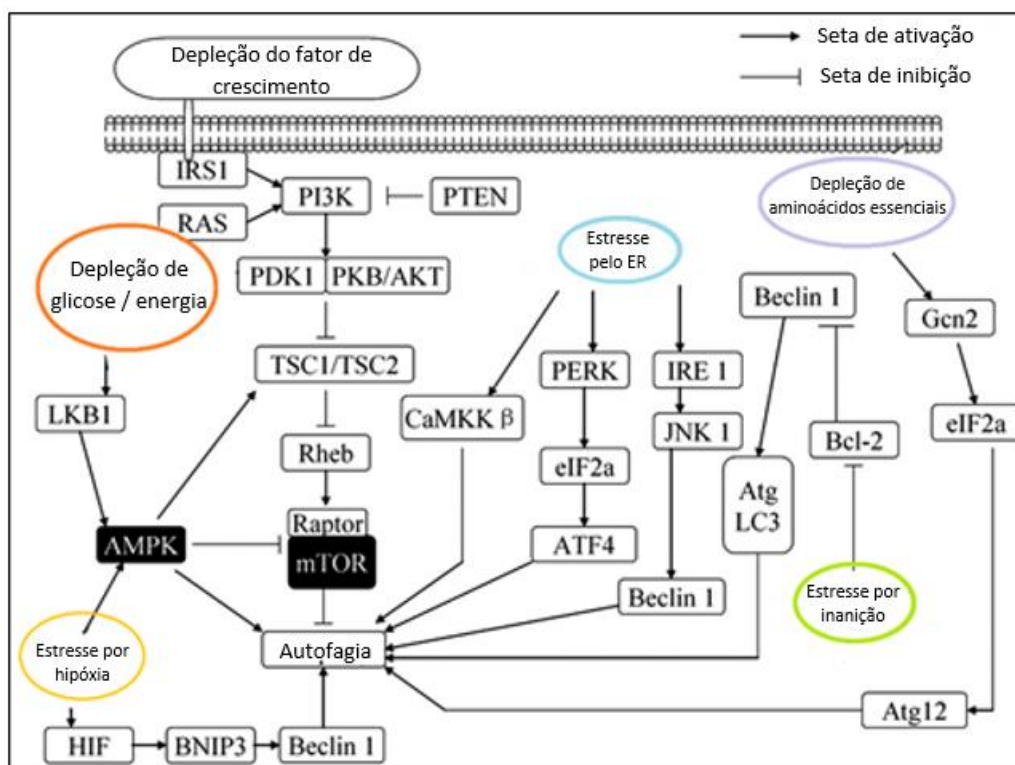
No entanto, se o estresse no microambiente tumoral persistir, a autofagia excessiva pode levar à morte autofágica denominada morte celular programada tipo II, desempenhando assim uma dupla função (XU; XIA; PAN, 2013). A partir disso, tem sido mostrado que certos agentes quimioterápicos tem sua efetividade antitumoral aumentando o fluxo autofágico (ARYAL et al., 2014; HAN et al., 2014; LU et al., 2014a). Enquanto, outros estudos mostraram que a autofagia tem efeito protetor levando a

progressão tumoral (BELOUNIS et al., 2016; LIU et al., 2016; OJHA; SINGH; BHATTACHARYYA, 2016a).

1.5.2 Autofagia e a subpopulação de células tronco tumorais

Com base no exposto acima, pode-se inferir que a terapia leva à seleção de células que expressam maiores níveis de autofagia, ou seja, as CTT resistentes ao tratamento seriam as mais dependentes da autofagia. Embora os mecanismos pelos quais a autofagia regula as CTT ainda não sejam totalmente conhecidos, alguns foram propostos, entre eles: 1. Os metabólitos de alta energia (lactato, cetonas) e a expressão de genes glicolíticos, que fornecem energia e nutrientes, promovendo a autorrenovação, crescimento tumoral e metástase. 2. Mediante a regulação de miRNAs, na sobrevivência e potencial invasivo das CTT. 3. Alteração de vias de sinalização como EGFR-STAT3, TGF β / TGF- β -SMAD (LEI et al., 2017).

Figura 4. Regulação da autofagia no câncer.



A ativação da autofagia em resposta à vários estímulos (círculos coloridos) oferece vantagem na progressão tumoral. Entre essas vias estão: PERK-eIF2 α , IRE1-JNK1 e a liberação de Ca²⁺ (estresse pelo ER, retículo endoplasmático), ativação de AMPK e subsequente inibição de mTOR (estresse energético ou por hipoxia) e mediante a transcrição de alguns genes de autofagia "Atg" (estresse por depleção de nutrientes) (Modificado de XU; XIA; PAN, 2013).

A autofagia é fundamental no controle homeostático e na manutenção da pluripotência tanto em células-tronco normais quanto tumorais (CHANG, 2020; NAZIO et al., 2019; SALEMI et al., 2012; SHARIF et al., 2017; TEIXEIRA; RENATO; KEITH, 2012). A participação da autofagia nas CTT foi demonstrada em várias neoplasias como câncer de bexiga (via JAK2 e STAT3) (OJHA; SINGH; BHATTACHARYYA, 2016b), cervical (modulação de Oct-4, SOX2, Nanog) (YANG et al., 2017), glioblastoma (via SDCBP/MDA-9/Syntenin) (TALUKDAR et al., 2018), ovário (pelo fator de transcrição NRF2) (WANG et al., 2018), colorretal (RAB5, RAB7 na via de mitofagia e DCLK1) (KANTARA et al., 2014; TAKEDA et al., 2019), oral (EGFR) (LV et al., 2020), entre outros. No entanto, o tipo mais estudado foi no câncer de mama, observando-se que a expressão de ATG4A, Bcl-1 e dos genes lisossomais resulta na manutenção das mamoasferas e no desenvolvimento da tumorigênese (GONG et al., 2013; WOLF et al., 2013). Onde subpopulações CD24⁺/CD24⁻ dependem da modulação da secreção de IL6 para a sobrevivência (MAYCOTTE et al., 2016).

Devido a dicotomia da autofagia, outros autores afirmam que estaria sendo regulada negativamente nas CTT. Como foi no caso da temozolomida, onde as células CD133⁺ contribuíram para a quimiorresistência com baixos níveis de autofagia (JUN et al., 2009). Por outro lado, após tratar células tumorais com a nigericina (HEGAZY et al., 2016) e rotterina (KUMAR; SHANKAR; SRIVASTAVA, 2013; SINGH et al., 2012), a indução da autofagia levou a supressão das características de CTT, e induziu a apoptose. Particularmente, no câncer escamoso do esôfago, observou-se que a metilbardoxolona inibiu os marcadores EMT e CTT, e induziu a morte celular (WANG et al., 2015).

1.5.3 Autofagia na quimiorresistencia tumoral

Devido à importância da autofagia no câncer, vários estudos têm proposto explorar sua modulação como alvo terapêutico no tratamento antitumoral. A cloroquina (CQ) e hidroxicloroquina (HQ) são inibidores do fluxo autofágico tardio, os quais atuam evitando a acidificação lisossomal, a partir do bloqueio da atividade lisossômica secundária, o que leva a não degradação das moléculas no autofagolisossomo (PASCOLO, 2015). Esses inibidores apresentaram eficácia quando combinados com outros fármacos, pois conseguiram atuar sinergicamente, melhorando a resposta à quimio-radioterapia (5-fluoracilo + RT) em células p53-mutadas (SCHONEWOLF et al., 2014), e potencializaram a citotoxicidade do Imatinib na diminuição do crescimento celular (aumento na atividade de caspases 3/7) e da clonogenicidade (GUPTA et al.,

2010) (GUPTA et al., 2010). Em experimentos *in vivo*, a CQ e HQ reduziram o volume tumoral (diminuindo a proteína autofágica SQSTM1), a metástase pulmonar em camundongos no tratamento com o sorafenibe, resultando em altas taxas de sobrevida (ERITJA et al., 2017). De modo similar, a HQ foi demonstrada como terapia pré-operatória em pacientes com adenocarcinoma pancreático em fase I e II, junto ao tratamento com gemcitabina, onde a inibição autofágica reduziu o marcador tumoral CA19-9 em 73% dos pacientes, obtendo uma melhora na sobrevida global e livre de doença neste grupo (BOONE et al., 2016).

Na literatura tem sido descrito a utilização de outros compostos farmacológicos que regulam diversos pontos da via autofágica, tais como: inibidores da fase inicial da autofagia, impedindo a formação do autofagossomo; como o 3-MA (inibidor da classe III das PI3K) (LI et al., 2015; SANTOS; LEOPOLDINO, 2018; SHIN et al., 2017; THU et al., 2015), a cicloheximida (inibidor da síntese de proteínas) (WANG; GUNDELACH; BRAM, 2017) e MRT68921 e MRT67307 (inibidores de ULK1 e ULK2) (PETHERICK et al., 2015); no bloqueio do autofagossomo, pela inativação de genes autofágicos (siRNA/shRNA Atg5, Beclin-1, Atg7) (CHEN et al., 2018b; DOMAGALA et al., 2018; QADIR et al., 2008) ou da expressão de microRNAs: miRNA26 (JIN et al., 2017), miRNA199-a-5p (LI et al., 2016b), miRNA-138-5p (TIAN et al., 2017); impedindo a formação do autofagolisossomos, a bafimolicina A1 (BAF), inibidor específico da V-ATPase (QUAN et al., 2019); e no bloqueio de proteases lisossomais, E64d (inibidor de catepsinas B,H e L) e a pepsatina A (inibidor de catepsinas D e E) (TANIDA et al., 2005).

Em relação as CTT, alguns fármacos foram mais eficazes pela sua ação nas CTT, como a salinomicina, que mostrou maior efetividade em relação ao paclitaxel devido ao seu efeito supressor na via autofágica-lisossomal e pró-apoptótico nas células tumorais, preferencialmente nas ALDH⁺ (YUE et al., 2013). Em outros casos, observou-se a implicação desses supressores autofágicos na capacidade de inibir o fenótipo de CTT, na formação de mamoesferas e na redução de populações CD44⁺/CD24⁻ (inibindo a migração e invasão celular pela desregulação MMP-9 e MMP-2) (AN et al., 2015) e CD133⁺ (HAO; LIU; TIAN, 2019). Como consequência, houve aumento na suscetibilidade das CTT aos tratamentos com salinomicina no TNBC "câncer de mama triplo negativo" (AN et al., 2015), gemcitabina no câncer pancreático (YANG et al., 2015) e cisplatina no câncer pulmonar de células não pequenas (HAO; LIU; TIAN, 2019), onde a eficácia do tratamento anti-CTT dependeria do tipo de tumor e da autofagia. Portanto, pode-se deduzir que esses reguladores de autofagia podem atuar como possíveis adjuvantes, reduzindo a resistência ao tratamento convencional em diferentes tipos de câncer.

II. OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos de novas combinações terapêuticas antitumorais em linhagens celulares de CECO resistentes à cisplatina com ênfase na eliminação de células tronco tumorais.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar os níveis das proteínas LC3 e SET nas linhagens tumorais (SCC9 e Cal27) de CECO selvagens (WT) e com resistência induzida à cisplatina (CisR);
- Determinar o potencial antitumoral das combinações dos fármacos selecionados: cloroquina (CQ), cisplatina (CIS), Fingolimod (FTY720) e paclitaxel (PTX) nas linhagens tumorais de CECO WT e CisR;
- Calcular o índice de sinergismo das combinações dos fármacos selecionados nas linhagens CECO WT e CisR;
- Avaliar o potencial de formação de colônias (clonogenicidade) das linhagens celulares CECO CisR expostas às combinações selecionadas dos fármacos;
- Determinar os níveis de proteínas envolvidas em algumas vias de sinalização tumoral após a exposição das linhagens celulares CECO CisR às combinações de fármacos selecionadas;
- Determinar a resposta aos tratamentos combinados quanto a expressão de genes relacionados à resistência a drogas nas linhagens CECO CisR;
- Avaliar o potencial de formação e viabilidade de esferas tumorais (cultura 3D) nas linhagens celulares CECO CisR expostas às combinações selecionadas dos fármacos.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3. Materiais e Métodos

3.1 Linhagens celulares

Foram utilizadas as linhagens de carcinoma oral Cal27 e SCC9 (derivadas de tumor de língua) adquiridas na American Type Culture Collection (ATCC), cultivadas de acordo com as recomendações da ATCC.

3.1.1.1 - Cal27 (ATCC® CRL-2095™), é uma linhagem celular estabelecida a partir de um paciente do sexo masculino de 56 anos de idade com carcinoma epidermoide pobremente diferenciado localizado na região mediana da língua, sem prévia RT (Radioterapia) antes da biopsia (GIOANNI et al., 1988). Apresenta características de células poligonais com citoplasma altamente granular (JIANG et al., 2009) e é considerada tumorigênica, porém não metastática.

3.1.1.2 - SCC9 (ATCC® CRL-1629™), é uma linhagem tumorigênica obtida a partir de um paciente do sexo masculino de 25 anos de idade com carcinoma epidermoide de língua sem RT (RHEINWALD; BECKETT, 1981). Foi classificado como T2N1: (T2: tumor primário maior que 2 cm, com dimensão máxima de 4 cm; N1: metástase em um único linfonodo homolateral de até 3 cm na máxima dimensão; M0: sem metástase a distância) (RIVERA, 2015).

Adicionalmente, usando uma estratégia de seleção induzida *in vitro* para imitar a administração de cisplatina na clínica, foram estabelecidas as linhagens resistentes à cisplatina (CisR): Cal27_{CisR} e SCC9_{CisR}. A aquisição de resistência foi levada a cabo após ciclos de incubações com a CDDP e tempos de recuperação, até conseguir taxas de proliferação normais antes de começar o novo ciclo. Essas novas linhagens celulares CisR foram obtidas e cedidas pela Dra. Luciana O. Almeida, jovem pesquisadora na FORP-USP e colaboradora neste estudo. As linhagens CisR possuem IC50 para cisplatina maior do que as linhagens selvagens e foram caracterizadas pelo grupo da Dra. Luciana Almeida (dados não publicados, artigo submetido).

3.2 Cultivo celular

As células Cal27 foram cultivadas no meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, D5648; Sigma-Aldrich Saint Louis, MO 63103, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (12657-029; Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), e agentes antibacterianos e antimicóticos (penicilina 10,000U/mL, estreptomicina 10mg/mL, anfotericina 25µg/mL; A5955, Sigma-Aldrich). A linhagem celular SCC9 foi mantida em meio de cultura DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Nutrient Mixture F-12) (12500-062, GIBCO) suplementado com solução de HEPES (15mM) (H3375, Sigma) e hidrocortisona (400 ng/mL) (H0888, Sigma), além dos compostos mencionados para o DMEM. O cultivo das células foi realizado em incubadora de CO₂ a 37°C e de atmosfera umidificada de 5%.

As células foram plaqueadas em placas de 100 mm de diâmetro e expandidas até atingir a confluência de 70 - 90%, após foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS, Phosphate-buffered saline: NaCl 137mM; KCL 2,7mM; Na₂HPO₄ 9,1mM; KH₂PO₄ 1,8mM; pH 7.4 Sigma Aldrich) e incubadas a 37°C com solução de Tripsina – EDTA (T4174, Sigma Aldrich). A ação da tripsina foi inativada adicionando DMEM completo. Posteriormente, as células foram coletadas e transferidas para tubos cônicos, centrifugadas à 200 x *g* por 5 minutos, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em meio DMEM completo. A seguir, foram contadas em câmara de Neubauer, e plaqueadas de acordo com os diferentes experimentos realizados.

3.3 Ensaio de viabilidade celular

O efeito antitumoral da combinação dos fármacos nas linhagens celulares foi avaliado inicialmente quanto a citotoxicidade pelo método de resazurina (AL-NASIRY et al., 2007). As células (2×10^3 – $2,5 \times 10^3$) foram distribuídas em placas de 96 poços na confluência de 50 – 60%, com 200 µL de meio de cultura e mantidas *overnight* antes de adicionar os fármacos. As células foram mantidas com os fármacos sensibilizadores Cloroquina (CQ, Sigma-Aldrich C6628) e Fingolimod (FTY720, Sigma-Aldrich SML0700; veículo: BSA, Sigma-Aldrich A7906) por 24h, e depois foi adicionado o segundo quimioterápico: Cisplatina (CDDP, Sigma-Aldrich 479306), Fingolimod e Paclitaxel (PTX, Sigma-Aldrich T7402), em associação ou não com o primeiro composto por mais 24 horas. Depois disso, o meio de cultura foi retirado e adicionou-se meio novo sem os compostos; nessas condições as células foram mantidas por mais 48 horas. O reagente

colorimétrico Alamar Blue® foi adicionado na concentração final de 10% (0.01 mg/mL) e as células foram mantidas em cultura por 2 horas, protegidas da luz. A fluorescência do reagente foi medida utilizando o fluorímetro de placas Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader (Biotek, Winooski, VT, EUA), com comprimentos de onda de excitação de 530/25 nm e de emissão de 590/35 nm determinando os valores lambda máximo. Os resultados da viabilidade celular estão apresentados como porcentagem de células viáveis em relação com o grupo controle. Foram realizados três ensaios independentes em quintuplicata experimental e os valores são mostrados como média e desvio padrão.

3.4 Cálculo do coeficiente de interação de compostos (CID)

O efeito sinérgico dos compostos nas linhagens celulares de CECO foi determinado por meio do teste de citotoxicidade por resazurina. O cálculo da interação entre os compostos (CID) nas condições combinadas foi realizado como descrito por Chou (CHOU, 2010), utilizando a formula:

$$CID = AB / (A \times B) \times 100$$

Onde:

AB: Taxa de viabilidade celular do tratamento combinado, em relação ao controle.

A, B: Taxas de viabilidade celular dos tratamentos isolados, em relação ao controle.

A taxa de viabilidade celular do controle é igual a 1 (CHOU, 2010; SUN et al., 2014). Portanto, os valores de CID foram definidos como:

- CID > 1: efeito antagônico entre os compostos.
- CID = 1: efeito aditivo entre os compostos.
- CID < 1: efeito sinérgico entre os compostos.
- CID < 0,7: efeito sinérgico significativo entre os compostos.

Esses ensaios foram realizados em triplicata biológica e quintuplicata experimental e os valores mostrados como média e desvio padrão.

3.5 Ensaio de formação de esferas tumorais

Para avaliar a subpopulação de células tronco tumorais nas linhagens celulares resistentes (Cal27_{CisR} e SCC9_{CisR}), utilizamos o ensaio de formação de esferóides ou esferas em placas de 96 poços de ultrabaixa adesão (*Ultra-low attachment plates, ULA*). As células foram plaqueadas e mantidas em cultura durante 7 dias na presença das combinações de fármacos selecionadas a partir dos resultados de CID. No final do período, determinou-se a porcentagem de eficiência de formação de esferas por condição. Foram adquiridas imagens representativas por poço no aumento de 20X utilizando microscópio de campo claro (Zeiss). Os experimentos foram realizados em triplicata biológica e cada ensaio foi realizado em quintuplicada experimental. Os valores são apresentados como média e desvio padrão.

3.6 Avaliação da viabilidade de esferas tumorais

A capacidade de recuperação e viabilidade das esferas após exposição aos fármacos, foi testada em placas de cultura para células aderentes. Sendo assim, no 8º dia do ensaio de formação de esferas supracitado, o conteúdo total de cada poço da placa *ULA*, contendo as esferas, foi transferido para placas convencionais de cultura de 96 poços e mantido por mais 48 horas. Ao final do período, as esferas aderidas foram fixadas em formalina tamponada neutra 10% e coradas com solução de cristal violeta 0,5%. A contagem e imagens adquiridas das esferas aderidas foi realizada em microscópio de campo claro.

3.7 Ensaio de clonalidade

A capacidade de sobrevivência celular em baixa densidade e de clonalidade das linhagens resistentes nas condições selecionadas foi avaliada pelo ensaio clonogênico (FRANKEN et al., 2006). As linhagens CECO resistentes (Cal27_{CisR}, SCC9_{CisR}) foram plaqueadas em placas de 24 poços (8×10^2 e 4×10^2 células, respectivamente) e mantidas em cultura por 7 dias. Os testes foram realizados com as combinações de fármacos que obtiveram maior ação antitumoral pelo ensaio de viabilidade. Após o término, as células foram fixadas em formalina tamponada neutra 10% e coradas com solução de cristal violeta 0,5% (61135, Sigma Aldrich). A contagem

das colônias (> 50 células), medição da % área e % intensidade das colônias foi realizado pelo software *Image J* segundo o protocolo de Guzmán (GUZMÁN et al., 2014). Estes experimentos foram realizados em triplicata biológica e experimental. Os gráficos e a análise estatística foram feitas no software GraphPad Prism versão 5.

3.8 Ensaio da marcação com acridina orange

Para detectar as estruturas típicas da autofagia, como as organelas vesiculares ácidas (AVOs), foi utilizado a coloração das células com acridina orange, seguindo o protocolo indicado pelo fabricante. As células CECO Cal27_{CisR} foram plaqueadas em placas de 24 poços e tratadas por 48 horas com os compostos conforme citado no item 3.3. A seguir, as células foram incubadas com uma solução de acridina orange (318337, Sigma-Aldrich) na concentração de 1,0 µg/mL em meio DMEM sem fenol por 15 min a 37°C. Após, as células foram lavadas com PBS e mantidas em meio sem fenol para visualização no microscópio de fluorescência Zeiss Axiovert 40 CFL utilizando os filtros 38HE (verde) e 00 (vermelho), e fotografadas com o software AxioVision 4.8.2 (Zeiss).

3.9 Análise de RNAm por qRT-PCR

As sequências dos genes-alvo foram obtidas do Genbank e exportadas para o programa Primer Express v 3.3 (Applied Biosystems). Os conjuntos de primers foram desenhados seguindo os critérios padrões definidos pelo software. A extração de RNA das amostras foi realizada com o reagente Qiazol (79306, Qiagen) seguindo as instruções do fabricante, e foi ressuspenso em água livre de RNase e DNase (SIGMA). A concentração e a qualidade do RNA foram determinadas pela quantificação no espectrofotômetro a 230 nm (Thermo Scientific), sendo consideradas adequadas as amostras que apresentarem valores do cálculo da razão 260/280nm entre 1.8 – 2.0. A reação de síntese de cDNA foi realizada utilizando-se 1 µg de RNA total e o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) em um volume final de 20 µL. A reação foi incubada em 25 °C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e a transcriptase reversa foi inativada por aquecimento a 85°C por 5 minutos. As reações em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real foram realizadas em triplicatas experimental e duplicata biológica utilizando-se o reagente GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, A6002) em reações de volume total de 12 µL contendo 6 µL do SYBR Green

Power Mix, 2,16 μ L de uma mistura de primers sense e antisense (900 nM de cada primer na reação), cDNA (300 ng) e água milli-Q q.s.p. As reações de PCR em tempo real foram realizadas no equipamento Mastercycler® ep realplex 4 (Eppendorf). O RNAm GADPH foi utilizado como controle endógeno. Os dados obtidos foram utilizados para o cálculo da expressão relativa utilizando $2^{-\Delta\Delta CT}$ segundo a formula: $2^{-(\Delta CT_{\text{teste}} - \Delta CT_{\text{referência}})}$ onde: $\Delta CT_{\text{teste}} = CT_{\text{gene alvo}} - CT_{\text{gene constitutivo}}$, $\Delta CT_{\text{referência}} = CT_{\text{gene alvo}} - CT_{\text{gene constitutivo}}$. O desvio padrão em todos os experimentos foi de Ct <0.5.

