



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Gilberto de Souza Melo

**EFEITOS BIOLÓGICOS DOS COMPOSTOS MIMÉTICOS DE BH3 SOBRE
CÉLULAS DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE BUCAL E FIBROBLASTOS ORAIS**

Florianópolis

2022

Gilberto de Souza Melo

**EFEITOS BIOLÓGICOS DOS COMPOSTOS MIMÉTICOS DE BH3 SOBRE
CÉLULAS DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE BUCAL E FIBROBLASTOS ORAIS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), como requisito para obtenção do título de Doutor em Odontologia – Área de Concentração: Diagnóstico Bucal.

Orientador (a): Prof^a Dr^a Elena Riet Correa Rivero

Coorientador (a): Prof^a Dr^a Carolina Amália Barcellos Silva

Florianópolis

2022

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

Melo, Gilberto de Souza

EFEITOS BIOLÓGICOS DOS COMPOSTOS MIMÉTICOS DE BH3 SOBRE
CÉLULAS DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE BUCAL E FIBROBLASTOS ORAIS
/ Gilberto de Souza Melo; orientador, Elena Riet Correa
Rivero, coorientador, Carolina Amália Barcellos Silva, 2022.
226 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Odontologia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Odontologia. 2. Carcinoma epidermoide. 3.
Proteínas BCL-2. 4. Senescência celular. 5. Fibroblastos. I.
Rivero, Elena Riet Correa. II. Silva, Carolina Amália
Barcellos. III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Odontologia.
IV. Título.

Gilberto de Souza Melo

**EFEITOS BIOLÓGICOS DOS COMPOSTOS MIMÉTICOS DE BH3 SOBRE
CÉLULAS DE CARCINOMA EPIDERMOIDE BUCAL E FIBROBLASTOS ORAIS**

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 25 de agosto de 2022, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof^a Dr^a Ariadne Cristiane Cabral da Cruz (Membro titular interno)
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a Dr^a Izabella Thaís da Silva (Membro titular interno)
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr^a Kamile Leonardi Dutra Horstmann (Membro titular externo)
Centro de Pesquisas Oncológicas

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

Prof^a Dr^a Mariane Cardoso
(Coordenadora do PPGO)

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a Dr^a Elena Riet Correa Rivero
(Orientadora)

Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2022.

Este trabalho é dedicado aos meus pais,
amigos e professores.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Gilberto Melo** e **Ligia Melo**, pelo suporte, carinho e compreensão ao longo desta longa trajetória. A vocês devo minhas conquistas e com vocês divido minhas frustrações. Agradeço por estarem sempre presentes, independentemente da distância.

Ao meu irmão, **Fabio Melo**, pelo companheirismo durante essa fase em que moramos novamente sobre um mesmo teto, dessa vez em Florianópolis. Agradeço também por toda sua contribuição, direta ou indireta, durante a execução deste trabalho.

À minha orientadora, profa. **Elena Riet Correa Rivero**, pelos ensinamentos, mentorias e oportunidades. As suas contribuições, desde as etapas de planejamento e aporte de recursos financeiros até as etapas de execução e revisão crítica, foram essenciais para que esse trabalho se tornasse possível.

À minha co-orientadora, profa. **Carolina Amália Barcellos Silva**, pela disponibilização da linhagem celular em estudo e por todas as suas contribuições nas etapas de planejamento e execução desta pesquisa.

À minha amiga e principal co-autora durante a pós-graduação, **Fernanda Weber**, pela parceria, companheirismo e importante contribuição para a execução da presente pesquisa e de outros trabalhos.

Às coordenadoras do Laboratório de Virologia Aplicada (LVA-UFSC), profa. **Ariadne Cristiane Cabral da Cruz**, profa. **Gislaine Fongaro** e profa. **Izabella Thaís da Silva**. Agradeço pelas oportunidades, ensinamentos e pelo acolhimento durante a minha passagem pelo LVA. O apoio de vocês foi fundamental para o meu desenvolvimento na área de cultivo celular.

Aos atuais integrantes e ex-integrantes do LVA, em especial **Isabella Dai Prá**, **Luiza Matos**, **Mariane Sordi**, **Rafael Cadamuro** e **Raíssa Curtarelli**. Agradeço pela disponibilidade e apoio de cada um de vocês nas diversas ocasiões em que precisei de algum tipo de ajuda durante a execução desta pesquisa.

À profa. **Mabel Mariela Rodriguez Cordeiro** e à profa. **Jussara Maria Gonçalves**, por todo o apoio nas etapas iniciais do projeto e pela disponibilização de materiais para uso na presente pesquisa.

Ao prof. **Eduardo Antunes Bortoluzzi**, pelo aporte de recursos financeiros destinados a compra de equipamentos. Sua contribuição foi fundamental para que o Laboratório de Cultivo Celular do PPGO-UFSC fosse colocado em funcionamento.

