



Universidade Federal de Santa Catarina

Centro de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Odontologia

DANIELE MARÇO DE SOUSA ROCHA

EFEITO DO TIDEGLUSIB COMO TRATAMENTO NEOADJUVANTE A QUIMIOTERÁPICOS
EM LINHAGEM DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL

Florianópolis
2025

DANIELE MARÇO DE SOUSA ROCHA

EFEITO DO TIDEGLUSIB COMO TRATAMENTO NEOADJUVANTE A QUIMIOTERÁPICOS
EM LINHAGEM DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), área de concentração em Diagnóstico Bucal, linha de pesquisa “Estudos dos eventos celulares e moleculares envolvidos nos processos fisiológicos e patológicos de interesse para a Odontologia”.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro

Coorientador (a): Prof^a. Dr^a. Elena Riet Correa Rivero

Florianópolis
2025

Ficha de identificação da obra elaborada pela autora,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Rocha, Daniele Março de Sousa
EFEITO DO TIDEGLUSIB COMO TRATAMENTO NEOADJUVANTE A
QUIMIOTERÁPICOS EM LINHAGEM DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE
ORDenhe Março de Sousa Rocha ; orientadora, Mabel
Mariela Rodríguez Cordeiro , coorientador, Elena Riet
Correa Rivero, 2025.
87 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Odontologia, Florianópolis, 2025.

Inclui referências.

1. Odontologia. 2. Carcinoma epidermoide. 3.
Tideglusib. 4. Proteína GSk-3. 5. Apoptose. I. Cordeiro ,
Mabel Mariela Rodríguez . II. Rivero, Elena Riet Correa .
III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

Daniele Março de Sousa Rocha

**EFEITO DO TIDEGLUSIB COMO TRATAMENTO NEOADJUVANTE A
QUIMIOTERÁPICOS EM LINHAGEM DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL**

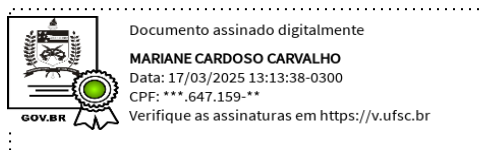
O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 18 de dezembro de 2024, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Kamile Leonardi Dutra Horstmann (Membro titular interno)
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

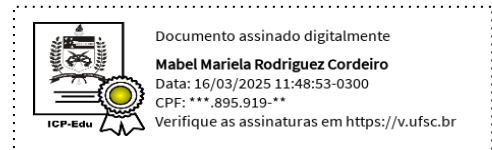
Profa. Dra. Jussara Maria Gonçalves Sfreddo (Membro titular externo)
Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE)

Profa. Dra. Sarah Freygang Mendes Pilati (Membro Suplente)
Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI)

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestra em Odontologia.



Profª Drª Mariane Cardoso
(Coordenadora do PPGO)
Universidade Federal de Santa Catarina



Profa. Dra. Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro
(Orientadora)
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2025.

"Esteja com quem te incentiva e com quem acredita em você, pois haverá dias em que nem você acreditará. Esteja com quem te encoraja e faz sorrir, porque, em algumas fases da vida, isso ajudará a seguir com mais leveza. Esteja com quem diz que tudo vai passar, mas permanece ao seu lado enquanto passa."

Tiara Martins

Dedico esta dissertação ao meu esposo Rafael Bernardo Appelt por todo amor, carinho, incentivo e paciência. E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelo dom da vida, saúde e sabedoria. E ainda por me dar forças para seguir, mesmo quando incansáveis vezes pensei em desistir.

A Profa. Dra. **Mabel Mariela Rodriguez Cordeiro**, pela orientação e oportunidade de participar desta linha de pesquisa. Obrigada pela confiança depositada em mim ao longo deste trabalho e pelos apontamentos realizados durante o desenvolvimento desta dissertação.

A Profa. Dra. **Elena Riet Correa Rivero** por compartilhar comigo seu vasto conhecimento, pela disponibilidade ao longo deste processo e dedicação em me treinar e orientar nos experimentos laboratoriais. Sou grata por toda a sabedoria, paciência, compreensão e exigência. Suas contribuições foram essenciais para a realização deste trabalho.

Aos professores **Michelle Tillmann Biz**, profa. **Carolina Amália Barcellos Silva** e prof. **Juliano Andreoli Miyake** pela disponibilidade, ensinamentos, planejamentos e discussões para melhoria deste trabalho.

Aos professores **Rogério Gondak**, prof. **Filipe Modolo**, prof. **Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior**, profa. **Liliane Grando** e prof. **Gustavo Rabelo** pelos ensinamentos durante as aulas e rotinas de diagnóstico bucal. Agradeço também ao prof. **Felipe Daltoé** pelos conselhos e paciência nas aulas de estágio docência.

Aos colegas **Gilberto Melo** e **Nicole Lonni** por “segurarem” minha mão do início ao fim desta jornada. Agradeço pela amizade, parceria, disponibilidade e contribuições para execução deste trabalho.

Aos amigos do LPB **Gilmara Iemos**, **Manoela Lira Reis**, **Leandro Perello Duro**, pela assistência técnica, pelo suporte em momentos desafiadores e pela disponibilidade em ajudar sempre que necessário. Agradeço por toda paciência e colaboração, que foram fundamentais para o bom andamento deste trabalho.

Aos **colegas da pós-graduação**, pelos momentos de aprendizado compartilhado, pela troca de ideias e pela parceria ao longo desta jornada. A convivência e o apoio de vocês tornaram este período mais “leve” e motivador, contribuindo para meu crescimento pessoal e acadêmico.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** e à **Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC)**, pela disponibilização de bolsas de estudo e verbas para financiamento de pesquisas.

Ao meu marido **Rafael Bernardo Appelt**, pelo suporte, carinho, parceria na vida e apoio incondicional em todas as etapas desta caminhada. Sua paciência, incentivo e compreensão fizeram toda a diferença, proporcionando força nos momentos difíceis e celebrando comigo cada conquista. Sou profundamente grata por tê-lo ao meu lado, compartilhando essa jornada e acreditando sempre no meu potencial. Agradeço por sempre me incentivar e me encorajar a ser uma pessoa melhor.

Resumo

O carcinoma epidermoide oral (CEO) é a neoplasia maligna mais prevalente da cavidade oral. Os tratamentos convencionais, como cirurgia, radioterapia e quimioterapia, ainda apresentam limitações, com baixa sobrevida e comprometimento funcional dos pacientes, destacando a necessidade de novos alvos terapêuticos. Estudos indicam que o Tideglusib (TDG), um inibidor seletivo da GSK-3 β usado em doenças neurodegenerativas, possui potencial antitumoral, induzindo apoptose e reduzindo a proliferação celular em alguns tumores. No entanto, sua ação no CEO ainda não havia sido explorada. Este estudo avaliou o efeito antitumoral do TDG *in vitro* em linhagem de CEO (CAL27), tanto isoladamente quanto como sensibilizador prévio à cisplatina (CPT) e ao cetuximabe (CTX). Inicialmente a expressão de GSK-3 β foi verificada por meio de imunocitoquímica em linhagem de carcinoma epidermoide de língua (CAL27), e por imunoistoquímica em casos de CEO. Para avaliação dos fármacos sobre as células foram utilizados os ensaios de citotoxicidade, viabilidade, proliferação celular, e apoptose. Os resultados mostraram que o TDG apresentou efeitos promissores, tanto isoladamente quanto em combinação com quimioterápicos. Porém, isoladamente, não foi superior aos fármacos convencionais. A expressão de GSK-3 β foi detectada nos casos de CEO, sugerindo seu potencial como alvo terapêutico. Conclui-se que o TDG pode atuar como alternativa neoadjuvante no tratamento de CEO, com maior impacto em combinações terapêuticas. Contudo, estudos adicionais são necessários para confirmar sua eficácia e segurança.

Palavras-chave: carcinoma epidermoide oral; Tideglusib; tumorigênese; quimioterapia.

Abstract

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most prevalent malignant neoplasm of the oral cavity. Conventional treatments, such as surgery, radiotherapy, and chemotherapy, still have limitations, with low survival and functional impairment of patients, highlighting the need for new therapeutic targets. Studies indicate that Tideglusib (TDG), a selective GSK-3 β inhibitor used in neurodegenerative diseases, has antitumor potential, inducing apoptosis and reducing cell proliferation in some tumors. However, its action in OSCC has not yet been explored. This study evaluated the antitumor effect of TDG in vitro in OSCC cell line (CAL27), both alone and as a pre-sensitizer to cisplatin (CPT) and cetuximab (CTX). Initially, the expression of GSK-3 β was verified by immunocytochemistry in a tongue squamous cell carcinoma cell line (CAL27), and by immunohistochemistry in OSCC cases. To evaluate the drugs on the cells, cytotoxicity, viability, cell proliferation, and apoptosis assays were used. The results showed that TDG presented promising effects, both alone and in combination with chemotherapeutics. However, alone, it was not superior to conventional drugs. The expression of GSK-3 β was detected in cases of OSCC, suggesting its potential as a therapeutic target. It is concluded that TDG can act as a neoadjuvant alternative in the treatment of OSCC, with a greater impact in therapeutic combinations. However, additional studies are needed to confirm its efficacy and safety.

Keywords: oral squamous cell carcinoma; Tideglusib; tumorigenesis; chemotherapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotomicrografia das células de CEO em cultivo (linhagem CAL27). Observa-se células com fenótipo epitelial, morfologia poligonal, citoplasma granular e variados tamanhos (Zeiss AxioVert 40C, 10x, Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Filtro de campo claro.

Figura 2 – Fases do crescimento celular: Fase lag - período de adaptação no qual não ocorre grande proliferação celular; Fase log - (logarítmica ou exponencial) período que a multiplicação celular é máxima e constante (Figura A); Fase estacionária – a velocidade de crescimento celular diminui (Figura B); Fase de declínio – redução do número de células (morte celular).

Figura 3 – Curva de crescimento celular: células Cal 27 mantidas em monocamada tiveram o seu número de células contado por um período de 07 dias. A partir destes resultados foi calculado a fase log (crescimento exponencial) sendo elaborado um gráfico com a curva de crescimento celular.

Figura 4 – Média das concentrações testadas de TDG em células CAL27.

Figura 5 - Média das concentrações testadas de CTX em células CAL27.

Figura 6 - Média das concentrações testadas de CPT em células CAL27.

Figura 7 - Ensaio de viabilidade (CAL27). Gráfico Box-Plot apresentando o percentual celular considerando os fármacos em diferentes concentrações para o tempo experimental de 24h.

Figura 8 - Ensaio de viabilidade (CAL27). Gráfico Box-Plot apresentando o percentual celular considerando os fármacos em diferentes concentrações para o tempo experimental de 48h.

Figura 9 - Gráficos de viabilidade celular (interação medicamentosa) em 24h e 48h.

Figura 10 - Ensaio de proliferação celular (CAL27). Gráfico de linhas demonstrando a curva padrão com base na intensidade de fluorescência e número correspondente de células.

Figura 11 - Representação gráfica de todos os grupos em ambos os tempos experimentais.

Figura 12 - Painel de fotomicrografias (Zeiss AxioVert 40C, 4x, adaptador 0,5x) do ensaio de migração ("Scratch") representativo em relação à linhagem de CEO (CAL27). As imagens representam o fechamento da área da fenda para o controle (DMEM) e os fármacos TDG, CTX, TDG+CTX, CPT, TDG+CPT nos tempos de 0h, 24h e 48h.

Figura 13 - Ensaio de migração (CAL27). Gráficos de barras representando o fechamento da área da fenda para o controle negativo (DMEM) e os fármacos nos tempos de 0h, 24h e 48h.

Figura 14 - Ensaio de apoptose (CAL27). Gráficos Dot-Plot para intensidade de fluorescência considerando os marcadores anexina V e iodeto de propídio para o controle negativo (DMEM), TDG, CTX, CPT nos tempos experimentais de 24h e 48h.

Figura 15- Análise da Expressão da Proteína GSK-3 β por Imunofluorescência em células CAL-27, observadas com microscópio eletrônico de fluorescência. Condensados azuis representam o material genético (provavelmente núcleo da célula) e, em verde, imunoexpressão da GSK-3 β em membrana celular.

Figura 16 – Marcação imunoistoquímica da expressão da GSK-3 β em amostras de tecidos não neoplásicos. Imagem ampliada.

Figura 17 – Marcação imunoistoquímica da expressão da GSK-3 β em amostras de CEO. Imagem ampliada.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Tideglusib - Ensaio de citotoxicidade (CAL27). Concentrações citotóxicas para 50% das células (CC50), desvio padrão (DP) e R2 nos tempos de 24h, 48h.

Tabela 2 - Cetuximabe - Ensaio de citotoxicidade (CAL27). Concentrações citotóxicas para 50% das células (CC50), desvio padrão (DP) e R2 nos tempos de 24h, 48h.

Tabela 3 – Cisplatina – Ensaio de citotoxicidade (CAL27). Concentrações citotóxicas para 50% das células (CC50), desvio padrão (DP) e R2 nos tempos de 24h, 48h.

Tabela 4 - Ensaio de viabilidade celular (CAL27). Medidas sumárias (média) e medidas de dispersão (desvio padrão) relativas ao percentual celular considerando os fármacos (TDG 320 µM, CTX 3450 µg/ml e CPT 5 µM) e o controle DMEM, no tempo experimental de 24h e 48h.

Tabela 5 - Análise ONE-WAY ANOVA (24h e 48h) e teste de múltiplas comparações (Tukey) entre os grupos experimentais com medidas em relação a diferença média entre os grupos e P valor.

Tabela 6 - Estatística descritiva do ensaio de proliferação (CAL27 CyQuant). Medidas sumárias (mínimo, máximo e média) e medidas de dispersão (desvio padrão) em relação ao número de células no tempo de 24h e 48h.

Tabela 7 - Teste de múltiplas comparações (Tukey) entre o grupo controle (DMEM) e os grupos experimentais (TDG, CTX, TDG+CTX, CPT, TDG+CPT) em 24h e 48h. Dados apresentados como diferença média e p valor.

Tabela 8 – Teste de múltiplas comparações (Tukey) entre o grupo TDG vs. os grupos CTX, TDG+CTX, CPT e TDG+CPT 24h e 48h. Dados apresentados como diferença média e p valor.

Tabela 9 - Teste de múltiplas comparações (Tukey) entre os grupos CTX vs. CPT vs. TDG+CTX e vs. TDG+CPT em 24h e 48h. Dados apresentados como diferença média e p valor.

Tabela 10 - Estatística descritiva do ensaio de migração celular pelo método “Scratch” em células de CEO, CAL27. Medidas sumárias (mínimo, máximo e média) e medidas de dispersão (desvio padrão) relativas ao fechamento da área da fenda considerando diferentes fármacos testados (TDG, CTX, TDG+CTX, CPT, TDG+CPT) e o grupo controle (DMEM), tempos experimentais de 0h, 24h e 48h.

Tabela 11 - Teste de múltiplas comparações (Tukey) entre os grupos em relação a área da fenda no tempo experimental de 24h. Dados apresentados como média, desvio padrão e valor de p para cada comparação.

Tabela 12 - Teste de múltiplas comparações (Tukey) entre os grupos em relação a área da fenda no tempo experimental de 48h. Dados apresentados como média, desvio padrão e valor de p para cada comparação.

Tabela 13 - Percentual de células apoptóticas, viáveis e necróticas em células CAL 27 após tratamento com os fármacos TDG, CTX, CPT ou combinações, controle negativo (DMEM), controle de apoptose (camptotecina) e de necrose (tratamento térmico), no tempo experimental de 24h.

Tabela 14 - Percentual de células apoptóticas, viáveis e necróticas em células CAL 27 após tratamento com os fármacos TDG, CTX, CPT ou combinações, controle negativo (DMEM), controle de apoptose (camptotecina) e de necrose (tratamento térmico), no tempo experimental de 48h.

LISTA DE ANEXOS

Anexo A - Aprovação de projeto no Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH-UFSC)

LISTA DE ABREVIATURAS SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
AR-A014418	Inibidor seletivo de GSK3
aRMS	Rabidomiossarcoma alveolar
ATCC	do inglês <i>American Type Culture Collection</i>
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
CAL 27	Linhagem celular de CEO
CC50	Concentração tóxica para 50%
CCE	Carcinoma de células escamosas
CEO	Carcinoma epidermoide oral
CEPSH-UFSC	Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina
CHIR-98014	Inibidor seletivo de GSK3
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO₂	Dióxido de Carbono
CPT	Cisplatina
CTX	Cetuximabe
DAB	Cromógeno 3,3'-diaminobenzidina
DAPI	Corante fluorescente 4',6'-diamino-2-fenil-indol
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EBSERH	Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares
EBV	Vírus Epstein–Barr
EGFR	Fator de crescimento epidérmico
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
EUA	Estados Unidos da América
eRMS	Rabidomiossarcoma embrionário transgênico
FUNDCT	Fundo Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
GLOBOCAN	Global Cancer Observatory
GSK-α	Glicogênio sintase quinase 3 alfa
GSK-3β	Glicogênio sintase quinase 3 beta
HCC	Carcinoma Hepato Celular
HFI	hiperplasia fibrosa inflamatória
HPV	Sigla em inglês para Papilomavírus Humano

HU	Hospital Universitário
IGF1R	Receptor do fator de crescimento 1 semelhante a insulina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LAMEB/UFSC	Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia da Universidade Federal de Santa Catarina
LPB	Laboratório de Patologia Bucal
LTDA	Sociedade de responsabilidade limitada
LY2090314	Inibidor seletivo de GSK3
MCTI	Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
NaCL	Soro fisiológico
NH4O4	Hidróxido de amônio
OVERNIGHT	“durante a noite”
PBS	Tampão fosfato-salino (do inglês <i>phosphate buffered saline</i>)
PI	Iodeto de propídio
PSP	Paralisia Supranuclear Progressiva
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotação por minuto
SFB	Soro fetal bovino
SRB	Sulforrodamina B
TA	Temperatura ambiente
TCA	Ácido tricloroacético (do inglês <i>trichloroacetic acid</i>)
TDG	Tideglusib
TDP-43	Transactive DNA-binding protein 43
TNM	Classificação de Tumores Malignos (T= extensão do tumor; N= ausência/ presença e extensão de metástase em linfonodos regionais; M= ausência/presença de metástase à distância).
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
WNT/β-Catenina	Via de sinalização tipo Wingless (Wnt)/ B-catenina

LISTA DE SIMBOLOS

~	Aproximadamente
*	Asterisco
[]	Concentração
DP	Desvio padrão
g	Grama
°C	Graus Celsius
H1	Hipótese alternativa
H0	Hipótese nula
h	Hora
=	Igual
IC	Intervalo de confiança
>	Maior que
±	Mais ou menos
<	Menor que
µg/ml	Micrograma por ml
µl	Microlitro
µM	Micromolar
mg	Miligrama
mg/ml	Miligrama por ml
mg/kg	Miligrama por quilograma
mm	Mililitro
mM	Milimolar
min	Minuto
nm	Nano molar
Nº	Número
II	Número romano, representando o número 2
%	Porcentagem, percentual ou por cento
R ²	R quadrado
®	Registrado
™	Trade mark ou marca comercial
vs.	Versus
x	Veze

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
2. HIPÓTESES	7
3. OBJETIVOS	8
3.1. Objetivo geral:.....	8
3.2. Objetivos específicos	8
4. JUSTIFICATIVA	9
5. REFERENCIAL TEÓRICO	10
5.1. Carcinoma Epidermoide Oral.....	10
5.2. Quimioterápicos	11
5.3. Cisplatina	12
5.4. Cetuximabe.....	12
5.5. Proteína GSK-3 β (glicogênio sintase quinase 3 beta).....	13
5.6. Tideglusib	14
6. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
6.1. Delineamento do Estudo e Aspectos Éticos e Legais	16
6.2. Fármacos.....	16
6.2.1. Tideglusib (TDG)	16
6.2.2. Cetuximabe (CTX).....	17
6.2.3. Cisplatina (CPT)	17
6.3. Linhagem celular	17
6.4. Procedimentos e protocolos de rotina	18
6.4.1. Descongelamento e cultivo celular	18
6.4.2. Crescimento celular	19
6.4.3. Contagem celular.....	20
6.4.4. Congelamento celular.....	21
6.5. Seleção da Amostra.....	21

6.6. Experimentos.....	22
6.7. Ensaio de citotoxicidade	22
6.8. Ensaio de viabilidade celular.....	23
6.9. Ensaio de proliferação celular (CyQuant®).....	23
6.10. Ensaio de migração celular ("Scratch").....	24
6.11. Ensaio de apoptose celular.....	25
6.12. Imunocitoquímica.....	26
6.13. Imunoistoquímica.....	27
6.14. Análise Estatística	28
7. Resultados	29
7.1. Ensaio de Citotoxicidade.....	29
7.1.1. Tideglusib (TDG)	29
7.1.2. Cetuximabe (CTX).....	30
7.1.3. Cisplatina (CPT)	31
7.2. Ensaio de viabilidade celular.....	32
7.3. Ensaio de proliferação celular (CyQuant).....	35
7.4. Ensaio de migração celular (Scratch).....	38
7.5. Ensaio de apoptose	43
7.6. Imunocitoquímica.....	47
7.7. Imunoistoquímica.....	47
8. Discussão.....	50
9. Conclusão	58
Referências	59
ANEXOS	69

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermoide oral (CEO) ou carcinoma de células escamosas (CCE), ocorre a partir de um epitélio de superfície displásico e, histologicamente, apresenta invasão do tecido conjuntivo por ilhas e/ou cordões de células escamosas epiteliais malignas. Este tipo de tumor ocorre em aproximadamente 95% dos casos, com estimativa de 15.100 novos casos por ano (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2023).

A causa do CEO é multifatorial. Nenhum agente ou fator (carcinógeno) etiológico único foi claramente definido ou aceito, porém, tanto fatores extrínsecos (tabaco, álcool) quanto intrínsecos (estados sistêmicos ou generalizados, desnutrição geral, predisposição genética, infecções por HPV e EBV) podem estar relacionados ao seu desenvolvimento (DE LIMA *et al.* 2019; IRANI, 2020; VANSHIKA *et al.* 2021).

Muitos tratamentos para câncer de cavidade oral têm como objetivo destruir as células cancerígenas, ou retardar seu crescimento. A estratégia terapêutica pode incluir cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapia alvo, imunoterapia, dentre outras estratégias associadas. O tratamento escolhido dependerá do estágio do câncer e das características individuais do paciente (CRAMER, BURTNESS, e FERRIS, 2019; AMERICA CANCER SOCIETY, 2023).

A quimioterapia passou por avanços significativos nas últimas décadas. Os estudos genéticos, a biologia molecular das células cancerígenas, a resposta imunológica ao câncer e o mecanismo de ação das drogas antineoplásicas, possibilitaram terapias cada vez mais individualizadas, de modo a aumentar a eficácia do tratamento com uma toxicidade cada vez menor. No entanto, tem sido demonstrado que muitos pacientes com CEO apresentam resposta insatisfatória à quimioterapia. A baixa eficácia dos tratamentos quimioterápicos tem sido relacionada a diversos mecanismos que variam desde o aumento do efluxo das drogas até a inativação de enzimas de reparo do DNA (CHAUHAN, GAJJAR e BASHA, 2016).

Estudos têm demonstrado que o Tideglusib (TDG), medicamento usado para o tratamento de doenças neurodegenerativas (Alzheimer e paralisia supranuclear progressiva) pode ser capaz de inibir a proteína GSK-3 β (glicogênio síntese quinase 3 beta), cuja superexpressão está relacionada ao crescimento tumoral. Assim, embora o interesse crescente pelo uso deste fármaco se dá através da regulação da GSK-3 no cérebro em pacientes com doença de Alzheimer, também tem sido demonstrada a sua capacidade de inibir a proliferação celular e induzir a apoptose em algumas neoplasias, entre elas, neuroblastoma, glioblastoma e osteossarcoma, próstata, pâncreas e câncer de pulmão (DUFFY *et al.*, 2014; SUN *et al.*, 2016; DAOUK *et al.*, 2019; HAO *et al.*, 2020; WEI *et al.*, 2021).