3.10 Análise de proteínas por Western blot

Para a extração de proteínas, as células foram lavadas com PBS 1X e lisadas utilizando o tampão CellLytic™ M (C2978, Sigma-Aldrich) suplementado com o coquetel de inibidores de proteases e fosfatases (Sigma-Aldrich; P8340, P0044). Os lisados foram submetidos a sonicação por três pulsos de dez segundos na potência 50% do aparelho Sonic Dismembrator (Modelo 100, Fisher Scientific). A concentração de proteínas foi determinada pelo ensaio de Bradford utilizando o reagente Bio-Rad protein assay (500-0006, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA), conforme as instruções do fabricante, e os lisados foram armazenados em freezer -80°C até a execução dos ensaios.

As amostras de proteínas dos lisados (20 μ g) foram separadas por eletroforese em gel de policrilamida com dodecilsulfato sódico 10% (SDS-PAGE), e transferidas para membrana de PVDF (GE Healthcare, Freiburg, Alemanha) usando tampão de transferência. Após a transferência, as membranas foram incubadas em solução de bloqueio: leite em pó desnatado 5% (p/v) (BioRad 170-6404) em solução salina tamponada de Tris (TBS/T) + Tween-20 0.1% (v/v) (Sigma-Aldrich; T1379) durante 1 h. No dia seguinte, as membranas foram incubadas *overnight* com anticorpo primário a 4°C. No dia seguinte, as membranas foram lavadas com TBS/T e incubadas por mais 1 h com anticorpo secundário diluído em solução de bloqueio. O imunocomplexo foi visualizado com substrato ECL™ Western Blot (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), e as imagens adquiridas pelo foto-documentador BioRad. A quantificação das bandas foi realizada por densitometria usando o software ImageLab™ (Bio-Rad Laboratories). Os anticorpos utilizados no trabalho estão listados na Tabela 2.

Tabela 2 - Anticorpos primários e secundários utilizados nas técnicas de Western Blotting e Imunofluorescência.

Anticorpo Primário	Código	Origem	Diluição	Fabricante
Anti-Calnexina	#2433	Coelho	1:2500	Cell signaling
Anti- β tubulina	#2128	Coelho	1:2500	Cell signaling
Anti-LC3B	#3868	Coelho	1:2000	Cell signaling
Anti-I2PP2A (SET)	Sc-5655	Cabra	1:2000	Sigma-Aldrich
Anti-cMyc	#5605	Coelho	1:5000	Cell signaling
Anti-Caspase3	#9665	Coelho	1:1000	Cell signaling
Anti-Caspase9	#9508	Camudongo	1:1000	Cell signaling
Anti-Bcl2	#15071	Camudongo	1:1000	Cell signaling
Anti-Stat3	#9139	Camudongo	1:1000	Cell signaling
Anti-pStat3 (Tyr705)	#9145	Coelho	1:1000	Cell signaling
Anti-NFkB	sc-372	Coelho	1:2500	Santa Cruz Biotechnology
Anti-pNFkB (Ser536)	#3033	Coelho	1:1000	Cell signaling
Anti-Akt	#9272	Coelho	1:1000	Cell signaling
Anti-pAkt (Ser473)	#4058	Coelho	1:1000	Cell signaling
Anti-Sphk1	HPA022829	Coelho	1:1000	Sigma-Aldrich
Anticorpo Secundário	Código	Origem	Diluição	Fabricante
Anti-coelho	65-6120	Cabra	1:5000	KPL/invitrogen
Anti-camudongo	04-18-06	Cabra	1:10000	KPL

3.11 Análises Estatísticas

Os dados foram analisados utilizando o software estatístico GraphPad Prism (CA, EUA) versão 5.0 para Windows. Os dados obtidos no estudo estão apresentados como a média \pm DP (desvio-padrão), e os valores $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes em todas as comparações. A descrição dos métodos estatísticos utilizados está nas legendas das figuras.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4. Resultados e discussões

4.1 Efeito da resistência a cisplatina em linhagens celulares CECO

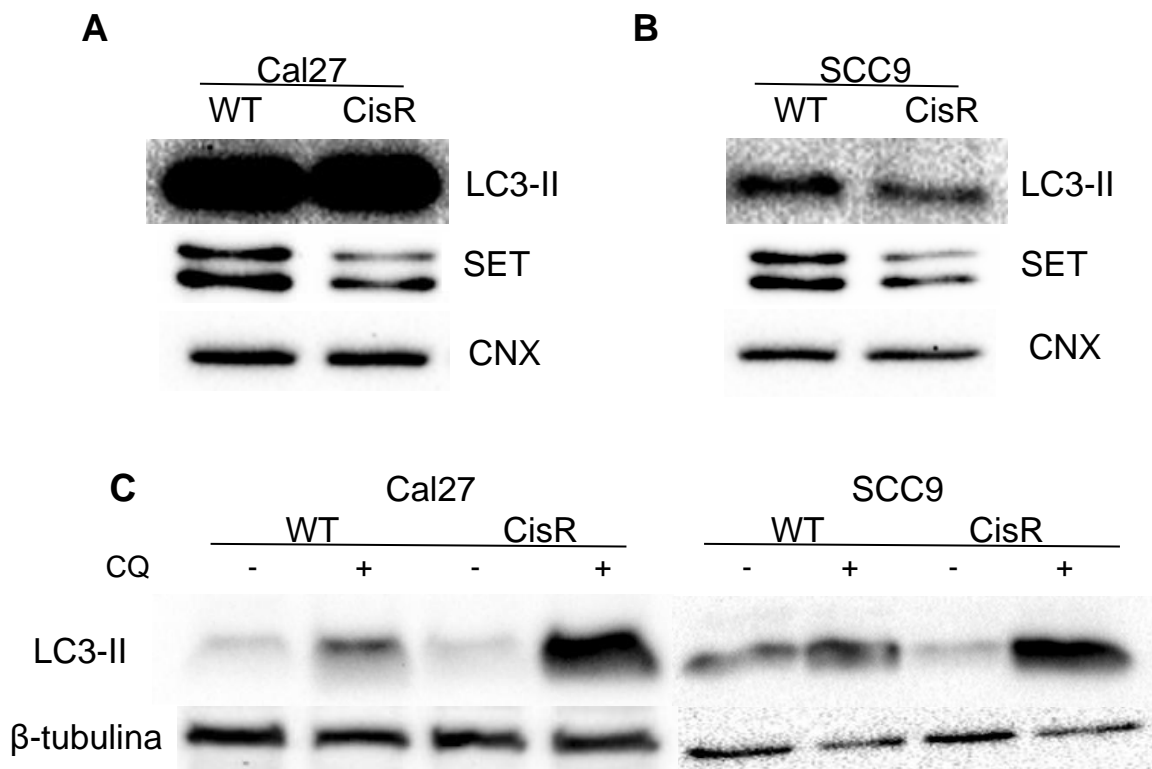
O mecanismo de resistência a cisplatina envolve diversas modificações genéticas e epigenéticas que incluem ativação e silenciamento de genes responsáveis por proliferação celular, apoptose e EMT (SHEN et al., 2012). Assim, têm sido relatados diferentes mecanismos adaptativos na resistência a cisplatina, tais como componentes da maquinaria autofágica e várias chaperonas da família de proteínas de choque térmico (HSP), prejudicando a resposta citostática / citotóxica nas células tumorais (GAŚIORKIEWICZ et al., 2020; HUANG et al., 2017; MORI et al., 2017).

A oncoproteína SET (I2PP2A) é um potente inibidor e altamente específico da proteína serina / treonina fosfatase 2A (PP2A) (LI; GUO; DAMUNI, 1995). A PP2A é considerada um supressor tumoral que desfosforila diversos substratos endógenos, tais como ERK, Akt, c-Myc, Bcl2, MAPK (ARNOLD; SEARS, 2006; KANEGAN et al., 2005; KUO et al., 2008; WESTERMARCK; HAHN, 2008), atuando em vias de sinalização frequentemente desreguladas no câncer; além de promover o desenvolvimento de resistência a quimioterapia (HUNG; CHEN, 2017). Particularmente, a superexpressão de SET em câncer de cabeça e pescoço, tem sido amplamente estudada e discutida pelo nosso grupo de pesquisa, que mostrou relevantes funções da SET ligadas à sobrevivência e adaptação ao estresse oxidativo (LEOPOLDINO et al., 2012), promoção da progressão tumoral, assim como na aquisição de fenótipo mesenquimal e potencial metastático e resistência a cisplatina (SOBRAL et al., 2014). Recentemente, mostramos a participação da SET na regulação do equilíbrio redox intracelular e na modulação do processo autofágico, favorecendo a sobrevivência celular (OUCHIDA et al., 2019), o que reforça seu potencial como um alvo terapêutico em CECO (GOTO, 2017).

Nesse sentido, avaliamos por Western blot tanto a SET quanto a proteína LC3-II, que é um indicador autofágico. A proteína endógena LC3 (proteína de cadeia leve associada ao microtúbulo 3, homólogo da Atg8 de levedura) possui duas formas: a LC3-I (citossólica) e LC3-II que é a LC3-I clivada e, conjugada com fosfatidiletanolamina (PE) durante a autofagia (autofagossomos). Esta forma modificada (LC3-II) está presente na membrana interna e externa durante o alongamento do autofagossomo, sendo correlacionada ao número dos mesmos (MIZUSHIMA; YOSHIMORIM; LEVINE, 2010; TANIDA; UENO; KOMINAMI, 2008).

O perfil das proteínas SET e LC3 nas linhagens Cal27 e SCC9 selvagem (Cal27_{WT} e SCC9_{WT}) e resistentes à cisplatina (Cal27_{CisR} e SCC9_{CisR}) estão mostrados na Figura 6.

Figura 5. Avaliação da autofagia e oncogênese das linhagens CECO selvagens e resistentes a cisplatina.



Os níveis da autofagia basal, assim como a ativação da proteína IPP2A (SET) foram analisados utilizando-se anticorpos primários para LC3 e SET, respectivamente. Sendo avaliadas as células (A) Cal27, (B) SCC9 e (C) o fluxo autofágico de ambas, através da inibição com cloroquina (CQ). A calnexina (CNX) e a β-tubulina foram utilizadas como controles do carregamento de proteínas no gel. Dados representativos de dois experimentos independentes.

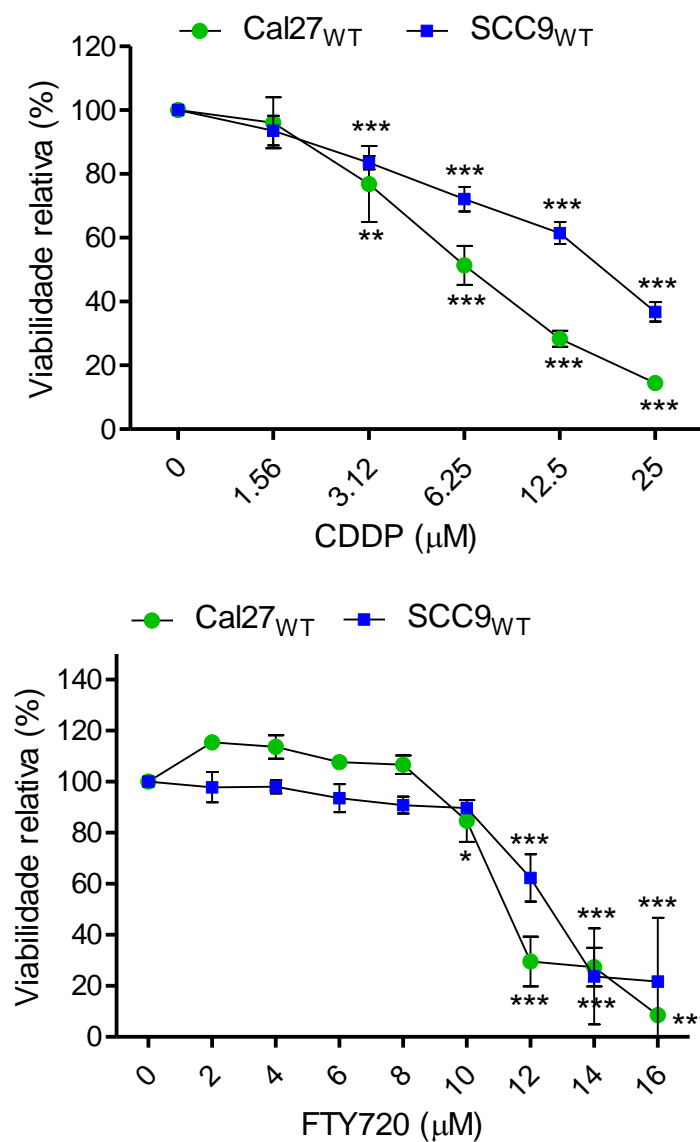
Como é mostrado na Figura 5A e 5B, ambas linhagens de carcinoma oral apresentaram diferentes níveis de autofagia basal (em ausência de estimulação). Posteriormente, a aquisição de quimiorresistencia levou a um leve incremento dos níveis basais de LC3-II na Cal27_{CisR}, e uma aparente diminuição na SCC9_{CisR}. Pelo qual, é possível inferir mecanismos diferentes que causam a resistência a cisplatina nestas linhagens em relação a autofagia, como foi observado em outras linhagens tumorais (REN et al., 2010; SIRICHANCHUEN; PENGSUPARP; CHANVORACHOTE, 2012). Em relação a SET, foi mostrado que apesar de ter uma redução na isoforma 1 (predominantemente nuclear; banda maior no Western blot, Figura 5A e 5B), a isoforma 2 (citoplasmática; banda menor no WB, Figura 5A e 5B) manteve a expressão, indicando

uma capacidade metastática persistente (MODY et al., 2017) associada às linhagens com resistência. Devido a isso, a proteína SET foi estabelecida como uma das proteínas de interesse nesse estudo. Para entender melhor a autofagia nestas linhagens, avaliamos o fluxo autofágico, que reflete a degradação de LC3-II no autofagolisossomo, quando comparamos a quantidade de LC3-II na presença e ausência de um inibidor de autofagia (MIZUSHIMA; YOSHIMORIM; LEVINE, 2010). O tratamento com CQ, alcalinizador do lúmen lisossomal (YANG et al., 2013) e inibidor da degradação de LC3-II, resultou no acúmulo endógeno de LC3-II, sobretudo nas linhagens CisR (Figura 5C), sugerindo um aumento significativo no fluxo autofágico com a quimioresistência em ambas as linhagens Cal27 e SCC9. Portanto, o nosso foco neste estudo foi direcionado ao desenvolvimento de estratégias farmacológicas que possam agir no mecanismo autofágico, que possibilite a morte de células do carcinoma oral com resistência à cisplatina.

4.2 Padronização de fármacos nas linhagens celulares CECO

Inicialmente, foi determinado o efeito isolado do FTY720 e CDDP na viabilidade das linhagens CECO: Cal27_{WT} e SCC9_{WT} (Figura 6). Conforme mostrado nos gráficos, observou-se que a incubação com concentrações crescentes de FTY720 e CDDP durante 72 horas, resultou em uma redução dose-dependente da viabilidade celular nas duas linhagens testadas (Figura 6). Onde os valores de viabilidade em resposta ao FTY720 foram consistentes com dados relatados anteriormente em outras células tumorais (OTA et al., 2019; ZHANG et al., 2010a). Nesse sentido, a diferença na resposta celular frente aos compostos, indicaria diferentes mecanismos subjacentes aos seus efeitos citotóxicos. Assim também, foi visto que a linhagem SCC9 mostrou uma menor sensibilidade para ambos compostos em relação à Cal27, fato que foi evidenciado anteriormente por autores como FERNANDEZ-GIL et al. (2019) e LIAO et al. (2018), indicando uma vantagem na sobrevivência nestas células cancerígenas. A partir desta análise, foi possível selecionar duas concentrações de cada fármaco com baixo efeito citotóxico (>50% viabilidade), a fim de serem utilizados para os ensaios subsequentes que teriam como estratégia a combinação de fármacos. As concentrações escolhidas foram de 3.12 μ M (76.84%) e 12.5 μ M (61.47%) de CDDP nas células Cal27_{WT} e SCC9_{WT}, respectivamente; para FTY720, selecionamos as concentrações de 2.5 μ M e 5 μ M (~100%) para ambas as linhagens (Figura 6).

Figura 6. Inibição do crescimento celular por CDDP e FTY720 em linhagens CECO.



A viabilidade celular de Cal27_{WT} e SCC9_{WT} foi avaliada pelo ensaio de resazurina após incubação com CDDP e FTY720 nas concentrações indicadas por 72 horas. Os resultados são apresentados como média e erro padrão de três experimentos independentes realizados em quintuplicada (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

4.3 Avaliação da citotoxicidade e do potencial sinérgico entre os fármacos selecionados nas linhagens celulares CECO *in vitro*

Nesta etapa, foi realizado um screening com os fármacos escolhidos para o estudo: cloroquina (CQ), FTY720, paclitaxel e CDDP. A estratégia utilizada nas combinações de fármacos foi: quimiosensibilização das células com o composto inibitório (CQ) e indutor de autofagia (FTY720), respectivamente, seguido da co-incubação com CDDP ou FTY720 ou PTX para avaliar se o tratamento combinado reduziria a viabilidade (sinergismo).

Os perfis de viabilidade celular das linhagens Cal27 e SCC9 (WT e CisR) foram obtidos por ensaio de resazurina tanto na condição de exposição ao fármaco isolado (monoterapia) quanto nas condições em combinação. Como esperado, observou-se uma diminuição da viabilidade nas quatro linhagens com os quimioterápicos CDDP e PTX isolados. O mesmo efeito, embora em menor intensidade, foi observado nos compostos associados à autofagia CQ e FTY720 (5 μ M) quando comparados com o controle (Tabela 3-6).

O efeito da cloroquina na viabilidade celular depende proporcionalmente da sua concentração, assim como dos níveis basais de autofagia de cada linhagem celular (LIN et al., 2017b; PARK; LEE, 2014). Onde além do seu papel no bloqueio do autofagolisossomo (concentração baixa de cloroquina); o acúmulo da cloroquina na sua forma protonada, pode levar à morte celular, adquirindo propriedades de detergente conduzindo a uma desestabilização lisossômica letal (BOYA; KROEMER, 2008), como foi visto em células tumorais de bexiga (CHEN et al., 2018a). Em relação ao FTY720, este composto consegue suprimir a capacidade proliferativa pelo mecanismo de apoptose, como foi demonstrado anteriormente em outras linhagens de carcinoma oral, e com ativação de resposta autofágica (BAI et al., 2017; GOTO et al., 2020; SANTOS; LEOPOLDINO, 2018).

Não obstante, os tratamentos combinados com os compostos selecionados por nós, mostraram maior eficiência do que a monoterapia. Onde a maioria das combinações com cloroquina, afetou significativamente ($p < 0.05$) a viabilidade de todas as linhagens (Tabelas 3-6). Por outro lado, foi visto que as combinações pré-sensibilizadas com o FTY720 na menor concentração (2.5 μ M) não teve efeito sinérgico significativo com os outros fármacos em nenhuma linhagem celular analisada. Contrário a isso, na dose maior de FTY720 (5 μ M) foi confirmada uma diminuição significativa ($p < 0.01$) na viabilidade quando esta foi combinada com a CDDP e PTX (0.001 μ M) nas linhagens resistentes a cisplatina Cal27_{CisR} e SCC9_{CisR}, obtendo nesta última linhagem

uma maior redução da viabilidade celular. Posteriormente, os valores obtidos da viabilidade foram utilizados para o cálculo do CID (coeficiente de interação de drogas) (Tabelas 2-5).

Os valores CID foram utilizados para caracterizar as combinações testadas como sinérgicas, aditivas ou antagônicas (SUN et al., 2014). A partir desta classificação, foram determinados cinco CIDs sinérgicos significativos (<0.7) nas mesmas combinações de Cal27_{WT} e Cal27_{CisR} (CQ 20 μ M + CDDP 3.12 μ M; CQ 20 μ M + FTY720 2.5 μ M; CQ 20 μ M + FTY720 5 μ M; CQ 20 μ M + PTX 0.001 μ M, FTY 5 μ M + PTX 0.001). No entanto, na SCC9_{WT} apenas três combinações obtiveram o CID significativo (CQ 40 μ M + CDDP 12.5 μ M; CQ 40 μ M + FTY720 2.5 μ M; CQ 40 μ M + FTY720 5 μ M), oposto à SCC9_{CisR}, onde além dessas três combinações, a significância no CID (<0.7) foi alcançada em outras cinco combinações (CQ 40 μ M + PTX 0.001 μ M; CQ 40 μ M + PTX 0.5 μ M; FTY720 5 μ M + CDDP 12.5 μ M; FTY720 5 μ M + PTX 0.001 μ M; FTY720 5 μ M + PTX 0.5 μ M). Sendo assim, ressaltamos que houve uma melhor resposta nas células resistentes do que nas WT frente as combinações dos fármacos testadas. Além disto, a linhagem SCC9_{CisR} foi a que mais evidenciou essa mudança na sensibilidade às combinações.

Portanto, esses dados confirmaram nossa hipótese de que a quimiosensibilização com CQ ou FTY720 pode ser uma estratégia terapêutica promissora e que a autofagia participa do mecanismo de quimiorresistência nas linhagens de CECO quando expostas aos quimioterápicos: PTX, FTY720 e CDDP. Como o foco do trabalho era identificar uma nova estratégia terapêutica eficiente contra células CECO resistentes a cisplatina, os próximos experimentos foram realizados somente com as linhagens resistentes e as três combinações, com sinergismo mais significativo, selecionadas para continuidade do estudo: Cal27_{CisR} (CQ 20 μ M + FTY720 5 μ M, CQ 20 μ M + PTX 0.001 μ M, FTY720 5 μ M + PTX 0.001 μ M) e SCC9_{CisR} (CQ 40 μ M + FTY720 2.5 μ M; CQ 40 μ M + PTX 0.5 μ M, FTY720 5 μ M + PTX 0.5 μ M). Como observado, as combinações para ambas as linhagens foram estabelecidas com os mesmos compostos, embora em concentrações diferentes, o que sugere que os mecanismos envolvidos na resposta aos fármacos utilizados conseguem superar as alterações específicas de cada linhagem associadas ou não à resistência a cisplatina.

Tabela 3 – Análise da viabilidade celular na linhagem Cal27_{WT} após incubação com as diferentes combinações dos fármacos: FTY720, CDDP, CQ e PTX.