À equipe do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB-UFSC), **Bibiana Sgorla de Almeida, Denis Dall Agnolo e Flávia Cardoso Amaral**. Agradeço pelo apoio técnico-científico para operação do citômetro de fluxo, interpretação e análise dos resultados.

Ao prof. **Eduardo Dalmarco** e à doutoranda **Tainá Lubschinski**, pela prontidão e disponibilidade em auxiliar com o armazenamento de reagentes no ultrafreezer do Laboratório de Pesquisa em Imunologia (LAPI-UFSC).

Aos meus amigos de longa data, **Davi Oliveira, Guilherme Santos, Letícia Berretta e Marília Fuller**, por estarem presentes em várias etapas da minha vida. Agradeço pela amizade, apoio e compreensão ao longo dessa jornada.

Aos meus amigos e colegas da pós-graduação, **Ana Guadalupe, Angélica Reinheimer, André Poletto, Andressa Paza, Bubacar Embaló, Carolina Flausino, Elis Batistella, Emanuely da Silva, Fernanda Scotti, Natália Bordignon, Nicole Lonni, Pedro Kammer, Rúbia Stuepp e Sarah Pilati**. Agradeço pelas parcerias tanto dentro quanto fora do ambiente acadêmico. A convivência com cada um de vocês foi muito importante durante esse período.

Aos professores do Laboratório de Patologia Bucal (LPB-UFSC), prof. **Felipe Daltoé**, prof. **Filipe Modolo**, profa. **Liliane Grandó** e prof. **Rogério Gondak**. Agradeço pelos ensinamentos durante as aulas e rotinas de diagnóstico e também pelos conselhos durante minha passagem pelo laboratório.

Aos atuais integrantes e ex-integrantes do LPB, **Gabriely Franzoi, Gilmara David Lemos, Júlia Pedron, Kelli Scatolin, Letícia Thiesen e Nicolle Francisconi** por todo o apoio durante meu período no laboratório. A amizade e companhia de vocês foram muito importantes para que a rotina dentro e fora do laboratório fosse mais descontraída e menos exaustiva.

Aos professores, atuais integrantes e ex-integrantes do Centro Brasileiro de Pesquisas Baseadas em Evidências (COBE-UFSC), profa. **Graziela De Luca Canto**, prof. **André Porporatti**, prof. **Carlos Flores-Mir, Fabio Domingos, Helena Polmann, Jéssica Conti Réus, João Victor Bett, Joyce Duarte, Júlia Meller, Kamile Dutra, Lia Honnef e Patrícia Pauletto**. Agradeço pela contribuição que vocês tiveram ao

longo dessa jornada, foi com vocês que iniciei no caminho da pesquisa acadêmica e desenvolvi o senso de trabalho em equipe.

Aos professores, atuais integrantes e ex-integrantes do Centro Especializado no Tratamento da Dor Crônica (CEMDOR-UFSC), profa. **Beatriz Mendes, Adriana Archer, Fernanda Berretta e Ligia Valesan**. Agradeço pelas oportunidades e trocas de experiências ao longo desse período.

Ao prof. **Daniel Araujo Fernandes** e Dr. **Fernando de Lima**. Agradeço pelo apoio, compreensão e oportunidades que vocês me proporcionaram durante a pós-graduação, incluindo as parcerias com o Laboratório de Engenharia Biomecânica (LEBm-UFSC).

Aos **Professores e Coordenadores** do PPGO-UFSC, pelo árduo trabalho de planejamento estratégico para o constante aprimoramento do programa, pelo esforço em lidar com burocracias e regulamentações para captação de recursos financeiros e pela transmissão de conhecimentos para a formação de mestres e doutores.

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.

À **Universidade Federal de Santa Catarina**, que foi minha segunda casa por mais de uma década. Agradeço pela disponibilização de infraestrutura, recursos financeiros e recursos humanos para que a presente pesquisa fosse executada.

À **Sociedade Brasileira**, por possibilitar que a Universidade Pública continue contribuindo com a formação de recursos humanos, avançando o conhecimento técnico-científico e desenvolvendo novas tecnologias.

RESUMO

Introdução: Considerando terapias anticâncer envolvendo alvos moleculares específicos, compostos miméticos de BH3 podem atuar de modo mais seletivo em células tumorais, minimizando possíveis efeitos adversos. Esses compostos podem, ainda, apresentar propriedades senolíticas e atuar em componentes do microambiente tumoral, tais como fibroblastos senescentes. Destaca-se que células senescentes podem acumular no organismo, resultando em efeitos deletérios.

Objetivos: Revisar a literatura acerca dos efeitos anticâncer dos miméticos de BH3 sobre carcinomas de cabeça e pescoço e avaliar, *in-vitro*, os efeitos biológicos de dois desses compostos (Navitoclax e Venetoclax) sobre células de carcinoma epidermoide bucal (CEB) e diferentes fenótipos de fibroblastos orais.