Ainda sobre a expressão de GSK3- β em neoplasias, Shimozaki *et al.* (2016) identificaram que células de osteossarcoma expressam predominantemente a forma ativa da

GSK-3 β , e a inibição dessa proteína suprimiu a proliferação e sobrevivência celular, induziu apoptose e mostrou eficácia contra tumores em camundongos. Em estudos clínicos, inibidores da GSK-3 β como TDG e LY2090314 apresentaram toxicidades controláveis e boa tolerabilidade, destacando o potencial terapêutico dessa abordagem (WALZ *et al.*, 2017). Outros inibidores de GSK-3 mostraram eficácia contra rabdomiossarcoma alveolar, um tipo agressivo e resistente às terapias convencionais (ZENG *et al.*, 2010). O inibidor de GSK3 β AR-A014418, combinado com quimioterápicos como temozolomida e gemcitabina, teve efeitos sinérgicos no tratamento de glioblastoma e câncer de pâncreas, aumentando a sensibilidade à radiação (DOMOTO *et al.*, 2016). A inibição de GSK-3 também potencializou os efeitos antitumorais do sorafenibe no carcinoma de células renais, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (KAWAZOE *et al.*, 2012). Esses achados reforçam ainda mais o potencial uso de um inibidor da GSK-3 β em tumores malignos.

Terapias convencionais para o CEO estão relacionadas a altas taxas de morbidade/mortalidade e sua recidiva, o que motiva a busca de novos alvos terapêuticos. Acredita-se que a inclusão do TDG no tratamento padrão poderia melhorar as taxas de remissão do câncer de cabeça e pescoço, além de melhorar a qualidade de vida do paciente e a sobrevida global. Sua eficácia pode ocorrer isoladamente ou em combinação com drogas citostáticas (VERMORKEN *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2017).

Visto que a literatura aponta um envolvimento da enzima GSK-3 β na progressão tumoral, bem como os achados de que o TDG atua inibindo essa proteína, e ainda consegue reduzir a proliferação de células neoplásicas ampliando as chances de sucesso do quimioterápico, e associado ao fato da resposta insatisfatória aos tratamentos com quimioterápicos, em alguns casos, além da ausência de estudos da ação desse medicamento em CEO, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do TDG, como um neoadjuvante a quimioterápicos em linhagens de CEO.

2. HIPÓTESES

As hipóteses nulas e alternativas a serem testadas neste estudo são:

- H0: O efeito do uso prévio do TDG na linhagem celular de CEO não possui superioridade quando comparado aos efeitos dos quimioterápicos Cetuximabe (CTX) e Cisplatina (CPT) sozinhos;
- H1: O efeito do uso prévio do TDG na linhagem celular de CEO possui superioridade quando comparado aos efeitos dos quimioterápicos CTX e CPT sozinhos.
- H0: TDG não inibe a viabilidade, proliferação e migração celular em linhagem celular de CEO;
- H1: TDG inibe a viabilidade, proliferação e migração celular em linhagem celular de CEO.
- H0: TDG não aumenta a apoptose celular em linhagem celular de CEO;
- H1: TDG aumenta a apoptose celular em linhagem celular de CEO.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

Avaliar o efeito antitumoral do Tideglusib (TDG) *in vitro*, e como tratamento prévio a Cetuximabe (CTX) e Cisplatina (CPT), em linhagem celular de CEO (Cal27).

3.2. Objetivos específicos

- 1) Analisar a expressão da proteína GSK-3 β na linhagem celular CAL27 e em casos de CEO.
- 2) Definir as concentrações de trabalho por meio da análise de citotoxicidade (CC50) do TDG e dos quimioterápicos CTX e CPT;
- 3) Avaliar a viabilidade, proliferação e migração celular após o tratamento com TDG, CTX e CPT isoladamente e após o tratamento com TGD previamente à exposição das células ao CTX e à CPT, nos períodos de 24 e 48 horas;
- 4) Avaliar a indução de apoptose após o tratamento com TDG, CTX e CPT isoladamente e após o tratamento do TDG previamente à exposição das células ao CTX e à CPT, nos períodos de 24 e 48 horas.

4. JUSTIFICATIVA

O CEO, é o câncer bucal mais comum. Seu comportamento agressivo e a baixa taxa de sobrevida, têm impulsionado estudos que visam uma maior eficácia dos métodos de tratamento.

Pesquisas recentes vêm demonstrando a eficácia do TDG no tratamento de algumas neoplasias. Porém, não há estudos na literatura sobre a ação deste medicamento no CEO.

Esta pesquisa visa elucidar como a inibição de uma determinada via de sinalização influencia o comportamento das células neoplásicas malignas, ou a sua resposta a quimioterápicos tradicionalmente utilizados para o seu tratamento. O conhecimento gerado poderá direcionar as próximas etapas para o uso do medicamento neoadjuvante ao quimioterápico.

O TDG é um fármaco que está em fase de testes e, se comprovada a sua eficácia, o estudo poderá avançar para etapas seguintes e, no futuro, vir a se tornar uma opção terapêutica para o CEO em seres humanos. Assim, este estudo buscou avaliar, *in vitro*, na linhagem celular Cal27, o efeito individual do TDG e como sensibilizador a dois quimioterápicos frequentemente utilizados no tratamento de CEO.

5. REFERENCIAL TEÓRICO

5.1. Carcinoma Epidermoide Oral

O carcinoma epidermoide oral (CEO), ou carcinoma de células escamosas (CCE), é considerado a neoplasia maligna de maior frequência na cavidade oral (CHAMOLI *et al.*, 2021).

Em um levantamento mundial realizado pelo GLOBOCAN, estima-se que a incidência de câncer de lábio e cavidade oral, para o ano de 2025, será de 422 mil novos casos, com maior frequência no sexo masculino, chegando a 294.000 casos (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2020).

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima que a incidência para o período de 2023 a 2025 seja de 15.100 novos casos de câncer na cavidade oral no Brasil, sendo 10.900 casos em homens e 4.200, em mulheres. A maior parte dos tumores malignos da cavidade bucal é constituída pelo CEO. Este tipo de tumor ocorre em aproximadamente 95% dos casos (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2023).

A causa do CEO é multifatorial. Nenhum agente ou fator carcinógeno etiológico único tem sido claramente definido ou aceito, porém, tanto fatores extrínsecos (tabaco, álcool) quanto intrínsecos (estados sistêmicos ou generalizados, desnutrição geral, anemia por deficiência de ferro, predisposição genética, vírus do papiloma humano – HPV, infecções por EBV) podem estar relacionados ao seu desenvolvimento (JOHNSON *et al.*, 2020; HOWARD, AGRAWAL e GOOI, 2021).

Histologicamente, o CEO surge a partir de um epitélio de superfície displásico e sua progressão gera rompimento da lâmina própria e invasão do tecido conjuntivo subjacente por ilhas e/ou cordões de células escamosas epiteliais malignas. Clinicamente, apresenta-se como feridas ou úlceras persistentes na cavidade oral e que não cicatrizam (DHANUTHAI *et al.*, 2018).

O sítio de maior acometimento pelo CEO é a língua (superfícies lateral, posterior e ventral). O soalho da boca é frequentemente acometido em homens, porém menos comum em mulheres. Outros locais de envolvimento (em ordem decrescente de frequência) incluem o palato mole, gengiva, mucosa jugal, mucosa labial e palato duro (LIU *et al.*, 2022).

O tratamento consiste em remover células cancerígenas e/ou retardar seu crescimento. A estratégia terapêutica pode ser de forma individual ou associada. A primeira escolha geralmente é a cirurgia, seguido por radioterapia, quimioterapia, terapia alvo e imunoterapia. O tratamento escolhido dependerá do estágio do câncer e das características

individuais do paciente (CAETANO-PINTO *et al.*, 2017; DE PAZ *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2023; RUFFIN *et al.*, 2023; VIKTORSSON *et al.*, 2023).

O prognóstico continua sendo um desafio para os clínicos e depende do tamanho da lesão, extensão, área comprometida e do estadiamento do sistema TNM (Classificação de Tumores Malignos – Tumor, Nódulo, Metástase). As lesões iniciais geralmente apresentam um prognóstico melhor comparado a estágios avançados (QUINTANILHA *et al.*, 2018). E apesar de grandes esforços em relação ao tratamento terem sido realizados nas últimas décadas, a taxa de sobrevida de 5 anos de pacientes com CEO não é mais do que 60%, devido à metástase e recorrência do tumor (LING, CHENG e TAO, 2021).

5.2. Quimioterápicos

Quimioterapia é um tipo de tratamento em que se utilizam substâncias químicas (medicamentos) para combater o câncer. O termo “quimioterapia” foi criado pelo químico alemão Paul Ehrlich, que investigou o uso de drogas para tratar doenças infecciosas (DEVITA e CHU, 2008). Por muitos anos, a radioterapia e a cirurgia foram os pilares para o tratamento do câncer. Porém, devido ao aparecimento de metástases e recorrência do câncer após cirurgia e irradiação, a quimioterapia combinada começou a ganhar maior destaque (AMJAD, CHIDHARLA e KASI, 2023).

A quimioterapia age sistemicamente atingindo as células cancerígenas em regiões do corpo. Sua função é inibir a proliferação celular e multiplicação do tumor. Os agentes quimioterápicos tradicionais atuam na síntese macromolecular e na função das células neoplásicas, atingindo o DNA, RNA e proteínas. Porém, não diferencia células saudáveis das células neoplásicas, podendo gerar efeitos colaterais. Os medicamentos usados na quimioterapia promovem a morte das células tumorais devido à sua citotoxicidade. Sua administração pode ser individual e/ou em conjunto à cirurgia e radioterapia. Também é indicada para uso com outros medicamentos na terapia-alvo, hormonioterapia e imunoterapia (PÉREZ-HERRERO e FERNÁNDEZ-MEDARDE, 2015).

Os quimioterápicos classificam-se em: agentes alquilantes, antimitóticos, hormonais, análogos de platina, imunoterápicos, anticorpos monoclonais, antimetabólitos, inibidores da topoisomerase (I e II), inibidores de quinase, inibidores de protease, inibidores da polimerase, quimioterápicos miscelâneos, inibidores da histonodesacetilase e agentes desmetilantes (SIA/SUS, 2018).

Os fármacos mais utilizados são Cisplatina (CPT), Fluorouracil, Docetaxel, Paclitaxel, Carboplatina, Cetuximabe (CTX), dentre outros. Sua forma de uso (isolada ou combinada),

vai depender do tipo de câncer, estágio da doença e estado de saúde geral do paciente. A quimioterapia à base de CPT ainda é considerada padrão ouro para o tratamento de CEO (DE OLIVEIRA *et al.*, 2021).

5.3. Cisplatina

A Cisplatina (CPT) é um tipo de fármaco para quimioterapia, análogo de platina. Geralmente é usada em combinação com outros medicamentos. Ela é utilizada como base para muitos planejamentos quimioterápicos indicados em ampla variedade de tumores sólidos. O efeito supressor no crescimento do tumor é limitado devido à sua toxicidade grave (GHOSH, 2019).

Seu modo de ação tem sido associado à sua capacidade de ligação ao DNA, interferindo no reparo, e induzindo a apoptose nas células cancerígenas. Porém, efeitos colaterais e a resistência aos medicamentos restringem sua aplicação e eficácia. Terapias combinadas de cisplatina com outros fármacos vêm sendo aplicadas como novas estratégias terapêuticas para superar a resistência e reduzir a toxicidade para vários tipos de câncer (DASARI e BERNARD TCHOUNWOU, 2014; KHALIL e JAMESON, 2019; ROMANI, 2022).

O efeito colateral mais comum do uso da CPT é a nefrotoxicidade seguido por ototoxicidade, neurotoxicidade, toxicidade gastrointestinal, toxicidade hematológica, cardiotoxicidade e hepatotoxicidade, dentre outros (QI *et al.*, 2019).

Relatórios anteriores indicaram que drogas citotóxicas podem induzir a ativação do fator de crescimento 1 semelhante a insulina (IGF1R), levando à resistência a fármacos por meio da ativação de vias pró-sobrevivência/anti-apoptóticas. Esse quimioterápico pode inibir a proliferação, viabilidade e formação de colônias de forma dependente da dose. Além de apoptose, mecanismos adicionais podem ser relevantes para o aumento da sensibilidade da CPT com a regulação negativa do IGF1R. A exploração da regulação ou inibição do IGF1R pode ser considerada como um método possível para quimiossensibilização no tratamento do CEO (MURARO *et al.*, 2021).

5.4. Cetuximabe

Cetuximabe (CTX) é um anticorpo monoclonal dirigido contra o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR). Ele atua inibindo o EGFR como sua superexpressão em tumores de cabeça e pescoço que são responsáveis pela falha terapêutica, resistência e

metástase. O CTX representa uma escolha terapêutica associada à radioterapia no caso de pacientes não aptos para platina (GEHRKE *et al.*, 2017; KHADELA *et al.*, 2022; LI *et al.*, 2023).

A utilização de anticorpos monoclonais para o tratamento de carcinoma vem mostrando melhores resultados terapêuticos com menor toxicidade em comparação aos protocolos quimioterápicos padrão. Identificar e direcionar os fatores subjacentes responsáveis pelo crescimento do tumor e progressão da doença pode ajudar na otimização atual de tratamento. A inclusão desses medicamentos poderá melhorar a remissão do tumor, bem como a qualidade de vida do paciente (DUDA *et al.*, 2020).

A CPT e o CTX estão indicados em combinação quimioterapêutica com outros agentes aprovados, em pacientes portadores de carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço, como um adjuvante aos procedimentos cirúrgicos e/ou radioterapêuticos apropriados (MCCUBREY *et al.*, 2016).

5.5. Proteína GSK-3 β (glicogênio sintase quinase 3 beta)

A busca por alternativas terapêuticas adjuvantes que complementem ou substituam os tratamentos convencionais tem ganhado destaque nos últimos anos. Nesse contexto, as terapias moleculares têm avançado, com foco crescente nas proteínas quinases. Entre essas, a glicogênio sintase quinase 3 beta (GSK-3 β) tem se destacado como um novo alvo no tratamento de carcinomas. Essa proteína quinase desempenha um papel crucial no metabolismo celular, influenciando processos como proliferação e apoptose celular. A glicogênio sintase quinase 3 (GSK-3) é uma proteína quinase serina/treonina, que consiste em dois genes relacionados, GSK-3 α e GSK-3 β . Ela exerce várias funções em processos celulares normais e em várias condições de doença. A literatura atual mostra que, no câncer, a superexpressão de GSK-3 pode se concentrar como um “promotor de tumor”, de acordo com o tipo da neoplasia e de mutações gênicas (HILLIARD *et al.*, 2011; VIDRI e FITZGERALD, 2020). Assim, acredita-se que a combinação de inibidores de GSK-3 com outros inibidores de moléculas pequenas, quimioterapia ou, ainda, radioterapia, pode ser mais efetivo no tratamento de carcinoma (TRNSKI *et al.*, 2015; SCHULZ *et al.*, 2018; HE *et al.*, 2020; LIN *et al.*, 2020; AUGELLO, *et al.*, 2020; PAN e VALAPALA, 2022).

Alguns estudos destacam uma vantagem terapêutica dos inibidores da GSK-3 e acentuam a importância deste alvo também na imunoterapia do câncer, podendo assim contribuir para uma resposta imune mais eficaz contra as células-alvo do tumor (DOMOTO *et al.*, 2020; KORNSUTHISOPON, TOMPKINS e OSATHANON, 2023). Porém, é importante destacar que tumores resistentes à terapia dividem os mesmos caminhos com sua

capacidade de invasão, sugerindo que a GSK-3 β forme um ciclo nocivo entre a invasão tumoral e a resistência à terapia nos tipos de câncer refratários (ALAOHALI *et al.*, 2022).

5.6. Tideglusib

Tideglusib (TDG), também chamado de NP031112 ou NP-12, nome químico 4-Benzyl-2-(naphthalen-1-yl) - [1,2,4] thiadiazolidine-3,5-dione e nome comercial Nypta® e Zentylor™, é um medicamento de molécula pequena, da classe das tiadiazolidinonas. Este fármaco foi proposto primeiramente para o tratamento da doença de Alzheimer e Paralisia Supranuclear Progressiva (PSP). Demonstrou ação neuroprotetora e anti-inflamatória em uma variedade de modelos animais (MORALES-GARCIA, *et al.*, 2012; WANG, *et al.*, 2016).

Também foi avaliada a eficácia de TDG *in vitro* e *in vivo* em diferentes modelos experimentais para a Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA). ELA é uma doença degenerativa do neurônio motor, onde os pacientes apresentam agregados de TDP-43 (Transactive DNA-binding protein 43) com modificações pós-traducionais, como hiperfosforilação, no citoplasma das células afetadas. A GSK-3 β é uma das proteínas quinases envolvidas na fosforilação de TDP-43. A regulação positiva de sua expressão e atividade é relatada na medula espinal e nos tecidos do córtex de pacientes com ELA. O tratamento com TDG diminuiu os níveis de TDP-43 e recuperou sua localização nuclear em linfoblastos de ELA em um modelo de neuroblastoma humano (MARTÍNEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2021).

Além do uso em doenças neurodegenerativas, o TDG vem sendo usado em diversas pesquisas, incluindo estudos com células-tronco (LOVESTONE *et al.*, 2015; YIANNOPOULOU e PAPAGEORGIOU, 2020; RAO *et al.*, 2022; SUN *et al.*, 2022), regeneração pulpar (ATILA *et al.*, 2022; ATILA *et al.*, 2023), formação de dentina reparadora (Neves *et al.*, 2017; ZAUGG *et al.*, 2020), formação e reparo ósseo (Comeau-Gauthier, 2020).

Ademais, acredita-se que ele pode ser capaz de inibir a proliferação e induzir a apoptose em algumas neoplasias, entre elas, neuroblastoma, glioblastoma e osteossarcoma. A superexpressão da proteína GSK-3 β também está relacionada ao crescimento tumoral, por isso se faz necessária a inibição da GSK-3 pelo TDG (MATHURAM *et al.*, 2016; BOUGHARIOS *et al.*, 2021; WEI *et al.*, 2021).

Zhang *et al.* (2020) observaram que a inativação de GSK-3 β por TDG pode potencializar o aumento da sensibilidade ao sorafenibe (inibição do tumor de 48,3% para 93,4%), no tratamento de Carcinoma Hepato Celular (HCC). Wei *et al.* (2021) consideram o TDG como uma estratégia terapêutica promissora para o tratamento do osteossarcoma sem efeitos colaterais, pois o mesmo inibiu a progressão do osteossarcoma por meio da repressão

da proliferação celular, indução da apoptose, suprimindo propriedades semelhantes às células-tronco cancerígenas.

Bou-Gharios *et al.* (2021) avaliaram o efeito da inibição da GSK-3 β com TDG, usando duas linhagens celulares de Glioblastoma humano, e combinaram TDG com radioterapia para avaliar se essa inibição aumentaria o efeito do tratamento padrão. O TDG reduziu significativamente a proliferação, viabilidade celular e a migração de ambas as linhagens de Glioblastoma de maneira dependente da dose e do tempo, *in vitro*. O tratamento individual e em combinação com radiação diminuiu significativamente a formação de colônias de células e reduziu a população de células-tronco cancerígenas de Glioblastoma. Foi sugerido, assim, que a combinação de TDG, como agente radioterapêutico adjuvante, também tem eficácia como uma nova estratégia para otimizar o efeito da radiação no Glioblastoma multiforme (HEDNA *et al.*, 2022).

Um estudo sobre o potencial efeito antitumoral do TDG em linhagens de células de neuroblastoma também foi realizado. Os resultados mostraram que o TDG reduziu significativamente a proliferação celular, viabilidade e migração das células de neuroblastoma e impediu a formação de neuroesferas, eliminando a capacidade de auto renovação de células-tronco cancerígenas resistentes, inibindo, assim, o crescimento e a progressão do tumor *in vivo* e impedindo a migração de células *in vitro*. No entanto, estudos futuros são necessários para investigar melhor seu potencial e decifrar os mecanismos subcelulares e moleculares subjacentes a esse fármaco (BAHMAD *et al.*, 2021).

A GSK-3 β é expressa indiretamente na supressão da miogênese do músculo esquelético e hipertrofia de cardiomiócitos. Em mioblastos, a inibição de GSK-3 β induz diferenciação muscular. Com isso, Bharathy *et al.* (2017) testaram a eficácia pré-clínica de TDG em modelos de Rabdomiossarcoma embrionário transgênico (eRMS) de peixe-zebra, *in vivo* e em modelos de xenoinxertos derivados de Rabdomiossarcoma alveolar (aRMS) de pacientes. *In vivo*, esse medicamento não mostrou efeito na progressão tumoral ou na miodiferenciação, embora o exame farmacodinâmico tenha identificado eficácia na redução da fosforilação mediada por GSK-3 β . *In vitro*, apresentou potência farmacocinética na redução da fosforilação da fosfo- β -catenina mediada por GSK-3 β e consequente aumento da β -catenina total em culturas de tumores primários com superexpressão de GSK-3 α e GSK-3 β . Porém, mesmo com eficácia no alvo, quando testado em dosagem mais alta (200 mg/kg), não apresentou efeito no crescimento tumoral ou miodiferenciação em modelos de xenoinxerto de aRMS ou eRMS.

Não foram encontrados relatos sobre a aplicação de TDG em CEO, bem como sobre efeitos colaterais que contraindiquem a utilização desse fármaco em carcinomas.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. Delineamento do Estudo e Aspectos Éticos e Legais

A pesquisa proposta é do tipo experimental, *in vitro*, analítica, prospectiva e retrospectiva.

Para a parte do estudo que envolveu as avaliações dos efeitos do TDG e dos quimioterápicos CTX e CPT, e a expressão de GSK-3 β , foi utilizada linhagem de células de carcinoma epidermoide oral (Cal27) adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro. Não foram utilizadas células de cultura primária e não foram realizados experimentos com animais.

Para a parte do estudo que envolveu as análises imunoistoquímicas de casos de CEO pertencentes ao Laboratório de Patologia Bucal (LPB), esta pesquisa conta com o parecer já submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH-UFSC), vinculado à linha de pesquisa “Etiologia, Diagnóstico, Prevenção e Terapias aplicadas à Odontologia” do Programa de Pós Graduação em Odontologia (Número do Parecer: 1.005.587– 30/03/2015; CAAE: 42976715.3.0000.0121) (Anexo A).

Este estudo foi desenvolvido em parceria com o Laboratório de Patologia Bucal (LPB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), colaboração com o Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia da Universidade Federal de Santa Catarina (LAMEB/UFSC) e Setor de Análises Clínicas do Hospital Universitário (HU) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

6.2. Fármacos

6.2.1. Tideglusib (TDG)

O TDG foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos da América [EUA]) através do representante local Sigma-Aldrich Brasil Ltda. (São Paulo, Brasil). O TDG foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) a uma concentração máxima de 10 mM (solução de estoque), sendo então armazenado em recipiente hermeticamente fechado, protegido da luz, em local seco, na temperatura recomendada de armazenamento 2 - 8 °C. Após a diluição para a concentração de trabalho, a solução foi filtrada antes do uso com auxílio de um filtro para seringa (membrana de polietersulfona de 0,22 μ m).

6.2.2. Cetuximabe (CTX)

O CTX [Erbix® 100 MG (5MG/ML) – 20 ML; MERCK(S/A) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha)] foi adquirido junto à empresa 4BIO Medicamentos S/A (São Paulo, SP). A solução comercial vem na forma líquida para infusão endovenosa, portanto, já pronta para uso, assim, não foi preciso fazer diluição do CTX. A solução foi filtrada e armazenada em geladeira (temperatura entre 2°C e 8°C).

6.2.3. Cisplatina (CPT)

A CPT foi adquirida da empresa Sigma-Aldrich Brasil Ltda. (São Paulo, Brasil). Seguindo as recomendações do fabricante, CPT foi diluída em soro fisiológico (NaCl) a uma concentração máxima de 25 mM (solução de estoque), sendo então armazenada em recipiente fechado, protegido da luz, local seco, na temperatura recomendada de armazenamento 2 - 8 °C.