Viabilidade (X% ± DP)						X ± DP
Dose (µM)	Compostos		Combinações (µM)		CID	
-	Controle	100	CQ 20	CDDP 3.12	15,18 ± 0,63 ***	0,42 ± 0,06
-	DMSO 5%	10,48 ± 0,83		FTY720 2.5	25,08 ± 1,76 ***	0,40 ± 0,05
2.5	BSA	96,07 ± 0,41		FTY720 5	21,52 ± 3,50 ***	0,37 ± 0,09
5		98,90 ± 9,86		PTX 0.001	17,31 ± 1,14 ***	0,57 ± 0,05
2.5	FTY720	92,57 ± 5,76		PTX 0.01	15,59 ± 1,42***	0,87 ± 0,07
5	CDDP	84,95 ± 9,54	FTY720 2,5	CDDP 3.12	72,66 ± 5,92 *	1,34 ± 0,08
3.12		57,78 ± 4,28		PTX 0.001	31,10 ± 6,82 **	0,77 ± 0,06
20	CQ	65,89 ± 7,62	FTY720 5	CDDP 3.12	58,94 ± 10,40	1,18 ± 0,16
0.001	PTX	44,97 ± 4,61		PTX 0.001	10,51 ± 1,64 ***	0,30 ± 0,05
0.01		27,34 ± 1,43				

Tabela 4 - Análise da viabilidade celular na linhagem Cal27_{CisR} após incubação com as diferentes combinações dos fármacos: FTY720, CDDP, CQ e PTX.

Viabilidade (X% ± DP)						X ± DP
Dose (µM)	Compostos		Combinações (µM)		CID	
-	Controle	100	CQ 20	CDDP 3.12	18,63 ± 7,71 ***	0,36 ± 0,06
-	DMSO 5%	11,35 ± 1,01		FTY720 2.5	27,90 ± 14,10 ***	0,39 ± 0,15
2.5	BSA	97,59 ± 1,11		FTY720 5	12,84 ± 4,37 ***	0,23 ± 0,05
5		99,14 ± 4,93		PTX 0.001	24,94 ± 7,35 **	0,48 ± 0,17
2.5	FTY720	97,96 ± 8,54		PTX 0.01	23,60 ± 12,36	1,14 ± 0,18
5	CDDP	75,79 ± 14,07	FTY720 2,5	CDDP 3.12	53,95 ± 4,58	1,05 ± 0,04
3.12		60,69 ± 11,24		PTX 0.001	46,05 ± 13,19	0,88 ± 0,04
20	CQ	72,64 ± 7,74	FTY720 5	CDDP 3.12	15,12 ± 3,48 ***	0,40 ± 0,07
0.001	PTX	63,54 ± 15,04		PTX 0.001	22,05 ± 5,34 **	0,53 ± 0,17
0.01		26,97 ± 6,65				

As células Cal27_{WT} e Cal27_{CisR} após pre-tratamento com CQ (20µM) ou FTY720 (2.5 µM e 5 µM) seguido dos tratamentos com CDDP (3.12 µM), FTY720 (2.5 µM, 5 µM) ou PTX (0.001 e 0.01) foram analisadas por resazurina para determinar a viabilidade. Os resultados são apresentados como média e desvio padrão (X% ± DP) de três experimentos independentes realizados em quintuplicada analisados pelo teste t de Student ou Dunnett (**p<0.001; **p<0.01; *p<0.05). Os valores com efeito sinérgico significativo (em negrito) foram considerados com CID <0.7 (CID representativo de três experimentos independentes realizados em quintuplicada).

Tabela 5 - Análise da viabilidade celular na linhagem SCC9_{WT} após incubação com as diferentes combinações dos fármacos: FTY720, CDDP, CQ e PTX.

Viabilidade (X% ± DP)					X ± DP	
Dose (µM)	Compostos		Combinações (µM)		CID	
-	Controle	100	CQ 40	CDDP 12.5	21,85 ± 3,47 ***	0,53 ± 0,11
-	DMSO 5%	32,25 ± 1,32		FTY720 2.5	34,86 ± 7,66 ***	0,47 ± 0,06
2.5	BSA	93,41 ± 9,35		FTY720 5	28,31 ± 8,42 ***	0,48 ± 0,14
5		98,57 ± 13,98		PTX 0.001	41,30 ± 5,60 *	0,73 ± 0,003
2.5	FTY720	98,07 ± 12,31		PTX 0.5	36,09 ± 7,60	1,25 ± 0,18
5		77,20 ± 9,67	PTX 1	34,78 ± 8,07	1,20 ± 0,19	
12.5	CDDP	51,16 ± 7,28	FTY720 2,5	CDDP 12.5	53,12 ± 8,28	1,12 ± 0,08
40	CQ	74,67 ± 8,61		PTX 0.001	61,92 ± 14,59	0,90 ± 0,11
0.001	PTX	68,29 ± 14,32	FTY720 5	PTX 0.5	40,17 ± 10,10	1,12 ± 0,09
0.5		42,26 ± 10,01		CDDP 12.5	43,71 ± 4,28	1,14 ± 0,09
1		40,67 ± 12,26	PTX 0.001	42,80 ± 3,05 *	0,92 ± 0,09	
				PTX 0.5	32,55 ± 3,22	1,13 ± 0,20

Tabela 6 - Análise da viabilidade celular na linhagem SCC9_{CisR} após incubação com as diferentes combinações dos fármacos: FTY720, CDDP, CQ e PTX.

Viabilidade (X% ± DP)					X ± DP	
Dose (µM)	Compostos		Combinações (µM)		CID	
-	Controle	100	CQ 40	CDDP 12.5	14,38 ± 4,97 ***	0,43 ± 0,12
-	DMSO 5%	44,96 ± 5,72		FTY720 2.5	28,09 ± 3,90 ***	0,42 ± 0,03
2.5	BSA	92,58 ± 2,94		FTY720 5	20,32 ± 3,73 ***	0,36 ± 0,04
5		100,02 ± 12,92		PTX 0.001	41,01 ± 11,50 ***	0,60 ± 0,10
2.5	FTY720	102,85 ± 6,49		PTX 0.5	23,11 ± 6,27 ***	0,57 ± 0,10
5		84,52 ± 6,75	PTX 1	26,62 ± 4,09 ***	0,73 ± 0,03	
12.5	CDDP	51,17 ± 8,33	FTY720 2,5	CDDP 12.5	52,87 ± 18,55	0,91 ± 0,12
40	CQ	75,02 ± 12,40		PTX 0.001	77,68 ± 11,36	0,89 ± 0,04
0.001	PTX	83,23 ± 9,61	FTY720 5	PTX 0.5	60,45 ± 7,46	0,90 ± 0,09
0.5		60,79 ± 9,14		CDDP 12.5	17,36 ± 2,99 ***	0,47 ± 0,09
1		56,92 ± 7,85	PTX 0.001	28,96 ± 6,97 ***	0,44 ± 0,12	
				PTX 0.5	19,96 ± 2,63 ***	0,39 ± 0,09

As células SCC9_{WT} e SCC9_{CisR} após pre-tratamento com CQ (40µM) ou FTY720 (2.5 µM e 5 µM) seguido dos tratamentos com CDDP (12.5 µM), FTY720 (2.5 µM, 5 µM) ou PTX (0.001 e 0.5µM) foram analisadas por resazurina para determinar a viabilidade. Os resultados são apresentados como média e desvio padrão (X% ± DP) de três experimentos independentes realizados em quintuplicada analisados pelo teste t de Student ou teste de Dunnett (***) p<0.001; **p<0.01; *p<0.05). Os valores com efeito sinérgico significativo (em negrita) foram considerados como CID <0.7 (CID representativo de três experimentos independentes realizados em quintuplicada).

Embora o mecanismo antitumoral da cloroquina não esteja claro, a inibição da atividade lisossomal por esse composto, interrompe a última etapa da autofagia resultando na falha em fornecer energia ou proteção celular via autofagia (KIMURA et al., 2013), reforçando nossa hipótese de que o bloqueio da autofagia, seja pela cloroquina ou outro inibidor, pode ser uma abordagem promissora no tratamento do câncer. De modo similar, foi descrito que sob coadministração lipossomal, a captação celular de doxorubicina, aumentou com a CQ, ajudando a reduzir o valor de IC50 (GAO; XU; QIU, 2017). Em outro estudo, a CQ foi capaz de agir sinergicamente com o ácido gambóico, melhorando a sua ação contra o crescimento do tumor em câncer de pâncreas (WANG et al., 2019). De modo similar, a combinação sub-letal de um indutor (ceramida C2) e inibidor de autofagia (CQ), resultou numa citotoxicidade aditiva, onde os autofagossomos acumulados e não degradados, aumentaram o estresse em células NSCLC, levando a morte celular (características de autofagia e apoptose aumentadas) (CHOU et al., 2019). Dessa maneira, os nossos resultados foram consistentes com esses trabalhos, sugerindo que a inibição da autofagia poderia mitigar os efeitos celulares protetores induzidos pela quimiorresistência, potencializando a ação de FTY720 e PTX com redução significativa na viabilidade celular.

Nesse contexto, uma das condições escolhidas por nós, CQ+PTX, foi estudada em outros modelos de câncer descritos na literatura. Confirmando um efeito sensibilizador da CQ no PTX em CECO (KBV20C) com aumento acentuado da parada do ciclo celular em G2 (CQ 100 μ M+PTX 75nM) (CHOI et al., 2016). Assim também, o pré-tratamento com CQ preveniu a resistência a PTX mediada por autofagia, potencializando o efeito do PTX no câncer endometrial (LIU; LI, 2015) e em NSCLC (indução de apoptose mediada por ROS, atenuando a metástase pela modulação de Akt e B-catenina) (DATTA et al., 2019). Outra estratégia descrita é a liberação combinada por meio de nanopartículas (MPEG-PLA) contendo PTX+CQ, que demonstrou redução na viabilidade *in vitro* de células tumorais de ovário bem como redução no volume tumoral com aumento na sobrevida em modelo de xenoinxerto em camundongo (SHAO et al., 2018). Também, a hidroxicloroquina (HCQ) + PTX, inibiu o crescimento de células de tumor de pulmão resistente a EGFR-TKI (H1975) *in vitro* e em camundongos (CHIN et al., 2020), sendo o primeiro relato da eficácia desta combinação *in vivo*. Igualmente, dentro de um ensaio clínico de fase II em pacientes com câncer de mama avançado/metastático com falha a terapia com antraciclinas (ANAND et al., 2021) mostraram a eficácia do tratamento com CQ (250mg) junto a agentes quimioterápicos baseados em taxanos (PTX 175mg/m²) e similares a taxanos, mostrando que a combinação foi bem tolerada sem apresentar toxicidade significativa.

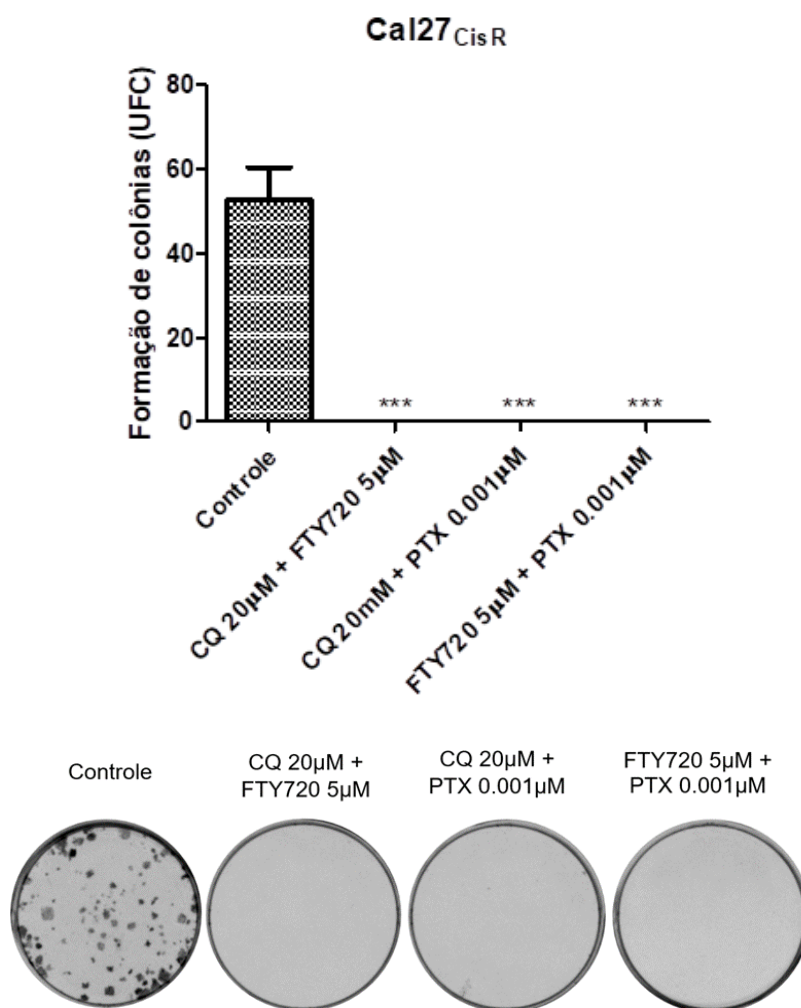
Todos estes dados reforçam que a autofagia é um importante mecanismo de resistência a quimioterapia em diferentes tipos de câncer, incluindo o CECO como demonstrado no nosso trabalho.

4.4 Efeito da combinação de fármacos na capacidade clonogênica e proliferação celular

A capacidade de sobrevivência e proliferação das células CECO após tratamento foi mimetizada *in vitro* pelo ensaio de formação de colônias. Este ensaio permite avaliar a capacidade de geração de uma colônia a partir de uma única célula isolada (capacidade de clonalidade e sobrevivência em baixa densidade celular) (FRANKEN et al., 2006), permitindo-nos fazer a comparação do potencial clonogênico das células tratadas com os compostos combinados em relação ao controle. Após exposição das células aos fármacos, as colônias foram coradas, e posteriormente, quantificadas no programa *Image J*. Conforme mostrado nas Figuras 7 e 8, após exposição aos fármacos combinados nas linhagens Cal27_{CisR} (CQ 20 μ M + FTY720 5 μ M, CQ 20 μ M + PTX 0.001 μ M, FTY720 5 μ M + PTX 0.001 μ M) e SCC9_{CisR} (CQ 40 μ M + FTY720 2.5 μ M; CQ 40 μ M + PTX 0.5 μ M, FTY720 5 μ M + PTX 0.5 μ M) houve ausência completa de colônias ($p < 0.001$), ou seja, as células não conseguiram sobreviver e proliferar em todas as combinações testadas (Figuras 7 e 8), enquanto no controle (sem fármacos) foi observado a formação de colônias (53 ± 7.77 UFC, 16 ± 1.73 UFC, respectivamente). Interessantemente, as colônias obtidas na SCC9_{CisR} controle mostraram maior tamanho e uma distribuição celular mais distante dentro da colônia quando comparadas à Cal27_{CisR}. Mostrando assim, diferenças na capacidade clonogênica e proliferativa entre as duas linhagens celulares. Nossos resultados, confirmaram que todas as combinações utilizadas foram eficientes em inibir a formação de colônias em ambas as linhagens, ou seja, as células CisR tiveram capacidade proliferativa e sobrevivência nula na presença dos fármacos combinados.

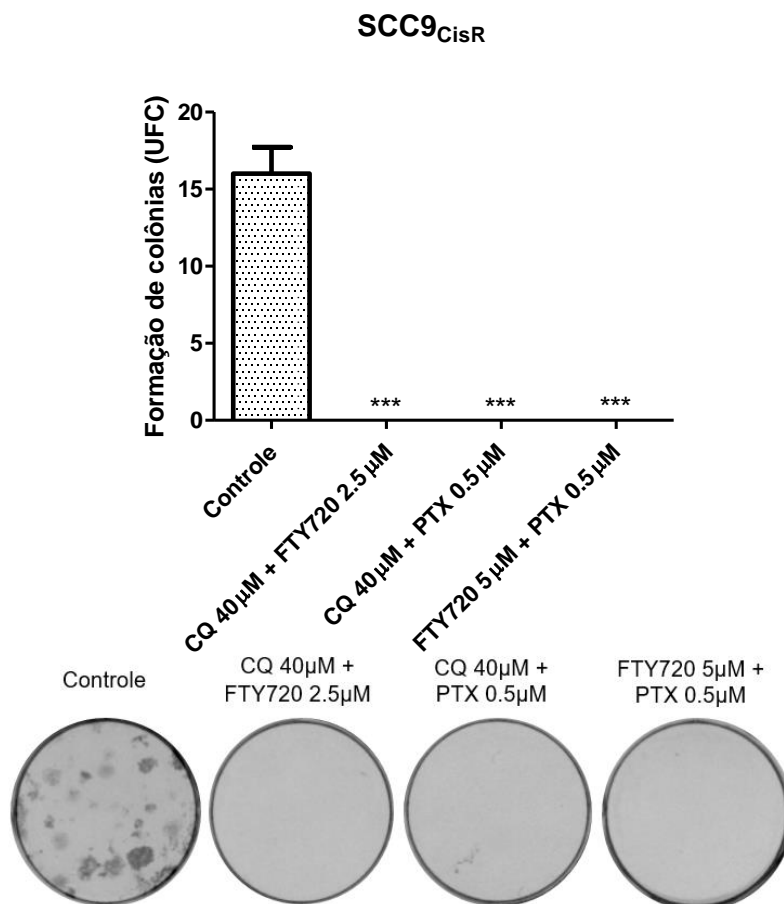
Outro ponto interessante é que o ensaio clonogênico demonstrou maior sensibilidade à estratégia de combinação dos fármacos do que o ensaio de viabilidade celular por resazurina, provavelmente devido à baixa densidade celular, o que é bastante relevante quando pensamos no tratamento do paciente, uma vez que a maioria dos tratamentos convencionais reduzem os tumores, mas não eliminam 100% das células malignas, deixando ainda células residuais, CTT ou micrometástases, devido ao fato de serem mais eficazes quando as células malignas estão em alta taxa de proliferação.

Figura 7. Redução da capacidade clonogênica na linhagem Cal27_{CisR} após exposição a combinação de fármacos.



As células foram plaqueadas na densidade de 8×10^2 céls./poço e cultivadas na presença dos tratamentos combinados por 7 dias para formação das colônias (mantendo o esquema de exposição ao primeiro fármaco 24 hs antes do segundo fármaco, e ambos continuaram na cultura pelo período complementar de 7 dias). As imagens são representativas de três experimentos independentes (A). Os gráficos representam o número de colônias (>50 células) nos grupos tratados e controle. Cada barra representa a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em quintuplicata (Test T'student não pareado, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Figura 8. Redução da capacidade clonogênica na linhagem SCC9_{CisR} após exposição a combinação de fármacos



As células foram plaqueadas na densidade de 4×10^2 céls./poço e cultivadas na presença dos tratamentos combinados por 7 dias para formação das colônias (mantendo o esquema de exposição ao primeiro fármaco 24 hs antes do segundo fármaco, e ambos continuaram na cultura pelo período complementar de 7 dias). As imagens são representativas de três experimentos independentes (A). Os gráficos representam o número de colônias (>50 células) nos grupos tratados e controle. Cada barra representa a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em quintuplicata (Test T'student não pareado, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

4.5 Indução da morte celular nas linhagens Cal27_{CisR} e SCC9_{CisR} pela combinação dos compostos

A análise da morfologia das células após exposição às combinações selecionadas dos fármacos foi realizada por microscopia de campo claro em contraste de fase e PlasDic e está mostrada na Figura 9. A incubação por 24 horas das linhagens CisR com os dois compostos induziu mudanças significativas nas células quando comparadas aos respectivos controles. Na condição de CQ+FTY, algumas células

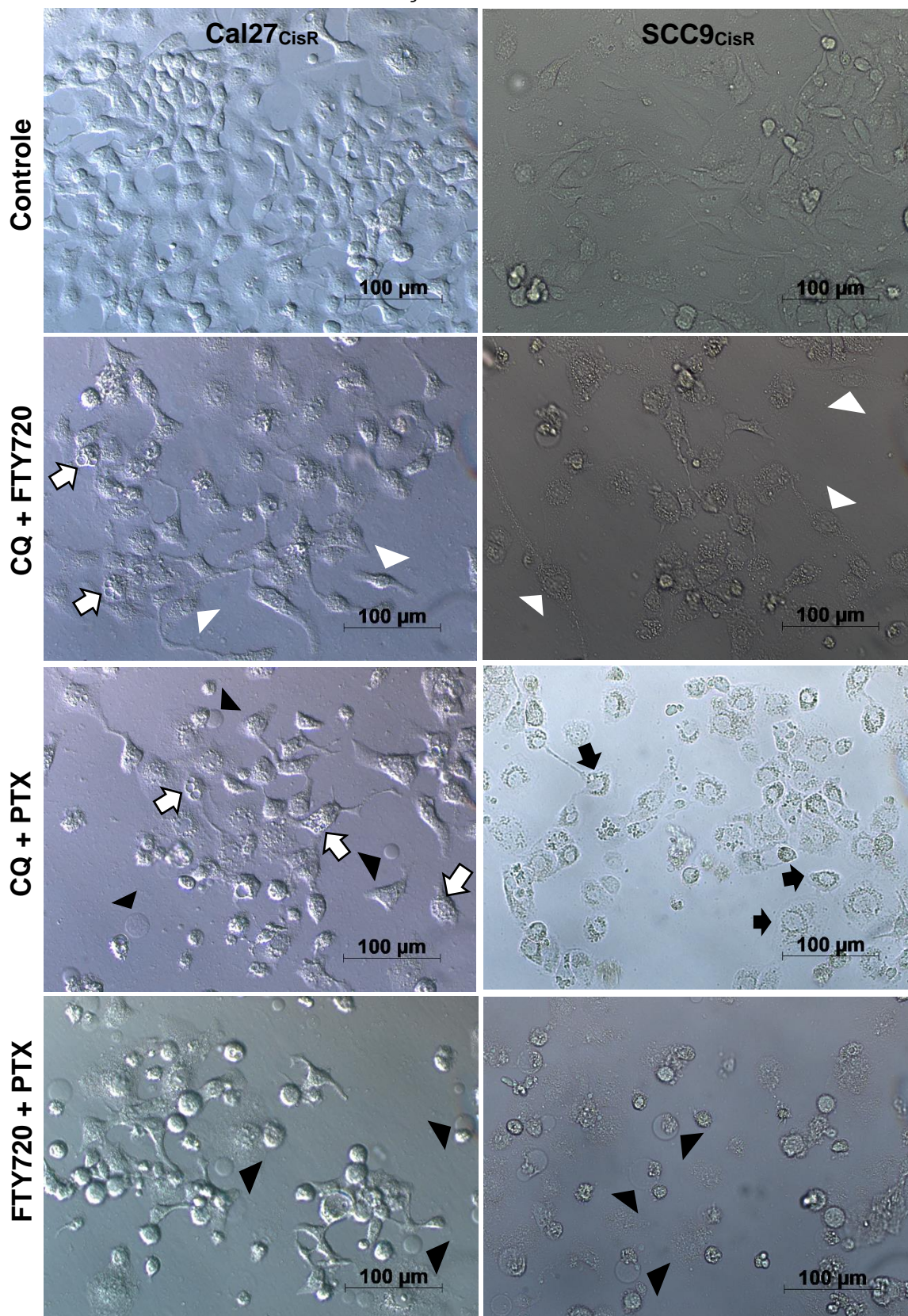
mesmo mantendo sua forma aparentemente normal, exibiram muitos vacúolos com conteúdo citoplasmático, indicando acúmulo excessivo de autofagolisossomos (cabeça de seta branca), como esperado devido, em parte, à inibição da autofagia pela CQ. Essas estruturas foram vistas de igual maneira em células tumorais de ovário após tratamento com FTY720 (ZHANG et al., 2010a) assim como identificado em células CECO em trabalho anterior do nosso grupo (SANTOS; LEOPOLDINO, 2018), que FTY720 induz autofagia e apoptose. Desta forma, foi possível reconhecer também nestas células, o processo de “plasma membrane blebbing” (ZHANG et al., 2018b) ou também chamado de “budding” (ELMORE, 2007) (seta branca), característica típica de apoptose.