Métodos: Uma revisão narrativa foi realizada com base em estudos que avaliaram miméticos de BH3 (putativos ou validados) sobre linhagens celulares de carcinoma, modelos xenográficos e/ou participantes humanos. Ademais, o estudo *in-vitro* foi realizado com uma linhagem imortalizada de CEB (CAL27) e uma linhagem primária de fibroblastos gengivais humanos (HGF). Os efeitos biológicos dos compostos Navitoclax e Venetoclax sobre a linhagem de CEB foram investigados através dos ensaios de citotoxicidade, proliferação e migração. Para verificar se o efeito foi seletivo para células tumorais, esses mesmos ensaios foram realizados em células de HGF com fenótipo normal. Além disso, um ensaio para marcadores de morte celular (apoptose e necrose) foi realizado considerando células de CEB e células de HGF com fenótipo senescente.

Resultados: Foram incluídos 40 estudos para análise na revisão, os quais demonstraram resultados promissores no que tange a indução de morte celular e inibição do crescimento tumoral. Os estudos também demonstraram que os miméticos de BH3 podem sensibilizar as células tumorais para estímulos apoptóticos, podendo aumentar a eficácia de outras terapias envolvendo quimioterápicos convencionais e/ou radiação ionizante. Considerando o estudo *in-vitro* realizado, foi observado que os compostos Navitoclax e Venetoclax apresentaram efeito citotóxico relevante e seletivo para células de CEB, especialmente em concentrações entre 10 μM e 20 μM , além de apresentar uma importante inibição nas capacidades de proliferação e migração dessas células. Além disso, o composto Navitoclax aumentou significativamente a expressão de marcadores de apoptose em células de CEB. Não foram observados efeitos citotóxicos relevantes em HGF com fenótipo senescente, indicando que esse tipo celular não apresentou susceptibilidade aos miméticos de BH3 em concentrações citotóxicas para células de CEB.

Conclusões: Os compostos miméticos de BH3 apresentaram resultados promissores no que tange o desenvolvimento de novas terapias anticâncer envolvendo alvos moleculares específicos. Estudos prévios e resultados do presente estudo *in-vitro* demonstraram efeitos biológicos seletivos para células tumorais. Entretanto, não foi observado um efeito senolítico relevante nas concentrações citotóxicas para células de CEB considerando os métodos e compostos utilizados no presente estudo. Desse modo, a realização de futuras pesquisas nesse contexto é encorajada, envolvendo a combinação de múltiplos miméticos de BH3 com alvos moleculares complementares e/ou com terapias convencionais, como quimioterápicos e radiação ionizante.

Palavras-chave: Carcinoma Epidermoide; Proteínas BCL-2; Apoptose. Microambiente Tumoral. Fibroblastos. Senescência Celular.

ABSTRACT

Introduction: In the context of molecularly-targeted therapies, BH3 mimetic drugs may present biological effects that are selective to tumour cells, whilst also minimising potential adverse effects. These drugs can present senolytic properties and eliminate several cell types from the tumour microenvironment, such as senescent fibroblasts. These cells can accumulate in the organism and result in potential deleterious effects.

Objectives: To review the literature concerning the anticancer effects of BH3 mimetic drugs on head and neck squamous cell carcinomas and also to evaluate the *in-vitro* biological effects of two BH3-mimetics (Navitoclax and Venetoclax) on oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells and on different phenotypes of oral fibroblasts (non-senescent and senescent).

Methods: A narrative review was conducted based on studies that evaluated the effect of BH3-mimetics (putative or validated) on malignant cell lines, xenograft models and/or human participants. Moreover, the *in-vitro* study was conducted using an immortalized OSCC cell line (CAL27) and a primary cell line of human gingival fibroblasts (HGF). The biological effects of Navitoclax and Venetoclax on the OSCC cell line were assessed through the cytotoxicity assay, proliferation assay, and migration assay. To assess whether the effects were selective to tumour cells, these assays were also conducted on non-senescent HGF cells. In addition, a cell death assay (apoptosis and necrosis) was performed considering OSCC cells and HGF cells with senescent phenotype.

Results: A total of 40 studies were included in the narrative review and promising results were found considering the BH3 mimetic capabilities considering cell death induction and tumour growth inhibition. Studies also showed that BH3-mimetics can sensitise tumour cells to apoptotic stimuli, thus enhancing the efficacy of other therapies such as chemotherapy and/or radiotherapy. Considering results from the present *in-vitro* study, it was found that both Navitoclax and Venetoclax presented relevant cytotoxic effects that were selective to OSCC cells (especially considering the 10 μ M e 20 μ M concentrations), and also presented inhibition capabilities considering OSCC cell proliferation and migration. In addition, the BH3-mimetic Navitoclax showed a significant increase in the expression of apoptosis markers considering OSCC cells. Concerning HGF with senescent phenotype, both Navitoclax and Venetoclax did not show relevant cytotoxic effects, indicating that this cell type was not susceptible to the investigated BH3-mimetic drugs considering doses that were otherwise cytotoxic for OSCC cells.