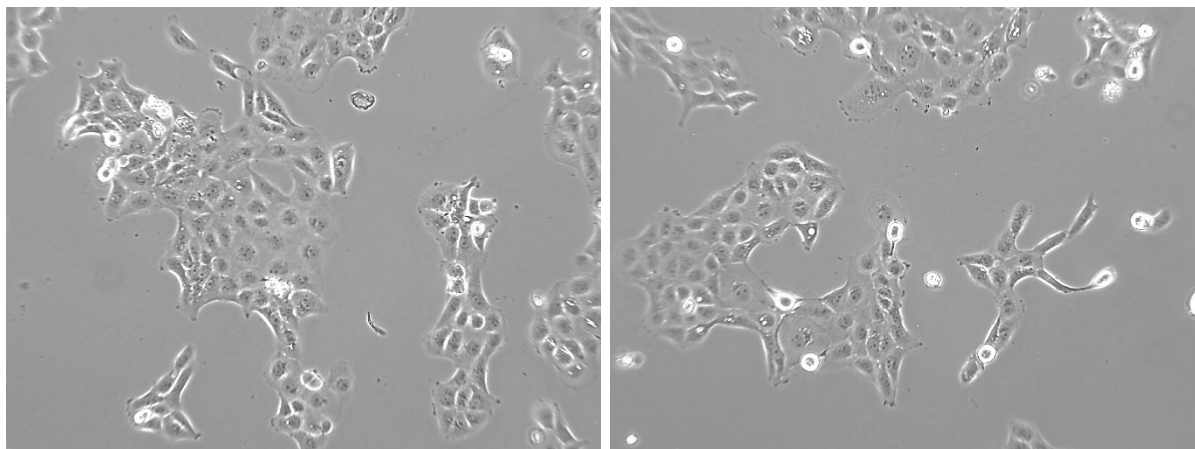
Estudo *in vitro*

6.3. Linhagem celular

Neste estudo foram utilizadas as células de linhagem celular de CEO Cal27. As células Cal27 foram adquiridas através do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e cultivadas de acordo com as recomendações propostas pela *American Type Culture Collection* (ATCC, 2023).

As CAL27 são células epiteliais isoladas de CEO de língua, originadas antes do tratamento de um paciente do sexo masculino de 56 anos. Esta linhagem celular foi estabelecida em 1982 por J. Gioanni (GIOANNI *et al.*, 1988). Apresentam morfologia poligonal e citoplasma altamente granular (Figura 1).

Figura 1 - Fotomicrografias das células de CEO em cultivo (linhagem CAL27). Observam-se células com fenótipo epitelial, morfologia poligonal, citoplasma granular e variados tamanhos (Zeiss AxioVert 40C, 10x, Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Filtro de campo claro.



Fonte: Fotomicrografias obtidas pela autora.

6.4. Procedimentos e protocolos de rotina

Todos os procedimentos e protocolos envolvendo cultivo celular foram realizados em cabines de fluxo laminar vertical classe II tipo A1 – BIOSEG12 (Veco ®), para manutenção da esterilidade dos materiais e das substâncias utilizadas. Além disso, todos os experimentos descritos foram realizados em triplicata e repetidos, pelo menos, duas vezes.

6.4.1. Descongelamento e cultivo celular

Para o descongelamento celular, os criotubos contendo as células foram removidos do botijão criogênico, acondicionados em um recipiente com gelo e rapidamente levados ao banho-maria a 37°C. Após o descongelamento rápido, as células foram transferidas para frascos de cultura com meio Eagle modificado por Dulbecco - High glicose (DMEM-HIGH) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

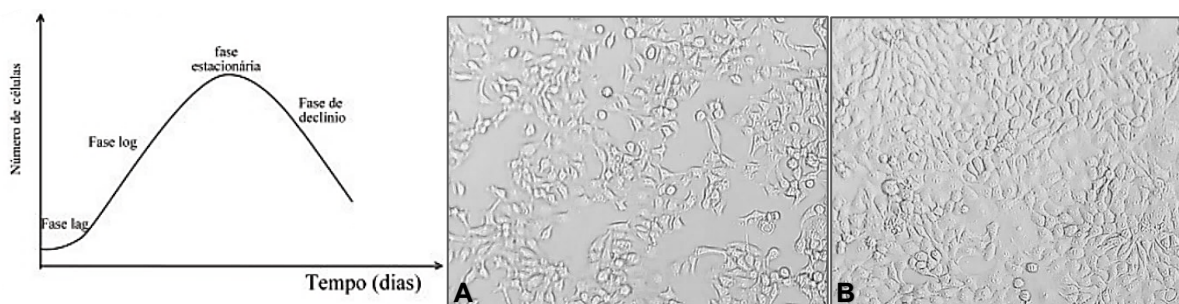
O meio de cultivo foi trocado a cada 2 a 3 dias e a progressão da cultura foi avaliada com auxílio de um microscópio invertido (Zeiss AxioVert 40C). Após atingirem a confluência, as células em cultivo foram enzimaticamente removidas dos frascos com volume apropriado de tripsina e contadas em um hemocitômetro. Em caso de excedente de células, elas foram descartadas ou congeladas.

6.4.2. Crescimento celular

As fases do crescimento celular possuem um padrão de crescimento representado por uma curva sigmoidal (Figura 2) denominada curva de crescimento. Essa curva reflete as fases de adaptação das células, condições ambientais, e de nutrientes necessários para o crescimento celular. A determinação da curva de crescimento é importante para a caracterização da cultura celular (FRESHNEY, 2000). Assim, a curva celular foi feita partindo do cultivo de 07 garrafas pequenas (T25), com mesma densidade celular (1×10^4) e 07 garrafas com 1×10^6 durante 07 dias. O meio de cultura foi trocado a cada 02 dias. A tripsinização e contagem celular da garrafa sequencial foi feito a cada 24 horas. A partir destes dados, foi elaborada a curva de crescimento celular para a linhagem Cal27 (Figura 3).

Utilizando-se destes dados, foi padronizado que a data de subcultivo ou repique celular fosse a partir do 3º dia de cultivo em monocamada pois, neste período, as células se encontram na maior fase de proliferação. Em contrapartida, a partir do 5º dia, observou-se um declínio no crescimento celular, onde o número de morte celular tende a aumentar em relação ao número de células novas e, com isso, a atividade metabólica decresce.

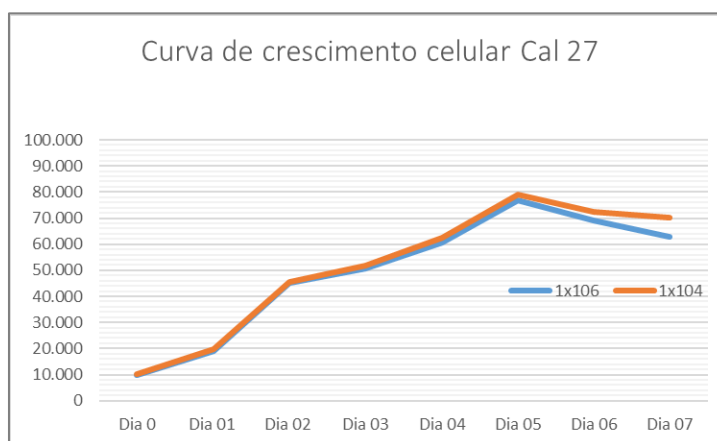
Figura 2 – Fases do crescimento celular: Fase lag - período de adaptação no qual não ocorre grande proliferação celular; Fase log - (logarítmica ou exponencial) período que a multiplicação celular é máxima e constante (A); Fase estacionária – a velocidade de crescimento celular diminui (B); Fase de declínio – redução do número de células (morte celular).



Fonte: Alves e Guimarães, 2010.

Fonte: Fotomicrografias capturadas por microscópio invertido com aumento de 40X e obtidas pela autora.

Figura 3 – Curva de crescimento celular: células Cal 27 mantidas em monocamada tiveram o seu número de células contado por um período de 07 dias. A partir destes resultados foi calculado a fase log (crescimento exponencial) sendo elaborado um gráfico com a curva de crescimento celular.



Fonte: Gráfico obtido pela autora.

6.4.3. Contagem celular

A contagem celular foi realizada pelo método de exclusão pelo corante Azul de Trypan (Sigma-Aldrich), o qual pigmenta células não viáveis em virtude do aumento de permeabilidade da membrana celular. As células foram enzimaticamente removidas dos frascos com tripsina e centrifugadas a 1000 rpm durante 3 a 5 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi aspirado e o precipitado de células resultante da centrifugação ressuspenso em 1 ml de meio de cultivo. Na sequência, foram retirados 20 µl da suspensão de células, as quais foram coradas com o acréscimo de 20 µl de azul de Trypan (fator de diluição).

As células da suspensão celular corada foram inseridas em um hemocitômetro (câmara de Neubauer, Fisher Scientific, Hampton, Nova Hampshire, EUA) e levadas ao microscópio invertido (Zeiss AxioVert 40C) para a contagem e observação das células. O número total de células presentes foi obtido através da seguinte equação matemática:

$$\text{Nº total de células/ml} = \frac{\text{Nº de células contadas} \times \text{fator de diluição} \times 10^4}{\text{Nº de quadrantes usados para contagem.}}$$

6.4.4. Congelamento celular

Para o congelamento, o tapete celular foi lavado 3 vezes com PBS (Tampão fosfato-salino) e, posteriormente, as células foram enzimaticamente removidas dos frascos com volume apropriado de tripsina até que se observasse o descolamento celular no microscópio invertido. A tripsina foi neutralizada com volume apropriado de meio DMEM suplementado com 10% de SFB.

A suspensão celular foi então transferida para um tubo tipo Falcon de 15ml, estéril, e centrifugada a 1000 rpm durante 5 min. Em seguida, o sobrenadante foi aspirado e as células ressuspensas em 1,5 ml de meio de congelamento (mantido em recipiente com gelo).

Quando necessário, um volume de meio de congelamento proporcional ao número de criotubos foi utilizado. Os criotubos (previamente identificados com as informações sobre linhagem, passagem, data e operador) foram acondicionados no dispositivo Mr. Frosty® (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), permanecendo no freezer -80°C por no mínimo 12h e no máximo 24h. Decorrido o tempo previsto, os criotubos foram transferidos para um botijão criogênico, mantidos em nitrogênio líquido a uma temperatura de -196°C.

Estudo retrospectivo

6.5. Seleção da Amostra

A amostra foi composta por casos de CEO diagnosticados no Laboratório de Patologia Bucal da UFSC (LPB). Também foram incluídas amostras de tecidos não neoplásicos, oriundos de cirurgia de freio labial superior e casos de hiperplasia fibrosa inflamatória (HFI).

Os critérios de inclusão foram: casos que tivessem material suficiente para obtenção de cortes para o estudo imuno-histoquímico e apresentassem imunorreatividade (comprovada pela marcação imuno-histoquímica para α -SMA). Para os casos de carcinoma também foi considerado a presença de áreas de carcinoma bem evidentes, para isso cortes corados em hematoxilina e eosina foram previamente avaliados, por um patologista experiente. Para os casos de tecidos não neoplásicos também foi considerada a presença de epitélio nas amostras. Os critérios de exclusão aplicados foram: material insuficiente para o preparo das lâminas, ausência de áreas evidentes de carcinoma (para os casos de CEO) e ausência de epitélio nos casos de tecido não neoplásico.

6.6. Experimentos

Estudo *in vitro*

6.7. Ensaio de citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi realizado pelo método da Sulforrodamina B (SRB Sigma-Aldrich). Este ensaio colorimétrico tem como base a capacidade do corante SRB em se ligar a aminoácidos presentes nas proteínas celulares.

Para a realização deste experimento, as células foram semeadas em placas de 96 cavidades em densidades de 2×10^4 (CAL27) células/cavidade, mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ durante 24h. Após esse período, as células foram observadas em microscópio invertido (Zeiss AxioVert 40C, 40x) para confirmação da adesão celular. Na sequência, o meio das placas foi aspirado e realizado o acréscimo dos compostos experimentais nas concentrações a serem testadas e tempos previstos (24 e 48 h).

Ao final de cada tempo experimental, foi realizada a fixação das células com ácido tricloroacético (TCA), em uma concentração final de 10%. As placas foram acondicionadas em geladeira durante 1h e, após este período, foram lavadas 4x com água destilada com o auxílio de uma pisseta graduada. As placas foram armazenadas destampadas, à temperatura ambiente (TA), por pelo menos 24h, para garantir a adequada secagem das cavidades.

Após este período, foi realizada a etapa de coloração das células com SRB, preparada em uma concentração de 0,057% (peso/volume) em solução de 1% de ácido acético (volume/volume). As placas foram mantidas à TA durante 30 min, sendo então lavadas 4x com solução de 1% de ácido acético, também com o auxílio de uma pisseta graduada. Após essa etapa, as placas ficaram mantidas destampadas por pelo menos 24h visando a completa secagem das cavidades.

Em seguida, foram acrescentados 100 µL de uma solução de Tris base (10 mM) em cada cavidade para solubilizar o corante ligado à proteína. Após 30 min, foi realizada a leitura da absorbância (filtro de 505 ou 515 nm) em leitora de microplacas (SpectraMax M2, Molecular Devices, Califórnia, EUA). O valor de absorbância dos compostos experimentais foi comparado ao controle negativo (meio DMEM completo), o qual foi utilizado como referência para o cálculo da medida de efeito (percentual de crescimento celular). Além disso, foi calculada a concentração citotóxica para 50% das células (CC50). O CC50 é a concentração do extrato (fármaco) que reduz a viabilidade celular em 50%.

6.8. Ensaio de viabilidade celular

Para avaliar o efeito dos medicamentos isoladamente, após o estabelecimento das doses de referência no ensaio de citotoxicidade, as células foram submetidas aos fármacos por tempos experimentais de 24h e 48 horas. As células foram semeadas em placas de 96 cavidades, em densidades de 2×10^4 células/cavidade, e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por um período de 24 horas. Após confirmação da adesão celular na placa, o meio de cultura foi removido das cavidades e foi adicionado meio de cultura com o medicamento a ser avaliado. As placas foram armazenadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ pelos períodos experimentais. Isto foi realizado para cada fármaco isoladamente.

Para a análise do efeito sensibilizador do tratamento com TDG previamente à exposição da cultura celular com CTX e CPT, as células foram semeadas em placas de 96 cavidades, em densidades de 2×10^4 células/cavidade, e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por um período de 24 horas. Confirmada a adesão celular por observação ao microscópio invertido, o meio de cultura foi trocado e adicionado o TDG na dose de referência. As células foram mantidas por 24h em contato com o medicamento, armazenadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, o meio foi aspirado e adicionado novo meio de cultura contendo CTX na dosagem de referência. As placas foram novamente mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ pelos tempos experimentais (24h e 48h). O mesmo protocolo foi realizado para avaliar o efeito do TDG sobre a ação da CPT nas células.

A avaliação da viabilidade celular em relação ao uso dos medicamentos isoladamente ou o pré-tratamento com TDG e posterior exposição aos quimioterápicos, foi feita pelo protocolo de coloração pela SRB, já descrito no item 6.7. O controle negativo foi de células cultivadas apenas com meio de cultura, sem adição dos fármacos, para todos os tempos experimentais.

6.9. Ensaio de proliferação celular (CyQuant®)

Para avaliação da proliferação celular, foi utilizado um método de quantificação baseado em corante fluorescente (CyQuant®, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, EUA). O corante CyQuant® GR se liga a ácidos nucleicos e possui maior acurácia do que ensaios baseados em metabolismo celular ou quantificação proteica. Para a realização desse ensaio, as células foram semeadas em densidades de 2×10^4 (CAL27) células/cavidade, em placas de 96 cavidades, e mantidas em estufa pelo tempo de 24h para garantir a adesão ao plástico. Após esse período, o meio de cultura foi aspirado e novo meio, contendo os

fármacos experimentais nas concentrações pré-estabelecidas, foi adicionado às células e mantido pelos tempos previstos.

Uma etapa adicional de lavagem com PBS foi realizada para evitar a interferência do vermelho fenol, presente no meio DMEM, com o corante fluorescente CyQuant® GR. Após a lavagem, as placas foram armazenadas em ultra freezer -80°C por, no mínimo, 24h e, no máximo, 30 dias. Essa etapa de armazenamento em baixa temperatura auxilia na lise da célula, importante para conseguir uma adequada ligação do corante fluorescente aos ácidos nucleicos.

Após essa etapa, as placas foram retiradas do freezer e mantidas em bancada até atingirem a TA. Subsequentemente, foram adicionados 200 µL de solução de CyQuant® GR e tampão de lise celular, preparada segundo as recomendações do fabricante. As placas foram incubadas à TA por um período de 5 min e protegidas da luz. As amostras resultantes foram levadas à leitora de microplacas com comprimentos de onda apropriados para fluorescência (480 nm excitação e 520 nm emissão), conforme recomendado pelo fabricante.

A curva-padrão foi elaborada considerando o número de células pré-estabelecido em diluição seriada de 50.000 a 50 células e a intensidade de fluorescência equivalente. A partir dessa curva, foi gerada uma equação linear, a qual as medidas de fluorescência das amostras foram interpoladas para obter o número correspondente de células. Subsequentemente, o número de células relativo a cada grupo experimental foi comparado ao controle negativo (meio DMEM completo) e ao tempo inicial (0h).

6.10. Ensaio de migração celular ("Scratch")

Para avaliação da migração celular, foi utilizado o método "Scratch", com a criação de uma interrupção da monocamada celular e acompanhamento do fechamento desta "fenda" ao longo dos tempos experimentais pré-determinados. Para a realização deste experimento, as células da linhagem CAL27 foram semeadas em uma densidade de $1,0 \times 10^5$ células/cavidade, em placas de 96 poços. Para minimizar o efeito da proliferação celular sobre o ensaio de migração, imediatamente antes do plaqueamento, as células foram centrifugadas a 1000 rpm durante 3 min e ressuspensas em meio DMEM suplementado com uma baixa concentração de SFB (0,1%), sendo mantidas em estufa a 37° e 5% de CO₂ para garantir a adesão celular e a inibição da proliferação ("serum starvation").

Após 24h do pré-tratamento em condição de "serum starvation", as cavidades foram inspecionadas em microscópio invertido (Zeiss AxioVert 40C, 40x) para verificar se as células atingiram uma confluência entre 90 e 100%. Em seguida, foi realizada uma fenda retilínea e

vertical na região central de cada cavidade com auxílio de uma ponteira estéril de 200 µL. A passagem da ponteira resultou no descolamento das células subjacentes, permitindo que as células às margens do espaço vazio recém-criado pudessem migrar. O meio de cultura foi aspirado e as cavidades lavadas 2 vezes com 200 µL de PBS. Os fármacos experimentais foram acrescentados nas concentrações pré-determinadas, enquanto o meio DMEM completo foi utilizado como controle.

Para avaliação do fechamento da fenda, foram realizadas fotomicrografias seriadas (Câmera CMOS 5MP, ZZCAT, Província de Hunan, China) com auxílio do software ToupView (ToupTek Photonics, Zhejiang, China), em microscópio invertido (Zeiss AxioVert 40C, 40x). Para cada cavidade, as fotomicrografias foram capturadas dos mesmos campos, a cada 24h, desde o tempo 0h até o fechamento total da “fenda” no grupo controle (48h). Em cada imagem obtida, foi realizada a mensuração da área do espaço vazio por meio do programa ImageJ (*software* de domínio público, National Institutes of Health, Maryland, EUA). Por fim, foi calculado o percentual de fechamento da fenda para cada grupo e tempo experimental, tendo como referência a área inicial mensurada no tempo de 0h.

6.11. Ensaio de apoptose celular

Para investigação da indução de morte celular por apoptose, foi utilizado um kit comercial para citometria de fluxo contendo os marcadores anexina V e iodeto de propídio (PI) (kit Tali® Apoptosis - Molecular Probes-Invitrogen, USA). Para tanto, as células foram semeadas em placas de 24 cavidades em densidades de $1,0 \times 10^6$ células/cavidade (CAL27) e foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂, durante 24h, para garantir a adesão das células a placa. Na sequência, o meio de cultura foi aspirado e acrescentado novo meio contendo os fármacos avaliados ou os controles.

Como controle negativo da apoptose, foi utilizado o meio DMEM completo e, como controle positivo a camptotecina (1,5 µM; Sigma-Aldrich). Ainda, como controle positivo de morte celular por necrose, as células foram submetidas a choque térmico, induzido da seguinte maneira: 1) exposição das células a uma temperatura de -80°C em ultra freezer durante 5 min; 2) rapidamente, exposição das células a uma temperatura de 50°C em banho-maria, durante 2 min; 3) repetição das etapas anteriores por mais 2 vezes. Após os tempos experimentais, o sobrenadante foi coletado e armazenado em tubos de poliestireno específicos para citometria de fluxo.

As células foram enzimaticamente descoladas pela adição de 200 µL de tripsina, sendo as placas mantidas em estufa a 37°C por aproximadamente 5 a 7 min. A tripsina foi

neutralizada com acréscimo de 1,5 ml de meio DMEM completo e, em seguida, as células foram coletadas nos tubos de poliestireno correspondentes. Os tubos foram centrifugados a uma velocidade de 1000 rpm durante 3 min e, em seguida, as células foram lavadas com PBS gelado (entre 4°C e 8°C) e novamente centrifugadas, com os mesmos parâmetros de centrifugação. O PBS foi aspirado e as células ressuspensas em solução tampão (concentração de 1X), disponibilizada no kit.

Na sequência, para cada 100 µL de suspensão celular, foram acrescentados 1 µL de anexina V e 1 µL de solução de iodeto de propídio (100 µg/ml). As células foram incubadas durante 15 min, à temperatura ambiente, protegidas da luz, sendo em seguida submetidas a citômetro de fluxo (FACSCANTO II, BD Bioscience, Nova Jersey, EUA) e analisadas no software FlowJo™ v10.10 (BD Life Sciences). Os parâmetros utilizados para leitura da fluorescência foram emissão de 530 nm (FL1) e >575 nm (FL3), como indicado pelo fabricante.

6.12. Imunocitoquímica

Em uma cabine de biossegurança, as células foram tripsinizadas e semeadas em lâmina de vidro própria para este procedimento (lâminas EZ Millicell®). Foi utilizada uma densidade celular de 1×10^4 por poço. As células foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂, por um período de 24 horas.

Para fixação das células, o meio de cultivo foi aspirado, as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS e, em seguida, acrescentado metanol puro em cada poço, cobrindo todo o pocinho. A lâmina foi armazenada por 6 minutos em freezer. A seguir, o metanol foi removido da lâmina de cultura e esta foi lavada 3 vezes com PBS. A seguir, foi adicionado o reagente Tween 20® (Polissorbato 20, Thermo Fisher Scientific) na concentração 0,5% previamente diluído em PBS não estéril e mantido por 10 minutos.

Para bloqueio das ligações inespecíficas, foi feita a remoção do Tween seguida da adição de solução de leite desnatado na proporção de 1g para 20ml de PBS não estéril, que foi mantida por 30 minutos para aguardar a reação. Posteriormente, foram feitas duas lavagens consecutivas com PBS para remover todo o leite.

A seguir, o anticorpo primário GSK-3β (Rabbit mAb, 488. Cell Signaling Technology®) foi diluído (1:200), colocado sobre as células, e a lâmina foi incubada em câmara úmida em TA por 1h. Para amplificar a reação, foi feita incubação do anticorpo secundário Citoqueratina (CK) (Mouse, 488. Alexa Fluor, 1:1000), em temperatura ambiente, durante 1 hora, sem

exposição das lâminas à luz. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS, 3 vezes por 5 minutos cada, removido a proteção de silicone e o excesso de PBS.

Por fim, foi adicionado o anticorpo da dupla marcação com meio de montagem revelados através do DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, Vectashield®). A montagem definitiva foi realizada com lamínula de 24x50mm e selagem das bordas da mesma com resina tosilamida. As lâminas foram armazenadas em ausência de luz, em uma caixa fechada na geladeira até o momento da leitura. As lâminas foram levadas ao microscópio com comprimentos de onda apropriados para fluorescência (Microscópio OLYMPUS BX41 - LAMEB/UFSC).

Estudo retrospectivo

6.13. Imunoistoquímica

Para avaliar a expressão da proteína GSK-3 β , foram selecionados 17 casos de CEO, e 15 casos de tecido não neoplásico (Freio labial superior e HFI). Para o controle positivo, foi utilizado tecido de placenta. Assim, os casos selecionados foram submetidos à técnica de imunoistoquímica usando o sistema de detecção Envision FLEX/HRP-polímero (DAKO).