Contudo, na condição de CQ+PTX, além da presença dos autofagolisossomos, foi observado o desprendimento das células da placa de cultura (perda de células viáveis, em suspensão). A estrutura celular apresentou uma redução do tamanho celular, mantendo a membrana intacta. Foi observado também o processo de “budding” nesta condição (seta branca), com a protrusão de corpos apoptóticos (cabeça de seta preta) na Cal27_{CisR}, considerado como um estágio avançado do apoptose. Este perfil está de acordo com estudo prévio, que mostrou efeito similar em outra linhagem de carcinoma oral submetida ao tratamento isolado com PTX (HU et al., 2015).

Paralelamente na SCC9_{CisR}, foi identificado uma formação parecida como ‘anel’ ou ‘bolha’, sugerindo que o paclitaxel induziria a formação de feixes de microtúbulos perinucleares (cabeça de seta preta), como foi observado anteriormente em células de câncer de mama (NAKAYAMA et al., 2009). Podendo ser confundida também, com a condensação da cromatina em torno da periferia nuclear, onde ambos mecanismos estariam implicados com o processo do apoptose.

Por fim, na condição de FTY+PTX, a morfologia celular foi a mais afetada de todas para ambas as linhagens, observando maior quantidade de células mortas arredondadas no sobrenadante e em algumas células a membrana plasmática está quase imperceptível, presença de muitos ‘debris’ celulares, sugerindo além de autofagia e apoptose, presença de necrose. Do mesmo modo, que a combinação anterior, foi visto a presença de ‘bolhas’ citoplasmáticas, resultando na desmontagem da célula em vesículas fechadas por membrana (cabeça de seta preta), presumivelmente pelo efeito do PTX.

Figura 9: Avaliação da morfologia celular de linhagens CECO após tratamento com as combinações de fármacos selecionadas.



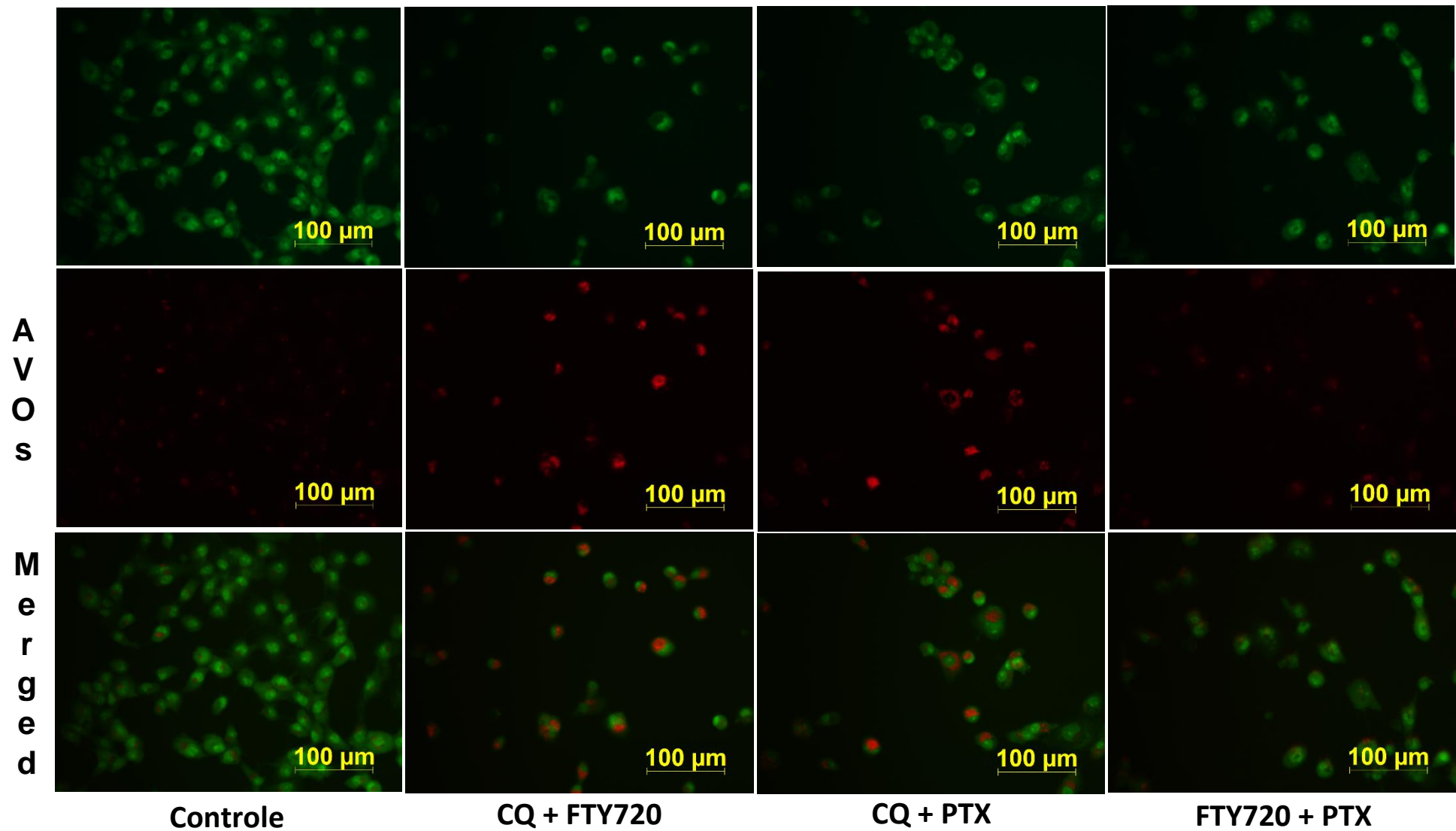
Após 24h de co-incubação com os quimioterápicos, as características morfológicas das linhagens Cal27_{CisR} e SCC9_{CisR} foram avaliadas por microscopia em campo claro com contraste de fase e PlasDic. Aumento 200X original. A barra de escala indica 100 µm.

4.6 Avaliação do fluxo autofágico nas células expostas às combinações dos fármacos

Durante o processo da autofagia ocorre formação de organelas vesiculares ácidas (AVO) como autofagolisossomos, esses compartimentos ácidos podem ser detectados pela marcação com o corante acridina orange (AO) (TRAGANOS; DARZYNKIEWICZ, 1994). Este agente lisossomotrópico consiste numa base fraca e sem carga, a qual é capaz de passar livremente pelas membranas biológicas. No pH ácido e já na sua forma protonada, a concentração progressiva do corante de AO nos grânulos lisossomais/AVOs resulta no efeito fluorescente. Contrário a isso, em pH neutro, o corante AO se comporta como uma molécula hidrófoba verde, emitindo a fluorescência verde brilhante (forma monomérica do corante) (MURUGAN; AMARAVADI, 2017; TRAGANOS; DARZYNKIEWICZ, 1994).

Sendo assim, para confirmar a presença de AVOs associados com autofagia nas condições testadas no presente trabalho, foi utilizado o método de fluorescência com a coloração de AO na linhagem Cal27_{CisR}, após 48 horas de incubação com os fármacos (Figura 10). Nesse sentido, a baixa concentração de AO utilizada, permitiu observar uma fluorescência verde brilhante que delimitava o citoplasma e o núcleo de todas as células avaliadas. Assim, foi visto que nas células do controle, poucos AVOs foram detectados (fluorescência vermelha pontilhada e difusa), presumivelmente devido a acridina se acumular em compartimentos ácidos como em vesículas endocíticas e no aparelho trans-Golgi bem como a autofagia basal da célula (MURUGAN; AMARAVADI, 2017). No entanto, nas células incubadas com CQ (20 μ M), se evidenciaram acúmulos maiores de AVOs em forma de depósitos granulares no citoplasma (fluorescência vermelha brilhante), indicando um acúmulo significativo de vesículas lisossomais, endossomos e autofagolisossomos. A partir disso, foi possível afirmar que houve um incremento nos níveis de autofagia como consequência da combinação dos fármacos com CQ, além de observar uma proporcionalidade entre a intensidade de fluorescência com o grau de acidez e volume das estruturas vesiculares (HAN; BURGESS, 2010). Foi observada uma diferença entre as condições CQ + PTX e FTY + PTX, sendo que na última a marcação com AO foi menos intensa, o que era de certa forma esperado devido a CQ ser inibidor de autofagia e induzir acúmulo de AVOs (na etapa final do processo). Por outro lado, o FTY720 já foi descrito como indutor da morte celular por meio de permeabilização da membrana lisossomal, um mecanismo relatado na citotoxicidade em células de linfoma do manto (MCL) (ALINARI et al., 2011).

Figura 10. Detecção da autofagia pela coloração com acridina orange.



Coloração por acridina orange para visualização de vesículas ácidas/AVOs/autofagolisossomos (fluorescência vermelha) relacionados a autofagia, bem como do citosol e nucleoplasma (fluorescência verde) em células Cal27_{CisR} controle e expostas às condições de CQ + FTY720, CQ + PTX e FTY720 + PTX. O primeiro fármaco foi adicionado 24 hs antes do segundo, e as células foram mantidas por mais 24 hs. Aumento 20x original. Barra de escala indica 100 µm.

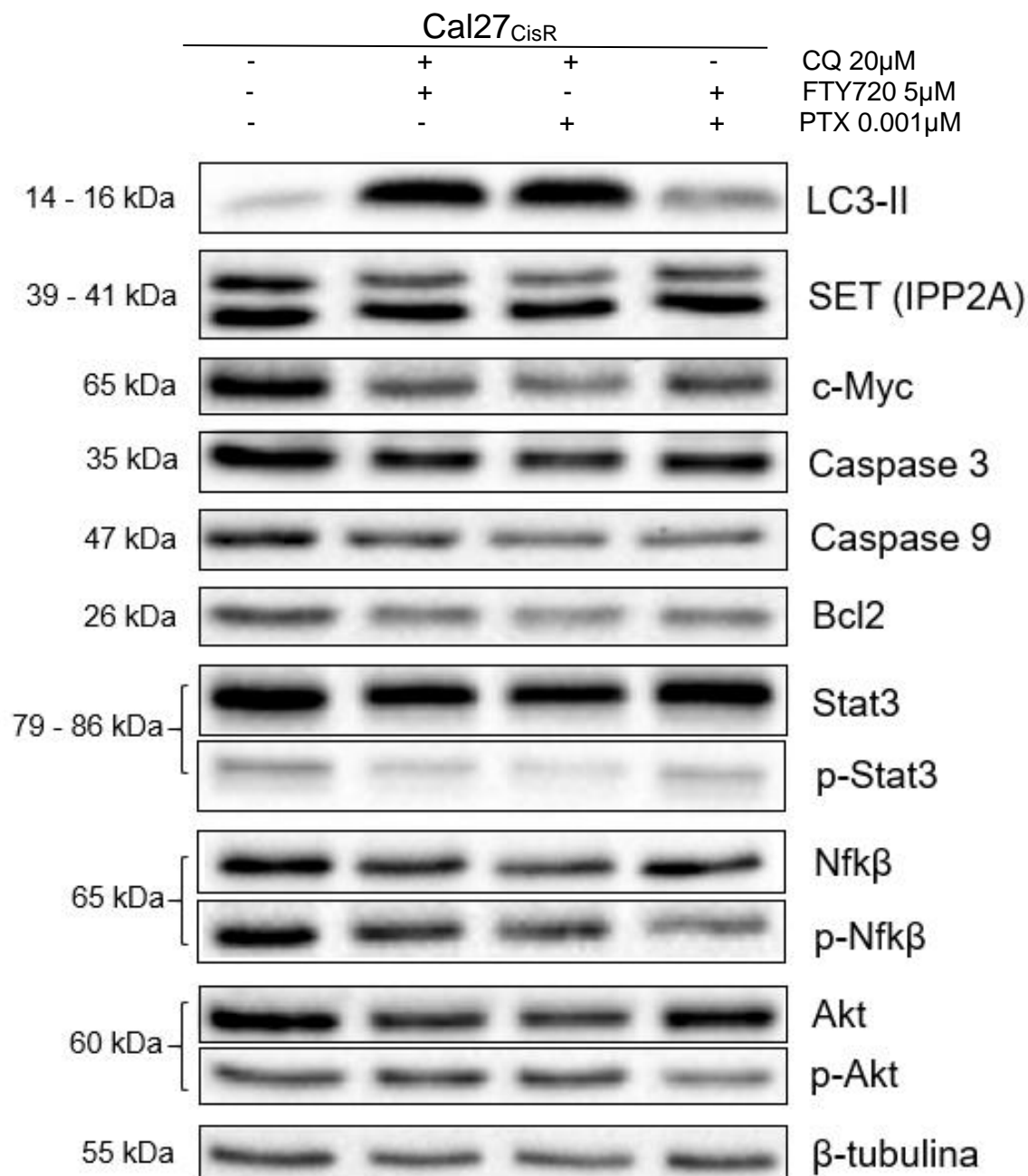
4.7 Efeito da combinação de fármacos nas principais vias de sinalização que participam da sobrevivência e proliferação nas células Cal27CisR e SCC9CisR

Os níveis das proteínas LC3-II (proteína autofágica), SET, c-Myc (proteínas oncogênicas), caspase-3, caspase-9, Bcl2 (proteínas anti-apoptóticas), Stat3, NFκB, Akt (proteínas envolvidas com a proliferação, sobrevivência e diferenciação celular) foram analisadas por Western blot (WB) nas linhagens tumorais após 24 horas da exposição à combinação dos fármacos (Figura 11 e 12). Analisando ambas as linhagens, podemos ver que as células quimiosensibilizadas com CQ, tiveram maiores níveis de LC3-II em comparação com a condição sem tratar e com o controle, assim como em relação a condição FTY+PTX. O monitoramento e a renovação da LC3-II induzida pela inibição lisossômica podem ser utilizados como uma medida do fluxo autofágico (KLIONSKY et al., 2021). Além disto, esses resultados corroboraram os resultados de microscopia de campo claro em contraste de fase e o ensaio da AO.

Independentemente da combinação realizada, foi visto que os níveis das proteínas c-Myc e SET foram reduzidos em ambas as linhagens (Figura 11 e 12). A proteína fosfatase 2A (PP2A) é uma enzima supressora de tumores envolvida na regulação negativa de oncoproteínas como c-Myc (YEH et al., 2004), sendo esta última mais expressa em estadiamentos avançados (III / IV) de pacientes CECO e em associação com outras oncoproteínas (LIN et al., 2019; PALLAVI; NALABOLU; HIREMATH, 2018). Inibidores biológicos de PP2A como I2PP2A/SET (LI; MAKKINJE; DAMUNI, 1996) ou CIP2A (JUNTTILA et al., 2007) podem modular a função de c-Myc. Nesse sentido, a ativação de PP2A (shSET, shCIP2A, OPP449 e FTY720) pode levar à redução na atividade de c-Myc, aumentando a supressão tumoral e induzindo a apoptose ou necroptose (JANGHORBAN et al., 2014; SADDOUGH et al., 2013; SANTOS; LEOPOLDINO, 2018). A partir disso, é possível inferir que em nossas condições sob tratamento com FTY720 (CQ+FTY e FTY+PTX), há redução de I2PP2A/SET, disponibilizando e reativando a PP2A, o que leva à uma queda de c-Myc, o qual foi observado com maior ênfase na linhagem SCC9_{CisR}.

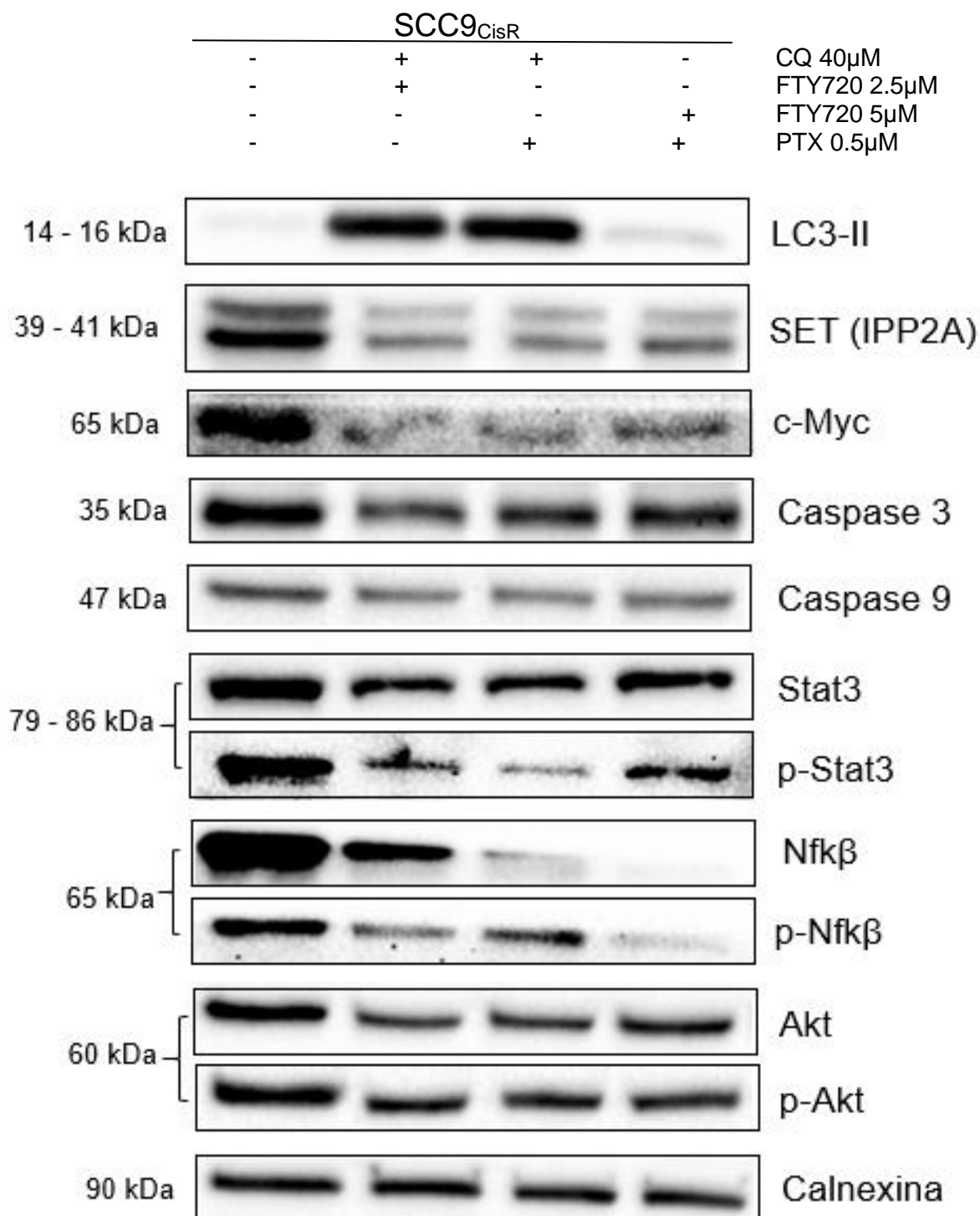
Por outro lado, foi descrito que a superexpressão de c-Myc tornou células tumorais mais propensas a inibição do crescimento após exposição ao PTX, em comparação com as células silenciadas (siRNA c-Myc) (CERQUETTI et al., 2015). Sendo sugerido que o tratamento com PTX em baixas doses (1 nM e 3 nM), consegue regular negativamente a expressão nuclear de c-Myc total e fosforilado, inibindo o ciclo celular em G0/G1 no câncer colorretal (LI et al., 2018).

Figura 11. Análise de vias de sinalização para apoptose, sobrevivência e proliferação em células Cal27_{CisR} após exposição aos fármacos combinados.



Após exposição das células Cal27_{CisR} às combinações sinérgicas dos fármacos, as proteínas foram extraídas para análise por Western blot. Utilizou-se anticorpos primários para proteínas envolvidas em diversas vias da sobrevivência, apoptose e proliferação. A β-tubulina foi utilizada como controle de carregamento de proteínas no SDS-PAGE. Imagem representativa de três experimentos independentes.

Figura 12. Análise de vias de sinalização para apoptose, sobrevivência e proliferação em células SCC9_{CisR} após exposição aos fármacos combinados.



Após exposição das células SCC9_{CisR} às combinações sinérgicas dos fármacos, as proteínas foram extraídas para análise por Western blot. Utilizou-se anticorpos primários para proteínas envolvidas em diversas vias da sobrevivência, apoptose e proliferação. A calnexina foi utilizada como controle de carregamento de proteínas no SDS-PAGE. Imagem representativa de três experimentos independentes.

Os dados citados acima estão de acordo com a redução significativa de c-Myc nas condições com PTX observada no nosso trabalho, sendo maior a diferença na condição CQ+PTX do que FTY+PTX. Neste sentido, embora a SET esteja associada com a resistência a PTX devido ativação da via PI3K/Akt (ZHANG et al., 2015), o PTX em combinação com FTY720 foi eficaz de causar redução dos níveis de I2PP2A/SET nas células com resistência a cisplatina, sobretudo na SCC9_{CisR} (Figura 11 e 12).

As neoplasias de cabeça e pescoço surgem a partir de células transformadas com alterações genéticas e epigenéticas em protooncogenes ou genes supressores de tumor (p53, p16, PTEN e RB) (FORASTIERE et al., 2001), assim como alterações em vias de sinalização promotoras de crescimento (EGFR) (KALYANKRISHNA; GRANDIS, 2006). No entanto, mecanismos independentes de EGFR como o transdutor de sinal do fator de transcrição e ativador da transcrição 3 (STAT3), o fator nuclear κ B (NF κ B) e a quinase Akt são também afetados na doença, participando na ativação de vias de sinalização chave, sendo recentemente implicados na evasão imune e representando alvos promissores para facilitar a resposta na imunoterapia em HNSCC (SQUARIZE et al., 2006; WONDERGEM et al., 2021). Nesse sentido, nossos resultados mostraram que todas as condições de tratamento combinado induziram uma diminuição da fosforilação (atividade) de NF κ B (Ser536), Stat3 (Tyr705) e Akt (Ser473), apresentando maior redução na p-Stat3 em ambas as linhagens, onde diferente da Cal27_{CisR}, as células SCC9_{CisR} apresentaram também alterações no seu nível de expressão. Por outro lado, mesmo não se observando diferenças na diminuição do nível da caspase-3 nas linhagens, as proteínas Bcl-2 e caspase-9 foram claramente reduzidas, indicando assim uma possível ativação da via de indução a morte celular por apoptose em CECO. A I2PP2A ou SET regula tanto a fosforilação da proteína Akt, que é desfosforilada pela PP2A (LEOPOLDINO et al., 2012), quanto p-STAT3 e NF κ B (GOTO et al., 2020), que reforça sua relevância como alvo em CECO.