Conclusions: BH3-mimetic drugs showed promising results concerning the development of novel molecularly-targeted therapies for cancer management. Results from previous studies and from the present *in-vitro* study showed that these drugs can exert biological effects that are selective to malignant cells. Nonetheless, no relevant senolytic effects were found considering the methods and compounds used in the present research. Therefore, future research on this topic is encouraged, particularly considering the potential combination of multiple BH3-mimetic drugs with complementary molecular targets and also with conventional treatments, such as chemotherapy and/or radiotherapy.

Keywords: Squamous Cell Carcinoma; BH3 Interacting Domain Death Agonist Protein; Apoptosis; Tumor Microenvironment; Fibroblasts; Cellular Senescence.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Figura representativa das 6 principais alterações para o desenvolvimento e progressão do câncer, originalmente propostas no ano 2000, incluindo: 1) autossuficiência em fatores de crescimento; 2) insensibilidade a supressores do crescimento; 3) invasão tecidual e metástase; 4) capacidade replicativa ilimitada; 5) angiogênese sustentada; e 6) evasão dos mecanismos de morte celular.37
- Figura 2** - Figura representativa das capacidades funcionais e habilitantes, propostas no ano de 2011, para o desenvolvimento e progressão do câncer.39
- Figura 3** - Figura representativa das capacidades funcionais e habilitantes, propostas no ano de 2022, para o desenvolvimento e progressão do câncer.41
- Figura 4** - Proteínas antiapoptóticas e proapoptóticas da família BCL-2. Proteínas antiapoptóticas compartilham homologia entre os domínios BH1 a BH4. Algumas proteínas proapoptóticas podem compartilhar homologia entre os domínios BH1 a BH3, entretanto, determinadas proteínas proapoptóticas apresentam somente homologia com a região BH3, sendo consideradas proteínas BH3-exclusivas.45
- Figura 5** - Diagrama representativo do mecanismo de apoptose pela via mitocôndria-dependente. A partir de estímulo apoptóticos, ocorre indução das proteínas proapoptóticas da família BCL-2 (direta- ou indiretamente, através da proteína p53). Essas proteínas antagonizam a ação das proteínas BCL-2 antiapoptóticas, resultando na ativação das proteínas efetoras BAX e BAK e liberação de citocromo C para o citoplasma. Subsequentemente, ocorre a iniciação da cascata de proteínas caspases, as quais são responsáveis pela iniciação do mecanismo de apoptose.46
- Figura 6** - Efeito Warburg reverso. As células tumorais, através da produção e secreção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e espécies reativas de oxigênio (ROS), induzem estresse oxidativo em células do microambiente tumoral. Isso desencadeia uma disfunção mitocondrial e mudança no metabolismo energético nas células do estroma, as quais passam a produzir lactato a partir de glicólise aeróbia. O lactato produzido retroalimenta as células tumorais para suprir sua alta demanda energética.53
- Figura 7** - (do artigo publicado em língua inglesa) - Graphical abstract.59

- Figura 8** - Fotomicrografia das células de CEB em cultivo (linhagem permanente CAL27). Observa-se células com fenótipo epitelial, morfologia poligonal, citoplasma granular e variados tamanhos (Zeiss AxioVert 40C, 10x, Zeiss, Oberkochen, Alemanha). a) Filtro de campo claro e b) filtro de contraste de fase. 108
- Figura 9** - Fotomicrografias (Zeiss AxioVert 40C, 10x) dos fibroblastos gengivais humanos (linhagem primária HGF) em cultivo. Observa-se células com fenótipo mesenquimal, morfologia dendrítica, estrelada e/ou fusiforme, apresentando ainda diversos prolongamentos citoplasmáticos. a) Filtro de campo claro e b) filtro de contraste de fase. 111
- Figura 10** - Fotomicrografias (Zeiss AxioVert 40C, 10x, contraste de fase) demonstrando (a) HGF não-senescentes entre a #6 e #10 passagem (morfologia fusiforme e alongada) e (b) HGF com fenótipo senescente, após 72h do segundo tratamento com peróxido de hidrogênio (morfologia irregular e achatada, com aumento do tamanho do citoplasma e do número de prolongamentos citoplasmáticos). 113
- Figura 11** - Painel representativo do ensaio de migração (linhagem CAL27). a) Fotomicrografia original (Zeiss AxioVert 40C, 4x, adaptador 0,5x) da ferida na monocamada celular, realizada com auxílio de uma ponteira de 200 µL e b) Imagem processada pelo software ImageJ para mensuração da área da ferida. 118
- Figura 12** - Fotomicrografias (Zeiss AxioVert 40C, 5x, campo claro) representando a marcação de β-galactosidase associada a senescência em (a) HGF não-senescentes, entre a #6 e #10 passagem e (b) HGF com fenótipo senescente, 72h após o segundo tratamento com H₂O₂. 121
- Figura 13** - Ensaio de citotoxicidade (CAL27). Gráficos de regressão linear e curva concentração-resposta considerando o percentual de crescimento celular das células de CEB em relação ao composto Navitoclax em diferentes tempos e concentrações. 123
- Figura 14** - Ensaio de citotoxicidade (CAL27). Gráfico Box-Plot apresentando o percentual de crescimento celular considerando o composto Navitoclax em diferentes tempos experimentais para cada concentração (relação tempo-dependente). 124
- Figura 15** - Ensaio de citotoxicidade (CAL27). Gráfico Box-Plot apresentando o percentual de crescimento celular considerando o composto Navitoclax em diferentes