Inicialmente foi feita a desparafinização dos cortes em xilol e hidratação por passagens sucessivas em etanol de concentrações decrescentes (100%, 95%, 70%). Após foi realizada a remoção do pigmento formólico em solução aquosa de hidróxido de amônia (NH₄OH) a 1%. A recuperação antigênica, feita com EDTA/Tris, pH:9,0 (Target Retrieval Solution, High pH), por 20 minutos em banho-maria a 96°C. Após resfriamento e lavagem dos cortes (Wash buffer - Solução salina com tampão Tris com Tween 20, pH 7,6) foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com aplicação sobre os cortes previamente secos de 50 μ l de tampão fosfato contendo peróxido de hidrogênio, 15 mmol/L de NaN₃ e detergente (Peroxidase-Blocking Reagent) em temperatura ambiente (TA) utilizado câmara úmida e escura por dez minutos. Após a lavagem dos cortes foi realizada a incubação com o anticorpo primário (GSK-3 β , 1:200) em TA, utilizado câmara úmida, por uma hora. Logo depois, foi feita a incubação do anticorpo secundário (EnVision Flex/HRP) em câmara úmida em TA por uma hora, seguido de lavagem de dois minutos com Wash buffer. A revelação da reação foi feita por meio da aplicação sob os cortes da solução contendo 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorato (DAB+ Chromogen) e solução tampão contendo peróxido de hidrogênio (Substrate Buffer), durante dois minutos em local isento de luz. Após lavagem, foi realizada a contra-coloração dos cortes com hematoxilina de Harris, desidratação, diafanização e montagem das lâminas com

Entellan® (MERK). Avaliação da reação foi feito por meio de análise das lâminas em microscópio de luz.

6.14. Análise Estatística

Os dados foram tabulados através do Software Microsoft Excel 2023 (Microsoft Corporation, Washington, EUA). Os resultados apresentados foram expressos como a média, desvio padrão e percentis. Para a análise dos resultados e testes estatísticos foram utilizados os softwares GraphPad Prism 10.2.3 (San Diego, CA, EUA) e SPSS IBM v.25 (IBM, Nova Iorque, EUA). O pressuposto da normalidade foi verificado através dos testes Shapiro-Wilk ($n < 30$). A análise estatística foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) *one-way*, complementada pelo teste post-hoc de Tukey para comparação de cada grupo individual com os grupos de controle. Em todas as análises foi adotado um nível de significância mínimo de 5% ($p < 0,05$). Além disso, para as análises de citometria de fluxo, os resultados foram analisados usando o software FlowJo v10.8 (BD Life Sciences).

7. Resultados

Estudo *in vitro*

7.1. Ensaio de Citotoxicidade

Inicialmente, para estabelecer a citotoxicidade do Tideglusib (TDG), do Cetuximabe (CTX) e da Cisplatina (CPT), na linhagem Cal27 de células de Carcinoma Epidermoide Oral (CEO), foi estabelecida a dose citotóxica mínima (CC50) dos fármacos, individualmente.

7.1.1. Tideglusib (TDG)

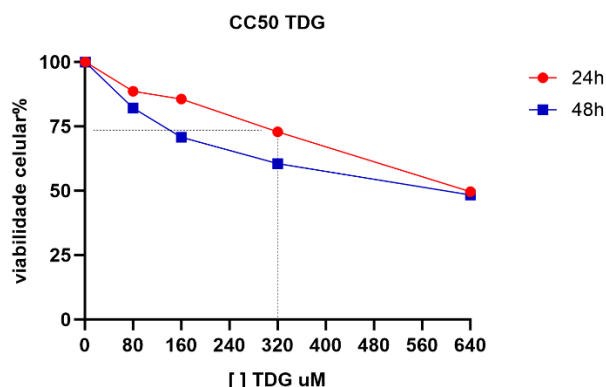
O TDG foi testado nas concentrações de 80 μM , 160 μM , 320 μM e 640 μM . As concentrações citotóxicas para 50% das células (CC50) e desvios-padrão em relação ao fármaco TDG, nos tempos de 24h e 48h, estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1- Tideglusib - Ensaio de citotoxicidade (CAL27). Concentrações citotóxicas para 50% das células (CC50), desvio padrão (DP) e R^2 nos tempos de 24h, 48h.

CC50 TDG		CAL 27	
TEMPO	CC50	DP	R^2
24 horas	638 μM	$\pm 69,1215$	0,9215
48 horas	525 μM	$\pm 60,1758$	0,8275

Legenda: Desvio padrão (DP); R^2 – O R quadrado ou coeficiente de determinação é uma medida estatística que indica a qualidade de ajuste de um modelo linear aos dados observados.

Pode-se observar que o CC50, para o tempo de 24h, ficou por volta de 638 μM e, para 48h, a concentração citotóxica foi de 525 μM , aproximadamente (Figura 4). Levando-se em consideração que, nos experimentos, o TDG seria administrado às células como tratamento prévio aos quimioterápicos, por um período de 24h, e que, após isso, as células ainda seriam expostas ou ao Cetuximabe ou à Cisplatina, por mais 24h ou 48h, o que também iria diminuir a viabilidade celular, foi decidido utilizar uma dosagem menor de TDG nos experimentos, de modo a permitir a manutenção de células suficientes para a realização dos ensaios. Assim, a concentração determinada foi aquela que permitia a viabilidade de, pelo menos, 75% das células da cultura expostas por 24h ao fármaco, portanto, a concentração de 320 μM foi estabelecida.

Figura 4 – Média das concentrações testadas de TDG em células CAL27.

7.1.2. Cetuximabe (CTX)

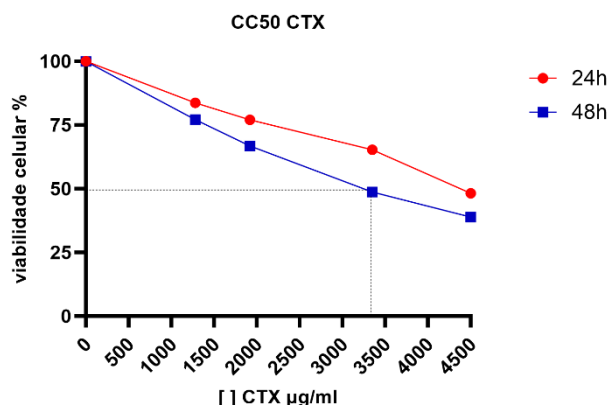
O CTX foi testado nas concentrações de 1280 μ g/ml, 1920 μ g/ml, 2880 μ g/ml e 4320 μ g/ml. As concentrações citotóxicas para 50% das células (CC50) e desvios-padrão em relação ao fármaco CTX, nos tempos de 24h e 48h, estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Cetuximabe - Ensaio de citotoxicidade (CAL27). Concentrações citotóxicas para 50% das células (CC50), desvio padrão (DP) e R2 nos tempos de 24h, 48h.

TEMPO	CC50 CTX	CAL 27	
	CC50	DP	R ²
24 horas	5185 μ g/ml	$\pm$ 1439	0,9274
48 horas	3441,5 μ g/ml	$\pm$ 804,75	0,8664

Legenda: Desvio padrão (DP); R2 – O R quadrado ou coeficiente de determinação é uma medida estatística que indica a qualidade de ajuste de um modelo linear aos dados observados.

Observa-se que o CC50 do CTX para o tempo de 24h foi, em média, de 5185 μ g/ml e de 3441,5 μ g/ml para o período de 48h. Considerando que, nos experimentos, as células seriam expostas ao medicamento por até 48 horas, e que a exposição ao fármaco na dosagem do CC50 de 24 horas resultaria em grande quantidade de morte celular logo no início do experimento, decidiu-se por utilizar a concentração de 3450 μ g/ml por ser a que reduziu em cerca de 50% a taxa de sobrevivência das células no tempo de 48h (Figura 5).

Figura 5 - Média das concentrações testadas de CTX em células CAL27.

7.1.3. Cisplatina (CPT)

A CPT foi testada nas concentrações de 2,5 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM e 40 µM. As concentrações citotóxicas para 50% das células (CC50) e desvios-padrão em relação ao fármaco CPT, nos tempos de 24h e 48h, estão apresentadas na Tabela 3.

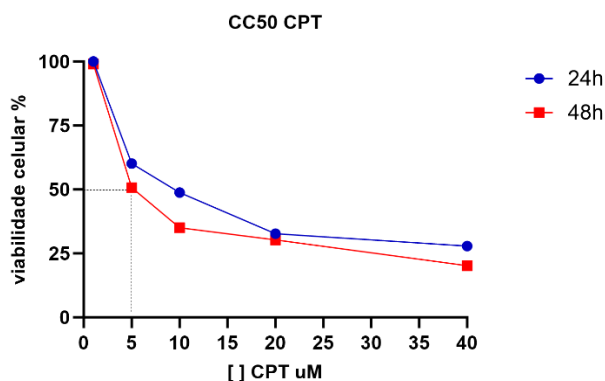
Tabela 3 – Cisplatina – Ensaio de citotoxicidade (CAL27). Concentrações citotóxicas para 50% das células (CC50), desvio padrão (DP) e R2 nos tempos de 24h, 48h.

TEMPO	CC50 CPT	CAL 27	
	CC50	DP	R ²
24 horas	12,4 µM	±3,812	0,8988
48 horas	4,94 µM	±0,880	0,9429

Legenda: Desvio padrão (DP); R2 – O R quadrado ou coeficiente de determinação é uma medida estatística que indica a qualidade de ajuste de um modelo linear aos dados observados.

Na Figura 6, percebe-se que o CC50 da CPT, para o tempo de 24h, estava na concentração média de 12,4 µM e na de 4,9 µM, para o período de 48h. Visto que, na realização dos experimentos, as células ficariam expostas ao medicamento por até 48 horas, e que a exposição ao fármaco na dosagem do CC50 de 24 horas resultaria em grande quantidade de perda da viabilidade celular logo no início do experimento, optou-se por utilizar a concentração de 5 µM (Figura 6).

Figura 6 - Média das concentrações testadas de CPT em células CAL27.



7.2. Ensaio de viabilidade celular

A avaliação da viabilidade celular em relação ao uso dos fármacos, isoladamente, ou o pré-tratamento com TDG por 24h e posterior exposição aos quimioterápicos, foi feita pelo protocolo de coloração pela SRB, já descrito na metodologia (6.7/6.8). O controle negativo foi de células cultivadas apenas com meio de cultura, sem adição dos fármacos, para todos os tempos experimentais. Após o estabelecimento das doses de referência (TDG 320 μ M, CTX 3450 μ g/ml e CPT 5 μ M) no ensaio de citotoxicidade, as células foram submetidas aos fármacos por tempos experimentais de 24h e 48 horas.

As estatísticas descritivas e suas respectivas medidas de dispersão em relação ao percentual celular nas diferentes concentrações e tempos experimentais estão apresentadas na Tabela 4, para os tempos de 24h e 48h, respectivamente.

Tabela 4 - Ensaio de viabilidade celular (CAL27). Medidas sumárias (média) e medidas de dispersão (desvio padrão) relativas ao percentual celular considerando os fármacos (TDG 320 μ M, CTX 3450 μ g/ml e CPT 5 μ M) e o controle DMEM, no tempo experimental de 24h e 48h.

		DMEM	TDG	CTX	TDG+CTX	CPT	TDG+CPT
24h	Média	100,00	64,7193	57,6578	41,8282	30,4152	20,2532
	(DP)	(4,42)	(7,61)	(3,018)	(4,19)	(4,14)	(2,90)
48h	Média	100,00	65,1323	39,4647	36,5548	19,1616	13,7518
	(DP)	(3,91)	(6,11)	(6,91)	(5,38)	(4,04)	(2,81)

Legenda: Desvio padrão (DP).

Ao avaliar os resultados encontrados, é possível perceber que todos os fármacos isoladamente (TDG, CTX e CPT), ou no pré-tratamento (TDG 24h, seguido por CTX 24/48h ou CPT 24/48h), diminuíram a viabilidade das células, com diferenças estatisticamente

significativas ($p < 0,05$) em comparação com o controle negativo (DMEM) no tempo de 24h e 48 h (Tabela 5 e Figuras 7, 8 e 9).

Para o tempo de 24h, todos os medicamentos aplicados isoladamente reduziram significativamente ($p < 0,05$) a viabilidade celular, assim como na exposição prévia das células ao TDG por 24h, seguido pelo tratamento com CTX ou CPT por 24h (Tabela 5 e Figuras 7 e 9).

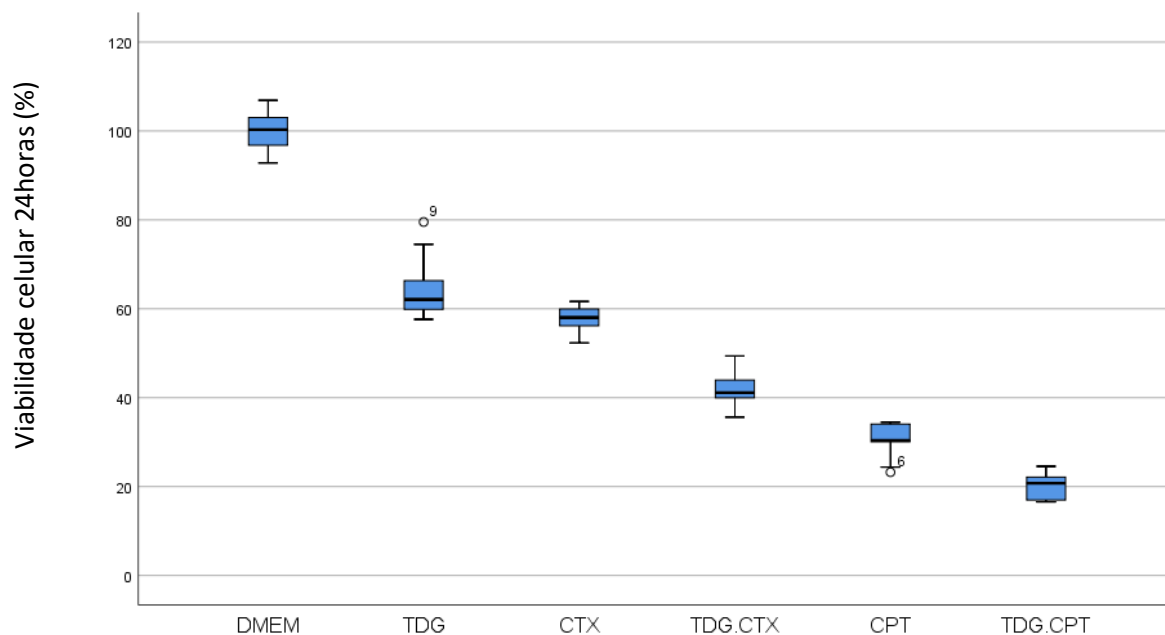
Considerando o tempo experimental de 48h, também foi encontrada uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) da viabilidade celular, quando do tratamento com os fármacos isoladamente. Entretanto, ao analisar os achados da exposição das células ao CTX e à CPT por 48h, após o tratamento prévio com TDG, não foram encontradas diferenças significativas ($p = 0,8254$ e $p = 0,2281$, respectivamente) no que se refere à viabilidade celular (Tabela 5 e Figuras 8 e 9).

Tabela 5 - Análise ONE-WAY ANOVA (24h e 48h) e teste de múltiplas comparações (Tukey) entre os grupos experimentais com medidas em relação a diferença média entre os grupos e P valor.

Teste de múltiplas comparações (Tukey)	Diferença média (P Valor)	
	24h	48h
DMEM vs. TDG	35,28 (<0,0001)	34,87 (<0,0001)
DMEM vs. CTX	42,28 (<0,0001)	60,54 (<0,0001)
DMEM vs. TDG+CTX	58,17 (<0,0001)	63,45 (<0,0001)
DMEM vs. CTP	69,58 (<0,0001)	80,84 (<0,0001)
DMEM vs. TDG+CPT	79,75 (<0,0001)	86,25 (<0,0001)
TDG vs. CTX	7,001 (0,0281)	25,67 (<0,0001)
TDG vs. TDG+CTX	22,89 (<0,0001)	28,58 (<0,0001)
TDG vs. CTP	34,30 (<0,0001)	45,97 (<0,0001)
TDG vs. TDG+CPT	44,47 (<0,0001)	51,38 (<0,0001)
CTX vs. TDG+CTX	15,89 (<0,0001)	2,910 (0,8254)
CTX vs. CTP	27,30 (<0,0001)	20,30 (<0,0001)
CTX vs. TDG+CPT	37,47 (<0,0001)	25,71 (<0,0001)
TDG+CTX vs. CTP	11,41 (<0,0001)	17,39 (<0,0001)
TDG+CTX vs. TDG+CPT	21,57 (<0,0001)	22,80 (<0,0001)
CTP vs. TDG+CPT	10,16 (0,0004)	5,408 (0,2281)

*Diferenças significativas $p < 0,05$.

Figura 7 - Ensaio de viabilidade (CAL27). Gráfico Box-Plot apresentando o percentual celular considerando os fármacos em diferentes concentrações para o tempo experimental de 24h.



Legenda: os valores marcados com círculo representam outliers moderados para mais (quando acima da caixa) e para menos (quando abaixo da caixa). Os números que acompanham os círculos indicam a posição na base de dados desses valores.

Figura 8 - Ensaio de viabilidade (CAL27). Gráfico Box-Plot apresentando o percentual celular considerando os fármacos em diferentes concentrações para o tempo experimental de 48h.

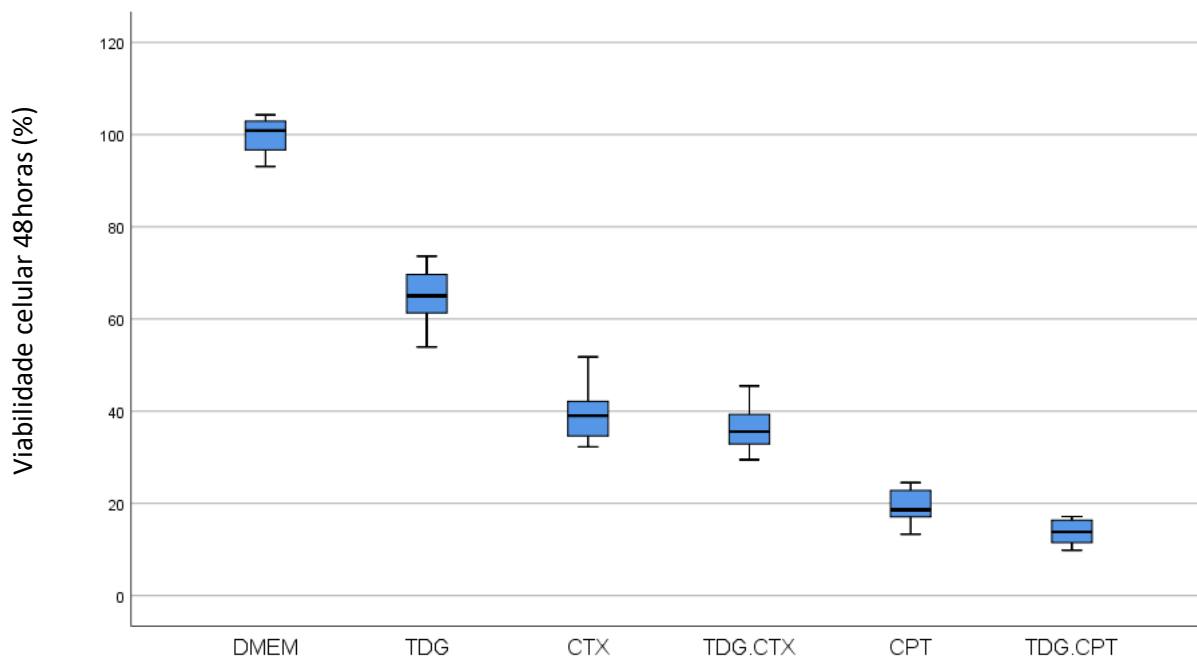
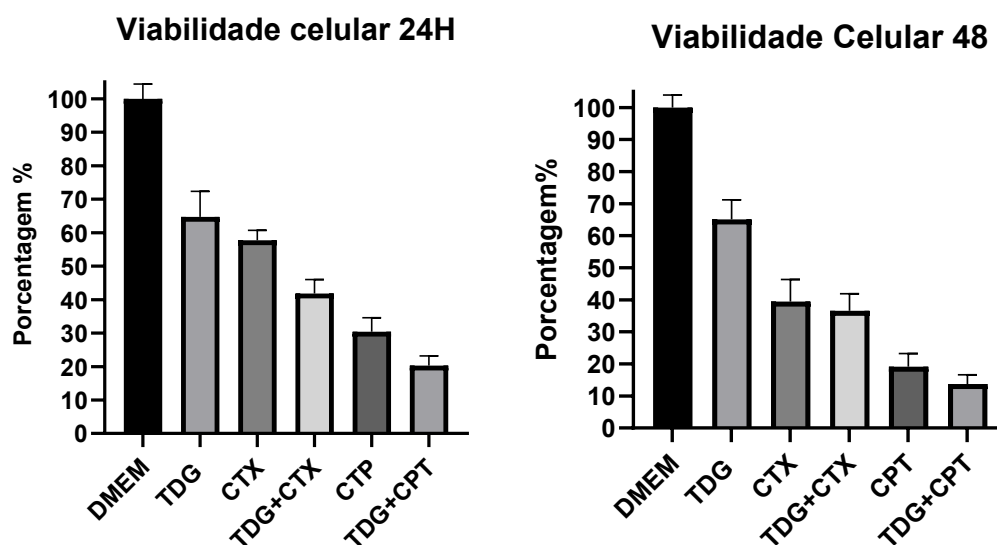


Figura 9 - Gráficos de viabilidade celular (interação medicamentosa) em 24h e 48h.

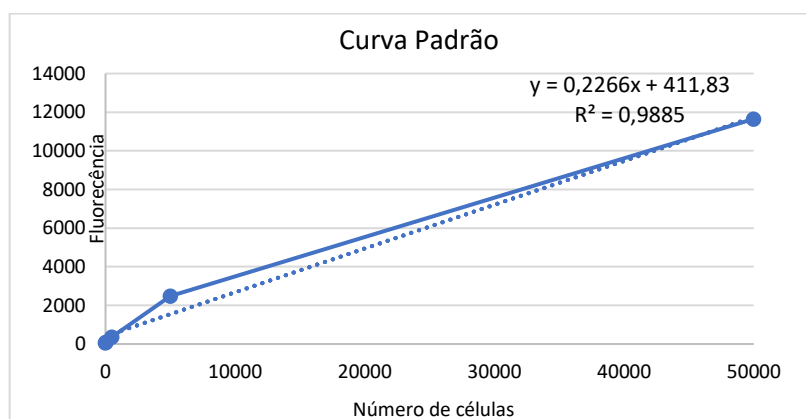


Legenda: Viabilidade celular após 24h e 48h de tratamento com os fármacos TDG, CTX, TDG+CTX, CPT e TDG+CPT; e avaliados pelo método de coloração SRB. Dados apresentados como média $\pm$ DP.

7.3. Ensaio de proliferação celular (CyQuant)

Para o ensaio de proliferação celular, foram investigados os medicamentos e tempos experimentais, tendo como base as concentrações dos fármacos definidas no ensaio de citotoxicidade. Desse modo, os grupos foram avaliados nas concentrações de TDG 320 μ M, CTX 3450 μ g/ml e CPT 5 μ M, no tempo de 24 e 48 horas. A curva-padrão considerando a intensidade de fluorescência e números de células de CEO (CAL27) está apresentada a seguir (Figura10).

Figura 10 - Ensaio de proliferação celular (CAL27). Gráfico de linhas demonstrando a curva padrão com base na intensidade de fluorescência e número correspondente de células.



Com base na curva-padrão, as medidas de fluorescência foram convertidas para número de células nas diferentes concentrações e tempos avaliados entre os grupos. As estatísticas descritivas estão apresentadas nas Tabela 6.

Tabela 6 - Estatística descritiva do ensaio de proliferação (CAL27 CyQuant). Medidas sumárias (média) e medidas de dispersão (desvio padrão) em relação ao número de células no tempo de 24h e 48h.

		DMEM	TDG	CTX	TDG+CTX	CPT	TDG+CPT
24h	Média	24973	8543	11642	3066	7173	1691
	(DP)	(7853)	(2173)	(1705)	(1231)	(2626)	(590,6)
48h	Média	40123	14300	7674	18,40	3484	-220,9
	(DP)	(9220)	(3626)	(2576)	(842,3)	(862,9)	(347,4)

Legenda: Desvio padrão (DP).

Os achados das análises estatísticas dos resultados estão presentes nas Tabelas 7, 8, 9, e são apresentados graficamente na Figura 11.

Em comparação com o controle negativo (DMEM), todos os fármacos testados, isoladamente ou no tratamento prévio com TDG e posterior exposição ao quimioterápico, inibiram a proliferação celular significativamente ($p < 0,05$) nos tempos de 24h e 48h (Tabela 7).

Na comparação do TDG com os quimioterápicos CTX e CPT, todos aplicados de maneira isolada, nos tempos de 24h e 48h, não houve diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$). Entretanto, na comparação do efeito do TDG, isoladamente, com a combinação TDG aplicado antes da exposição ao quimioterápico, apenas esta última interação dos tratamentos no tempo de 48h, apresentou diferença estatística, tanto para o grupo TDG+CTX quanto para o TDG+CPT (Tabela 8), indicando uma maior diminuição na proliferação das células na combinação dos fármacos.