Nossos resultados estão de acordo com ZHANG et al (2014) que sugerem que o FTY720 regula negativamente a via PI3K/Akt/mTOR/p70S6K, sendo chave na redução da migração e invasão de células tumorais de glioblastoma. Mais ainda, o FTY720 foi capaz de suprimir o crescimento e a progressão do tumor pela indução seletiva de apoptose via regulação negativa de p-Akt (ser473) e positiva da caspase-3 clivada, junto com diminuição da quinase adesão focal (NG et al., 2007). CRISTOBAL et al (2015) sugeriu que a inibição de PI3K/Akt induzida por FTY720 é mediada pela desfosforilação de PP2A, assim como pela inibição da SphK1 (PCHEJETSKI et al., 2010). Além da regulação negativa de Akt induzida por IL-6, os níveis de Stat3 e MAPK também foram desregulados em células de mieloma múltiplo (YASUI et al., 2005). Onde o FTY720, eliminou a cascata de amplificação NF κ B/IL-6/Stat3 pela diminuição de

Sphk1 e S1PR1, inibindo o desenvolvimento de câncer de cólon em pacientes com colite ulcerosa (LIANG et al., 2013). Nesse contexto, a diminuição significativa de p-Stat3 pelo FTY720 inibiu a proliferação e EMT induzindo a parada na fase G1 e apoptose (clivagem de caspases 3, 8 e 9, diminuição de Bcl-2 e Bcl-xL) nas células tumorais de colangiocarcinoma (LU et al., 2014b).

Stat3 tem outras funções não baseados na transcrição, visto que Stat3 fosforilado em tirosina foi encontrado fora do núcleo, em aderências focais de células tumorais de ovário, sugerindo que a sinalização de quinase/STAT ativada por Janus pode contribuir na invasão (SILVER et al., 2004). NG et al (2006) propuseram que a migração é promovida pela interação entre Stat3 e microtúbulos (MT) competindo com a stathmin (proteína desestabilizadora de MT). Desse modo, foi visto que a quimioterapia baseada em MT (PTX) inibe a ativação de Stat3 induzida por citocinas, mostrando perda na p-Stat3 e interrompendo a interação de Stat3 com a tubulina em câncer de mama, ovário e próstata (WALKER et al., 2010). Recentemente, foi descrito que a apoptose induzida por PTX (aumento na clivagem de PARP e caspase-3), aumenta a liberação de citocromo C mitocondrial por meio da regulação negativa de Stat3 e p-Stat3 (Ser727) no carcinoma epidermóide de esôfago (ZHANG et al., 2017). Por fim, foi descrito que o PTX aumentou a apoptose e a sensibilidade à lobaplatina devido a inibição da via PI3K/Akt em câncer de pulmão (MA et al., 2018).

4.8 Análise dos níveis de expressão de genes de resistência a fármacos após exposição das células CisR as combinações de fármacos selecionadas

A aquisição da resistência a diferentes fármacos antitumorais tem sido, em parte, fundamentada na expressão de um ou mais genes transportadores ABC (ATP-binding cassette) dependentes de ATP, os quais transportam diversas moléculas através de membranas biológicas, incluindo os quimioterápicos (CHOI, 2005). Para entendermos melhor a resposta das células Cal27_{CisR} e SCC9_{CisR} frente as condições antitumorais testadas nesse estudo, os níveis de RNAm de 3 genes de resistência: MDR1, MRP e BCRP, foram analisados por PCR em tempo real.

De acordo com nossos resultados, a expressão de BCRP foi reduzida significativamente na presença de todas as combinações em ambas as linhagens, exceto na Cal27_{CisR} CQ+PTX (que não alterou). O nível de RNAm de MRP1 apresentou um perfil semelhante em ambas as linhagens, não diferindo consideravelmente entre os diferentes grupos. Por outro lado, os níveis de MDR1 foram aumentados em todas as

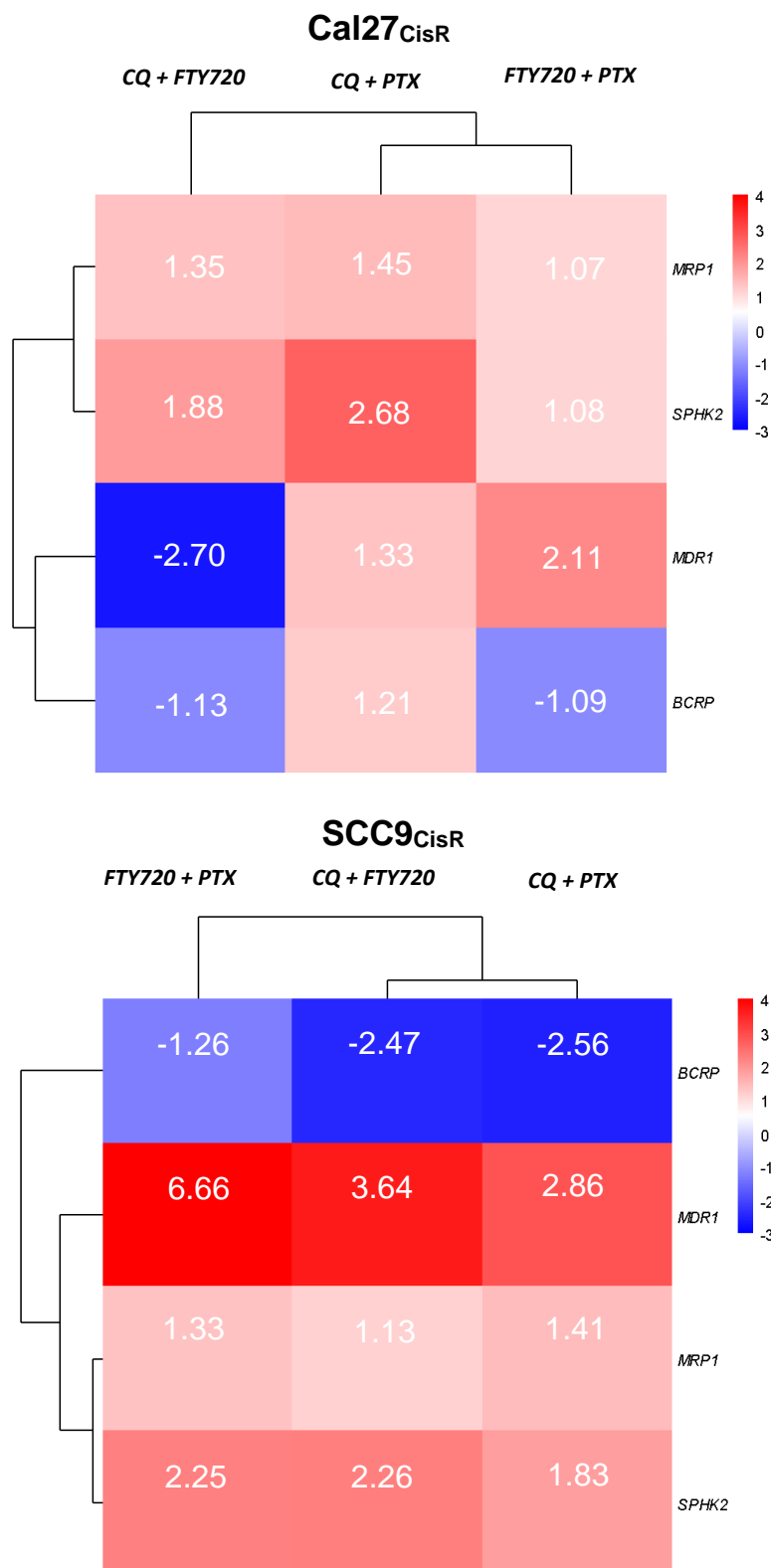
condições, com exceção da combinação de CQ+FTY na Cal27_{CisR} onde apresentou redução (Figura 13).

Outro gene avaliado que está indiretamente associado com a ação do FTY720 foi SPHK2, que apresentou uma tendência de aumento na expressão em todas as condições, exceto na FTY720+PTX (fold change, FC<2). Esse resultado pode ser explicado como uma tentativa das células compensarem a redução na via de sinalização S1P/SphK1. No geral, pudemos verificar que os níveis de RNAm dos 4 genes seguiram perfis similares nas duas linhagens, com exceção do gene MDR1 que apresentou maior nível na linhagem SCC9_{CisR}. Isto sugere que a linhagem SCC9_{CisR} teria um potencial maior para resistência a fármacos do que a Cal27_{CisR}, e mesmo assim as combinações selecionadas por nós foram eficientes na indução da morte celular nas duas linhagens.

Vários estudos sugerem a MRP2 como a principal ATPase responsável na resistência a cisplatina no câncer através do efluxo de conjugados de platino-GSH (HINOSHITA et al., 2000; KORITA et al., 2010; YAMASAKI et al., 2011). Porém, especificamente em CECO, diversos autores evidenciaram que os 3 transportadores: MDR1, MRP1 e BCRP poderiam ser regulados positivamente. Por outro lado, FRIEDRICH; PUNKE; REYMANN (2004) reportaram que apenas a BCRP teve relação com estágios mais avançados (SG III e IV) e períodos de sobrevida mais curtos em pacientes com carcinoma oral, além de uma co-expressão entre MDR1 e MRP1. Da mesma maneira, linhagens resistentes a cisplatina (YD-8/CIS, YD-9/CIS, YD-38/CIS) incrementaram a expressão de BCRP em comparação com suas células parentais (CHOI; KIM; YUN, 2019).

Contrário a isso, outros trabalhos se focaram apenas na atividade de MRP. NAKAMURA et al (2005) indicaram uma maior expressão de MRP1 e MRP2, comparado com MDR1 na linhagem H-1R (resistente a cisplatina). Esta afirmação foi corroborada por SUZUKI et al (2011) que mostraram ausência de MDR1 comparada com uma alta expressão de MRP1 e MRP2 em todos os clones de célula única obtidos a partir de amostras de pacientes com carcinoma de língua. Então, de acordo com nossos achados é possível afirmar que a regulação negativa do BCRP e a não alteração de MRP1 (genes principalmente expressos em CECO) são bons indicadores de que a terapia combinada testada no nosso estudo consegue eliminar células com potencial mais agressivo e resistente.

Figura 13. Perfis de RNAm de marcadores de quimiorresistência e SPHK2 nas linhagens Cal27_{CisR} e SCC9_{CisR} após exposição a combinação dos fármacos.



A análise de RT-qPCR foi realizada para avaliar os níveis de expressão relativa dos genes de resistência a múltiplos fármacos, sob a terapia combinada. Dados representativos de três experimentos (média do fold change em cada quadrado).

Por outro lado, foi demonstrado que várias drogas antimaláricas afetaram as interações com a proteína de transporte mediada por BCRP (sulfato de estrona, E1S) e MRP1 em membranas isoladas de células HEK293, entre elas a CQ (100 μM) que inibiu o 31% da atividade de transporte de BCRP, sem diferenças na MRP1 (RIJPMA et al., 2014). De modo similar, GAO; XU; QIU (2015) indicaram que o efeito inibidor da CQ atingiu a atividade transportadora de P-gp ($\geq 100\mu\text{M}$) e MRP1 (300 μM – 1,000 μM) em linhagens tumorais de pulmão e ovário resistentes a PTX. Portanto, essas descobertas são consistentes com nossos resultados, onde o efeito nas condições CQ+PTX e CQ+FTY desregulou eficientemente a expressão de BCRP sem diferenças significativas em MRP1. Sugerindo que o efeito da CQ na expressão desses genes poderia ser obtido com menor concentração (20 μM e 40 μM) em terapia combinada para uso em células previamente expostas a ciclos de terapia com cisplatina.

Os substratos de P-gp (MDR1) abrangem uma ampla gama de compostos. Assim a P-gp é responsável pela extrusão ativa de 27 famílias de compostos, entre eles o paclitaxel (taxol) (SILVA et al., 2015). Deste modo, foi descrito que o PTX induz a expressão de MDR1 em linhagens de câncer gástrico, de mama e pulmão (LUQUE et al., 2012). Igualmente, biopsias de câncer de pulmão avançado mostraram uma correlação entre a resposta da quimioterapia baseada em taxol e a expressão de P-gp (CHIOU et al., 2003). Por outro lado, a superexpressão de P-gp foi observada de igual forma em mitocôndrias de células tumorais de câncer de ovário resistentes e sensíveis a PTX (GUO et al., 2019). Outros trabalhos, no entanto, afirmam que não existe implicâncias na quimiorresistência e saída do PTX (IKUTA et al., 2005; ROLFF et al., 2009). Deste modo, os nossos dados sugerem uma regulação positiva de RNAm de MDR1 sob o tratamento com CQ+PTX, sendo ainda maior na condição de FTY+PTX na linhagem SCC9_{CisR}, mas que de fato não foi capaz de impedir os efeitos sinérgicos dos fármacos na indução da morte celular em ambas as linhagens.

HONIG et al (2003) relataram que o FTY720 (15 μM) melhora o fluxo da atividade de Abcb1 “MDR1” e Abcc1 “MRP1”. Por outro lado, CANNON et al (2012) demonstraram que o FTY720 e FTP720p reduziram a atividade basal de P-gp (proporcionalmente à concentração e tempo) *in vitro*, aumentaram a captação de fármacos substratos da glicoproteína P (verapamilo e paclitaxel) *in vivo* em até 5 vezes, em capilares cerebrais de rato. Nesse sentido, os nossos resultados seriam coerentes

com HONIG et al (2003) onde o FTY720 poderia ter aumentado os níveis de MDR1 e SPHK2 nas condições de FTY+PTX e CQ+FTY, tendo maior efeito na SCC9_{CisR}. Com base nestes dados, podemos especular que a SPHK2 pode ter um papel importante no desenvolvimento de resistência a cisplatina, bem como na eficácia de tratamentos quimioterápicos devido a modulação da expressão de MDR1. Sendo assim, a sugestão do uso de inibidores de SPHK2 poderia favorecer a resposta à fármacos, inibindo a regulação positiva de MDR1. Até o momento, nossos resultados representam a primeira evidência de que a SPHK2 pode estar de alguma forma envolvida na regulação de MDR1 na quimiorresistencia em carcinoma oral. Outros experimentos já estão em andamento para avaliarmos esta possível relação da SphK2 com genes de resistência a múltiplas drogas.

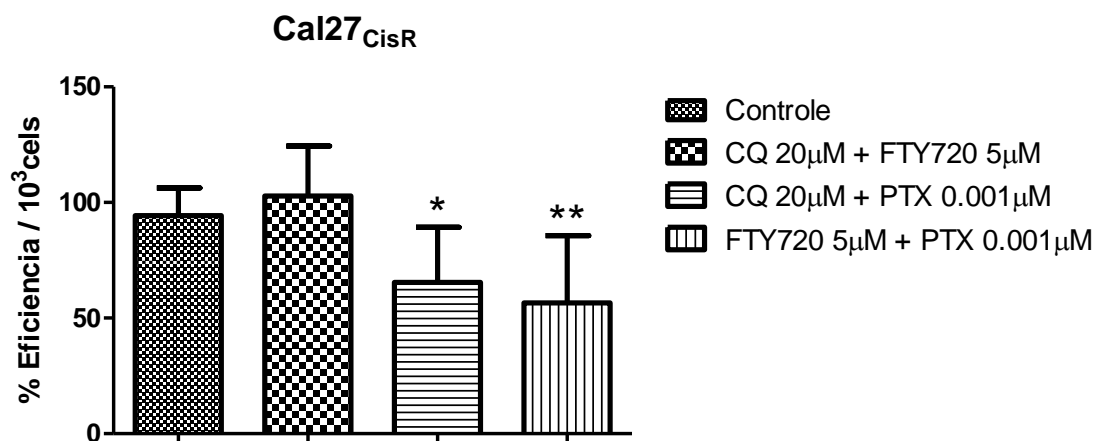
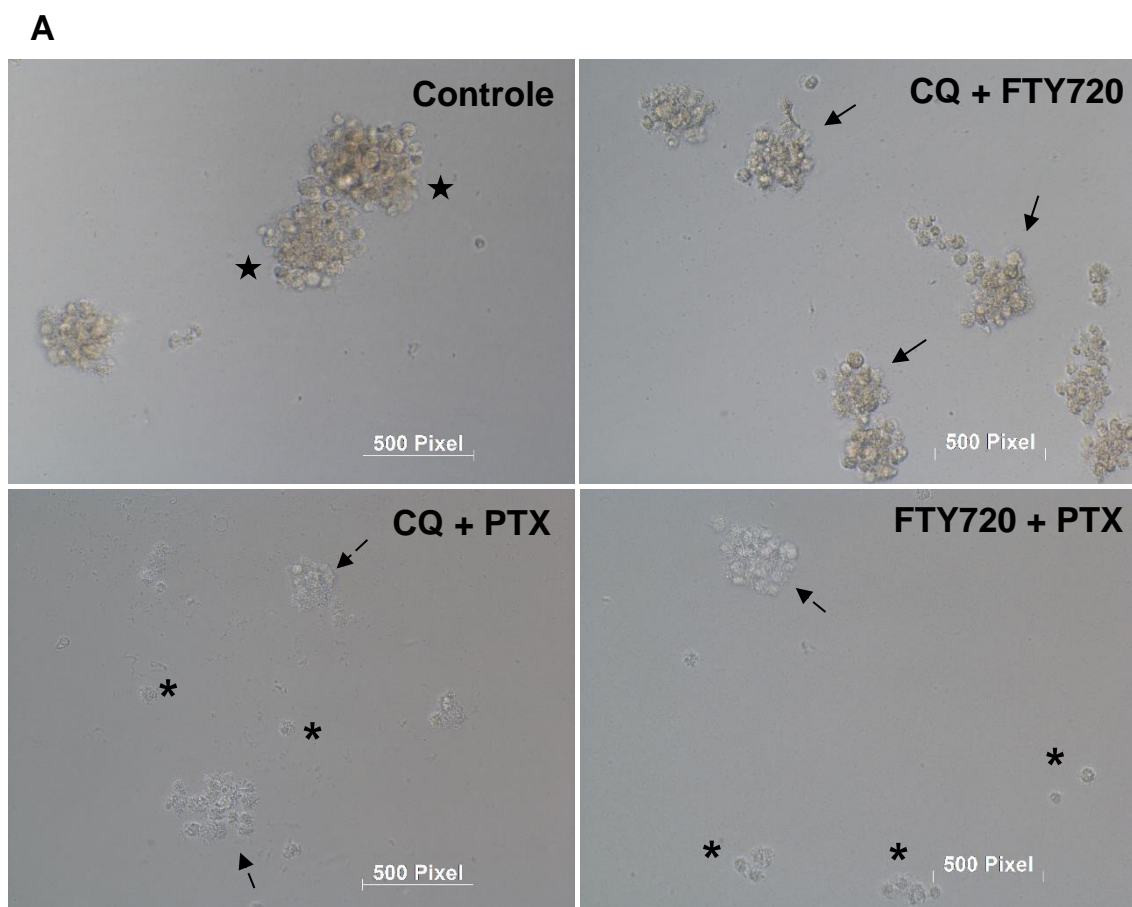
4.9 Efeito da combinação de fármacos na capacidade de formação de células tronco-tumorais

A células-tronco tumorais representam pequenas subpopulações no câncer oral, que estão associadas com a autorrenovação, progressão do tumor, recorrência, metástase e resistência a terapia (GHAZI et al., 2019). Desta forma, é necessário identificar marcadores confiáveis de CTT associado a CECO que possam inclusive atuar como alvos terapêuticos. A cultura tridimensional (3D) exhibe com maior precisão os tumores *in vivo*, em relação as interações célula-célula, célula-matriz, complexidade estrutural, crescimento e proliferação celular, perfis de expressão gênica e proteica, assim como sensibilidade a fármacos e está diretamente relacionada a presença de CTT (BIGHETTI-TREVISAN et al., 2019). Nesse sentido, a aplicação de terapias combinadas com alvos nas CTT tem ganhado notoriedade e impacto em estudos atuais *in vitro* e *in vivo*, por ser melhor do que a terapia antitumoral convencional e a monoterapia (BIGHETTI-TREVISAN et al., 2019).

Portanto, adicionalmente aos ensaios realizados, realizamos os ensaios de formação esferas tumorais nas linhagens CECO CisR. As células Cal27_{CisR} e SCC9_{CisR} foram plaqueadas em condições de cultura não aderente (3D) utilizando placas de ultrabaixa adesão, a qual permite a formação de esferas tumorais em suspensão (subpopulação com características de CTT). O ensaio de formação de esferas foi realizado na presença das combinações dos fármacos em ambas as linhagens e na ausência dos fármacos (Figuras 14A e 15A). A quantidade de esferas formadas foi reduzida nos grupos tratados de ambas as linhagens quando comparado ao controle, apresentando uma queda mais drástica no tratamento de FTY720 + PTX, obtendo 56.6% na Cal27_{CisR} (p<0.01) e 53.22% na SCC9_{CisR} (p<0.001) dessas estruturas

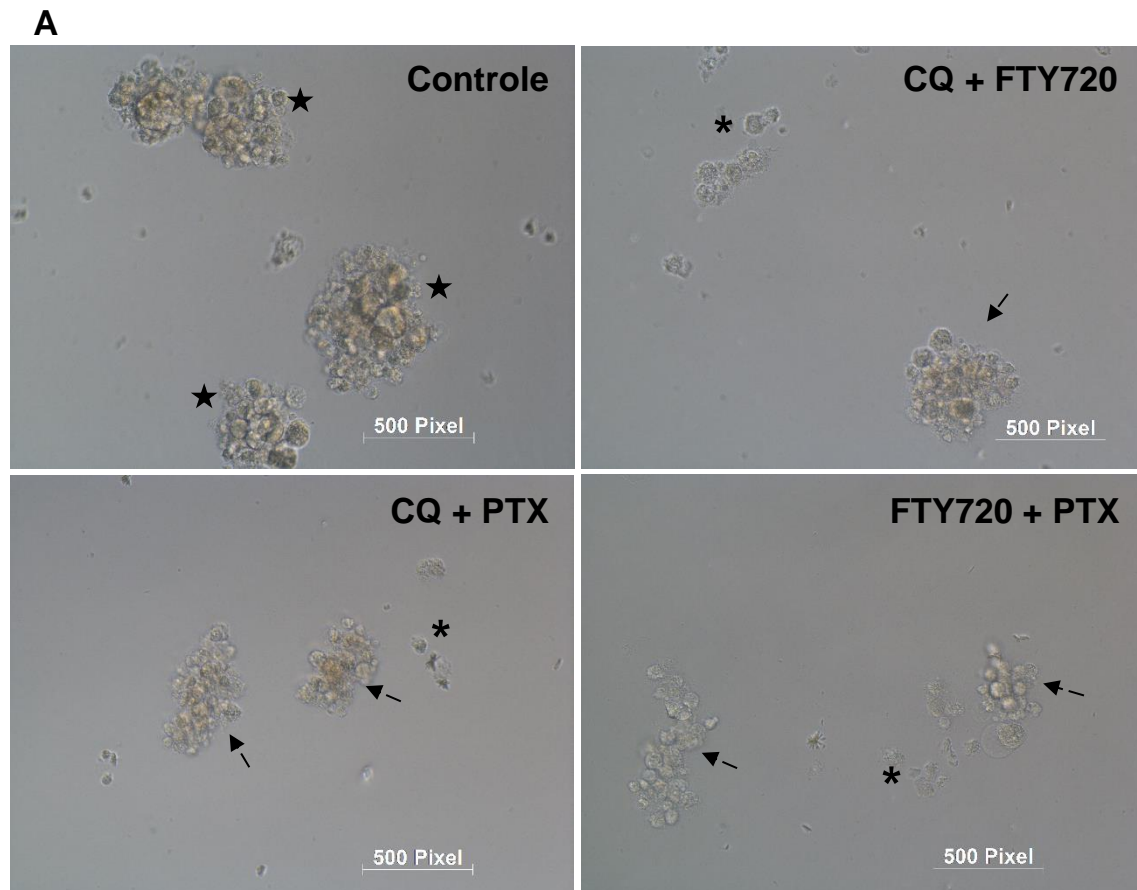
(Figuras 14B e 15B). A morfologia das células/esferas nesta combinação foi a mais afetadas, observando a perda da estrutura das esferas, maior número de debris celulares, assim como uma tonalidade mais clara nas formações celulares resultantes. Estas características foram vistas de igual forma no tratamento com CQ + PTX, o qual diminuiu significativamente o número das esferas tumorais em 65.4% ($p < 0.05$) e 78.49% ($p < 0.01$) na Cal27_{CisR} e SCC9_{CisR}, respectivamente.