concentrações para cada tempo experimental (relação concentração-dependente).	125
Figura 16 - Ensaio de citotoxicidade (CAL27). Gráficos de regressão linear e curva concentração-resposta considerando o percentual de crescimento celular das células de CEB considerando o composto Venetoclax em diferentes tempos e concentrações.	125
Figura 17 - Ensaio de citotoxicidade (CAL27). Gráfico Box-Plot apresentando o percentual de crescimento celular considerando o composto Venetoclax em diferentes tempos experimentais para cada concentração (relação tempo-dependente)......	126
Figura 18 - Ensaio de citotoxicidade (CAL27). Gráfico Box-Plot apresentando o percentual de crescimento celular considerando o composto Venetoclax em diferentes concentrações para cada tempo experimental (relação concentração-dependente).	127
Figura 19 - Ensaio de citotoxicidade (HGF não-senescentes). Gráfico Box-Plot apresentando o percentual de crescimento celular considerando diferentes compostos (DMEM, Navitoclax e Venetoclax) em diferentes concentrações (5 μ M, 10 μ M e 20 μ M) no tempo de 72h.	130
Figura 20 - Ensaio de citotoxicidade (HGF senescentes). Gráfico Box-Plot apresentando o percentual de crescimento celular considerando diferentes compostos (DMEM, Navitoclax e Venetoclax) em diferentes concentrações (5 μ M, 10 μ M e 20 μ M) no tempo de 72h.	132
Figura 21 - Ensaio de proliferação (CAL27). Gráfico de linhas demonstrando a curva- padrão com base na intensidade de fluorescência e número correspondente de células.	133
Figura 22 - Ensaio de proliferação (CAL27). Gráfico Box-Plot apresentando o número de células para o controle (DMEM) nos tempos de 0h e 72h e para os compostos experimentais Navitoclax e Venetoclax (10 μ M e 20 μ M) no tempo de 72h.	134
Figura 23 - Ensaio de proliferação (HGF não-senescentes). Gráfico de linhas apresentando a curva-padrão com base na intensidade de fluorescência e número correspondente de células.	135

Figura 24 - Ensaio de proliferação (HGF não-senescentes). Gráfico Box-Plot apresentando o número de células para o controle (DMEM) nos tempos de 0h e 72h e para os compostos experimentais Navitoclax e Venetoclax (10 μ M e 20 μ M) no tempo de 72h.	137
Figura 25 - Ensaio de migração (CAL27). Gráfico Box-Plot apresentando o percentual de fechamento da área da ferida para o controle negativo (DMEM) e os compostos a) Navitoclax (10 μ M e 20 μ M) e b) Venetoclax (10 μ M e 20 μ M) nos tempos de 24h e 48h.	139
Figura 26 - Painel de fotomicrografias (Zeiss AxioVert 40C, 4x, adaptador 0,5x) do ensaio de migração (" <i>Scratch</i> ") representativo em relação à linhagem de CEB (CAL27). As imagens representam o fechamento da área da ferida para o controle (DMEM) e o composto Navitoclax (10 μ M e 20 μ M) nos tempos de 24h e 48h.	140
Figura 27 - Painel de fotomicrografias (Zeiss AxioVert 40C, 4x, adaptador 0,5x) representativo do ensaio de migração (" <i>Scratch</i> ") em relação à linhagem de CEB (CAL27). As imagens representam o fechamento da área da ferida para o controle (DMEM) e o composto Venetoclax (10 μ M e 20 μ M) nos tempos de 24h e 48h.	141
Figura 28 - Ensaio de migração (HGF não-senescentes). Gráfico Box-Plot apresentando o percentual de fechamento da área da ferida para o controle negativo (DMEM) e os compostos a) Navitoclax (10 μ M e 20 μ M) e b) Venetoclax (10 μ M e 20 μ M) nos tempos de 24h, 48h e 72h.....	144
Figura 29 - Painel de fotomicrografias (Zeiss AxioVert 40C, 4x, adaptador 0,5x) representativo do ensaio de migração (HGF não-senescentes). As imagens representam o fechamento da área da ferida para o controle (DMEM) e o composto Navitoclax (10 μ M e 20 μ M) nos tempos de 24h, 48h e 72h.	145
Figura 30 - Painel representativo de fotomicrografias (Zeiss AxioVert 40C, 4x, adaptador 0,5x) do ensaio de migração (HGF não-senescentes). As imagens representam o fechamento da área da ferida para o controle (DMEM) e o composto Venetoclax (10 μ M e 20 μ M) nos tempos de 24h, 48h e 72h.	146
Figura 31 - 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), Navitoclax e Venetoclax no tempo de 48h.	148