Ao se comparar o efeito do CTX ou da CPT aplicados nas células isoladamente ou posteriormente ao tratamento com TDG, foi encontrada uma maior redução na proliferação celular no grupo TDG+CPT em relação ao tratamento apenas com CTX, no tempo de 24h. As demais comparações não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$) (Tabela 9).

Tabela 7 - Teste de múltiplas comparações (Tukey) entre o grupo controle (DMEM) e os grupos experimentais (TDG, CTX, TDG+CTX, CPT, TDG+CPT) em 24h e 48h. Dados apresentados como diferença média e p valor.

Teste de múltiplas comparações (Tukey)	Diferença média	P Valor
DMEM 24 vs. TDG 24	16430	0,0013*
DMEM 24 vs. CTX 24	13331	0,0070*
DMEM 24 vs. TDG+CTX 24	21907	<0,0001*
DMEM 24 vs. CPT 24	17800	0,0006*
DMEM 24 vs. TDG+CPT24	23282	<0,0001*
DMEM48 vs. TDG 48	25823	<0,0001*
DMEM48 vs. CTX 48	32449	<0,0001*
DMEM48 vs. TDG+CTX 48	40105	<0,0001*
DMEM48 vs. CPT 48	36639	<0,0001*
DMEM48 vs. TDG+CPT 48	40344	<0,0001*

*Diferenças significativas $p < 0,05$.

Tabela 8 – Teste de múltiplas comparações (Tukey) entre o grupo TDG vs. os grupos CTX, TDG+CTX, CPT e TDG+CPT 24h e 48h. Dados apresentados como diferença média e p valor.

Teste de múltiplas comparações (Tukey)	Diferença média	P Valor
TDG 24 vs. CTX 24	-3099	0,8908
TDG 24 vs. TDG+CTX 24	5477	0,4676
TDG 24 vs. CPT 24	1370	0,9966
TDG 24 vs. TDG+CPT24	6852	0,2556
TDG 48 vs. CTX 48	6626	0,4320
TDG 48 vs. TDG+CTX 48	14282	0,0131*
TDG 48 vs. CPT 48	10816	0,0712
TDG 48 vs. TDG+CPT 48	14521	0,0116*

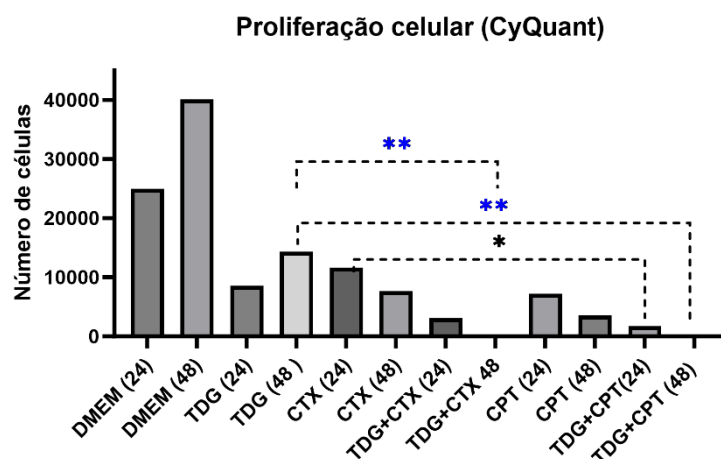
*Diferenças significativas $p < 0,05$.

Tabela 9 - Teste de múltiplas comparações (Tukey) entre os grupos CTX vs. CPT vs. TDG+CTX e vs. TDG+CPT em 24h e 48h. Dados apresentados como média e p valor.

Teste de múltiplas comparações (Tukey)	Diferença média	P Valor
CTX 24 vs. TDG+CTX 24	8576	0,1044
CTX 24 vs. CPT 24	4469	0,6608
CTX 24 vs. TDG+CPT24	9951	0,0484*
CPT 24 vs. TDG+CPT24	5482	0,4667
CTX 48 vs. TDG+CTX 48	7656	0,2938
CTX 48 vs. CPT 48	4190	0,8200
CTX 48 vs. TDG+CPT 48	7895	0,2667
CPT 48 vs. TDG+CPT 48	3705	0,8811

*Diferença significativa $p < 0,05$.

Figura 11 - Representação gráfica de todos os grupos em ambos os tempos experimentais.



Legenda: *Diferença estatística entre o CTX vs. TDG+CPT em 24h. **Diferença estatística entre grupos TDG vs. TDG+CTX e TDG vs. TDG+CPT em 48h.

7.4. Ensaio de migração celular (Scratch)

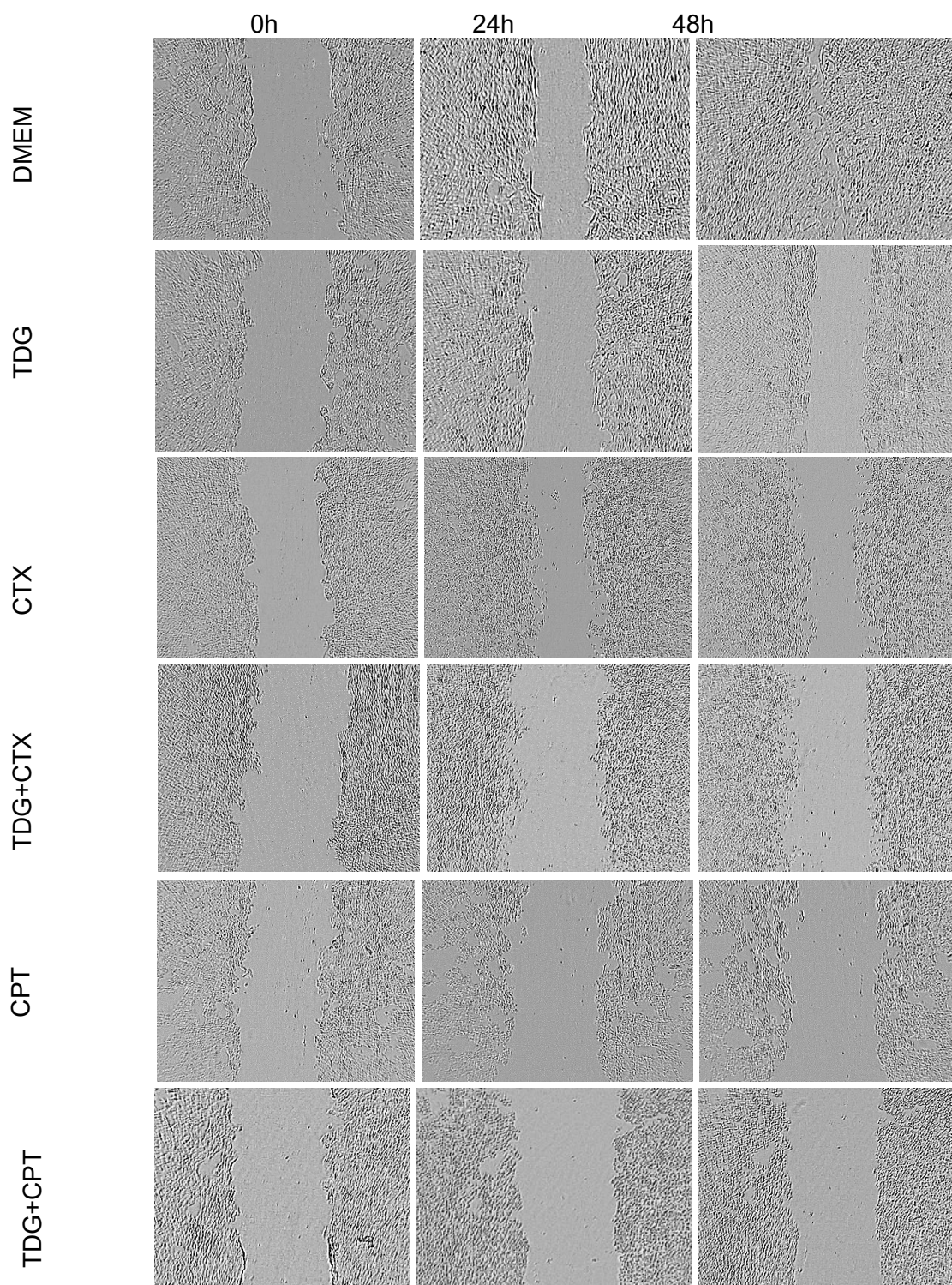
Os fármacos foram testados nas concentrações pré-determinadas (TDG 320 μ M, CTX 3450 μ g/ml e CPT 5 μ M) e DMEM completo foi utilizado como controle. Cada grupo teve as áreas das “fendas” retilíneas avaliadas nos tempos 0h, 24h e 48h (Figura 12). As estatísticas descritivas e medidas sumárias e de dispersão em relação ao percentual de fechamento da área da fenda, nos diferentes grupos e tempos experimentais, estão apresentadas na Tabela 10. A figura 13 apresenta, graficamente, os achados dessas análises.

Tabela 10 - Estatística descritiva do ensaio de migração celular pelo método do “Scratch” em células de CEO, CAL27. Medidas sumárias (média) e medidas de dispersão (desvio padrão) relativas ao fechamento da área da fenda considerando os diferentes fármacos testados (TDG, CTX, TDG+CTX, CPT, TDG+CPT) e o grupo controle (DMEM), nos tempos experimentais de 0h, 24h e 48h.

Fármaco	Média (DP) 0h	Média (DP) 24h	Média (DP) 48h
DMEM	661420,00 (,000)	177242,67 (21924,677)	18248,00 (1287,666)
TDG	661420,00 (,000)	251438,33 (66473,046)	207646,67 (81789,118)
CTX	661420,00 (,000)	328299,67 (2610,301)	307342,67 (18554,156)
TDG+CTX	661420,00 (,000)	399744,00 (65850,266)	388382,67 (63341,101)
CPT	661420,00 (,000)	493508,33 (32188,900)	487581,00 (31283,151)
TDG+CPT	661420,00 (,000)	492775,33 (67981,208)	483239,33 (73741,626)

Legenda: Desvio padrão (DP).

Figura 12 - Painel de fotomicrografias (Zeiss AxioVert 40C, 4x, adaptador 0,5x) do ensaio de migração celular ("Scratch") representativo em relação à linhagem de CEO (CAL27). As imagens representam o fechamento da área da fenda para o controle (DMEM) e os fármacos TDG, CTX, TDG+CTX, CPT, TDG+CPT, nos tempos de 0h, 24h e 48h.



Fonte: Fotomicrografias obtidas pela autora.

Na comparação dos fármacos aplicados de maneira isolada com o grupo controle negativo (DMEM), observou-se que o CTX e a CPT inibiram, significativamente, a migração das células de CEO no tempo de 24h. Entretanto, não foi encontrada diferença estatística ($p>0,05$) na comparação entre TDG e DMEM nesse mesmo período de observação. Já para o tempo de 48h, todos os fármacos avaliados (TDG, CTX e CPT) inibiram, de maneira significativa, a migração celular, em comparação com o controle.

Quando da comparação do efeito dos medicamentos aplicados isoladamente sobre a migração das células CAL27, entre si, todos eles apresentaram efeito inibidor, com diferença estatisticamente significativa apenas entre TDG e CPT (24h e 48h) ou entre CTX e CPT (24h e 48h), com a CPT apresentando a maior diminuição na migração das células. Entretanto, é importante destacar que, na comparação entre TDG e CTX, em ambos os tempos experimentais (24h e 48h), não foi encontrada diferença estatística ($p>0,05$), mostrando que os dois fármacos apresentaram efeito similar na inibição da migração das células CAL27.

Ao se avaliar o efeito da exposição das células ao TDG por 24h, antes do tratamento com os quimioterápicos (TDG+CTX ou TDG+CPT), foi encontrada diferença estatisticamente significativa apenas na comparação com o controle (DMEM), tanto nas 24h quanto nas 48h de avaliação. Ainda, foi observado que o uso prévio do TDG não mostrou diferença ($p>0,05$) quando comparado ao efeito do quimioterápico (CTX ou CPT) aplicado de maneira isolada.

Importante destacar que, ao se comparar a combinação TDG+CTX com a CPT aplicada isoladamente, em ambos os tempos experimentais (24h e 48h), não foram encontradas diferenças estatísticas significativas ($p>0,05$), o que parece sugerir que o tratamento das células com TDG prévio ao CTX equipara o efeito do CTX ao que a CPT tem individualmente sobre a migração das células CAL27. Os Dados do Teste de múltiplas comparações (Tukey) entre os grupos em relação a área da fenda, estão apresentados na Tabela 11 (24h) e 12 (48h).

Figura 13 - Ensaio de migração (CAL27). Gráficos de barras representando o fechamento da área da fenda para o controle negativo (DMEM) e os fármacos nos tempos de 0h, 24h e 48h.

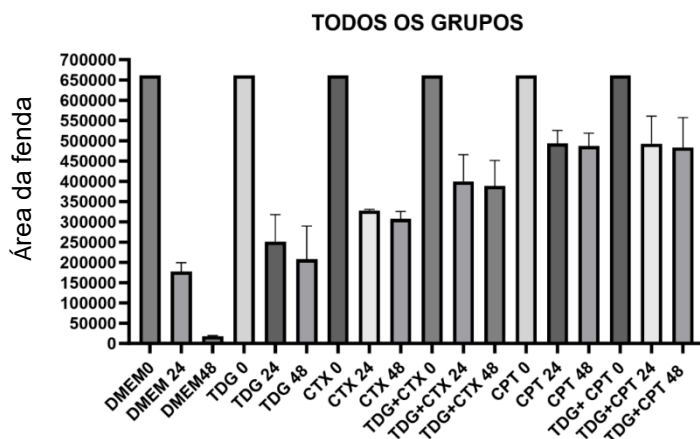


Tabela 11 - Teste de múltiplas comparações (Tukey) entre os grupos em relação a área da fenda no tempo experimental de 24h. Dados apresentados como média, desvio padrão e valor de p para cada comparação.

24 horas	DMEM	TDG	CTX	CPT	TDG+CTX
TDG	M= 214341 DP= 52464 P=0,7750				
CTX	M=252772 DP=106813 P=0,0102*	M= 289869 DP=54350 P=0,7289			
CPT	M=335376 DP=223633 P<0,0001*	M=372473 DP=17119 P<0,0001*	M=410904 DP=116820 P=0,0033*		
TDG+CTX	M=288494 DP=157332 P<0,0001*	M=325591 DP=10488 P=0,0127*	M=364022 DP=50519 P=0,8187	M=446626 DP=66301 P=0,4100	
TDG+CPT	M=203316 DP=261725 P<0,0001*	M=372107 DP=17065 P<0,0001*	M=410538 DP=116301 P=0,0035*	M=493142 DP=518 P>0,9999	M=446260 DP=65783 P=0,4230

Legenda: Média (M), desvio padrão (DP), P valor * diferença estatística ($p < 0,05$).

Tabela 12 - Teste de múltiplas comparações (Tukey) entre os grupos em relação a área da fenda no tempo experimental de 48h. Dados apresentados como média, desvio padrão e valor de p para cada comparação.

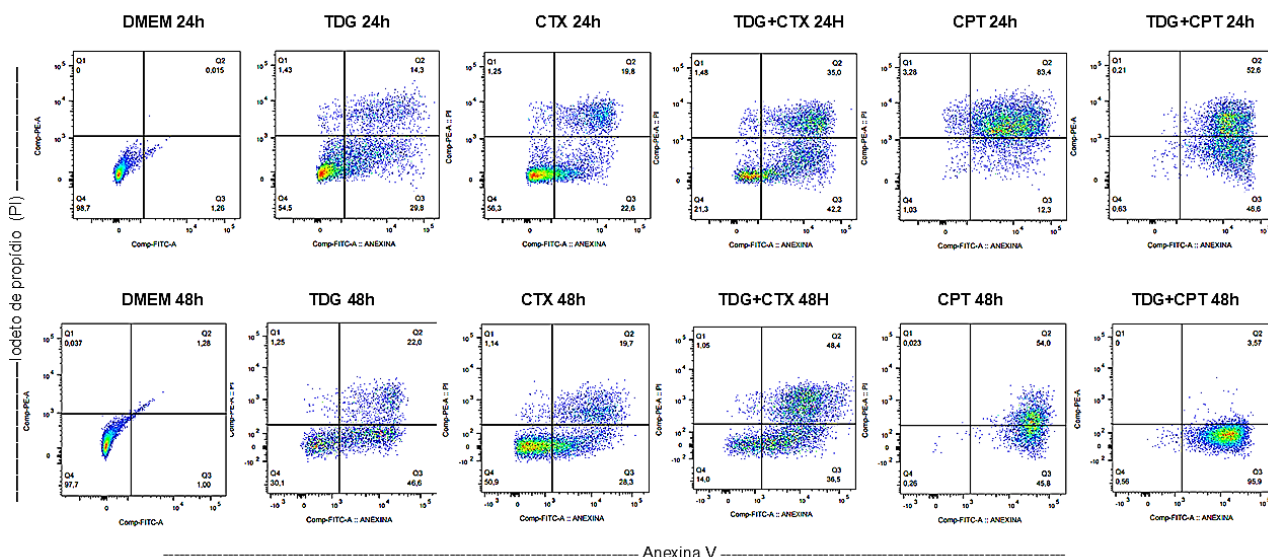
48 horas	DMEM	TDG	CTX	CPT	TDG+CTX
TDG	M=112948 DP=133925 P=0,0004*				
CTX	M=162796 DP=204421 P<0,0001*	M=257495 DP=70496 P=0,3118			
CPT	M=252915 DP=331869 P<0,0001*	M=347614 DP=197943 P<0,0001*	M=397462 DP=127448 P=0,0009*		
TDG+CTX	M=203316 DP=261725 P<0,0001*	M=298015 DP=127800 P=0,0009*	M=347863 DP=57304 P=0,6514	M=437982 DP=70144 P=0,3195	
TDG+CPT	M=250744 DP=328798 P<0,0001*	M=345443 DP=194873 P<0,0001*	M=395291 DP=124377 P=0,0013*	M=485410 DP=3070 P>0,9999	M=435811 DP=67073 P=0,3908

Legenda: Média (M), desvio padrão (DP), P valor * diferença estatística (p<0,05).

7.5. Ensaio de apoptose

A indução de apoptose após tratamento com TDG, CTX, CPT, de maneira isolada, ou tratamento prévio das células com TDG por 24h antes da exposição ao quimioterápico, foi confirmada por citometria de fluxo (Figura 14). A citometria de fluxo é um método amplamente usado para quantificar a “morte” celular usando uma série de características de células apoptóticas ou necróticas. Avalia a ligação de anexina V marcada fluorescentemente em conjunto com o iodeto de propídio (PI). Células viáveis (Q4) foram definidas como células que eram negativas tanto para PI quanto para anexina V. As células necróticas foram definidas como células PI positivas e anexina V negativa (Q1). Por outro lado, as células apoptóticas precoces ou iniciais (Q3) foram definidas como aquelas sendo PI negativas com coloração de anexina V positiva, enquanto as células apoptóticas tardias ou necróticas (Q2) foram definidas como as células que eram positivas tanto para PI quanto para anexina V. Os dados dos percentuais de células apoptóticas, viáveis e necróticas em células CAL27 após tratamento com os fármacos testados estão apresentadas na Tabela 13 (24h) e Tabela 14 (48h).

Figura 14 - Ensaio de apoptose (CAL27). Gráficos Dot-Plot para intensidade de fluorescência considerando os marcadores anexina V e iodeto de propídio para o controle negativo (DMEM), TDG, CTX, TDG+CTX, CPT E TDG+CPT nos tempos experimentais de 24h e 48h.



Na análise dos resultados do tempo de 24h (Tabela 13), o grupo controle (DMEM) apresentou maior porcentagem de células viáveis (98,7%), mantendo a viabilidade celular, como era esperado. O uso isolado de TDG induziu apoptose precoce (29,8%) e apoptose tardia ou necrose (14,3%), mas ainda manteve um número considerável de células viáveis (54,5%). O CTX aplicado de maneira isolada também demonstrou um menor comprometimento da viabilidade celular, com um percentual de 56,3% células viáveis; ainda, 22,6% das células estavam em estágio de apoptose precoce e outros 19,8% estavam em apoptose tardia ou necróticas. Por outro lado, o uso de CPT isoladamente apresentou um percentual de células viáveis muito baixo (1,03%), enquanto houve um aumento substancial na quantidade de células em apoptose tardia ou em necrose (83,4%). Cabe destacar que este fármaco foi o que apresentou maior porcentagem de células necróticas (3,28%) dentre todos os medicamentos avaliados tanto isoladamente ou na combinação de tratamento prévio com TDG, demonstrando o seu alto grau de citotoxicidade.

Ainda para o tempo de 24h, quando do uso do TDG previamente ao CTX (TDG+CTX), o percentual de células em estágio de apoptose precoce ou de apoptose tardia/necrose quase dobrou (de 22,6% para 42,2% e de 19,8% para 35%, respectivamente) em relação ao tratamento apenas com CTX, associado a uma redução expressiva de células viáveis (de 56,3% para 21,3%), sugerindo que o TDG apresentou um efeito sensibilizador, que potencializou o efeito da posterior exposição das células ao quimioterápico.

Na avaliação do uso do TDG previamente à CPT (TDG+CPT), no tempo de 24h, o número de células viáveis continuou extremamente baixo (0,63%), mas observou-se uma mudança no mecanismo de morte celular, onde predominava a morte por apoptose tardia ou necrose quando da exposição isolada à CPT, agora foi encontrada quase que metade das células em apoptose precoce e outra quase metade em apoptose tardia/necrose (46,6% e 52,6%, respectivamente). Estes achados, em conjunto, sugerem que o TDG tem uma potente ação neoadjuvante, aumentando a indução de apoptose e reduzindo a viabilidade celular, mas não somente isso, também promovendo mais o mecanismo de apoptose, diminuindo a necrose e, por conseguinte, reduzindo as consequências negativas deste tipo de mecanismo de morte celular no organismo.

Tabela 13 - Percentual de células apoptóticas, viáveis e necróticas em células CAL 27 após tratamento com os fármacos TDG, CTX, CPT ou combinações, controle negativo (DMEM), controle de apoptose (camptotecina) e de necrose (tratamento térmico), no tempo experimental de 24h.

ENSAIO DE APOPTOSE 24h	Q1 Necrose	Q2 Apoptose tardia	Q3 Apoptose inicial	Q4 Células viáveis
CONTROLE NEGATIVO - células sem tratamento/DMEM	0 %	0,015 %	1,26 %	98,7 %
Controle Positivo Anexina V	0,28 %	0,22 %	55,5 %	44,0 %
Necrose – células com tratamento térmico	67,0 %	0,28 %	0 %	32,7 %
TDG	1,43 %	14,3 %	29,8 %	54,5 %
CTX	1,25 %	19,8 %	22,6 %	56,3 %
TDG+CTX	1,48 %	35,0 %	42,2 %	21,3 %
CPT	3,28 %	83,4 %	12,3 %	1,03 %
TDG+CPT	0,21 %	52,6 %	46,6 %	0,63 %

Ao analisar os achados no tempo de 48h (Tabela 14), o grupo controle negativo (DMEM) apresentou maior porcentagem de células viáveis (97,7%), assim como era esperado. O uso isolado de TDG apresentou um aumento de células em apoptose precoce (46,6%) e apoptose tardia ou necrose (22,0%), quando comparado ao tempo de 24h, mas ainda manteve um número considerável de células viáveis (30,1%), o que parece indicar um efeito tempo-dependente. Já o CTX aplicado de maneira isolada apresentou quase metade das células viáveis (50,9%), enquanto não houve mudanças expressivas nas porcentagens de células que estavam em estágio de apoptose precoce ou em apoptose tardia/necróticas (28,3% e 19,7%, respectivamente), em comparação com o tempo de 24h, o que sugere que não há influência do tempo de exposição ao fármaco sobre a morte celular. Considerando o uso de CPT isoladamente, este quimioterápico apresentou um percentual de células viáveis

muito baixo (0,26%), enquanto houve uma diminuição expressiva na quantidade de células em apoptose tardia ou em necrose (54,0%) e um aumento de células em apoptose precoce (45,8%), bem como uma porcentagem muito baixa de células em necrose (0,023%), quando comparado com o tempo de 24h de exposição ao fármaco. Isto parece indicar que ocorre uma mudança de perfil no mecanismo de morte celular em função do tempo.