Figura 14. Efeito da combinação de fármacos na geração de esferas tumorais de células Cal27_{CisR}.



As células CECO (1×10^3 cels) foram semeadas em placas ULA e tratadas com a combinação de fármacos para permitir a formação de estruturas celulares em suspensão durante 8 dias de incubação antes da avaliação microscópica. **A.** Os painéis de cima mostram as fotografias dos poços representativos (Estrela: Formação sólida circular considerada como esfera; Seta completa: Formações sólidas em desenvolvimento; Seta tracejada: Massa de células em processo de desintegração; Asterisco: Células isoladas). **B.** Os valores nos gráficos foram apresentados como média + SD de 2 repetições (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

Figura 15. Efeito da combinação de fármacos na geração de esferas tumorais de células SCC9_{CisR}.



As células CECO (1×10^3 cels) foram semeadas em placas ULA e tratadas com a combinação de fármacos para permitir a formação de estruturas celulares em suspensão durante 8 dias de

incubação antes da avaliação microscópica. **A.** Os painéis de cima mostram as fotografias dos poços representativos (Estrela: Formação sólida circular considerada como esfera; Seta completa: Massa de células em processo de desintegração; Seta tracejada: Formação sólida em desenvolvimento; Asterisco: Células isoladas). **B.** Os valores nos gráficos foram apresentados como média + SD de 2 repetições (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

Nossos resultados estão de acordo com outros estudos, onde a combinação de CQ+PTX atenuou a subpopulação CTT (células CD133⁺, esferoides e expressão de Oct4) de forma mais eficientemente que o PTX isolado em NSCLC (DATTA et al., 2019). Também, a CQ inibiu a formação de mamíferas e reduziu a população CD44^{alta}/CD24^{baixa} em células de câncer de mama triplo negativas (TNBC), sendo que o efeito foi melhor quando foi combinado com PTX, presumivelmente pela inibição da via Jak2-Stat3 (CHOI et al., 2014). Por outro lado, o tratamento apenas com o PTX apresentou maior efeito na área periférica (maior proliferação) das esferas de carcinoma cervical (LUKINA et al., 2018), mas sem redução de tamanho dos mesmos; contrário à perda de tamanho observada das esferas na nossa condição testada (CQ+PTX). Isto sugere que essa combinação tem maior potencial contra as estruturas esferoides.

Na condição CQ + FTY foi visto a formação de esferas menores, onde apenas a linhagem SCC9_{CisR} mostrou uma redução no número de esferas (71.16%, $p < 0.001$), comparado com o leve aumento na mesma condição nas células Cal27_{CisR}. Neste caso, o incremento de esferas pode estar relacionado ao efeito do FTY720, como foi visto no aumento em número e tamanho de neuroesferas de células tronco-neurais em resposta ao composto, o qual foi relacionado com uma maior capacidade proliferativa (TAN et al., 2016).

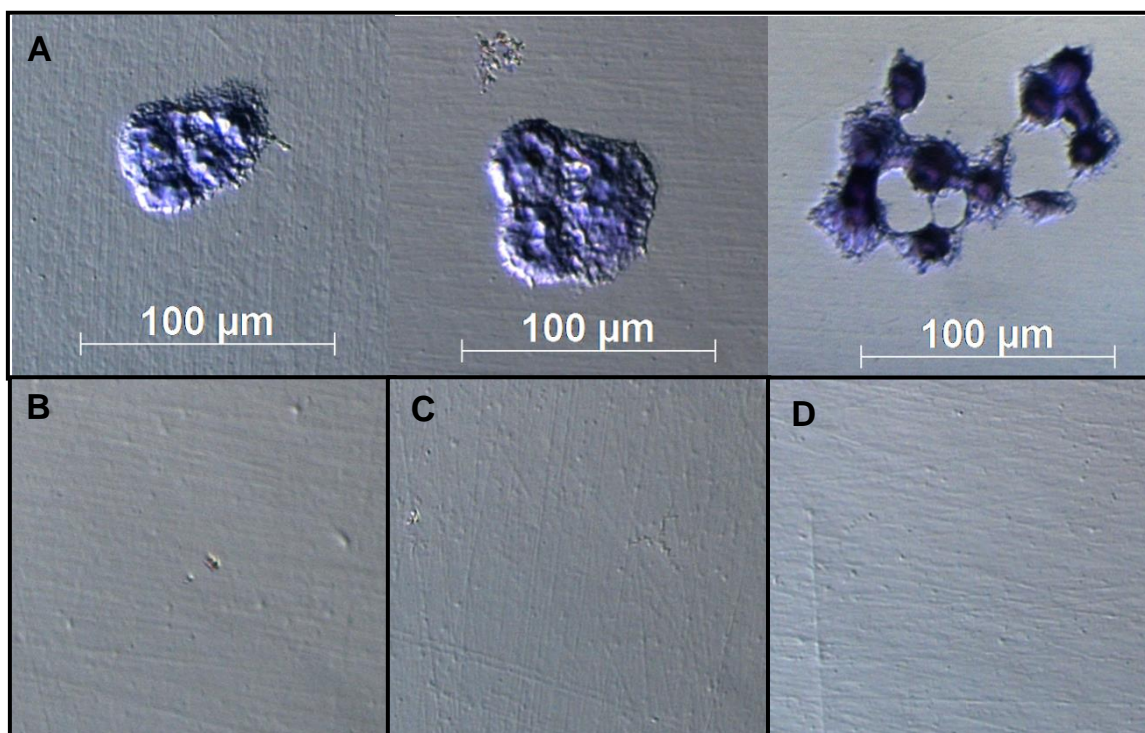
Portanto, podemos concluir que a inibição da autofagia mediada por CQ em combinação com os quimioterápicos, diminuiu consideravelmente a capacidade de formação de esferas dentro da população heterogênea de CECO. A nossa afirmação ganha força como o estudo de WANG et al (2018), que mostrou que a autofagia é ativada de forma sustentável nos esferoides de câncer de ovário, a inibição desta (shAtg5), impediu a entrada dos esferoides no estado quiescente, abolindo assim a capacidade de auto-renovação. Em consequência, os níveis de autofagia estariam associados positivamente com as características de autorrenovação e pluralidade das células tronco tumorais.

Para avaliarmos a viabilidade das células das estruturas 3D (esferas), foi realizado o ensaio da capacidade de aderência e sobrevivência das esferas após crescimento em condições de ultrabaixa adesão. Para isso, as esferas obtidas no ensaio anterior, foram coletadas e transferidas para placas de adesão convencional de 96 poços (flat bottom) e mantidas durante 48 h. No final, as células e/ou colônias resultantes foram fixadas, coradas e analisadas por microscopia de campo claro. Como

resultado, foi observado a dissociação das esferas, o qual derivou na presença de uma subpopulação de células e colônias aderentes apenas nas condições sem tratamento (Controle) de Cal27_{CisR} e SCC9_{CisR} (Figura 16), sendo visto um maior volume de células aderidas na linhagem SCC9_{CisR} (Figura 17).

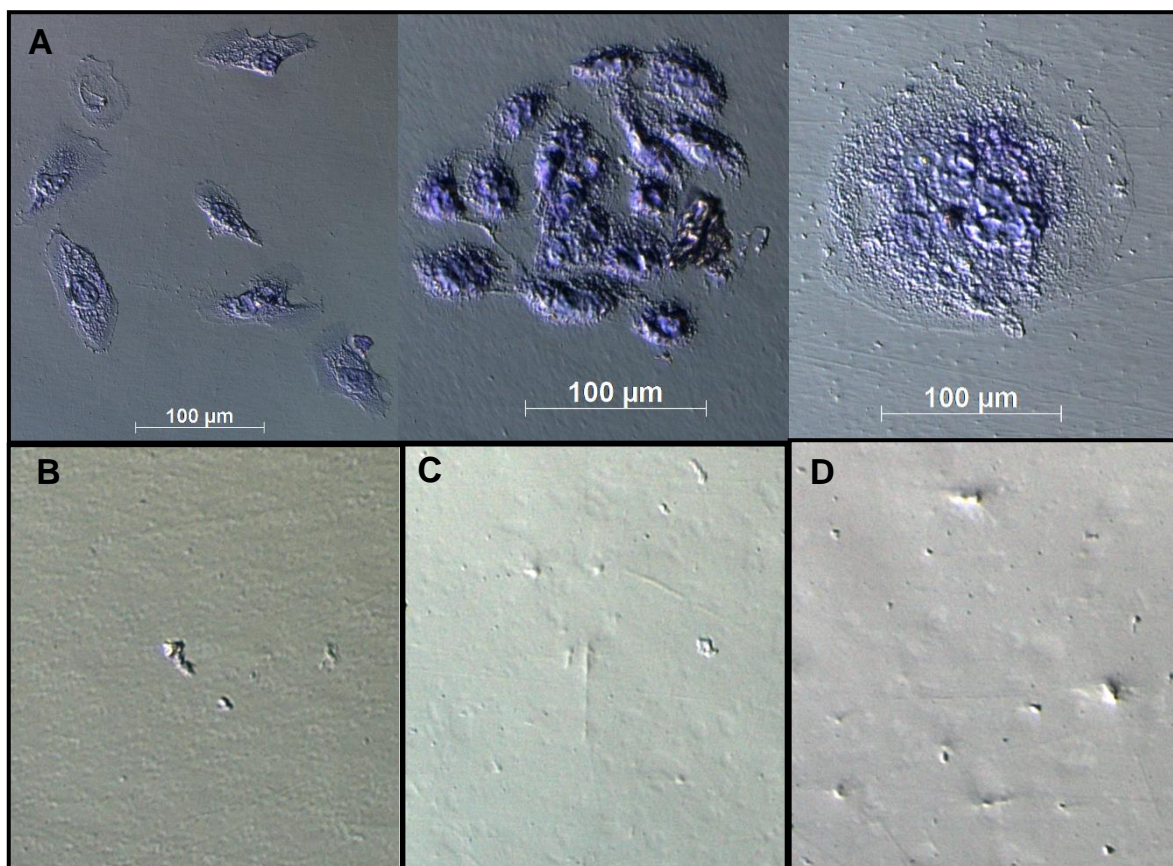
Em resumo este ensaio mostrou que, mesmo observando a presença de estruturas tipo “esferas” nas condições tratadas (Figuras 14 e 15), as células derivadas das tumoresferas não estavam mais viáveis, sendo incapazes de aderir a placa e proliferar novamente. Este esquema de avaliação de viabilidade e plasticidade das células tumorais após a transferência de 3D para 2D, tem sido utilizado em outras linhagens tumorais com a finalidade de avaliar a capacidade clonogênica de células derivadas de tumoresferas frente as células parentais aderentes (CALVET; ANDRE; MIR, 2014; SHRESTHA et al., 2021; ZHANG et al., 2018a). Por fim, estes resultados confirmaram que as combinações testadas induziram a morte das células presentes nas esferas, eliminando assim as subpopulações de CTT em ambas as linhagens CisR de CECO.

Figura 16. Efeito da combinação de fármacos na aderência de esferas tumorais de Cal27_{CisR}.



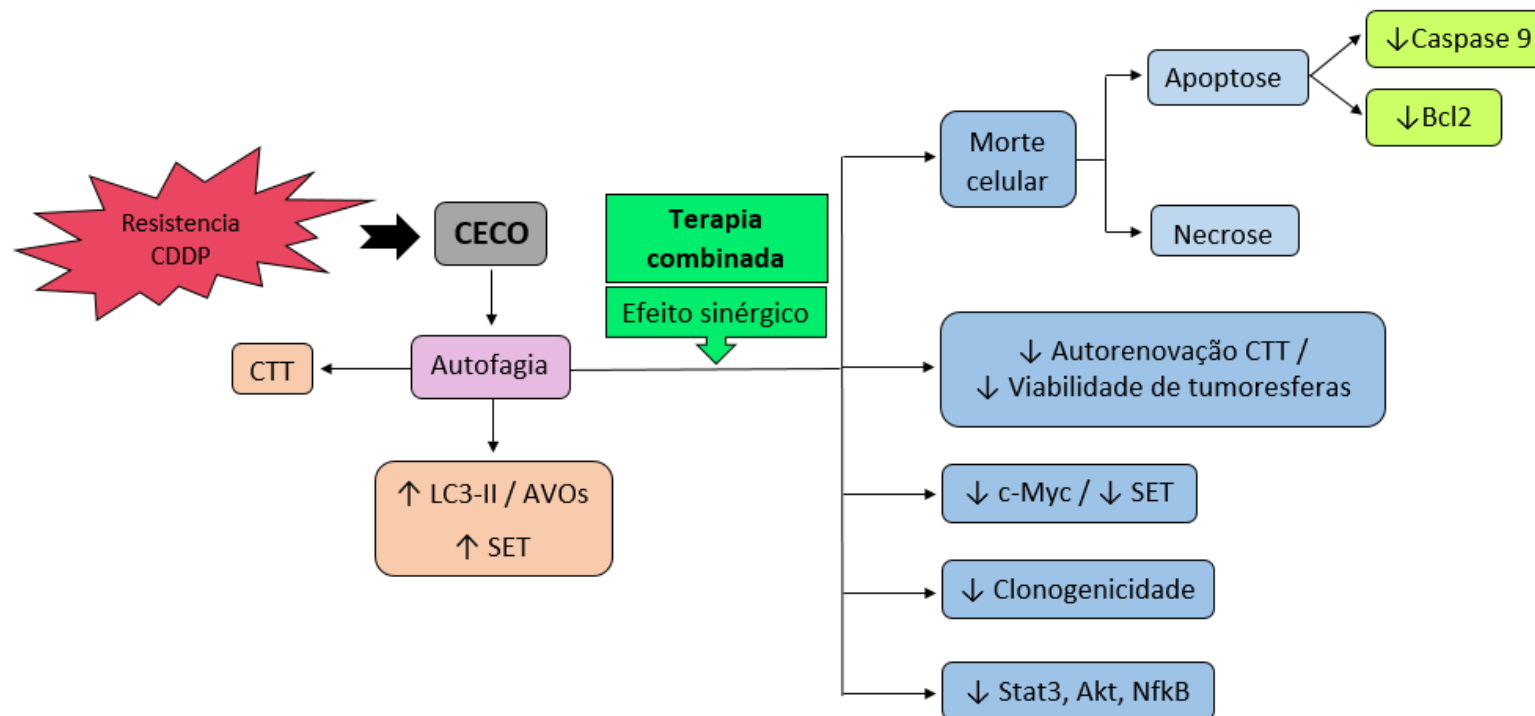
As esferas resultantes do ensaio de formação de esferas, foram re-plaqueados em placas de adesão convencional (96 poços) durante 48 horas e posteriormente avaliadas no microscópio de campo claro. **A.** Controle **B.** Tratamento: CQ 20µM + FTY720 5µM **C.** Tratamento: CQ 20µM + PTX 0.001µM **D.** Tratamento: FTY720 5µM + PTX 0.001µM.

Figura 17. Efeito da combinação de fármacos na aderência de esferas tumorais de SCC9_{CisR}.



As esferas resultantes do ensaio de formação de esferas, foram re-plaqueadas em placas de adesão convencional (96 poços) durante 48 horas e posteriormente avaliadas no microscópio de campo claro. **A.** Controle **B.** Tratamento: CQ 40µM + FTY720 2.5µM **C.** Tratamento: CQ 40µM + PTX 0.5µM **D.** Tratamento: FTY720 5µM + PTX 0.5µM.

Figura 18. Esquema representativo dos efeitos da terapia combinada em linhagens CECO CisR *in vitro*.



A aquisição de resistência a cisplatina em CECO ativa o mecanismo de autofagia a qual promove a manutenção das CTTs dentro da população heterogênea de CECO. Em nosso trabalho, foi corroborado o aumento da autofagia nas linhagens CECO CisR através do aumento de LC3-II, SET e da presença de AVOs (acridina orange). Frente a isso, o sinergismo da terapia combinada baseada em medicamentos existentes na clínica (CQ, FTY720, PTX), afetou vias paralelas conhecidas no desenvolvimento e progressão tumoral (diminuição de c-Myc, SET, Stat3, Akt, NfκB). Identificando a apoptose (diminuição da marcação de caspase 9 e Bcl2) e a necrose como principais mecanismos de morte celular. Outros mecanismos afetados nas células CECO CisR foram a troncalidade e a viabilidade das células com características de CTTs (esferoides), além da perda de clonogenicidade.

V. CONCLUSÃO

5. Conclusão

Nossos resultados mostraram que as linhagens CECO (Cal27 e SCC9) com resistência à CDDP apresentam aumento do fluxo autofágico, o que indica a quimiosensibilização terapêutica com alvo na autofagia combinada a fármacos convencionais como potencial estratégia antitumoral em CECO para impedir recidivas e tratar pacientes que não respondem a cisplatina.

A Cloroquina (CQ), inibidor de autofagia, em baixas concentrações *in vitro* possui sinergismo com os fármacos antitumorais testados (CDDP, FTY720 e PTX), sendo essa a primeira evidência experimental do sinergismo entre CQ + FTY720 e FTY720 + PTX no modelo *in vitro* de carcinoma epidermóide oral.

Por fim, as combinações de fármacos testadas foram capazes de reduzir o potencial de formação de esferas tumorais nas linhagens CECO CisR bem como induziu a morte das células dessas estruturas, provavelmente devido a relação entre a autorrenovação das CTTs e autofagia.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. Referências Bibliográficas

ALBERS, A. E. et al. Stem cells in squamous head and neck cancer. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 81, n. 3, p. 224–240, 2011.

ALINARI, L. et al. FTY720 increases CD74 expression and sensitizes mantle cell lymphoma cells to milatuzumab-mediated cell death. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 118, n. 26, p. 6893–6903, 2011.

ALLAM, R. M. et al. Fingolimod interrupts the cross talk between estrogen metabolism and sphingolipid metabolism within prostate cancer cells. **Toxicology Letters**, v. 291, n. October 2017, p. 77–85, 2018.

ALLEGRA, E.; TRAPASSO, S. Cancer stem cells in head and neck cancer. **OncoTargets and Therapy**, v. 5, p. 375–383, 2012.

ALVARENGA, L. et al. Epidemiologic evaluation of head and neck patients in a university hospital of Northwestern São Paulo State. **Revista Brasileira de Otorrinologia**, v. 74, n. 1, p. 68–73, 2008.

AMARAVADI, R. K. et al. Principles and Current Strategies for Targeting Autophagy for Cancer Treatment. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 4, p. 654–666, 2011.

AN, H. et al. Salinomycin promotes Anoikis and decreases inhibition of STAT3 activation in MDA-MB-231 cells. **PLoS ONE**, v. 2, n. 11, p. 1–17, 2015.

ANAND, K. et al. A Phase II study of the efficacy and safety of Chloroquine in combination with Taxanes in the treatment of patients with advanced or metastatic anthracycline-refractory breast cancer. **Clinical Breast Cancer**, v. 21, n. 3, p. 199–204, 2021.

ANDREADIS, C. et al. 5-Fluorouracil and cisplatin in the treatment of advanced oral cancer. **Oral Oncology**, v. 39, n. 4, p. 380–385, jun. 2003.

APEL, A. et al. Blocked Autophagy Sensitizes Resistant Carcinoma Cells to Radiation Therapy. **Cancer Research**, v. 68, n. 5, p. 1485–1495, 2008.

ARNOLD, H. K.; SEARS, R. C. Protein Phosphatase 2A Regulatory Subunit B56 α Associates with c-Myc and Negatively Regulates c-Myc Accumulation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 7, p. 2832–2844, 2006.

ARYAL, P. et al. Baicalein induces autophagic cell death through AMPK / ULK1 activation and downregulation of mTORC1 complex components in human cancer cells. **The FEBS Journal**, v. 281, n. 20, p. 4644–4658, 2014.

AYOB, A. Z.; RAMASAMY, T. S. Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. **Journal of Biomedical Science**, v. 25, n. 1, p. 1–18, 2018.

BAI, L.-Y. et al. FTY720 Induces Autophagy- Associated Apoptosis in Human Oral Squamous Carcinoma Cells, in Part, through a Reactive Oxygen Species / Mcl-1-Dependent Mechanism. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 5600, 2017.

BELOUNIS, A. et al. Autophagy is associated with chemoresistance in neuroblastoma. **BMC Cancer**, v. 16, n. 891, p. 1–14, 2016.

BESSELL, A. et al. Interventions for the treatment of oral and oropharyngeal cancers: surgical treatment. **Cochrane Systematic Review**, n. 9, 2011.

BIGHETTI-TREVISAN, R. L. et al. Cancer Stem Cells : Powerful Targets to Improve Current Anticancer Therapeutics. **Stem cells international**, 2019.

BOONE, B. et al. Safety and Biologic Response of Pre-operative Autophagy Inhibition with Gemcitabine in Patients with Pancreatic Adenocarcinoma. **Annals of Surgery Oncology**, v. 22, n. 13, p. 4402–4410, 2016.

BOROVSKI, T. et al. Cancer stem cell niche: The place to be. **Cancer Research**, v. 71, n. 3, p. 634–639, 2011.

BOYA, P.; KROEMER, G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. **Oncogene**, v. 27, n. 50, p. 6434–6451, 2008.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, set. 2018.

BRINKMANN, V. et al. The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 24, p. 21453–21457, 2002.

CALVET, C. Y.; ANDRE, F. M.; MIR, L. M. The Culture of Cancer Cell Lines as Tumorspheres Does Not Systematically Result in Cancer Stem Cell Enrichment. **PloS ONE**, v. 9, n. 2, 2014.

CANALS, D.; HANNUN, Y. Novel Chemotherapeutic Drugs in Sphingolipid Cancer. **Sphingolipids: Basic Science and Drug Development.**, n. 215, p. 211–238, 2014.

CANNON, R. E. et al. Targeting blood-brain barrier sphingolipid signaling reduces basal P-glycoprotein activity and improves drug delivery to the brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 39, p. 15930–15935, 2012.

CEPEDA, V. et al. Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 3–18, 1 jan. 2007.

CERQUETTI, L. et al. C-MYC modulation induces responsiveness to paclitaxel in adrenocortical cancer cell lines. **International Journal of Oncology**, v. 46, n. 5, p. 2231–2240, 2015.