Figura 32 - Ensaio de apoptose (HGF senescentes). Gráficos Dot-Plot para intensidade de fluorescência considerando os marcadores anexina V e iodeto de propídio para o controle negativo (DMEM), Navitoclax e Venetoclax no tempo de 48h.	149
Figura 33 - Ensaio de citotoxicidade (CAL27). Gráfico Box-Plot apresentando o percentual de crescimento celular considerando o solvente (DMSO) em diferentes concentrações para cada tempo experimental (24h, 48h e 72h).....	155
Figura 34 - Ensaio de citotoxicidade (HGF não-senescentes). Gráfico Box-Plot apresentando o percentual de crescimento celular considerando o solvente (DMSO) em diferentes concentrações no tempo experimental de 72h.	157
Figura 35 - Ensaio de citotoxicidade (HGF senescentes). Gráfico Box-Plot apresentando o percentual de crescimento celular considerando o solvente (DMSO) em diferentes concentrações no tempo experimental de 72h.	159
Figura 36 - Ensaio de proliferação (CAL27). Gráfico Box-Plot apresentando o número de células para o controle (DMEM) nos tempos de 0h e 72h e para o solvente DMSO (0,25%) no tempo de 72h.....	160
Figura 37 - Ensaio de proliferação (HGF não-senescentes). Gráfico Box-Plot apresentando o número de células para o controle (DMEM) nos tempos de 0h e 72h e para o solvente DMSO (0,25%) no tempo de 72h.....	162
Figura 38 - Ensaio de migração (CAL27). Gráfico Box-Plot apresentando o percentual de fechamento da área da ferida para o controle negativo (DMEM) e o solvente DMSO (0,25%) nos tempos de 24h e 48h.	163
Figura 39 - Ensaio de migração (HGF não-senescentes). Gráfico Box-Plot apresentando o percentual de fechamento da área da ferida para o controle negativo (DMEM) e o solvente DMSO (0,25%) nos tempos de 24h, 48h e 72h.	165

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - (do artigo publicado em língua inglesa). Table 1 - BH3-mimetic drugs found across HNSCC studies. Validation status and molecular targets.	88
Tabela 2 - (do artigo publicado em língua inglesa). Table 2 - Validation status of head and neck squamous cell carcinomas cell lines assessed across included studies, according to the latest report (June 2021, v11) of the International Cell Line Authentication Committee (ICLAC).	89
Tabela 3 - (do artigo publicado em língua inglesa). Table 3 Validated BH3-mimetic drugs. Characteristics and main findings of preclinical studies assessing ABT-737 and derivatives (navitoclax and venetoclax) in head and neck squamous cell carcinomas (either as single-agents or combined with chemotherapy/ionising radiation).	90
Tabela 4 - (do artigo publicado em língua inglesa). Table 4 - Validated BH3-mimetic drugs. Characteristics and main findings of preclinical studies assessing the combination of multiple BH3-mimetic drugs in head and neck squamous cell carcinomas.	94
Tabela 5 - (do artigo publicado em língua inglesa). Table 5 - Putative BH3-mimetic drugs. Characteristics and main findings of preclinical studies assessing Gossypol and derivatives (TW-37 and ApoG2) in head and neck squamous cell carcinomas (either as single-agents or combined with chemotherapy/ionising radiation).	96
Tabela 6 - (do artigo publicado em língua inglesa). Table 6 - Putative BH3-mimetic drugs. Characteristics and main findings of preclinical studies assessing obatoclax, sabutoclax, and YC137 on head and neck squamous cell carcinomas (either as single-agents or combined with chemotherapy/ionising radiation).	102
Tabela 7 - (do artigo publicado em língua inglesa). Table 7 - Methods used for detection of cell death across included studies assessing the effects of validated and putative BH3-mimetics in head and neck squamous cell carcinomas.	104
Tabela 8 - Ensaio de citotoxicidade (CAL27). Medidas sumárias (média e mediana) e respectivas medidas de dispersão (desvio padrão e intervalo interquartil) relativas ao percentual de crescimento celular considerando diferentes compostos (DMEM,	