Quando da exposição das células ao TDG previamente ao CTX (TDG+CTX), no tempo de 48h de tratamento com o quimioterápico, houve um aumento do percentual de células em estágio de apoptose precoce (36,5%) mas um acréscimo expressivo na quantidade de células em apoptose tardia/necrose (48,4%) em relação ao tratamento apenas com CTX, associado a uma redução expressiva de células viáveis (de 50,9% para 14,0%), novamente indicando que o TDG apresentou um efeito sensibilizador, que potencializou o efeito posterior do quimioterápico sobre as células CAL27.

Ainda analisando os dados do tempo de 48h, na avaliação do uso do TDG previamente à CPT (TDG+CPT), novamente foi observada uma mudança no perfil de morte celular. Quando a CPT foi usada isoladamente havia um certo balanço entre apoptose precoce e apoptose tardia/necrose, na combinação dos fármacos encontrou-se uma predominância de morte celular por apoptose inicial (95,9% das células) e uma expressiva redução no percentual de células em apoptose tardia ou necróticas (3,57%). Isto, novamente, indica que o TDG “conduz” as células no sentido da morte por apoptose, mas não por necrose, com efeito tempo-dependente, o que pode ser benéfico no sentido de minimizar os efeitos colaterais que a necrose pode desencadear no organismo.

Tabela 14 - Percentual de células apoptóticas, viáveis e necróticas em células CAL 27 após tratamento com os fármacos TDG, CTX, CPT ou combinações, controle negativo (DMEM), controle de apoptose (camptotecina) e de necrose (tratamento térmico), no tempo experimental de 48h.

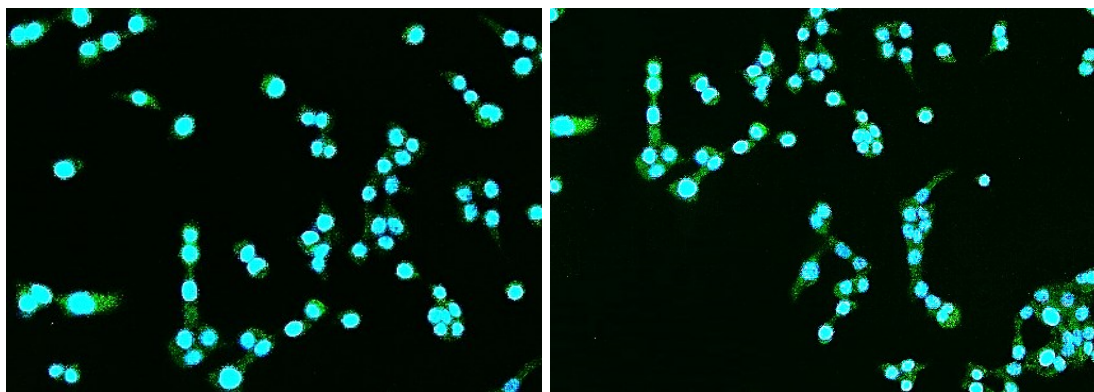
ENSAIO DE APOPTOSE 48h	Q1 Necrose	Q2 Apoptose tardia	Q3 Apoptose inicial	Q4 Células viáveis
CONTROLE NEGATIVO - células sem tratamento/DMEM	0,037 %	1,28 %	1,00 %	97,7 %
Controle Positivo Anexina V	0,42 %	0,96 %	84,4 %	14,2 %
Necrose – células com tratamento térmico	64,9 %	0,031 %	0,015 %	35,1 %
TDG	1,25 %	22,0 %	46,6 %	30,1 %
CTX	1,14 %	19,7 %	28,3 %	50,9 %
TDG+CTX	1,05 %	48,4 %	36,5 %	14,0 %
CPT	0,023 %	54,0 %	45,8 %	0,26 %
TDG+CPT	0 %	3,57 %	95,9 %	0,56 %

Assim, pode-se observar que, de maneira geral, o TDG apresentou efeitos mais marcantes com o aumento do tempo de exposição, tanto isoladamente quanto quando usado previamente ao CTX ou à CPT.

7.6. Imunocitoquímica

A imunofluorescência foi utilizada para analisar a expressão da proteína GSK-3 β nas células CAL-27. O ensaio foi realizado usando anticorpos específicos para a proteína GSK-3 β , e as células foram observadas sob um microscópio de fluorescência. Os resultados mostraram que a proteína GSK-3 β está presente nas células CAL-27, com um padrão de expressão predominantemente citoplasmático. Isso significa que a proteína é detectada principalmente no citoplasma das células, e não no núcleo ou na membrana celular (Figura 15).

Figura 15 – Análise da Expressão da Proteína GSK-3 β por Imunofluorescência em células CAL-27, observadas com microscópio eletrônico de fluorescência. Condensados azuis representam o material genético (provavelmente núcleo da célula) e, em verde, imunoexpressão da GSK-3 β em membrana celular.



Fonte: Fotomicrografias obtidas pela autora.

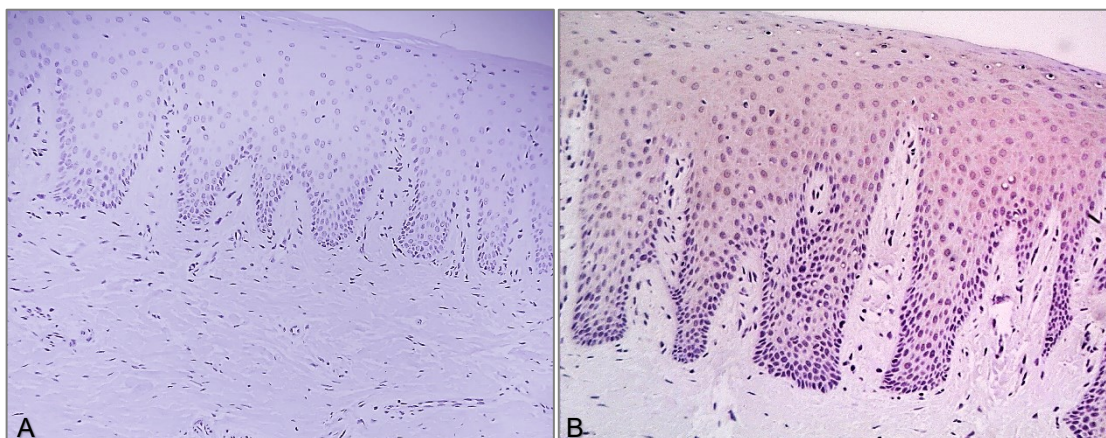
Estudo retrospectivo

7.7. Imunoistoquímica

Neste estudo, avaliou-se a expressão da GSK3 β em amostras de tecidos não neoplásicos (n=15, sendo 5 provenientes de tecido de freio labial superior e 10 de HFI) e em casos de CEO (n=17). A análise foi realizada em um microscópio de luz, por dois avaliadores

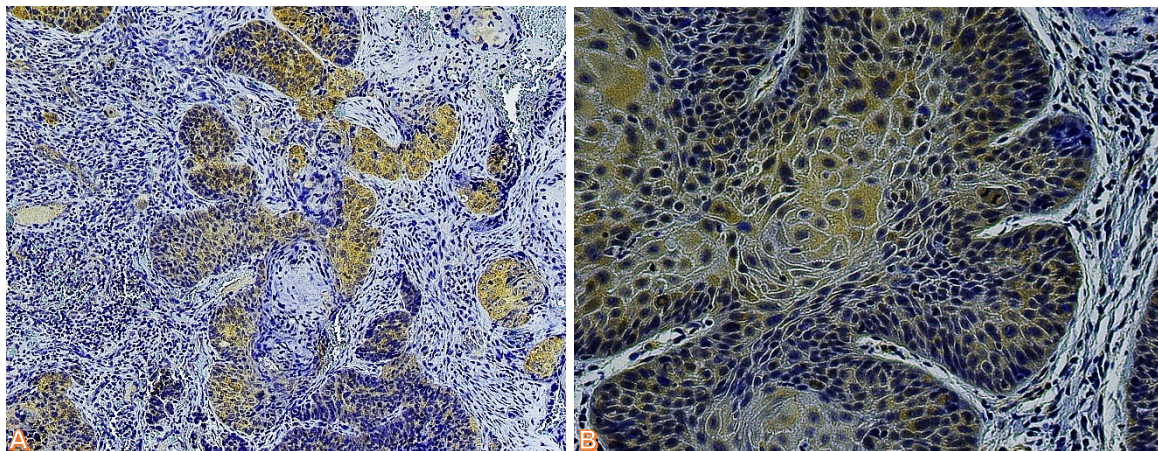
calibrados e uma patologista experiente. Nos casos de tecidos não neoplásicos (n=15), a presença de GSK-3 β foi detectada de forma fraca ou moderada em 4 (26,7%) dos casos analisados, enquanto 11 (73,3%) amostras não apresentaram marcação para a proteína. Por outro lado, em casos de CEO (n=17), a expressão da proteína GSK-3 β foi detectada em 15 (88,2%) dos casos analisados, enquanto 2 (11,8%) amostras não apresentaram marcação para a proteína. Os casos sem neoplasia, apresentaram a imunomarcacão citoplasmática, mas só em região epitelial. Nos casos positivos em amostras de CEO, a expressão de GSK-3 β exibiu um padrão citoplasmático, característico da localização predominante da proteína dentro das células tumorais. A expressão citoplasmática de GSK-3 β indica que a proteína está sendo produzida e possivelmente desempenhando um papel em processos celulares essenciais como proliferação celular, sobrevivência e regulação do ciclo celular no contexto do CEO. As imunorreacções podem ser verificadas na Figura 16 (tecidos não neoplásicos) e na Figura 17 (amostras de CEO).

Figura 16 - Marcação imunohistoquímica da expressão da GSK-3 β em amostras de tecidos não neoplásicos. Imagem ampliada.



Legenda: Fotomicrografias cortes de tecidos não neoplásicos. Em (A) (200x) não houve imunorreacção positiva para GSK3- β . Em (B) (400x), imunorreacção positiva para GSK-3 β na região epitelial.
Fonte: Fotomicrografias obtidas pela autora.

Figura 17 – Marcação imunohistoquímica da expressão da GSK-3 β em amostras de CEO. Imagem ampliada.



Legenda: Fotomicrografia cortes de CEO. Observa-se intensa marcação citoplasmática positiva para GSK3- β em ambas as imagens. A) (100x) e B) (400x). Fonte: Fotomicrografias obtidas pela autora.

8. Discussão

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar, *in vitro*, o efeito antitumoral do Tideglusib (TDG) de maneira isolada ou como tratamento prévio a Cetuximabe (CTX) e Cisplatina (CPT), em linhagem celular de CEO (Cal27). É importante ressaltar que não houve exposição concomitante das células a dois ou três medicamentos, para poder verificar, efetivamente, a capacidade do TDG em sensibilizar as células tumorais, de maneira a potencializar o efeito de uma posterior exposição aos quimioterápicos CTX ou CPT. Assim, as células foram tratadas com TDG durante 24h e, após esse tempo, o fármaco foi removido e novo meio de cultura, agora com a adição da dosagem pré-estabelecida de CTX ou CP, foi aplicado às células, e mantido por períodos de 24h e 48h.

O TDG é um inibidor de GSK-3 que tem mostrado potencial terapêutico em várias formas de carcinoma. A literatura mais recente indica que a inibição da GSK-3 β pode modular a proliferação e a migração celular, processos essenciais para a progressão tumoral (THAPA *et al.*, 2023; LIN *et al.*, 2024). Em estudos pré-clínicos, a inibição de GSK-3 β com TDG tem sido investigada para reduzir a proliferação de células tumorais e foi encontrado que, em alguns casos, pode aumentar a apoptose (morte celular programada) em células cancerígenas (MATHURAM *et al.*, 2016; WEI *et al.*, 2021; BAHMAD *et al.*, 2021). Neste estudo, foi possível observar que o TDG inibiu a proliferação, a viabilidade e a migração de células de linhagem de CEO Cal27, sugerindo que o seu efeito poderia estar associado à inibição ou bloqueio de vias de sinalização que promovem a sobrevivência, a proliferação e a movimentação dessas células tumorais. Isso é consistente com a literatura, onde a GSK-3 β é vista como uma proteína chave para o crescimento tumoral (MANCINELLI *et al.*, 2017; HE *et al.*, 2020). Além disso, a combinação de TDG com outros agentes, pode potencializar esse efeito, talvez por inibir vias adicionais de sinalização que a GSK-3 β controla (DUDA *et al.*, 2020).

Os dados obtidos no presente trabalho destacam a influência dos diferentes fármacos, isolados e combinados, na viabilidade celular ao longo dos tempos experimentais (24h e 48h). Na concentração de TDG utilizada nos experimentos deste estudo (definida como metade da dosagem obtida no ensaio CC50, visto que, em alguns grupos, posteriormente seria feita a exposição a quimioterápicos reconhecidamente com alta toxicidade), quando utilizado isoladamente, o TDG não apresentou um efeito muito acentuado sobre a viabilidade celular, comparado aos outros medicamentos avaliados, sem grande variação no percentual de células viáveis nos tempos de 24h e 48h (64,7% e 65,1%, respectivamente), sugerindo que o fármaco estabiliza seu impacto citotóxico sem intensificar a ação com o tempo. Outros

autores, obtiveram dados semelhantes, onde o tratamento com TDG, reduziu a viabilidade e a proliferação de células de câncer pancreático, além de diminuir a expressão da proteína POTE (um membro da família do domínio anquirina) que está frequentemente superexpressa em diversos tipos de câncer (Hao *et al.*, 2020). Daouk *et al.*, (2019) perceberam que o TDG demonstrou capacidade de inibir o crescimento e a formação de esferas por células-tronco cancerígenas em linhagens celulares humanas de câncer de pulmão KRAS-mutante. Ainda, Bou-Guarios *et al.*, (2021) observaram que o tratamento com TDG, sozinho e em combinação com radiação, reduziu significativamente a formação de colônias e formação de esferas das linhagens celulares de Glioblastoma. Reduziu também a proliferação, a viabilidade e a migração de ambas as linhagens celulares de maneira dependente da dose e do tempo *in vitro*. Este comportamento pode estar relacionado ao mecanismo de inibição da GSK-3 β , associada à regulação de vias de sinalização celular críticas para a proliferação e sobrevivência (DOMOTO *et al.*, 2020; LIN *et al.*, 2024).

Neste estudo, o CTX, um inibidor do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), demonstrou redução da viabilidade celular e a citotoxicidade que aumentou com o passar do tempo, de 57,7% células viáveis em 24h, para 39,5% em 48h. Estes dados reforçam a eficácia cumulativa do CTX ao longo do tempo, embora sua melhor aplicação seja em combinação com outras terapias, possivelmente devido à interrupção progressiva de vias de sobrevivência celular mediadas por EGFR (GREENHALGH *et al.*, 2009; GUY, JEAN-BAPTISTE, *et al.*, 2021).

Por outro lado, a CPT, um quimioterápico que causa danos irreparáveis ao DNA, reduziu a viabilidade celular e mostrou maior impacto citotóxico isolado, de 30,4% em 24h e 19,2% em 48h, demonstrando um efeito inibidor acumulativo. A diminuição acentuada na viabilidade de células CAL27 promovida pela CPT corrobora com estudos que destacam seu papel como um dos tratamentos mais eficazes, embora associado a resistência em longo prazo (ROMANI 2022).

Para avaliar o efeito sensibilizador do TDG como tratamento prévio ao CTX e CPT, dois grupos experimentais foram estabelecidos para todos os ensaios: exposição prévia das células ao TDG por 24h, seguido pelo tratamento com CTX e exposição prévia das células ao TDG por 24h, seguido pelo tratamento com CPT, com as células ficando expostas aos quimioterápicos pelos tempos de 24h ou 48h. A combinação de TDG com CTX apresentou uma redução significativa na viabilidade celular, de aproximadamente 28%, no tempo de 24h, comparado ao efeito do CTX isolado, mas não houve diferença significativa entre o CTX isolado e o tratamento prévio com TDG (redução de cerca de 7% na viabilidade das células) no período de 48h, demonstrando que o maior efeito do TDG na potencialização da posterior

ação do CTX aconteça de maneira mais precoce, perdendo um pouco esse efeito com o aumento do tempo. Estes resultados sugerem uma sinergia moderada entre os fármacos, o que pode ser explicado pela ação combinada de inibição da GSK-3 β e do bloqueio do EGFR, afetando simultaneamente múltiplos alvos das células tumorais (DUDA *et al.*, 2020).

A combinação de TDG com CPT intensificou ainda mais os efeitos citotóxicos deste quimioterápico, aumentando a inibição da viabilidade celular em pouco mais de 30%, em ambos os tempos experimentais (24h e 48h), quando comparado ao efeito da CPT aplicada isoladamente. Estes achados sugerem uma forte sinergia, possivelmente devido à contribuição do TDG em sensibilizar as células tumorais ao efeito genotóxico da CPT. Este efeito pode estar relacionado à regulação de vias apoptóticas mediadas pela GSK-3 β , exacerbando os danos ao DNA promovidos pela CPT (AL-LAZIKANI *et al.*, 2012). O potencial dos inibidores de GSK-3 para serem usados no tratamento de pacientes com câncer pode ser mais eficaz ao combinar os inibidores de GSK-3 com outros inibidores de moléculas pequenas, quimioterapia ou radioterapia, pois podem sensibilizar células tumorais a terapias padrão, modulando vias de sobrevivência celular e otimizando o benefício terapêutico (DUDA *et al.*, 2020). Abe, Kensaku, *et al.*, (2019) mostraram que inibir a atividade ou expressão de GSK3 β pode reduzir a sobrevivência, proliferação e invasão de células de sarcoma sinovial e fibrossarcoma, bem como induzir apoptose. Além disso, confirmaram a eficácia dos inibidores de GSK3 β contra xenoinxertos de tumores de sarcoma sinovial e fibrossarcoma, em camundongos.

Cabe destacar que o ensaio de proliferação celular apontou que todos os fármacos testados, isoladamente ou no tratamento prévio com TDG e posterior exposição ao quimioterápico, em comparação com o controle negativo (DMEM), inibiram a proliferação celular de maneira significativa, em ambos os tempos experimentais (24h e 48h). Entretanto, quando comparado o efeito do tratamento com o quimioterápico sozinho em relação à exposição prévia das células ao TDG, não foram encontradas diferenças significativas, sugerindo que este fármaco não tem um efeito sensibilizador acentuado em relação à potencial ação do quimioterápico sobre a proliferação celular, ou seja, o efeito seria aquele inerente ao próprio fármaco.

Em relação ao ensaio de apoptose, neste estudo foi observado que, no tratamento das células CAL27 com diferentes fármacos após 24h, o TDG e o CTX foram aqueles que, quando aplicados de maneira isolada, tiveram uma maior manutenção de células viáveis (em média 55,0%), em comparação à CPT (1,0%). Ademais, em relação ao percentual de células que se encontravam em processo de morte celular, tanto TDG quanto CTX promoveram mais apoptose precoce (29,8% e 22,6%, respectivamente) do que tardia ou necrose (14,3% e

19,8%, respectivamente). Por outro lado, houve uma substancial porcentagem das células tratadas com CPT, por 24h, em mecanismos de morte celular por apoptose tardia ou necrose (83,4%) e este fármaco foi o que apresentou maior percentual de células necróticas (3,28%) dentre todos os medicamentos avaliados, tanto isoladamente ou na combinação de tratamento prévio com TDG, demonstrando o seu alto grau de citotoxicidade.

A interação no grupo TDG+CTX para o tempo de 24h mostrou que o percentual de células tanto em estágio de apoptose precoce quanto de apoptose tardia/necrose quase que dobrou, associado a uma redução expressiva de células viáveis (de 56,3% para 21,3%), quando comparado ao tratamento apenas com CTX, o que indica que o TDG foi capaz de sensibilizar as células, de maneira a potencializar o efeito da posterior exposição ao quimioterápico. Por outro lado, chama a atenção que, na avaliação do uso do TDG previamente à CPT (TDG+CPT), no tempo de 24h, observou-se uma mudança no mecanismo de morte celular apresentado pelas células, comparado ao tratamento somente com CPT, já que foi encontrada quase que metade das células em apoptose precoce e outra quase metade em apoptose tardia/necrose (46,6% e 52,6%, respectivamente). Cabe destacar que os efeitos da morte celular por necrose são mais intensos e muitas vezes negativos, em comparação ao mecanismo de apoptose.

Quando a apoptose foi avaliada após o uso dos medicamentos, de maneira isolada, por um período de 48h, observou-se que o TDG apresentou um aumento de células em apoptose precoce (46,6%) e apoptose tardia ou necrose (22,0%), quando comparado ao tempo de 24h, mantendo um percentual considerável de células viáveis (30,1%), indicando uma ação tempo-dependente. O CTX, por sua vez, manteve quase metade das células viáveis (50,9%), mas não apresentou mudanças expressivas nos índices de apoptose precoce (28,3%) e tardia/necrose (19,7%), em comparação com o tempo de 24h, o que parece indicar que não há influência do tempo em relação ao efeito desse quimioterápico sobre a morte celular. Analisando o efeito do uso de CPT isoladamente, este medicamento apresentou um percentual de células viáveis muito baixo (0,26%), enquanto houve uma diminuição expressiva na quantidade de células em apoptose tardia ou em necrose (54,0%) e um aumento de células em apoptose precoce (45,8%), bem como uma porcentagem muito baixa de células em processo de necrose (0,023%), quando comparado com o tempo de 24h de exposição ao quimioterápico. Isto parece indicar que há uma mudança de perfil no mecanismo de morte celular em função do tempo.

Quando as células foram tratadas com TDG previamente ao CTX (TDG+CTX), no tempo de 48h de exposição ao quimioterápico, observou-se um aumento do percentual de células em estágio de apoptose precoce (36,5%) e de células em apoptose tardia/necrose

(48,4%) em relação ao tratamento apenas com CTX, associado a uma redução expressiva de células viáveis (de 50,9% para 14,0%). Na avaliação do uso do TDG previamente à CPT (TDG+CPT) no tempo de 48h, novamente foi observada uma mudança no perfil de morte celular, com predomínio de apoptose inicial (95,9%) e expressiva redução da quantidade de células em processo de apoptose tardia ou necrose (3,57%). Essas descobertas indicam que o TDG direciona as células para apoptose, em vez de necrose, de forma dependente do tempo.

Assim, em conjunto, esses resultados sugerem que o TDG tem uma importante ação sensibilizadora, reduzindo a viabilidade celular, mas, além disso, promovendo morte celular mais pelo mecanismo de apoptose e diminuindo a necrose, com efeito tempo-dependente, o que reduziria as consequências negativas deste tipo de processo de morte celular no organismo. Assim, na clínica, isso significaria que o TDG poderia auxiliar a minimizar os efeitos colaterais do uso dos quimioterápicos.

Outros pesquisadores também avaliaram a monoterapia com TDG e sua associação com outros fármacos. Zhou *et al.*, (2016) avaliaram os efeitos do TDG, da Temozolomida e de sua combinação em camundongos com glioblastoma (GSC11 ou GSC20). O TDG reprimiu a tumorigênese do glioma, sensibilizou os xenoenxertos de glioblastoma ao tratamento com Temozolomida e melhorou a sobrevivência do camundongo, sugerindo uma estratégia terapêutica potencial contra o glioblastoma. Quando utilizado em células de osteossarcoma, o TDG reduziu a proliferação celular e induziu apoptose de forma dependente da dose (WEI *et al.*, 2021). Além disso, o TDG também foi eficaz na indução de apoptose em células IMR32 de neuroblastoma humano (MUTHURAM *et al.*, 2016). De forma semelhante, outro inibidor de GSK3 β (CHIR-98014) foi capaz de inibir a proliferação e invasão celular, além de induzir apoptose e promover a parada do ciclo celular na fase G0/G1, em células de carcinoma hepatocelular (WANG *et al.*, 2024).

Estudos anteriores reforçam os achados deste trabalho, ressaltando o potencial de combinações terapêuticas como CPT e CTX no CEO. De Azevedo *et al.* (2022) mostraram que a combinação de CTX+CPT reduz o crescimento celular e induz apoptose, independentemente de p53. Além disso, pode melhorar a eficácia terapêutica ao atingir múltiplos alvos moleculares, desencadeando morte celular imunogênica e promovendo resposta antitumoral com doses moderadas de CTX e CPT. Khadela *et al.*, (2023) verificaram que a inclusão de paclitaxel, em regimes similares, aumentou a eficácia e reduziu a toxicidade em alguns casos, sugerindo que terapias combinadas podem otimizar os resultados. Esses achados demonstram que as combinações de CTX e CPT têm efeito sinérgico, promovendo apoptose e ativando a resposta imunológica no CEO. Em linha com esses resultados, esta

pesquisa observou que o uso de TDG+CTX, embora eficaz ao longo do tempo, teve um efeito sinérgico menos pronunciado em comparação com o TDG+CPT, que se manteve o mais categórico, induzindo quase 100% de apoptose precoce e resultando em uma grande redução da viabilidade celular tumoral em 48 horas.