CHANG, N. C. Autophagy and Stem Cells : Self-Eating for Self-Renewal. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 1–11, 2020.

CHEN, H. E. et al. Chloroquine induces lysosomal membrane permeability- mediated cell death in bladder cancer cells. **Formosan Journal of Surgery**, v. 51, n. 4, p. 133–141, 2018a.

CHEN, H. H. W.; KUO, M. T. Role of Glutathione in the Regulation of Cisplatin Resistance in Cancer Chemotherapy. **Metal-Based Drugs**, p. 1–7, 2010.

CHEN, J. et al. Inhibition of autophagy promotes cisplatin-induced apoptotic cell death through Atg5 and Beclin 1 in A549 human lung cancer cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 17, n. 5, p. 6859–6865, 2018b.

CHEN, Y. C. et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 385, n. 3, p. 307–313, 2009.

CHI, A.; DAY, T.; NEVILLE, B. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma- An update. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, n. 5, p. 401–421, 2015.

CHIN, T. et al. Targeting microtubules sensitizes drug resistant lung cancer cells to lysosomal pathway inhibitors. **Theranostics**, v. 10, n. 6, p. 2727–2743, 2020.

CHIOU, J. et al. Comparing the Relationship of Taxol-Based Chemotherapy Response with P-glycoprotein and Lung Resistance-Related Protein Expression in Non-Small Cell Lung Cancer. **Lung**, v. 181, n. 5, p. 267–273, 2003.

CHIOU, S.-H. et al. Positive Correlations of Oct-4 and Nanog in Oral Cancer Stem-Like Cells and High-Grade Oral Squamous Cell Carcinoma. **Human Cancer Biology**, v. 14, n. 13, p. 4085–4095, 2008.

CHOI, A. et al. Anti-malarial Drugs Primaquine and Chloroquine Have Different Sensitization Effects with Anti-mitotic Drugs in Resistant Cancer Cells. **Anticancer Research**, v. 36, n. 4, p. 1641–1648, 2016.

CHOI, C. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. **Cancer Cell International**, v. 5, n. 1, p. 1–13, 2005.

CHOI, D. S. et al. Chloroquine eliminates cancer stem cells through deregulation of Jak2 and DNMT1. **Stem Cells**, v. 32, n. 9, p. 2309–2323, 2014.

CHOI, H. S.; KIM, Y.; YUN, P.-Y. Upregulation of MDR- and EMT-Related Molecules in Cisplatin-Resistant Human Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Lines. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 12, 2019.

CHOU, H.-L. et al. Combination Therapy of Chloroquine and C2-Ceramide Enhances Cytotoxicity in Lung Cancer H460 and H1299 Cells. **Cancers**, v. 11, n. 3, 2019.

CHOU, T. C. Drug combination studies and their synergy quantification using the choutalalay method. **Cancer Research**, v. 70, n. 2, p. 440–446, 2010.

CLAY, M. et al. Single marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase. **Head & Neck**, v. 32, n. 9, p. 1195–1201, 2010.

CRISTOBAL, I. et al. Activation of the Tumor Suppressor PP2A Emerges as a Potential Therapeutic Strategy for Treating Prostate Cancer. **Marine Drugs**, v. 13, n. 6, p. 3276–3286, 2015.

DATTA, S. et al. Autophagy inhibition with chloroquine reverts paclitaxel resistance and attenuates metastatic potential in human nonsmall lung adenocarcinoma A549 cells via ROS mediated modulation of β -catenin pathway. **Apoptosis**, v. 24, n. 5, p. 414-, 2019.

DOMAGALA, A. et al. Inhibition of autophagy sensitizes cancer cells to Photofrin-based photodynamic therapy. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 1–10, 2018.

DONTU, G. et al. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem / progenitor cells. **Genes & development**, v. 17, n. 10, p. 1253–1270, 2003.

ELKASHTY, O.; ASHRY, R.; TRAN, S. Head and neck cancer management and cancer stem cells implication. **Saudi Dental Journal**, v. 31, n. 4, p. 395–416, 2019.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.

ERITJA, N. et al. Autophagy orchestrates adaptive responses to targeted therapy in endometrial cancer. **Autophagy**, v. 13, n. 3, p. 608–624, 2017.

FELLER, L.; LEMMER, J. Oral Squamous Cell Carcinoma: Epidemiology, Clinical Presentation and Treatment. **Journal of Cancer Therapy**, v. 3, p. 263–268, 2012.

FERNANDEZ-GIL, B. et al. Melatonin Enhances Cisplatin and Radiation Cytotoxicity in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma by Stimulating Mitochondrial ROS Generation, Apoptosis and Autophagy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1–12, 2019.

FORASTIERE, A. et al. Head and Neck Cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 26, p. 1890–1900, 2001.

FRANKEN, N. A. P. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315–2319, 2006.

FRIEDRICH, R. E.; PUNKE, C.; REYMAN, A. Expression of multi-drug resistance genes (mdr1, mrp1, bcrp) in primary oral squamous cell carcinoma. **In vivo**, v. 18, n. 2, p. 133–148, 2004.

GAO, M.; XU, Y.; QIU, L. Enhanced combination therapy effect on paclitaxel-resistant carcinoma by chloroquine co-delivery via liposomes. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 6615–6632, 2015.

GAO, M.; XU, Y.; QIU, L. Sensitization of multidrug-resistant malignant cells by liposomes co-encapsulating doxorubicin and chloroquine through autophagic inhibition. **Journal of Liposome Research**, v. 27, n. 2, p. 151–160, 2017.

GAŚIORKIEWICZ, B. M. et al. Autophagy modulating agents as chemosensitizers for cisplatin therapy in cancer. **Investigational New Drugs**, v. 39, n. 2, p. 538–563, 2020.

GEORGE, A.; RANGANATHAN, K.; KRISHNA, U. Expression of MMP-1 in histopathological different grades of oral squamous cell carcinoma and in normal buccal mucosa – an immunohistochemical study. **Cancer Biomarkers**, v. 7, n. 6, p. 275–283, 2010.

GHAZI, N. et al. Cancer Stem Cells and Oral Carcinogenesis ; a Review Article. **International Journal of Cancer Management**, v. 12, p. 1–9, 2019.

GIOANNI, J. et al. Two new human tumor cell lines derived from squamous cell carcinomas of the tongue: Establishment, characterization and response to cytotoxic treatment. **European Journal of Cancer and Clinical Oncology**, v. 24, n. 9, p. 1445–1455, 1988.

GOERTZEN, C. et al. Oral inflammation promotes oral squamous cell carcinoma invasion. **Oncotarget**, v. 9, n. 49, p. 29047–29063, 2018.

GOLD, J. M.; RAJA, A. Cisplatin (Cisplatinium). In: **StatPearls (Internet)**. [s.l.] StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2020.

GÓMEZ-RUIZ, S. et al. On the Discovery, Biological Effects, and Use of Cisplatin and Metallocenes in Anticancer Chemotherapy. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v. 2012, p. 1–14, 2012.

GONG, C. et al. Beclin 1 and autophagy are required for the tumorigenicity of breast cancer stem-like / progenitor cells. **Oncogene**, v. 32, n. 18, p. 2261–2272, 2013.

GONZALEZ, V. M. et al. Is Cisplatin-Induced Cell Death Always Produced by Apoptosis? **Molecular Pharmacology**, v. 59, n. 4, p. 657–663, abr. 2001.

GOTO, R. N. **Estudo in vitro e in vivo de novos compostos : com alvo-específico (hnRNP K e SET) ou com ação na mitocôndria para uso como antitumoral em carcinoma oral ou como citoprotetor em célula não- tumoral**. [s.l.] Universidade de Sao Paulo, 2017.

GOTO, R. N. et al. Synergic effect of OP449 and FTY720 on oral squamous cell carcinoma. **European Journal of Pharmacology**, v. 882, 2020.

GUO, W. et al. Mitochondria P-glycoprotein confers paclitaxel resistance on ovarian cancer cells. **Oncotarget**, v. 12, p. 3881–3891, 2019.

GUPTA, A. et al. Autophagy inhibition and antimalarials promote cell death in gastrointestinal stromal tumor (GIST). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 32, p. 14333–14338, 2010.

GUZMÁN, C. et al. ColonyArea: An ImageJ plugin to automatically quantify colony formation in clonogenic assays. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1–9, 2014.

HAN, H.-Y. et al. Sulfasalazine Induces Autophagic Cell Death in Oral Cancer Cells via Akt and ERK Pathways. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 16, p. 6939–6944, 2014.

HAN, J.; BURGESS, K. Fluorescent Indicators for Intracellular pH. **Chemical Reviews**, v. 110, p. 2709–2728, 2010.

HAN, L. et al. Cancer stem cells : therapeutic implications and perspectives in cancer therapy. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 3, n. 2, p. 65–75, 2013.

HAO, C.; LIU, G.; TIAN, G. Autophagy inhibition of cancer stem cells promotes the efficacy of cisplatin against non-small cell lung carcinoma. **Therapeutic Advances in Respiratory Disease**, v. 13, p. 1–11, 2019.

HARTNER, L. Chemotherapy for Oral Cancer. **Dental Clinics of North America**, v. 62, n. 1, p. 87–97, 2018.

HEGAZY, A. M. et al. Therapeutic Strategy for Targeting Aggressive Malignant Gliomas by Disrupting Their Energy Balance. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 41, p. 21496–21509, 2016.

HINOSHITA, E. et al. Increased Expression of an ATP-binding Cassette Superfamily Transporter , Multidrug Resistance Protein 2 , in Human Colorectal Carcinomas. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 6, p. 2401–2407, 2000.

HIRATA, N. et al. Sphingosine-1-phosphate promotes expansion of cancer stem cells via S1PR3 by a ligand-independent Notch activation. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 1–14, 25 dez. 2014.

HONIG, S. M. et al. FTY720 stimulates multidrug transporter – and cysteinyl leukotriene – dependent T cell chemotaxis to lymph nodes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 5, p. 627–637, 2003.

HU, J. et al. Paclitaxel induces apoptosis and reduces proliferation by targeting epidermal growth factor receptor signaling pathway in oral cavity squamous cell carcinoma. **Oncology letters**, v. 10, n. 4, p. 2378–2384, 2015.

HUANG, S.-H.; O’SULLIVAN, B. Oral cancer: Current role of radiotherapy and chemotherapy. **Oral Medicine and Pathology**, v. 18, n. 2, p. 233–240, 2013.

HUANG, Z. et al. Heat Shock Protein 27 , a Novel Regulator of Transforming Growth Factor β Induced Resistance to Cisplatin in A549 Cell. **Pharmacology**, v. 100, p. 283–291, 2017.

HUNG, M.; CHEN, K. Reprogramming the oncogenic response: SET protein as a potential therapeutic target in cancer. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 21, n. 7, p. 685–694, 2017.

IKUTA, K. et al. Expression of Multidrug Resistance Proteins and Accumulation of Cisplatin in Human Non-small Cell Lung Cancer Cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 4, p. 707–712, 2005.

INCA. **Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**. Rio de Janeiro: [s.n.].

ISHITSUKA, A. et al. FTY720 and cisplatin synergistically induce the death of cisplatin-resistant melanoma cells through the downregulation of the PI3K pathway and the decrease in epidermal growth factor receptor expression. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 34, n. 4, p. 1169–1174, 2014.

JANGHORBAN, M. et al. Targeting c-MYC by antagonizing PP2A inhibitors in breast cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 25, p. 9157–9162, 2014.

JELIHOVSCHI, I. et al. Detection of Human Papilloma Virus in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas: a Literature Review. **Revista medico-chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi**, v. 119, n. 2, p. 502–509, 2015.

JIANG, L. et al. CAL 27 is an oral adenosquamous carcinoma cell line. **Oral Oncology**, v. 45, n. 11, p. e204–e207, 2009.

JIANG, Y. et al. Cisplatin-induced autophagy protects breast cancer cells from apoptosis by regulating yes-associated protein. **Oncology Reports**, v. 38, n. 6, p. 3668–3676, out. 2017.

JUN, F. et al. Glioblastoma stem cells resistant to temozolomide-induced autophagy. **Chinese Medical Journal**, v. 122, n. 11, p. 1255–1259, 2009.

JUNTTILA, M. R. et al. CIP2A Inhibits PP2A in Human Malignancies. **Cell**, v. 130, n. 1, p. 51–62, 2007.

KALYANKRISHNA, S.; GRANDIS, J. R. Epidermal Growth Factor Receptor Biology in Head and Neck Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 17, p. 2666–2672, 2006.

KANEGAN, M. J. VAN et al. Distinct Protein Phosphatase 2A Heterotrimers Modulate Growth Factor Signaling to Extracellular Signal-regulated Kinases and Akt *. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 43, p. 36029–36036, 2005.

KANTARA, C. et al. Curcumin Promotes Autophagic Survival of a Subset of Colon Cancer Stem Cells , Which Are Ablated by DCLK1-siRNA. **Cancer Research**, v. 74, n. 9, p. 2487–2499, 2014.

KATAYAMA, A. et al. Expressions of Matrix Metalloproteinases in Early-Stage Oral Squamous Cell Carcinoma as Predictive Indicators for Tumor Metastases and Prognosis. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 2, p. 634–640, 2004.

KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 52–67, 2010.

KESSENBROCK, K.; WANG, C.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases in stem cell regulation and cancer. **Matrix Biology**, v. 44, p. 184–190, 2015.

KIMURA, T. et al. Chloroquine in Cancer Therapy: A Double-Edged Sword of Autophagy. **Cancer Research**, v. 73, n. 1, p. 3–7, 2013.

KLIONSKY, D. J. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition). **Autophagy**, v. 17, n. 1, p. 1–382, 2021.

KOBAYASHI, N.; DE NORONHA, S. Cancer stem cells: a new approach to tumor development. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 61, n. 1, p. 86–93, 2015.

KONDAGUNTA, G. V. et al. Combination of Paclitaxel, Ifosfamide, and Cisplatin Is an Effective Second-Line Therapy for Patients With Relapsed Testicular Germ Cell Tumors. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 27, p. 6549–6555, 20 set. 2005.

KORITA, P. V et al. Multidrug resistance-associated protein 2 determines the efficacy of cisplatin in patients with hepatocellular carcinoma. **Oncology Reports**, v. 23, n. 4, p. 965–972, 2010.

KOUKOURAKIS, M. I. et al. Cancer stem cell phenotype relates to radio-chemotherapy outcome in locally advanced squamous cell head-neck cancer. **British Journal of Cancer**, v. 106, n. 5, p. 846–853, 2012.

KREITZBURG, K. M. et al. FTY720 enhances the anti-tumor activity of carboplatin and tamoxifen in a patient-derived xenograft model of ovarian cancer. **Cancer Letters**, v. 436, n. 1, p. 75–86, nov. 2018.

KRISHNAMURTHY, S. et al. Endothelial cell-initiated signaling promotes the survival and self-renewal of cancer stem cells. **Cancer Research**, v. 70, n. 23, p. 9969–9978, 2010.

KRISHNAMURTHY, S. et al. Endothelial Interleukin-6 defines the tumorigenic potential of primary human cancer stem cells. **Stem Cells**, v. 32, n. 11, p. 2845–2857, 2015.

KRISHNAMURTHY, S.; NÖR, J. E. Head and neck cancer stem cells. **Journal of Dental Research**, v. 91, n. 4, p. 334–340, 2012.

KUMAR, D.; SHANKAR, S.; SRIVASTAVA, R. K. Rottlerin-induced autophagy leads to the apoptosis in breast cancer stem cells : molecular mechanisms. **Molecular Cancer**, v. 12, n. 171, p. 1–15, 2013.

KUMAR, M. et al. Oral cancer: Etiology and risk factors: A review. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 12, n. 2, p. 458–463, 2016.

KUO, Y. et al. Regulation of Phosphorylation of Thr-308 of Akt , Cell Proliferation , and Survival by the B55 α Regulatory Subunit Targeting of the Protein Phosphatase 2A Holoenzyme to Akt *. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 4, p. 1882–1892, 2008.

KUPFERMAN, M. et al. TrkB induces EMT and has a key role in invasion of head and neck squamous cell carcinoma. **Oncogene**, v. 29, n. 14, p. 2047–2059, 2010.

LEE, J. W. et al. Sphingosine kinase 1 as a potential therapeutic target in epithelial ovarian cancer. **International Journal of Cancer**, v. 137, n. 1, p. 221–229, 2015a.

LEE, S. H. et al. Human papillomavirus 16 (HPV16) enhances tumor growth and cancer stemness of HPV-negative oral / oropharyngeal squamous cell carcinoma cells via miR-181 regulation. **Papillomavirus Research**, v. 1, p. 116–125, 2015b.

LEE, S. H. et al. Orai1 promotes tumor progression by enhancing cancer stemness via NFAT signaling in oral / oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Oncotarget**, v. 7, n. 28, p. 43239–43255, 2016.

LEI, Y. et al. Targeting autophagy in cancer stem cells as an anticancer therapy. **Cancer Letters**, v. 393, p. 33–39, 2017.

LEOPOLDINO, A. M. et al. SET protein accumulates in HNSCC and contributes to cell survival: Antioxidant defense , Akt phosphorylation and AVOs acidification. **Oral Oncology**, v. 48, p. 1106–1113, 2012.

LI, J. et al. Inhibition of autophagy by 3-MA enhances IL-24-induced apoptosis in human oral squamous cell carcinoma cells. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 34, p. 1–13, 2015.

LI, J. et al. FTY720-induced enhancement of autophagy protects cells from FTY720 cytotoxicity in colorectal cancer. **Oncology Reports**, v. 35, n. 5, p. 2833–2842, 2016.

LI, M.; GUO, H.; DAMUNI, Z. Purification and Characterization of Two Potent Heat-Stable Protein Inhibitors of Protein Phosphatase 2A from Bovine Kidney? **Biochemistry**, v. 34, p. 1988–1996, 1995.

LI, M.; MAKKINJE, A.; DAMUNI, Z. The Myeloid Leukemia-associated Protein SET Is a Potent Inhibitor of Protein Phosphatase 2A*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 19, p. 11059–11062, 1996.

LI, W. et al. Low - dose paclitaxel downregulates MYC proto - oncogene bHLH transcription factor expression in colorectal carcinoma cells. **Oncology letters**, v. 15, n. 2, p. 1881–1887, 2018.

LI, Y. et al. Combination treatment of FTY720 and cisplatin exhibits enhanced antitumour effects on cisplatin-resistant non-small lung cancer cells. **Oncology Reports**, v. 39, n. 2, p. 565–572, nov. 2017.

LIANG, J. et al. Sphingosine-1-Phosphate Links Persistent STAT3 Activation, Chronic Intestinal Inflammation, and Development of Colitis-Associated Cancer. **Cancer Cell**, v. 23, n. 1, p. 107–120, 2013.

LIAO, J. et al. Cancer-associated fibroblasts confer cisplatin resistance of tongue cancer via autophagy activation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, p. 1341–1348, 2018.

LIDGERWOOD, G. E. et al. Roles of lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate in stem cell biology. **Progress in Lipid Research**, v. 72, n. September, p. 42–54, 2018.

LIN, J.-F. et al. Cisplatin induces protective autophagy through activation of BECN1 in human bladder cancer cells. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 11, p. 1517–1533, maio 2017a.

LIN, S. et al. c-MYC expression in T (III/IV) stage oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients. **Cancer Management and Research**, v. 11, p. 5163–5169, 2019.

LIN, Y.-C. et al. Chloroquine and hydroxychloroquine inhibit bladder cancer cell growth by targeting basal autophagy and enhancing apoptosis. **Kaohsiung Journal of Medical Sciences**, v. 33, n. 5, p. 215–223, 2017b.

LIU, G. et al. Osteopontin induces autophagy to promote chemo-resistance in human hepatocellular carcinoma cells. **Cancer Letters**, v. 383, n. 2, p. 171–182, 2016.

LIU, S.; LI, X. Autophagy inhibition enhances sensitivity of endometrial carcinoma cells to paclitaxel. **International Journal of Oncology**, v. 46, n. 6, p. 2399–2408, 2015.

LU, J. et al. Cyclovirobuxine D Induces Autophagy-Associated Cell Death via the Akt / mTOR Pathway in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 125, n. 1, p. 74–82, 2014a.

LU, Z. et al. FTY720 inhibits proliferation and epithelial- mesenchymal transition in cholangiocarcinoma by inactivating STAT3 signaling. **BMC Cancer**, v. 14, n. 1, p. 1–11, 2014b.

LUKINA, M. M. et al. Metabolic cofactors NAD(P)H and FAD as potential indicators of cancer cell response to chemotherapy with paclitaxel. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1862, n. 8, p. 1693–1700, 2018.

LUQUE, R. et al. Drug resistance induced by paclitaxel and carboplatin plasmatic concentrations in lung cancer cell lines. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, 2012.

LV, X. et al. EGFR enhances the stemness and progression of oral cancer through inhibiting autophagic degradation of SOX2. **Cancer Medicine**, v. 9, n. 3, p. 1131–1140, 2020.

MA, B. et al. Inhibition of autophagy enhances cisplatin cytotoxicity in human adenoid cystic carcinoma cells of salivary glands. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 42, p. 774–780, 2013.

MA, D. et al. Paclitaxel increases the sensitivity of lung cancer cells to lobaplatin via PI3K/Akt pathway. **Oncology letters**, v. 15, n. 5, p. 6211–6216, 2018.

MARFIA, G. et al. Autocrine/paracrine sphingosine-1-phosphate fuels proliferative and stemness qualities of glioblastoma stem cells. **Glia**, v. 62, n. 12, p. 1968–1981, 2014.

MARKOPOULOS, A. K. Current Aspects on Oral Squamous Cell Carcinoma. **The Open Dentistry Journal**, v. 6, n. 1, p. 126–130, 2012.

MARVASO, G. et al. Sphingosine analog fingolimod (FTY720) increases radiation sensitivity of human breast cancer cells in vitro. **Cancer Biology and Therapy**, v. 15, n. 6, p. 797–805, 2014.

MAYCOTTE, P. et al. Autophagy Supports Breast Cancer Stem Cell Maintenance by Regulating IL6 Secretion. **Molecular Cancer Research**, v. 13, n. 4, p. 651–658, 2016.

MICHIFURI, Y. et al. High expression of ALDH1 and SOX2 diffuse staining pattern of oral squamous cell carcinomas correlates to lymph node metastasis. **Pathology International**, v. 62, n. 10, p. 684–689, 2012.

MISUNO, K. et al. Quantitative proteomic analysis of sphere-forming stem-like oral cancer cells. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 4, n. 6, p. 1–13, 2013.

MIZUSHIMA, N.; YOSHIMORIM, T.; LEVINE, B. Methods in Mammalian Research. **Cell**, v. 140, n. 3, p. 313–326, 2010.

MODY, H. R. et al. SET contributes to the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 40, p. 67966–67979, 2017.

MORI, Y. et al. Suppression of heat shock protein 70 by siRNA enhances the antitumor effects of cisplatin in cultured human osteosarcoma cells. **Cell Stress and CHaperones**, v. 22, p. 699–706, 2017.

MURUGAN, S.; AMARAVADI, R. K. Methods for Studying Autophagy Within the Tumor Microenvironment. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1, p. 145–166, 2017.