Navitoclax e Venetoclax, concentrações (5 μ M, 10 μ M e 20 μ M) e tempos experimentais (24h, 48h e 72h).....	122
Tabela 9 - Ensaio de citotoxicidade (CAL27). Concentrações citotóxicas para 50% das células (CC50) e intervalo de confiança de 95% em relação ao composto Navitoclax nos tempos de 24h, 48h e 72h.....	123
Tabela 10 - Ensaio de citotoxicidade (CAL27). Concentrações citotóxicas para 50% das células (CC50) e intervalo de confiança de 95% considerando o composto Venetoclax nos tempos de 24h, 48h e 72h.	126
Tabela 11 - Ensaio de citotoxicidade (CAL27). Probabilidades de significância (valores de p) considerando os compostos Navitoclax e Venetoclax em diferentes concentrações (5 μ M, 10 μ M e 20 μ M) e tempos experimentais (24h, 48h e 72h)..	128
Tabela 12 - Ensaio de citotoxicidade (HGF). Medidas sumárias (média e mediana) e respectivas medidas de dispersão (desvio padrão e intervalo interquartil) relativas ao percentual de crescimento celular considerando diferentes compostos (DMEM, Navitoclax e Venetoclax) e concentrações (5 μ M, 10 μ M e 20 μ M) no tempo experimental de 72h.....	129
Tabela 13 - Ensaio de citotoxicidade (HGF senescentes). Medidas sumárias (média e mediana) e respectivas medidas de dispersão (desvio padrão e intervalo interquartil) relativas ao percentual de crescimento celular considerando diferentes compostos (DMEM, Navitoclax e Venetoclax) e concentrações (5 μ M, 10 μ M e 20 μ M) no tempo experimental de 72h.....	131
Tabela 14 - Ensaio de proliferação (CAL27). Medidas sumárias (média e mediana) e respectivas medidas de dispersão (desvio padrão e intervalo interquartil) em relação ao número de células para o controle (DMEM) nos tempos de 0h e 72h e para os compostos experimentais Navitoclax e Venetoclax (10 μ M e 20 μ M) no tempo de 72h.	133
Tabela 15 - Ensaio de proliferação (HGF não-senescentes). Medidas sumárias (média e mediana) e respectivas medidas de dispersão (desvio padrão e intervalo interquartil) em relação ao número de células para o controle (DMEM) nos tempos de 0h e 72h e para os compostos experimentais Navitoclax e Venetoclax (10 μ M e 20 μ M) no tempo de 72h.	136

Tabela 16 - Ensaio de migração (CAL27). Medidas sumárias (média e mediana) e respectivas medidas de dispersão (desvio padrão e intervalo interquartil) relativas ao percentual de fechamento da área da ferida considerando diferentes compostos (DMEM, Navitoclax e Venetoclax), concentrações (10 µM e 20 µM) e tempos experimentais (24h e 48h).....	138
Tabela 17 - Ensaio de migração (CAL27). Probabilidades de significância (valores de p) considerando os compostos Navitoclax e Venetoclax em diferentes concentrações (10 µM e 20 µM) e tempos experimentais (24h, 48h).....	142
Tabela 18 - Ensaio de migração (HGF não-senescentes). Medidas sumárias (média e mediana) e respectivas medidas de dispersão (desvio padrão e intervalo interquartil) relativas ao percentual de fechamento da área da ferida considerando diferentes compostos (DMEM, Navitoclax e Venetoclax), concentrações (10 µM e 20 µM) e tempos experimentais (24h, 48h e 72h).	143
Tabela 19 - Ensaio de apoptose (CAL27). Medidas sumárias (média geométrica) e respectivas medidas de dispersão (desvio padrão) relativas à intensidade de fluorescência de anexina V e iodeto de propídio para os compostos DMEM, Navitoclax (20 µM) e Venetoclax (20 µM) no tempo experimental de 48h.....	147
Tabela 20 - Ensaio de apoptose (HGF senescentes). Medidas sumárias (média geométrica) e respectivas medidas de dispersão (desvio padrão) relativas ao a intensidade de fluorescência para os compostos DMEM, Navitoclax (20 µM) e Venetoclax (20 µM) no tempo experimental de 48h.....	149
Tabela 21 - Ensaio de citotoxicidade (CAL27). Medidas sumárias (média e mediana) e respectivas medidas de dispersão (desvio padrão e intervalo interquartil) relativas ao percentual de crescimento celular considerando o controle negativo (DMEM) e o solvente (DMSO) em diferentes tempos experimentais (24h, 48h e 72h).	154
Tabela 22 - Ensaio de citotoxicidade (HGF não-senescentes). Medidas sumárias (média e mediana) e respectivas medidas de dispersão (desvio padrão e intervalo interquartil) relativas ao percentual de crescimento celular considerando o controle negativo (DMEM) e o solvente (DMSO) no tempo de 72h.	156
Tabela 23 - Ensaio de citotoxicidade (HGF senescentes). Medidas sumárias (média e mediana) e respectivas medidas de dispersão (desvio padrão e intervalo interquartil)	

relativas ao percentual de crescimento celular considerando o controle negativo (DMEM) e o solvente (DMSO) no tempo de 72h..... 158

Tabela 24 - Ensaio de proliferação (CAL27). Medidas sumárias (média e mediana) e respectivas medidas de dispersão (desvio padrão e intervalo interquartil) em relação ao número de células para o controle (DMEM) nos tempos de 0h e 72h e para o solvente (DMSO) na concentração de 0,25% e no tempo de 72h..... 160