Estudos sobre a sinergia entre inibidores de vias moleculares e quimioterapia têm mostrado avanços promissores no tratamento de diversos tipos de câncer. Eles indicam que a combinação de inibidores de vias específicas, como os que bloqueiam proteínas envolvidas no crescimento tumoral, e quimioterápicos pode aumentar a eficácia terapêutica (CHEN E ZANG, 2015; WU *et al.*, 2022). Por exemplo, em alguns tipos de câncer, como o câncer de mama HER2 positivo, a combinação de terapias-alvo com quimioterapia tem se mostrado eficaz, especialmente em sensibilizar as células tumorais ao dano do DNA causado pela quimioterapia. O uso de anticorpos como o trastuzumabe, combinado com agentes citotóxicos, pode melhorar a resposta ao tratamento, particularmente quando as células cancerígenas são resistentes ao anticorpo sozinho (LESNIAK *et al.*, 2009). Além disso, a sinergia de inibidores de angiogênese, como o bevacizumabe, com quimioterapia tem mostrado um impacto no aumento da eficácia, especialmente em cânceres com crescimento agressivo, ao reduzir a formação de novos vasos sanguíneos que alimentam os tumores (KIM *et al.*, 2012).

Tais combinações terapêuticas são fundamentais para impulsionar tratamentos mais eficazes e personalizados. A proposta de combinações racionais de medicamentos baseia-se frequentemente em evidências de sinergia observadas em estudos *in vitro* e *in vivo* entre os agentes envolvidos (HOLOHAN *et al.*, 2013). As abordagens atuais de terapia combinada pressupõem que melhores resultados são alcançados pela combinação de medicamentos em suas doses máximas toleradas. Apesar de não ter sido evidenciado diferença estatística entre a monoterapia e a terapia combinada com TDG neste estudo, foi possível observar que os resultados das combinações reduziram a proliferação e a migração celular, mesmo que de forma moderada. Na literatura, já é comprovado que o uso de terapias combinadas levou a uma redução na toxicidade de tratamentos individuais, permitindo que os pacientes tolerem regimes de tratamento. O desenvolvimento de medicina personalizada e terapias direcionadas permitirá um tratamento ainda mais preciso e eficaz do câncer oral (SILVA *et al.*, 2023).

Essa abordagem é impulsionada pela descoberta de novos alvos terapêuticos, como a proteína GSK-3 β . Nesta pesquisa, foi identificada a superexpressão dessa proteína em células CAL27 e em tecidos tumorais de CEO, reforçando seu potencial como alvo terapêutico para o uso do TDG nesses casos. Apesar da dualidade funcional (dicotomia) da GSK-3 em processos celulares, os resultados apontaram que, em tecidos orais não neoplásicos, há

pouca ou nenhuma expressão dessa proteína. Esse achado sugere que o TDG poderia ser uma alternativa segura, com baixo risco de afetar vias de sinalização não relacionadas ao tumor, especialmente quando usado em conjunto com a quimioterapia convencional. No entanto, estudos adicionais são necessários para confirmar essa hipótese e garantir a segurança e eficácia dessa abordagem terapêutica.

A expressão desta proteína em casos de CEO corrobora com o estudo de Mishra *et al.*, (2024), onde foram avaliadas a expressão e a atividade das isoformas α/β da glicogênio sintase quinase 3 (GSK3 α/β) e avaliação do seu potencial oncogênico por meio de uma correlação com a expressão de ciclina D1 e p53 no câncer oral. A expressão de GSK3 β foi significativamente maior em relação à GSK3 α , indicando o maior papel da isoforma β no câncer de boca. Os achados da literatura reforçam os resultados desta pesquisa em relação à superexpressão de GSK3- β em casos de CEO. Umashankar *et al.*, (2022) também analisaram a expressão de GSK3- β em CEO através de PCR em tempo real, confirmando sua expressão e indicando que a proteína GSK-3 β está de fato presente no CEO. Ainda, esse estudo demonstrou expressão elevada em comparação a tecidos saudáveis. Essa superexpressão foi observada principalmente nos casos de CEO bem diferenciados e moderadamente diferenciados. Esse comportamento justifica seu potencial como alvo terapêutico, mas também demanda mais investigações sobre seu impacto em diferentes vias de sinalização.

Ainda sobre a expressão de GSK3- β em neoplasias, Shimozaki *et al.*, (2016) identificaram que células de osteossarcoma expressam predominantemente a forma ativa da GSK-3 β . A inibição dessa proteína suprimiu a proliferação e sobrevivência celular, induziu apoptose e mostrou eficácia contra tumores em camundongos. Em estudos clínicos, inibidores como TDG e LY2090314 apresentaram toxicidades controláveis e boa tolerabilidade, destacando o potencial terapêutico dessa abordagem (WALZ *et al.*, 2017). Além disso, inibidores de GSK-3 mostraram eficácia contra rabdomiossarcoma alveolar, um tipo agressivo e resistente às terapias convencionais (ZENG *et al.*, 2010). Outro inibidor de GSK-3 β (AR-A014418), combinado com quimioterápicos (temozolomida e gemcitabina), teve efeitos sinérgicos no tratamento de glioblastoma e câncer de pâncreas, aumentando a sensibilidade à radiação (DOMOTO *et al.*, 2016). A inibição de GSK-3 também potencializou os efeitos antitumorais do sorafenibe no carcinoma de células renais, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (KAWAZOE *et al.*, 2012). Esses achados reforçam ainda mais o uso de um inibidor da GSK-3 β em tumores malignos.

Em resumo, os resultados indicam que a combinação de TDG com quimioterápicos como CTX e CPT pode representar uma abordagem promissora para aumentar a eficácia

terapêutica, particularmente no contexto de células resistentes à quimioterapia. Contudo, o grau de sinergia depende, significativamente, do mecanismo de ação de cada fármaco e do tempo de exposição, destacando a importância de otimizar combinações terapêuticas para maximizar os resultados clínicos.

9. Conclusão

Pesquisas com TDG vêm mostrando sua eficácia em células neoplásicas. Acredita-se que esse fármaco associado a quimioterápicos convencionais pode potencializar os benefícios no controle da progressão tumoral. O TDG apresentou resultados promissores nos diferentes ensaios propostos nesta pesquisa (proliferação, viabilidade, migração e apoptose celular), tanto de maneira isolada, como tratamento neoadjuvante aos quimioterápicos convencionais (CTX e CPT), sensibilizando as células ao efeito destes fármacos. Porém, isoladamente, não foi superior aos fármacos convencionais. Na avaliação de sua capacidade de sensibilizar as células, quando estas foram previamente tratadas com TDG por 24h, de maneira a potencializar a posterior ação do quimioterápico (CTX ou CPT) por 24h e 48h, o efeito mais destacado foi observado com relação à viabilidade, no tempo de 24h, e à apoptose celular, em 24h e 48h de exposição ao quimioterápico. Isso evidencia seu potencial como alternativa neoadjuvante no tratamento de CEO.

A expressão da GSK-3 β nos casos analisados sugere um novo alvo terapêutico para o tratamento de CEO, especialmente considerando que já há pesquisas indicando o potencial desse fármaco na inibição da GSK-3 β em diversos tipos de câncer. No entanto, mais estudos devem ser realizados.

Diante disso, espera-se que, a respeito do seu emprego como tratamento neoadjuvante a quimioterápicos, o TDG possa avançar nas pesquisas e representar mais uma abordagem terapêutica para o tratamento de carcinoma epidermoide oral (CEO).

Perspectivas futuras: Realizar experimentos adicionais para investigar o mecanismo molecular do TDG, especialmente em vias apoptóticas e estresse oxidativo. Avaliar o potencial do TDG em modelos *in vivo* para confirmar os resultados observados *in vitro*. Explorar combinações com outros agentes terapêuticos para verificar se o efeito sinérgico se mantém em diferentes cenários.

Referências

- ABE, KENSAKU, *et al.* "Glycogen Synthase Kinase 3 β as a Potential Therapeutic Target in Synovial Sarcoma and Fibrosarcoma". **Cancer Science**, vol. 111, nº 2, dezembro de 2019, p. 429. pmc.ncbi.nlm.nih.gov, <https://doi.org/10.1111/cas.14271>.
- ALAOHALI, A.; SALZLECHNER, C.; ZAUGG, L. K.; SUZANO, F.; MARTINEZ, A.; GENTLEMAN, E.; SHARPE, P. T. GSK3 Inhibitor-Induced Dentinogenesis Using a Hydrogel. **Journal of Dental Research**, v. 101, n. 1, p. 46–53, jan. 2022. DOI10.1177/00220345211020652.
- AL-LAZIKANI, B., BANERJI, U. & WORKMAN, P. Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era. **Nat Biotechnol** 30, 679–692 (2012). <https://doi.org/10.1038/nbt.2284>.
- ALVES, EA; GUIMARÃES, ACR. Cultivo celular. In: MOLINARO, Etelcia Moraes; CAPUTO, Luzia Fátima Gonçalves; AMENDOEIRA, Maria Regina Reis (Org.). Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. v.2. **Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde** (Icict/Fiocruz). Rio de Janeiro: EPSJV, 2010. p.215-253. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/13410>. Acesso em: 10 jun. 2023.
- AMJAD, M. T.; CHIDHARLA, A.; KASI, A. Cancer Chemotherapy. **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564367/>.
- ATILA, D.; CHEN, C.-Y.; LIN, C.-P.; LEE, Y.-L.; HASIRCI, V.; TEZCANER, A.; LIN, F.-H. In vitro evaluation of injectable Tideglusib-loaded hyaluronic acid hydrogels incorporated with Rg1-loaded chitosan microspheres for vital pulp regeneration. **Carbohydrate Polymers**, v. 278, p. 118976, 15 fev. 2022. DOI 10.1016/j.carbpol.2021.118976.
- ATILA, D.; KESKIN, D.; LEE, Y.-L.; LIN, F.-H.; HASIRCI, V.; TEZCANER, A. Injectable methacrylated gelatin/thiolated pectin hydrogels carrying melatonin/tideglusib-loaded core/shell PMMA/silk fibroin electrospun fibers for vital pulp regeneration. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 222, p. 113078, 1 fev. 2023. DOI 10.1016/j.colsurfb.2022.113078.
- AUGELLO, G.; EMMA, M. R.; CUSIMANO, A.; AZZOLINA, A.; MONTALTO, G.; MCCUBREY, J. A.; CERVELLO, M. The Role of GSK-3 in Cancer Immunotherapy: GSK-3 Inhibitors as a New Frontier in Cancer Treatment. **Cells**, v. 9, n. 6, p. 1427, 9 jun. 2020. DOI 10.3390/cells9061427.
- BAHMAD, H. F.; CHALHOUB, R. M.; HARATI, H.; BOU-GHARIOS, J.; ASSI, S.; BALLOUT, F.; MONZER, A.; MSHEIK, H.; ARAJI, T.; ELAJAMI, M. K.; GHANEM, P.; CHAMAA, F.; KADARA, H.; ABOU-ANTOUN, T.; DAOUD, G.; FARES, Y.; ABOU-KHEIR, W. Tideglusib attenuates growth of neuroblastoma cancer stem/progenitor cells in vitro and in vivo by specifically targeting GSK-3 β . **Pharmacological Reports**, v. 73, n. 1, p. 211–226, fev. 2021. DOI 10.1007/s43440-020-00162-7.
- BD BIOSCIENCES FACSCANTO II - 3 LASER FLOW CYTOMETER, **BD BIOSCIENCES - STEMART**. [s. d.]. Disponível em: <https://www.ste-mart.com/bd-biosciences-facscanto-ii-3->

laser-flow-cytometer-bd-biosciences-115575.htm?gclid=EAlaIQobChMImcag-aSAgAMV9U9IAB3eTwzwEAAYASAAEgLCHPD_BwE . Acesso em: 4 jun. 2023.

BHARATHY, N.; SVALINA, M. N.; SETTELMEYER, T. P.; CLEARY, M. M.; BERLOW, N. E.; AIRHART, S. D.; XIANG, S.; KECK, J.; HAYDEN, J. B.; SHERN, J. F.; MANSOOR, A.; LATHARA, M.; SRINIVASA, G.; LANGENAU, D. M.; KELLER, C. Preclinical testing of the glycogen synthase kinase-3 β ; inhibitor tideglusib for rhabdomyosarcoma. **Oncotarget**, v. 8, n. 38, p. 62976–62983, 16 jun. 2017. DOI 10.18632/oncotarget.18520.

BOU-GHARIOS, J.; ASSI, S.; BAHMAD, H. F.; KHARROUBI, H.; ARAJI, T.; CHALHOUB, R. M.; BALLOUT, F.; HARATI, H.; FARES, Y.; ABOU-KHEIR, W. The potential use of tideglusib as an adjuvant radio-therapeutic treatment for glioblastoma multiforme cancer stem-like cells. **Pharmacological Reports**, v. 73, n. 1, p. 227–239, fev. 2021. DOI 10.1007/s43440-020-00180-5. <https://doi.org/10.1007/s43440-020-00180-5>.

CAETANO-PINTO, P.; JAMALPOOR, A.; HAM, J.; GOUMENOU, A.; MOMMERSTEEG, M.; PIJNENBURG, D.; RUIJTENBEEK, R.; SANCHEZ-ROMERO, N.; VAN ZELST, B.; HEIL, S. G.; JANSEN, J.; WILMER, M. J.; VAN HERPEN, C. M. L.; MASEREEUW, R. Cetuximab Prevents Methotrexate-Induced Cytotoxicity in Vitro through Epidermal Growth Factor Dependent Regulation of Renal Drug Transporters. **Molecular Pharmaceutics**, v. 14, n. 6, p. 2147–2157, 5 jun. 2017. DOI 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00308.

CAL 27 - CRL-2095 | **ATCC**. [s. d.]. Detailed product information. Disponível em: <https://www.atcc.org/products/crl-2095>. Acesso em: 11 jul. 2023.

CHAMOLI, A.; GOSAVI, A. S.; SHIRWADKAR, U. P.; WANGDALE, K. V.; BEHERA, S. K.; KURREY, N. K.; KALIA, K.; MANDOLI, A. Overview of oral cavity squamous cell carcinoma: Risk factors, mechanisms, and diagnostics. **Oral Oncology**, v. 121, p. 105451, 1 out. 2021. DOI 10.1016/j.oraloncology.2021.105451.

CHAUHAN, N.; GAJJAR, A.; BASHA, S. H. Pharmacophore feature-based virtual screening for finding potent GSK-3 inhibitors using molecular docking and dynamics simulations. **Bioinformation**, v. 12, n. 10, p. 391–395, 2016. <https://doi.org/10.6026/97320630012391>.

CHEN, DH., ZHANG, XS. Targeted therapy: resistance and re-sensitization. **Chin J Cancer** 34, 43 (2015). <https://doi.org/10.1186/s40880-015-0047-1>.

CHEN, S.; HU, H.; MIAO, S.; ZHENG, J.; XIE, Z.; ZHAO, H. Anti-tumor effect of cisplatin in human oral squamous cell carcinoma was enhanced by andrographolide via upregulation of phospho-p53 in vitro and in vivo. **Tumor Biology**, v. 39, n. 5, p. 101042831770533, maio 2017. DOI 10.1177/1010428317705330.

COMEAU-GAUTHIER, M.; TARCHALA, M.; LUNA, J. L. R.-G.; HARVEY, E.; MERLE, G. Unleashing β -catenin with a new anti-Alzheimer drug for bone tissue regeneration. **Injury**, v. 51, n. 11, p. 2449–2459, 1 nov. 2020. DOI 10.1016/j.injury.2020.07.035.

CRAMER, J. D.; BURTNESSE, B.; LE, Q. T.; FERRIS, R. L. The changing therapeutic landscape of head and neck cancer. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 16, n. 11, p. 669–683, nov. 2019. DOI 10.1038/s41571-019-0227-z.

DAOUK R, HASSANE M, BAHMAD HF, et al. Genome-Wide and Phenotypic Evaluation of Stem Cell Progenitors Derived From Gprc5a-Deficient Murine Lung Adenocarcinoma With

Somatic Kras Mutations. **Front Oncol.** 2019;9:207. Published 2019 Apr 2. doi:10.3389/fonc.2019.00207. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6454871/>.

DASARI, S.; BERNARD TCHOUNWOU, P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology**, v. 740, p. 364–378, 5 out. 2014. DOI 10.1016/j.ejphar.2014.07.025.

DE AZEVEDO, J.; MOURTADA, J.; BOUR, C.; DEVIGNOT, V.; SCHULTZ, P.; BOREL, C.; PENCREACH, E.; MELLITZER, G.; GAIDDON, C.; JUNG, A.C. The EXTREME Regimen Associating Cetuximab and Cisplatin Favors Head and Neck Cancer Cell Death and Immunogenicity with the Induction of an Anti-Cancer Immune Response. **Cells** 2022, 11, 2866. <https://doi.org/10.3390/cells11182866>.

DE LIMA, M. A. P.; TEODORO, I. P. P.; GALIZA, L. E. de; FILHO, P. H. B. M.; MARQUES, F. de M.; PINHEIRO JUNIOR, R. F. F.; MACEDO, G. E. C.; FACUNDO, H. T.; DA SILVA, C. G. L.; LIMA, M. V. A. Association between Epstein-Barr Virus and Oral Carcinoma: A Systematic Review with Meta-Analysis. **Critical Reviews in Oncogenesis**, v. 24, n. 4, p. 349–368, 2019. <https://doi.org/10.1615/CritRevOncog.2019031897>.

DE OLIVEIRA, T. B.; MARTA, G. N.; DE CASTRO JUNIOR, G.; KOWALSKI, L. P. Induction Chemotherapy for Advanced Oral Cavity Cancer. **Current Oncology Reports**, v. 23, n. 11, p. 129, nov. 2021. DOI 10.1007/s11912-021-01119-6.

DE PAZ, D.; KAO, H.-K.; HUANG, Y.; CHANG, K.-P. Prognostic Stratification of Patients With Advanced Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma. **Current Oncology Reports**, v. 19, n. 10, p. 65, out. 2017. DOI 10.1007/s11912-017-0624-3.

DEVITA, V. T.; CHU, E. A History of Cancer Chemotherapy. **Cancer Research**, v. 68, n. 21, p. 8643–8653, 1 nov. 2008. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-07-6611. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/68/21/8643/541799/A-History-of-Cancer-Chemotherapy>.

DHANUTHAI, K.; ROJANAWATSIRIVEJ, S.; THOSAPORN, W.; KINTARAK, S.; SUBARNBHESAJ, A.; DARLING, M.; KRYSHALSKYJ, E.; CHIANG, C.-P.; SHIN, H.-I.; CHOI, S.-Y.; LEE, S.-S.; AMINISHAKIB, P. Oral cancer: A multicenter study. **Medicina Oral, Patologia Oral Y Cirugia Bucal**, v. 23, n. 1, p. e23–e29, 1 jan. 2018. <https://doi.org/10.4317/medoral.21999>.

DOMOTO T, PYKO IV, FURUTA T, et al. Glycogen synthase kinase-3 β is a pivotal mediator of cancer invasion and resistance to therapy. **Cancer Sci.** 2016;107(10):1363-1372. doi:10.1111/cas.13028.

DOMOTO, T.; UEHARA, M.; BOLIDONG, D.; MINAMOTO, T. Glycogen Synthase Kinase 3 β in Cancer Biology and Treatment. **Cells**, v. 9, n. 6, p. 1388, 3 jun. 2020. DOI10.3390/cells9061388. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7349761/>.

DUDA, P.; AKULA, S. M.; ABRAMS, S. L.; STEELMAN, L. S.; MARTELLI, A. M.; COCCO, L.; RATTI, S.; CANDIDO, S.; LIBRA, M.; MONTALTO, G.; CERVELLO, M.; GIZAK, A.; RAKUS, D.; MCCUBREY, J. A. Targeting GSK3 and Associated Signaling Pathways Involved in Cancer. **Cells**, v. 9, n. 5, p. 1110, 30 abr. 2020. DOI 10.3390/cells9051110. <https://doi.org/10.3390/cells9051110>.

DUFFY, D. J.; KRSTIC, A.; SCHWARZL, T.; HIGGINS, D. G.; KOLCH, W. GSK3 inhibitors regulate MYCN mRNA levels and reduce neuroblastoma cell viability through multiple mechanisms, including p53 and Wnt signaling. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 13, n. 2, p. 454–467, fev. 2014. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0560-T>.

FRESHNEY, R. I. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. 4. ed. Wiley-Liss, 2000.

GEHRKE, T.; SCHERZAD, A.; ICKRATH, P.; SCHENDZIELORZ, P.; HAGEN, R.; KLEINSASSER, N.; HACKENBERG, S. Zinc oxide nanoparticles antagonize the effect of Cetuximab on head and neck squamous cell carcinoma in vitro. **Cancer Biology & Therapy**, v. 18, n. 7, p. 513–518, 11 maio 2017. DOI10.1080/15384047.2017.1323598.

GHOSH, S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. **Bioorganic Chemistry**, v. 88, p. 102925, jul. 2019. DOI 10.1016/j.bioorg.2019.102925.

GIOANNI, J.; FISCHER, J. L.; LAMBERT, J. C.; DEMARD, F.; MAZEAU, C.; ZANGHELLINI, E.; ETTORRE, F.; FORMENTO, P.; CHAUVEL, P.; LALANNE, C. M. 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 & Clinical Oncology**, v. 24, n. 9, p. 1445–1455, set. 1988. [https://doi.org/10.1016/0277-5379\(88\)90335-5](https://doi.org/10.1016/0277-5379(88)90335-5).

GREENHALGH J, BAGUST A, BOLAND A, FLEEMAN N, MCLEOD C, DUNDAR Y, PROUDLOVE C, SHAW R. Cetuximab for the treatment of recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. **Health Technol Assess**. 2009 Oct;13 Suppl 3:49-54. doi: 10.3310/hta13suppl3/08. PMID: 19846029. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19846029/>.

GUY, JEAN-BAPTISTE, et al. “Combining Radiation to EGFR and Bcl-2 Blockade: A New Approach to Target Cancer Stem Cells in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma”. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, vol. 147, nº 7, julho de 2021, p. 1905–16. PubMed, <https://doi.org/10.1007/s00432-021-03593-8>.

HAO Q, GAO L, NIU W, CHEN L, ZHANG P, CHEN Z. POTE stimulates the proliferation of pancreatic cancer by activating the PI3K/Akt/GSK-3 β /catenin signaling. **BioFactors**. 2020; 46: 685–692. <https://doi.org/10.1002/biof.1640>.

HE, R.; DU, S.; LEI, T.; XIE, X.; WANG, Y. Glycogen synthase kinase 3 β in tumorigenesis and oncotherapy (Review). **Oncology Reports**, v. 44, n. 6, p. 2373–2385, 20 out. 2020. DOI 10.3892/or.2020.7817.

HEDNA, R.; KOVACIC, H.; PAGANO, A.; PEYROT, V.; ROBIN, M.; DEVRED, F.; BREUZARD, G. Tau Protein as Therapeutic Target for Cancer? Focus on Glioblastoma. **Cancers**, v. 14, n. 21, p. 5386, jan. 2022. DOI 10.3390/cancers14215386.

HILLIARD TS, GAISINA IN, MUEHLBAUER AG, GAISIN AM, GALLIER F, BURDETTE JE. Glycogen synthase kinase 3 β inhibitors induce apoptosis in ovarian cancer cells and inhibit in-vivo tumor growth. **Anticancer Drugs**. 2011; 22:978–985. doi: 10.1097/CAD.0b013e32834ac8fc.

HOLOHAN, C., VAN SCHAEYBROECK, S., LONGLEY, D. *et al.* Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nat Rev Cancer** 13, 714–726 (2013). <https://doi.org/10.1038/nrc3599>.

HOWARD, A.; AGRAWAL, N.; GOOI, Z. Lip and Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 35, n. 5, p. 895–911, out. 2021. DOI 10.1016/j.hoc.2021.05.003.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: **INCA**, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/ptbr/assuntos/cancer/tipos/boca>. Acesso em: 4 jan. 2023.

IRANI, S. New Insights into Oral Cancer—Risk Factors and Prevention: A Review of Literature. **International Journal of Preventive Medicine**, v. 11, p. 202, 30 dez. 2020. DOI 10.4103/ijpvm.IJPVM_403_18.