NAGAHASHI, M. et al. Sphingosine-1-phosphate in the lymphatic fluid determined by novel methods. **Heliyon**, v. 2, n. 12, 1 dez. 2016.

NAKAMURA, M. et al. Establishment and characterization of a cisplatin-resistant oral squamous cell carcinoma cell line H-IR. **Oncology Reports**, v. 14, p. 1281–1286, 2005.

NAKAYAMA, S. et al. Prediction of paclitaxel sensitivity by CDK1 and CDK2 activity in human breast cancer cells. **Breast Cancer Research**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2009.

NARUSE, T. et al. Cetuximab for the treatment of locally advanced and recurrent/metastatic oral cancer: An investigation of distant metastasis. **Molecular and Clinical Oncology**, v. 5, n. 2, p. 246–252, ago. 2016.

NAZIO, F. et al. Autophagy and cancer stem cells: molecular mechanisms and therapeutic applications. **Cell Death & Differentiation**, v. 26, p. 690–702, 2019.

NEMA, R. et al. Emerging role of sphingosine-1-phosphate signaling in head and neck squamous cell carcinoma. **Oncotargets and Therapy**, v. 9, p. 3269–3280, 2016.

NG, D. C. H. et al. Stat3 regulates microtubules by antagonizing the depolymerization activity of stathmin. **The Journal of Cell Biology**, v. 172, n. 2, p. 245–257, 2006.

NG, K. T. et al. Marked suppression of tumor growth by FTY720 in a rat liver tumor model: The significance of down-regulation of cell survival Akt pathway. **International Journal of Oncology**, v. 30, n. 2, p. 375–380, 2007.

NG, M. L. et al. Regulatory role of sphingosine kinase and sphingosine-1-phosphate receptor signaling in progenitor/stem cells. **World Journal of Stem Cells**, v. 10, n. 9, p. 119–133, 26 set. 2018.

OGRETMEN, B. Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 18, n. 1, p. 33–50, 2017.

OJHA, R.; BHATTACHARYYA, S.; SINGH, S. K. Autophagy in Cancer Stem Cells: A Potential Link Between Chemoresistance, Recurrence, and Metastasis. **BioResearch Open Access**, v. 4, p. 97–108, 2015.

OJHA, R.; SINGH, S. K.; BHATTACHARYYA, S. JAK-mediated Autophagy Regulates Stemness and Cell Survival in Cisplatin Resistant Bladder Cancer Cells. **Biochimica et Biophysica Acta BBA**, v. 1860, n. 11, p. 2484–2497, 2016a.

OKAMOTO, A. et al. Expansion and characterization of cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Oral Oncology**, v. 45, n. 7, p. 633–639, 2009.

OMURA, K. Current status of oral cancer treatment strategies: Surgical treatments for oral squamous cell carcinoma. **International Journal of Clinical Oncology**, v. 19, n. 3, p. 423–430, 2014.

ORTIZ, R. et al. CD44 and ALDH1 immunoexpression as prognostic indicators of invasion and metastasis in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 47, n. 8, p. 740–747, 2018.

OTA, K. et al. Fingolimod sensitizes EGFR wild - type non - small cell lung cancer cells to lapatinib or sorafenib and induces cell cycle arrest. **Oncology Reports**, v. 720, p. 231–242, 2019.

OUCHIDA, A. T. et al. SET protein accumulation prevents cell death in head and neck squamous cell carcinoma through regulation of redox state and autophagy. **BBA - Molecular Cell Research**, v. 1866, n. 4, p. 623–637, 2019.

PALLAVI, N.; NALABOLU, G. R. K.; HIREMATH, S. K. S. Bcl-2 and c-Myc expression in oral dysplasia and oral squamous cell carcinoma: An immunohistochemical study to assess tumor progression. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology: JOMFP**, v. 22, n. 3, p. 325–331, 2018.

PAPAGERAKIS, S. et al. Oral epithelial stem cells—Implications in normal development and cancer metastasis. **Experimental Cell Research**, v. 325, n. 2, p. 111–129, jul. 2014.

PARK, D.; LEE, Y. Biphasic Activity of Chloroquine in Human Colorectal Cancer Cells. **Development & Reproduction**, v. 18, n. 4, p. 225–231, 2014.

PASCOLO, S. Time to use a dose of Chloroquine as an adjuvant to anti-cancer chemotherapies. **European Journal of Pharmacology**, v. 15, n. 771, p. 139–144, 2015.

PATEL, B. P. et al. Activation of MMP-2 and MMP-9 in Patients With Oral Squamous Cell Carcinoma. **Journal of Surgical Oncology**, v. 90, n. 2, p. 81–88, 2005.

PATMANATHAN, S. N. et al. The antineoplastic properties of FTY720: Evidence for the repurposing of fingolimod. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 19, n. 10, p. 2329–2340, 2015.

PATMANATHAN, S. N. et al. Aberrant expression of the S1P regulating enzymes, SPHK1 and SGPL1, contributes to a migratory phenotype in OSCC mediated through S1PR2. **Scientific Reports**, v. 6, n. March, p. 1–13, 2016.

PCHEJETSKI, D. et al. FTY720 (Fingolimod) Sensitizes Prostate Cancer Cells to Radiotherapy by Inhibition of Sphingosine Kinase-1. **Cancer Research**, v. 70, n. 21, p. 8651–8661, 2010.

PEITZSCH, C. et al. Cancer Stem Cells in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Identification, Characterization and Clinical Implications. **Cancers**, v. 11, n. 5, p. 616–639, 2 maio 2019.

PERDOMO, S. et al. Head and neck cancer burden and preventive measures in Central and South America. **Cancer Epidemiology**, v. 44, p. S43–S52, 2016.

PERYONE, M. Ueber die Einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlorur. **Annalen der Chemie und Pharmacie**, 1845.

PETHERICK, K. J. et al. Pharmacological Inhibition of ULK1 Kinase Blocks Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) - dependent Autophagy. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 18, p. 11376–11383, 2015.

PLAKS, V.; KONG, N.; WERB, Z. The Cancer Stem Cell Niche: How Essential is the Niche in Regulating Stemness of Tumor Cells? **Cell Stem Cell**, v. 16, n. 3, p. 225–238, 2016.

PRINCE, M. E. et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. v. 104, n. 3, 2007.

QADIR, M. . et al. Macroautophagy inhibition sensitizes tamoxifen-resistant breast cancer cells and enhances mitochondrial depolarization. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 112, p. 389–403, 2008.

RAPIDIS, A. et al. Docetaxel in the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 4, n. 5, p. 865–886, out. 2008.

REN, J.-H. et al. Acquired Cisplatin Resistance in Human Lung Adenocarcinoma Cells Is Associated with Enhanced Autophagy. **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, v. 25, n. 1, p. 1–6, 2010.

RHEINWALD, J. G.; BECKETT, M. A. Tumorigenic Keratinocyte Lines Requiring Anchorage and Fibroblast Support Cultured from Human Squamous Cell Carcinomas. **Cancer Research**, v. 41, n. 5, p. 1657–1663, 1981.

RIDDELL, I. A.; LIPPARD, S. J. 1. CISPLATIN AND OXALIPLATIN: OUR CURRENT UNDERSTANDING OF THEIR ACTIONS. In: SIGEL, A. et al. (Eds.). . **Metallo-Drugs: Development and Action of Anticancer Agents**. Berlin, Boston: De Gruyter, 2018. p. 1–42.

RIJPMA, S. R. et al. Atovaquone and quinine anti-malarials inhibit ATP binding cassette transporter activity. **Malaria Journal**, v. 13, p. 1–8, 2014.

RIVERA, C. Essentials of oral cancer. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 9, p. 11884–11894, 2015.

ROCHA, C. et al. DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship. **Clinics**, v. 73, n. Suppl 1, p. 1–10, 9 out. 2018.

ROLFF, J. et al. Response of Patient-Derived Non-Small Cell Lung Cancer Xenografts to Classical and Targeted Therapies Is Not Related to Multidrug Resistance Markers. **Journal of Oncology**, 2009.

SADDOUGHI, S. A. et al. Sphingosine analogue drug FTY720 targets I2PP2A / SET and mediates lung tumour suppression via activation of PP2A-RIPK1- dependent necroptosis. **EMBO Molecular Medicine**, v. 5, n. 1, p. 105–121, 2013.

SALEMI, S. et al. Autophagy is required for self-renewal and differentiation of adult human stem cells. **Cell Research**, v. 22, n. 2, p. 432–435, 2012.

SANTOS, L.; LEOPOLDINO, A. **Análise dos mecanismos antitumorais de FTY720 em câncer espinocelular de cabeça e pescoço**. [s.l.] Universidade de Sao Paulo-Ribeirao Preto, 2018.

SASAHIRA, T.; KIRITA, T. Hallmarks of Cancer-Related Newly Prognostic Factors of Oral Squamous Cell Carcinoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 8, 2018.

SCHLUMPF, M. F.; HAERLE, S. K. The current role of imaging in head and neck cancer: A clinician's perspective. **Swiss Medical Weekly**, v. 144, n. September, p. 1–9, 2015.

SCHONEWOLF, C. A. et al. Autophagy inhibition by chloroquine sensitizes HT-29 colorectal cancer cells to concurrent chemoradiation. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**, v. 6, n. 3, p. 74–82, 2014.

SHANG, H. et al. Multidrug resistance and tumor-initiating capacity of oral cancer stem cells. **Journal of the Balkan Union of Oncology**, v. 21, n. 2, p. 461–465, 2016.

SHAO, M. et al. Encapsulation of chloroquine and doxorubicin by MPEG-PLA to enhance anticancer effects by lysosomes inhibition in ovarian cancer. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 8231–8245, 2018.

SHARIF, T. et al. Autophagic homeostasis is required for the pluripotency of cancer stem cells. **Autophagy**, v. 13, n. 2, p. 264–284, 2017.

SHARMA, S. et al. Fingolimod (FTY720): First approved oral therapy for multiple sclerosis. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 2, n. 1, p. 49–51, 2011.

SHEN, D. et al. Cisplatin Resistance : A Cellular Self-Defense Mechanism Resulting from Multiple Epigenetic and Genetic Changes. **Pharmacological Reviews**, v. 64, n. 3, p. 706–721, 2012.

SHI, S. et al. ER stress and autophagy are involved in the apoptosis induced by cisplatin in human lung cancer cells. **Oncology Reports**, v. 35, n. 5, p. 2606–2614, maio 2016.

SHIN, D. et al. Redox Biology RITA plus 3-MA overcomes chemoresistance of head and neck cancer cells via dual inhibition of autophagy and antioxidant systems. **Redox Biology**, v. 13, p. 219–227, 2017.

SHIPLEY, W. U. Treatment of Invasive Bladder Cancer by Cisplatin and Radiation in Patients Unsited for Surgery. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 258, n. 7, p. 931–935, 21 ago. 1987.

SHRESTHA, R. et al. Dual Targeting of Sorafenib-Resistant HCC-Derived Cancer Stem Cells. **Current Oncology**, v. 28, n. 3, p. 2150–2172, 2021.

SI, M.; LANG, J. The roles of metallothioneins in carcinogenesis. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 11, n. 1, p. 1–20, 23 dez. 2018.

SILVA, R. et al. Modulation of P-glycoprotein ef fl ux pump : induction and activation as a therapeutic strategy. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 149, p. 1–123, 2015.

SILVER, D. L. et al. Activated Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) 3 : Localization in Focal Adhesions and Function in Ovarian Cancer Cell Motility. **Cancer Research**, v. 64, n. 10, p. 3550–3558, 2004.

SINGH, B. N. et al. Rottlerin induces autophagy which leads to apoptotic cell death through inhibition of PI3K / Akt / mTOR pathway in human pancreatic cancer stem cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 84, n. 9, p. 1154–1163, 2012.

SIRICHANCHUEN, B.; PENGSUPARP, T.; CHANVORACHOTE, P. Long-term cisplatin exposure impairs autophagy and causes cisplatin resistance in human lung cancer cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 364, n. 1, p. 11–18, 2012.

SMITH, A. G.; MACLEOD, K. F. Autophagy, cancer stem cells and drug resistance. **The Journal of Pathology**, v. 247, n. 5, p. 708–718, 2019.

SOBRAL, L. M. et al. Stable SET knockdown in head and neck squamous cell carcinoma promotes cell invasion and the mesenchymal-like phenotype in vitro, as well as necrosis, cisplatin sensitivity and lymph node metastasis in xenograft tumor models. **Molecular Cancer**, v. 13, n. 1, p. 1–13, 2014.

SOTIROPOULOU, P. A. et al. Chemical approaches to targeting drug resistance in cancer stem cells. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 10, p. 1547–1562, 2014.

SQUARIZE, C. H. et al. Molecular Crosstalk between the NF- κ B and STAT3 Signaling Pathways in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Molecular Cross-Talk between the NF K B and STAT3 Signaling Pathways in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Neoplasia**, v. 8, n. 9, p. 733–746, 2006.

SUDHAKARA, M. et al. Uncommon features in conventional oral squamous cell carcinoma. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 20, n. 2, p. 316–319, 2016.

SUGIYAMA, T. et al. Paclitaxel-cisplatin combination in advanced ovarian cancer: a phase II study. **International Journal of Clinical Oncology**, v. 5, n. 2, p. 85–88, abr. 2000.

SUN, M. et al. Nitidine chloride induces apoptosis, cell cycle arrest, and synergistic cytotoxicity with doxorubicin in breast cancer cells. **Tumor Biology**, v. 35, n. 10, p. 10201–10212, 2014.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020 : GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

SUZUKI, M. et al. Heterogeneity of anticancer drug sensitivity in squamous cell carcinoma of the tongue. **Human Cell**, v. 24, n. 1, p. 21–29, 2011.

TAKASAKI, T. et al. More than Just an Immunosuppressant: The Emerging Role of FTY720 as a Novel Inducer of ROS and Apoptosis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1–13, 28 mar. 2018.

TAKEDA, M. et al. Disruption of Endolysosomal RAB5 / 7 Efficiently Eliminates Colorectal Cancer Stem Cells. **Molecular Cell Biology**, v. 79, n. 7, p. 1426–1437, 2019.

TALUKDAR, S. et al. MDA-9 / Syntenin regulates protective autophagy in anoikis-resistant glioma stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 22, p. 5768–5773, 2018.

TAN, B. et al. Effects of FTY720 (Fingolimod) on Proliferation , Differentiation , and Migration of Brain-Derived Neural Stem Cells. **Stem Cells International**, 2016.

TANIDA, I. et al. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. **Autophagy**, v. 1, n. 2, p. 84–91, 2005.

TANIDA, I.; UENO, T.; KOMINAMI, E. LC3 and Autophagy. **Methods in Molecular Biology**, v. 445, n. 2, p. 77–88, 2008.

TEIXEIRA, A.; RENATO, A.; KEITH, O. Autophagy in Stem Cell Maintenance and Differentiation. **Stem Cells and Development**, v. 21, n. 4, p. 513–520, 2012.

THEOCHARIS, A. D. et al. Extracellular Matrix Structure. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 4–27, 2016.

THU, A. et al. Autophagy inhibitor 3-methyladenine potentiates apoptosis induced by dietary tocotrienols in breast cancer cells. **European Journal of Nutrition**, v. 54, p. 265–272, 2015.

TIAN, S. et al. miR-138-5p suppresses autophagy in pancreatic cancer by targeting SIRT1. **Oncotarget**, v. 8, n. 7, p. 11071–11082, 2017.

TRAGANOS, F.; DARZYNKIEWICZ, Z. Lysosomal Proton Pump Activity : Supravital Cell Staining with Acridine Orange Differentiates Leukocyte Subpopulations. **Methods in Cell Biology**, v. 41, 1994.

VAN GELDER, M. et al. Efficacy of cisplatin-based immunochemotherapy plus alloSCT in high-risk chronic lymphocytic leukemia: Final results of a prospective multicenter phase 2 HOVON study. **Bone Marrow Transplantation**, v. 51, n. 6, p. 799–806, 2016.

VASSILOMANOLAKIS, M. et al. Vinorelbine and cisplatin in metastatic breast cancer patients previously treated with anthracyclines. **Annals of Oncology**, v. 11, n. 9, p. 1155–1160, set. 2000.

VELMURUGAN, B. K. et al. PP2A deactivation is a common event in oral cancer and reactivation by FTY720 shows promising therapeutic potential. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 2, p. 1300–1311, 2018.

WALKER, S. R. et al. Microtubule-Targeted Chemotherapeutic Agents Inhibit Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) Signaling. **Molecular Pharmacology**, v. 78, n. 5, p. 903–908, 2010.

WALLINGTON-BEDDOE, C. T. et al. FTY720 produces caspase-independent cell death of acute lymphoblastic leukemia cells. **Autophagy**, v. 7, n. 7, p. 707–715, 2011.

WANG, H. et al. Gambogic acid induces autophagy and combines synergistically with chloroquine to suppress pancreatic cancer by increasing the accumulation of reactive oxygen species. **Cancer Cell International**, v. 19, n. 1, p. 1–15, 2019.

WANG, L.; GUNDELACH, J. H.; BRAM, R. J. Cycloheximide promotes paraptosis induced by inhibition of cyclophilins in glioblastoma multiforme. **Cell Death & Disease**, v. 8, n. 5, p. 1–11, 2017.

WANG, Q. et al. Core shell lipid-polymer hybrid nanoparticles with combined docetaxel and molecular targeted therapy for the treatment of metastatic prostate cancer. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2017.

WANG, Q. et al. Autophagy Is Indispensable for the Self-Renewal and Quiescence of Ovarian Cancer Spheroid Cells with Stem Cell- Like Properties. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2018.

WANG, Y.-C. et al. Benzyl butyl phthalate promotes breast cancer stem cell expansion via SPHK1/S1P/S1PR3 signaling. **Oncotarget**, v. 7, n. 20, p. 29563, 2016.

WANG, Y. et al. Bardoxolone methyl induces apoptosis and autophagy and inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and stemness in esophageal squamous cancer cells. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 9, p. 993–1026, 2015.

WANG, Z.; ZHU, G. **DNA Damage Repair Pathways and Repair of Cisplatin-Induced DNA Damage**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.

WESTERMARCK, J.; HAHN, W. C. Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation. **Trends in Molecular Medicine**, v. 14, n. 4, p. 152–160, 2008.

WHITE, C. et al. The emerging role of FTY720 (Fingolimod) in cancer treatment. **Oncotarget**, v. 7, n. 17, p. 23106–23127, 26 abr. 2016.

WISNOVSKY, S. P. et al. Targeting Mitochondrial DNA with a Platinum-Based Anticancer Agent. **Chemistry & Biology**, v. 20, n. 11, p. 1323–1328, nov. 2013.

WOLF, J. et al. A mammosphere formation RNAi screen reveals that ATG4A promotes a breast cancer stem-like phenotype. **Breast Cancer Research**, v. 15, n. 6, p. 1–13, 2013.

WONDERGEM, N. E. et al. At the Crossroads of Molecular Biology and Immunology : Molecular Pathways for Immunological Targeting of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Molecular Insights to Immunologically Target HNSCC**, v. 2, p. 1–9, 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION WHO. **World Cancer Report 2014**. Geneva, Switzerland: International Agency for Research on Cancer, 2014.

XU, Y.; XIA, X.; PAN, H. Active autophagy in the tumor microenvironment : A novel mechanism for cancer metastasis (Review). **Oncology Letters**, v. 5, n. 2, p. 411–416, 2013.

YAMASAKI, M. et al. Role of multidrug resistance protein 2 (MRP2) in chemoresistance and clinical outcome in oesophageal squamous cell carcinoma. **British Journal of Cancer**, v. 104, n. 4, p. 707–713, 2011.

YANG, M. et al. Blockade of autophagy reduces pancreatic cancer stem cell activity and potentiates the tumoricidal effect of gemcitabine. **Molecular Cancer**, v. 14, n. 179, p. 1–17, 2015.

YANG, Y. et al. Application and interpretation of current autophagy inhibitors and activators. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 34, n. 5, p. 625–635, 2013.

YANG, Z. et al. Cisplatin Preferentially Binds Mitochondrial DNA and Voltage-Dependent Anion Channel Protein in the Mitochondrial Membrane of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Possible Role in Apoptosis. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 19, p. 5817–5825, 1 out. 2006.

YASUI, H. et al. FTY720 Induces Apoptosis in Multiple Myeloma Cells and Overcomes Drug Resistance. **Cancer Research**, v. 65, n. 16, p. 7478–7485, 2005.

YE, J. et al. The cancer stem cell niche: cross talk between cancer stem cells and their microenvironment. **Tumor Biology**, v. 35, p. 3945–3951, 2014.

YEH, E. et al. A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells. **Nature cell biology**, v. 6, n. 4, p. 308–318, 2004.

YUE, W. et al. Inhibition of the autophagic flux by salinomycin in breast cancer stem-like / progenitor cells interferes with their maintenance. **Autophagy**, v. 9, n. 5, p. 714–729, 2013.

ZHANG, J. et al. Enrichment and characterization of cancer stem - like cells in ultra-low concentration of serum and non-adhesive culture system. **American Journal of translational research**, v. 10, n. 5, 2018a.

ZHANG, L. et al. FTY720 reduces migration and invasion of human glioblastoma cell lines via inhibiting the PI3K / AKT / mTOR / p70S6K signaling pathway. **Tumor Biology**, v. 35, n. 11, p. 10707–10714, 2014.

ZHANG, L. I. et al. FTY720 for cancer therapy (Review). **Oncology Reports**, v. 30, p. 2571–2578, 2013a.

ZHANG, N. et al. FTY720 induces necrotic cell death and autophagy in ovarian cancer cells: A protective role of autophagy. **Autophagy**, v. 6, n. 8, p. 1157–1167, 16 nov. 2010a.

ZHANG, N. et al. Combination of FTY720 with cisplatin exhibits antagonistic effects in ovarian cancer cells: Role of autophagy. **International Journal of Oncology**, v. 42, n. 6, p. 2053–2059, 2013b.

ZHANG, P. et al. Side population in oral squamous cell carcinoma possesses tumor stem cell phenotypes. **Cancer Letters**, v. 277, n. 2, p. 227–234, 2009.

ZHANG, Q. et al. A subpopulation of CD133 + cancer stem-like cells characterized in human oral squamous cell carcinoma confer resistance to chemotherapy. **Cancer Letters**, v. 289, n. 2, p. 151–160, 2010b.

ZHANG, W. et al. Paclitaxel resistance in MCF-7 / PTX cells is reversed by paeonol through suppression of the SET / phosphatidylinositol 3-kinase / Akt pathway. **Molecular Medicine Reports**, v. 12, n. 1, p. 1506–1514, 2015.

ZHANG, X. et al. Paclitaxel induces apoptosis of esophageal squamous cell carcinoma cells by downregulating STAT3 phosphorylation at Ser727. **Oncology Reports**, v. 37, n. 4, p. 2237–2244, 2017.

ZHANG, Y. et al. Plasma membrane changes during programmed cell deaths. **Nature Publishing Group**, v. 28, n. 1, p. 9–21, 2018b.

ZOU, B. O. et al. Aldehyde dehydrogenase activity is a cancer stem cell marker of tongue squamous cell carcinoma. **Molecular Medicine Reports**, v. 5, n. 4, p. 1116–1120, 2012.