JOHNSON, D. E.; BURTNES, B.; LEEMANS, C. R.; LUI, V. W. Y.; BAUMAN, J. E.; GRANDIS, J. R. Head and neck squamous cell carcinoma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 6, n. 1, p. 1–22, 26 nov. 2020. DOI 10.1038/s41572-020-00224-3.

KAWAZOE H, BILIM VN, UGOLKOV AV, YUUKI K, NAITO S, NAGAOKA A, KATO T, TOMITA Y. GSK-3 inhibition in vitro and in vivo enhances antitumor effect of sorafenib in renal cell carcinoma (RCC). **Biochem Biophys Res Commun**. 2012 Jul 6;423(3):490-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.05.147. Epub 2012 Jun 5. PMID: 22683636.

KHADELA, A.; SHAH, Y.; MISTRY, P.; MANSURI, M.; SUREJA, D.; BODIWALA, K. A review of efficacy and safety of cetuximab and bevacizumab-based monoclonal antibodies in head and neck cancer. **Medical Oncology**, v. 40, n. 1, p. 66, 30 dez. 2022. DOI 10.1007/s12032-022-01939-x.

KHADELA, A., VYAS, B., MANSURI, M. et al. Impact of cetuximab plus cisplatin alone and cetuximab plus cisplatin and paclitaxel regimen on humanistic outcome in head and neck cancer. **J Egypt Natl Canc Inst** 35, 1 (2023). <https://doi.org/10.1186/s43046-023-00160-9>.

KHALIL, A.; JAMESON, M. J. Downregulation of IGF1R Expression Inhibits Growth and Enhances Cisplatin Sensitivity of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells In Vitro. **Hormones and Cancer**, v. 10, n. 1, p. 11–23, 1 fev. 2019. DOI 10.1007/s12672-018-0352-7.

KIM, A., UEDA, Y., NAKA, T. et al. Therapeutic strategies in epithelial ovarian cancer. **J Exp Clin Cancer Res** 31, 14 (2012). <https://doi.org/10.1186/1756-9966-31-14>.

KORNSUTHISOPON, C.; TOMPKINS, K. A.; OSATHANON, T. Tideglusib enhances odontogenic differentiation in human dental pulp stem cells in vitro. **International Endodontic Journal**, v. 56, n. 3, p. 369–384, mar. 2023. DOI 10.1111/iej.13877.

LENISAK, D.; XU, Y.; DESCHENES, J.; LAI, R.; THOMS, J.; MURRAY, D.; GOSH, S.; MACKEY, J.R.; SABRI, S.; ABDULKARIM, B. Beta1-integrin circumvents the antiproliferative effects of trastuzumab in human epidermal growth factor receptor-2-positive breast cancer. **Cancer Res**. 2009, 69, 8620–8628. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1591>.

LI, Q.; TIE, Y.; ALU, A.; MA, X.; SHI, H. Targeted therapy for head and neck cancer: signaling pathways and clinical studies. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 8, n. 1, p. 1–28, 16 jan. 2023. DOI 10.1038/s41392-022-01297-0.

LI, Y.; YANG, C.; GAN, Y.; LU, F.; QIN, Y. Radiotherapy plus cetuximab or cisplatin in head and neck squamous cell carcinoma: an updated systematic review and meta-analysis of

randomized controlled trials. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 280, n. 1, p. 11–22, 1 jan. 2023. DOI 10.1007/s00405-022-07572-8.

LIN C, YU M, WU X, WANG H, WEI M, ZHANG L. Targeting Moonlighting Enzymes in Cancer. **Molecules**. 2024;29(7):1573. Published 2024 Apr 1. doi:10.3390/molecules29071573. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11013064/#B25-molecules-29-01573>.

LIN, J.; SONG, T.; LI, C.; MAO, W. GSK-3 β in DNA repair, apoptosis, and resistance of chemotherapy, radiotherapy of cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1867, n. 5, p. 118659, 1 maio 2020. DOI 10.1016/j.bbamcr.2020.118659.

LING, Z; CHENG, B; TAO, X. Epithelial-to-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma: Challenges and opportunities. **Int J Cancer**. 2021 Apr 1;148(7):1548-1561. Doi: 10.1002/ijc.33352.

LIU, C.; WANG, M.; ZHANG, H.; LI, C.; ZHANG, T.; LIU, H.; ZHU, S.; CHEN, J. Tumor microenvironment and immunotherapy of oral cancer. **European Journal of Medical Research**, v. 27, n. 1, p. 198, 8 out. 2022. DOI 10.1186/s40001-022-00835-4.

LOVESTONE, S.; BOADA, M.; DUBOIS, B.; HÜLL, M.; RINNE, J. O.; HUPPERTZ, H.-J.; CALERO, M.; ANDRÉS, M. V.; GÓMEZ-CARRILLO, B.; LEÓN, T.; DEL SER, T.; ARGO INVESTIGATORS. A phase II trial of tideglusib in Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's disease: JAD**, v. 45, n. 1, p. 75–88, 2015. <https://doi.org/10.3233/JAD-141959>.

MANCINELLI R, CARPINO G, PETRUNGARO S, et al. Multifaceted Roles of GSK-3 in Cancer and Autophagy-Related Diseases. **Oxid Med Cell Longev**. 2017;2017:4629495. doi:10.1155/2017/4629495

MANUAL DE BASES TÉCNICAS DA ONCOLOGIA - **SIA/SUS**. 13 abr. 2018. INCA - Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: [ftp://arpoador.datasus.gov.br/siasus/Documentos/APAC/Manual Oncologia 30a edicao Agosto 2022 25 08 2022.pdf](ftp://arpoador.datasus.gov.br/siasus/Documentos/APAC/Manual%20Oncologia%2030a%20edicao%20Agosto%202022%2025%2008%202022.pdf) Acesso em: 12 jul. 2023.

MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, L.; GONZALO-CONSUEGRA, C.; GÓMEZ-ALMERÍA, M.; PORRAS, G.; DE LAGO, E.; MARTÍN-REQUERO, Á.; MARTÍNEZ, A. Tideglusib, a Non-ATP Competitive Inhibitor of GSK-3 β as a Drug Candidate for the Treatment of Amyotrophic Lateral Sclerosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, p. 8975, jan. 2021. DOI 10.3390/ijms22168975.

MATHURAM, T. L.; RAVIKUMAR, V.; REECE, L. M.; KARTHIK, S.; SASIKUMAR, C. S.; CHERIAN, K. M. Tideglusib induces apoptosis in human neuroblastoma IMR32 cells, provoking sub-G0/G1 accumulation and ROS generation. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 46, p. 194–205, 1 set. 2016. DOI 10.1016/j.etap.2016.07.013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1382668916301910>.

MAZOR M, KAWANO Y, ZHU H, WAXMAN J, KYPTA RM. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 represses androgen receptor activity and prostate cancer cell growth. **Oncogene**. 2004; 23:7882–7892. doi: 10.1038/sj.onc.1208068.

MCCUBREY, J. A.; FITZGERALD, T. L.; YANG, L. V.; LERTPIRIYAPONG, K.; STEELMAN, L. S.; ABRAMS, S. L.; MONTALTO, G.; CERVELLO, M.; NERI, L. M.; COCCO, L.; MARTELLI, A. M.; LAIDLER, P.; DULIŃSKA-LITEWKA, J.; RAKUS, D.; GIZAK, A.; NICOLETTI, F.; FALZONE, L.; CANDIDO, S.; LIBRA, M. Roles of GSK-3 and microRNAs on epithelial

mesenchymal transition and cancer stem cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 8, p. 14221–14250, 16 dez. 2016. DOI 10.18632/oncotarget.13991.

MCCUBREY, J. A.; RAKUS, D.; GIZAK, A.; STEELMAN, L. S.; ABRAMS, S. L.; LERTPIRIYAPONG, K.; FITZGERALD, T. L.; YANG, L. V.; MONTALTO, G.; CERVELLO, M.; LIBRA, M.; NICOLETTI, F.; SCALISI, A.; TORINO, F.; FENGA, C.; NERI, L. M.; MARMIROLI, S.; COCCO, L.; MARTELLI, A. M. Effects of mutations in Wnt/ β -catenin, hedgehog, Notch and PI3K pathways on GSK-3 activity—Diverse effects on cell growth, metabolism and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 12, p. 2942–2976, dez. 2016. DOI 10.1016/j.bbamcr.2016.09.004.

MISHRA R. Glycogen synthase kinase 3 beta: Can it be a target for oral cancer. **Mol Cancer**. 2010; 9:144. doi: 10.1186/1476-4598-9-144.

MISHRA, RAJAKISHORE, et al. “Correction: Expression and Inactivation of Glycogen Synthase Kinase 3 Alpha/ Beta and Their Association with the Expression of Cyclin D1 and P53 in Oral Squamous Cell Carcinoma Progression”. **Molecular Cancer**, vol. 23, no 1, julho de 2024, p. 149. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1186/s12943-024-02058-z>.

MORALES-GARCIA, J. A.; LUNA-MEDINA, R.; ALONSO-GIL, S.; SANZ-SANCRISTOBAL, M.; PALOMO, V.; GIL, C.; SANTOS, A.; MARTINEZ, A.; PEREZ-CASTILLO, A. Glycogen synthase kinase 3 inhibition promotes adult hippocampal neurogenesis in vitro and in vivo. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 3, n. 11, p. 963–971, 21 nov. 2012. DOI 10.1021/cn300110c.

MURARO, E.; FANETTI, G.; LUPATO, V.; GIACOMARRA, V.; STEFFAN, A.; GOBITTI, C.; VACCHER, E.; FRANCHIN, G. Cetuximab in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma: Biological mechanisms involved in efficacy, toxicity and resistance. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 164, p. 103424, ago. 2021. DOI10.1016/j.critrevonc.2021.103424.

NEVES, V. C. M.; BABB, R.; CHANDRASEKARAN, D.; SHARPE, P. T. Promotion of natural tooth repair by small molecule GSK3 antagonists. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 39654, 9 jan. 2017. DOI 10.1038/srep39654.

PAN, H.-Y.; VALAPALA, M. Regulation of Autophagy by the Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) Signaling Pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1709, 1 fev. 2022. DOI 10.3390/ijms23031709.

PÉREZ-HERRERO, E.; FERNÁNDEZ-MEDARDE, A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 93, p. 52–79, jun. 2015. DOI 10.1016/j.ejpb.2015.03.018.

QI, L.; LUO, Q.; ZHANG, Y.; JIA, F.; ZHAO, Y.; WANG, F. Advances in Toxicological Research of the Anticancer Drug Cisplatin. **Chemical Research in Toxicology**, v. 32, n. 8, p. 1469–1486, 19 ago. 2019. DOI 10.1021/acs.chemrestox.9b00204.

QUINTANILHA, J. C. F.; VISACRI, M. B.; SOUSA, V. M.; BASTOS, L. B.; VAZ, C. O.; GUARNIERI, J. P. O.; AMARAL, L. S.; MALAGUTI, C.; LIMA, C. S. P.; VERCESI, A. E.; MORIEL, P. Cisplatin-induced human peripheral blood mononuclear cells' oxidative stress and nephrotoxicity in head and neck cancer patients: the influence of hydrogen peroxide. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 440, n. 1–2, p. 139–145, mar. 2018. <https://doi.org/10.1007/s11010-017-3162-2>.

RAO, A. C.; VENKATESH, K. V.; NANDINI, V.; SIHIVAHANAN, D.; ALAMOUDI, A.; BAHAMMAM, H. A.; BAHAMMAM, S. A.; ZIDANE, B.; BAHAMMAM, M. A.; CHOCHAN, H.; ALBAR, N. H.; YADALAM, P. K.; PATIL, S. Evaluating the Effect of Tideglusib-Loaded Bioactive Glass Nanoparticles as a Potential Dentine Regenerative Material. **Materials**, v. 15, n. 13, p. 4567, 29 jun. 2022. DOI 10.3390/ma15134567.

ROMANI, A. M. P. Cisplatin in cancer treatment. **Biochemical Pharmacology**, v. 206, p. 115323, dez. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115323>.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36368406/>.

RUFFIN, A. T.; LI, H.; VUJANOVIC, L.; ZANDBERG, D. P.; FERRIS, R. L.; BRUNO, T. C. Improving head and neck cancer therapies by immunomodulation of the tumour microenvironment. **Nature Reviews Cancer**, v. 23, n. 3, p. 173–188, mar. 2023. DOI 10.1038/s41568-022-00531-9.

SCHULZ, L.; PRIES, R.; LANKA, A. S.; DRENCKHAN, M.; WOLLENBERG, B. Inhibition of GSK3 α / β impairs the progression of HNSCC. **Oncotarget**, v. 9, n. 45, p. 27630–27644, 12 jun. 2018. DOI 10.18632/oncotarget.25250.

SHIMOZAKI S, YAMAMOTO N, DOMOTO T, *et al.* Efficacy of glycogen synthase kinase-3 β targeting against osteosarcoma via activation of β -catenin. **Oncotarget**. 2016;7(47):77038-77051. doi:10.18632/oncotarget.12781.

SILVA JPN, PINTO B, MONTEIRO L, SILVA PMA, BOUSBAA H. Combination Therapy as a Promising Way to Fight Oral Cancer. **Pharmaceutics**. 2023;15(6):1653. Published 2023 Jun 4. doi:10.3390/pharmaceutics15061653.

SUN A., Li C., Chen R., Huang Y., Chen Q., Cui X., Liu H., Thrasher JB, Li B. Gsk-3 β Controls Autophagy by Modulating LKB1-AMPK Pathway in Prostate Cancer Cells. **The Prostate**. 2016; 76:172–183. doi: 10.1002/pros.23106.
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5408751/>.

SUN, J.; ZHAO, H.; SHEN, C.; LI, S.; ZHANG, W.; MA, J.; LI, Z.; ZHANG, M.; YANG, J. Tideglusib promotes wound healing in aged skin by activating PI3K/Akt pathway. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 13, n. 1, p. 269, 21 jun. 2022. DOI 10.1186/s13287-022-02949-2.

Thapa, Riya, et al. “A review of Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3) inhibitors for cancers therapies”. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 253, dezembro de 2023, p. 127375. ScienceDirect, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127375>.

TRNSKI, D.; SABOL, M.; GOJEVIĆ, A.; MARTINIĆ, M.; OZRETIĆ, P.; MUSANI, V.; RAMIĆ, S.; LEVANAT, S. GSK3 β and Gli3 play a role in activation of Hedgehog-Gli pathway in human colon cancer — Targeting GSK3 β downregulates the signaling pathway and reduces cell proliferation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1852, n. 12, p. 2574–2584, dez. 2015. DOI 10.1016/j.bbadis.2015.09.005.

Umashankar K, Selvaraj J, Ramani P. Gene Expression of GSK3, TGF β -1 and PI3 Kinase In Oral Squamous Cell Carcinoma – A Real Time PCR Based Approach. **Oral Maxillofac Pathol J** 2022; 13(1): page no. 18-22

VANSHIKA, S.; PREETI, A.; SUMAIRA, Q.; VIJAY, K.; SHIKHA, T.; SHIVANJALI, R.; SHANKAR, S. U.; MATI, G. M. Incidence OF HPV and EBV in oral cancer and their clinico-

pathological correlation- a pilot study of 108 cases. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 11, n. 2, p. 180–184, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2021.01.007>.

VERMORKEN, J. B.; MESIA, R.; RIVERA, F.; REMENAR, E.; KAWECKI, A.; ROTTEY, S.; ERFAN, J.; ZABOLOTNYY, D.; KIENZER, H.-R.; CUISSOL, D.; PEYRADE, F.; BENASSO, M.; VYNNYCHENKO, I.; DE RAUCOURT, D.; BOKEMEYER, C.; SCHUELER, A.; AMELLAL, N.; HITT, R. Platinum-Based Chemotherapy plus Cetuximab in Head and Neck Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 11, p. 1116–1127, 11 set. 2008. DOI10.1056/NEJMoa0802656.

VIDRI RJ, FITZGERALD TL. GSK-3: An important kinase in colon and pancreatic cancers. **Biochim Biophys Acta Mol Cell Res**. 2020; 1867:118626. doi: 10.1016/j.bbamcr.2019.118626.

VIKTORSSON, KRISTINA, et al. “Advances in Molecular Targeted Therapies to Increase Efficacy of (Chemo)Radiation Therapy”. **Strahlenther Onkol**, v.199, no 12, dezembro de 2023, p. 1091–109. PubMed, <https://doi.org/10.1007/s00066-023-02064-y>.

WALZ A, UGOLKOV A, CHANDRA S, et al. Molecular Pathways: Revisiting Glycogen Synthase Kinase-3 β as a Target for the Treatment of Cancer. **Clin Cancer Res**. 2017;23(8):1891-1897. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2240.

WANG, H.; HUANG, S.; YAN, K.; FANG, X.; ABUSSAUD, A.; MARTINEZ, A.; SUN, H.-S.; FENG, Z.-P. Tideglusib, a chemical inhibitor of GSK3 β , attenuates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal mice. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1860, n. 10, p. 2076–2085, 1 out. 2016. DOI 10.1016/j.bbagen.2016.06.027.

WANG, R., TANG, D., OU, L. et al. β -Sitosterol alleviates the malignant phenotype of hepatocellular carcinoma cells via inhibiting GSK3B expression. **Human Cell** 37, 1156–1169 (2024). <https://doi.org/10.1007/s13577-024-01081-y>.

WEI, D.; ZHU, X.; LI, S.; LIU, G.; WANG, Y.; WANG, W.; ZHANG, Q.; JIANG, S. Tideglusib suppresses stem-cell-like features and progression of osteosarcoma by inhibiting GSK-3 β /NOTCH1 signaling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 554, p. 206–213, maio 2021. DOI 10.1016/j.bbrc.2020.12.055.

World Health Organization. International Agency for Research on Cancer - IARC. **GLOBOCAN**. GLOBOCAN 2020: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, 2023. Lyon: IARC, 2023. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>. Acesso em: 09 mar 2023.

WU, W., PU, Y. & SHI, J. Nanomedicine-enabled chemotherapy-based synergetic cancer treatments. **J Nanobiotechnol** 20, 4 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12951-021-01181-z>.

YIANNPOULOU, K. G.; PAPAGEORGIOU, S. G. Current and Future Treatments in Alzheimer Disease: An Update. **Journal of Central Nervous System Disease**, v. 12, p. 117957352090739, jan. 2020. DOI 10.1177/1179573520907397. York: Wiley-Liss, 1994. 397 p.

ZAUGG, L. K.; BANU, A.; WALTHER, A. R.; CHANDRASEKARAN, D.; BABB, R. C.; SALZLECHNER, C.; HEDEGAARD, M. A. B.; GENTLEMAN, E.; SHARPE, P. T. Translation Approach for Dentine Regeneration Using GSK-3 Antagonists. **Journal of Dental Research**, v. 99, n. 5, p. 544–551, maio 2020. DOI 10.1177/0022034520908593.

ZENG FY, DONG H, CUI J, LIU L, CHEN T. Glycogen synthase kinase 3 regulates PAX3-FKHR-mediated cell proliferation in human alveolar rhabdomyosarcoma cells. **Biochem Biophys Res Commun**. 2010;391(1):1049-1055. doi:10.1016/j.bbrc.2009.12.017.

ZHANG, S.; GAO, W.; TANG, J.; ZHANG, H.; ZHOU, Y.; LIU, J.; CHEN, K.; LIU, F.; LI, W.; TO, S. K. Y.; WONG, A. S. T.; ZHANG, X.; ZHOU, H.; ZENG, J.-Z. The Roles of GSK-3 β in Regulation of Retinoid Signaling and Sorafenib Treatment Response in Hepatocellular Carcinoma. **Theranostics**, v. 10, n. 3, p. 1230–1244, 1 jan. 2020. DOI 10.7150/thno.38711.

ZHOU A, LIN K, ZHANG S, *et al*. Nuclear GSK3 β promotes tumorigenesis by phosphorylating KDM1A and inducing its deubiquitylation by USP22. **Nat Cell Biol**. 2016;18(9):954-966. doi:10.1038/ncb3396.

ANEXOS

Anexo A - Parecer já submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH-UFSC).

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: O papel do estroma no desenvolvimento e progressão do câncer de boca

Pesquisador: Elena Riet Correa Rivero

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 42976715.3.0000.0121

Instituição Proponente: Departamento de Patologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.005.587

Data da Relatoria: 30/03/2015

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto vinculado à linha de pesquisa "Etiologia, Diagnóstico, Prevenção e Terapias aplicadas à Odontologia", do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFSC. A professora coordenadora faz parte do grupo de Pesquisa em Diagnóstico Bucal da UFSC. O projeto desdobrar-se-á em uma tese de doutorado e um Trabalho de Conclusão de Curso. Como amostra positiva de neoplasia invasiva serão incluídos casos de carcinoma epidermóide de boca (CEB) e como amostra de tecido não neoplásico serão incluídos casos de HFI (hiperplasia fibrosa inflamatória). A seleção dos casos será feita com base no diagnóstico histopatológico e na análise das lâminas coradas em H&E. Com base na casuística desse Serviço de Diagnóstico espera-se no final ao menos 25 casos de DEBM; 25 casos de DEBM, 20 casos de carcinoma epidermóides de boca e 20 casos de HFI.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- O objetivo principal deste projeto é contribuir com o entendimento sobre o processo de invasão do CEB (carcinoma epidermóide de boca), por meio do estudo das interações parênquima/estroma nos mecanismos de crescimento e invasão tumoral.

Objetivo Secundário:

1- Promover um levantamento dos laudos histopatológicos de lesões diagnosticadas como displasias epiteliais, CEB e hiperplasia fibrosa inflamatória (HFI), presentes nos arquivos do

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II (Edifício Santa Clara), R: Desembargador Vitor Lima,
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 1.005.587

Laboratório de Patologia Bucal (LPB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC);

2- Proceder a avaliação histológica dos casos selecionados e Classificar as displasias epiteliais segundo o sistema binário, em displasias de alto risco de

malignização (DEAM) e baixo risco de malignização (DEBM);

3- Investigar a presença de fibroblastos senescentes, por meio de marcadores de senescência celular (p16 e beta galactosidase), assim como por meio de marcadores de FAC (podoplanina), na lâmina própria de DEBM, DEAM e HFI, assim como no estroma de CEB.

4- Investigar a expressão de caveolina-1, osteopontina e MMP-2 na lâmina própria de DEBM, DEAM e HFI, e no CEB.

5- Estabelecer o índice de proliferação epitelial, por meio da marcação do antígeno Ki-67, em DEBM, DEAM, HFI e CEB;

6- Comparar a expressão das proteínas em estudo nos casos de DEBM, DEAM, HFI e CEB;

7- Comparar a expressão das proteínas em estudo nos casos de displasias epiteliais que evoluíram para carcinoma epidermóide;

8- Fazer a correlação das proteínas em estudo nos casos de DEBM, DEAM, HFI e CEB.

9- Correlacionar os achados deste estudo com os já existentes na literatura.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Em relação aos riscos da pesquisa, os pesquisadores esclarecem que "Durante a pesquisa será apenas utilizado o material resultante de biópsia da lesão, previamente realizada, o qual encontra-se armazenado nos arquivos do LPB, sem causar qualquer tipo de desconforto aos pacientes. Como haverá acesso aos dados presentes nas fichas de biópsia e laudos histopatológicos, há um risco de perda de sigilo dessas informações, mas os pesquisadores garantem que tomarão todos os cuidados para evitar que isso ocorra".

No que se refere aos benefícios do estudo, observa-se que "envolvem a produção de conhecimento científico podendo servir de base para outros estudos, e possivelmente tentar ajudar os próximos pacientes que tenham a mesma doença no futuro, facilitando o seu diagnóstico".

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem comentários adicionais.

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II (Edifício Santa Clara), R: Desembargador Vitor Lima,
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 1.005.587

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos necessários ao processo estão disponíveis na Plataforma Brasil e de acordo com a legislação vigente: folha de rosto; projeto de pesquisa; informações detalhadas sobre o projeto, incluindo cronograma e orçamento; e termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) a ser apresentado aos participantes da pesquisa.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

De acordo com o exposto nesse parecer, o projeto de pesquisa "O papel do estroma no desenvolvimento e progressão do câncer de boca" deve ser considerado APROVADO.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

FLORIANOPOLIS, 30 de Março de 2015

Assinado por:
Washington Portela de Souza
(Coordenador)

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II (Edifício Santa Clara), R: Desembargador Vitor Lima,
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br