Tabela 25 - Ensaio de proliferação (HGF). Medidas sumárias (média e mediana) e respectivas medidas de dispersão (desvio padrão e intervalo interquartil) em relação ao número de células para o controle (DMEM) nos tempos de 0h e 72h e para o solvente (DMSO) na concentração de 0,25% e no tempo de 72h..... 161

Tabela 26 - Ensaio de migração (CAL27). Medidas sumárias (média e mediana) e respectivas medidas de dispersão (desvio padrão e intervalo interquartil) relativas ao percentual de fechamento da área da ferida considerando o solvente DMSO (0,25%) e os tempos experimentais de 24h e 48h..... 163

Tabela 27 - Ensaio de migração (HGF não-senescentes). Medidas sumárias (média e mediana) e respectivas medidas de dispersão (desvio padrão e intervalo interquartil) relativas ao percentual de fechamento da área da ferida considerando o solvente DMSO (0,25%) e os tempos experimentais de 24h, 48h e 72h..... 164

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).	194
--	-----

LISTA DE ANEXOS

Anexo A - Aprovação do projeto no comitê de ética (CEPSH-UFSC).....	196
Anexo B - Artigos científicos aceitos ou publicados durante o período do doutorado (agosto de 2018 até agosto de 2022).....	201

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α-SMA	<i>α-actina de músculo liso (do inglês α-smooth muscle actin)</i>
ATCC	<i>Coleção de Cultura Tipo Americana (do inglês American Type Culture Collection)</i>
BCL-2	Proteínas da família leucemia/linfoma de células-B grupo 2 (do inglês <i>B-cell leukemia/lymphoma-2</i>)
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CC50	Concentração citotóxica para 50% das células
CEB	Carcinoma epidermoide bucal
CEPID	Centro de Ensino e Pesquisa em Implantes Dentários
CEPSH	Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO₂	Dióxido de carbono
DISC	Complexo de sinalização de indução de morte celular (DISC, do inglês <i>death-inducing signaling complex</i>)
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco (do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DP	Desvio padrão
EGF	Fator de crescimento epidérmico (do inglês <i>epidermal growth factor</i>)
ERK	Quinases reguladas por sinal extracelular (do inglês <i>extracellular-regulated kinase</i>)
EUA	Estados Unidos da América
FAC	Fibroblasto associado ao câncer

FAP	Proteínas ativadoras de fibroblastos (do inglês <i>fibroblast activation protein</i>)
FAPESC	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Santa Catarina
FDA	<i>Administração de Alimentos e Medicamentos</i> (do inglês <i>Food and Drug Administration</i>)
FSAS	Fenótipo secretório associado à senescência
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HGF	Fibroblastos gengivais humanos (do inglês <i>human gingival fibroblast</i>)
HPV	Papilomavírus humano (do inglês <i>human papilloma virus</i>)
i.e.	Isto é
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IQR	Intervalo interquartil
LAMEB	Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia
LPB	Laboratório de Patologia Bucal
LVA	Laboratório de Virologia Aplicada
MAPK	Proteína-quinases ativadas por mitógenos (do inglês <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
N.S.	Não significativo
OPMD	Desordens potencialmente malignas (do inglês <i>oral potentially malignant disorders</i>)
OSCC	Carcinoma epidermoide oral (do inglês <i>oral squamous cell carcinoma</i>)
PBS	Solução salina de fosfato tamponada (do inglês <i>phosphate-buffered saline</i>)
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas (do inglês <i>platelet-derived growth factor</i>)
p. ex.	Por exemplo

pRb	Proteína do retinoblastoma
PROTAC	Quimera de direcionamento de proteólise (do inglês <i>proteolysis targeting chimera</i>)
PSA	Penicilina-estreptomicina-anfotericina (do inglês <i>penicillin-streptomycin-amphotericin</i>)
ROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês <i>reactive oxygen species</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês <i>ribonucleic acid</i>)
RS	Revisão sistemática
SA-β-Gal	β-Galactosidase associada a senescência (do inglês <i>senescence-associated β-galactosidase</i>)
SFB	Soro fetal bovino
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês <i>vascular endothelial growth factor</i>)
TA	Temperatura ambiente
TCA	Ácido tricloroacético (do inglês <i>trichloroacetic acid</i>)
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF-β	Fator de crescimento tumoral-β (do inglês <i>tumour growth factor-β</i>)
TNF	Fator de necrose tumoral (do inglês <i>tumour necrosis factor</i>)
TNF-α	Fator de necrose tumoral-α (do inglês <i>tumour necrosis factor-α</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Percentual, porcentagem ou por cento
®	Registrado
°C	Graus célsius
h	Hora
Ki	Constante de inibição
min	Minuto
L	Litro
mL	Mililitro
µL	Microlitro
mm	Milímetros
nm	Nanômetro
mm²	Milímetros quadrados
mg	Miligrama
ng	Nanograma
mM	Milimolar
µM	Micromolar
nM	Nanomolar
rpm	Rotação por minuto
≅	Aproximadamente
±	Mais ou menos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
2 JUSTIFICATIVA.....	32
3 OBJETIVOS.....	33
3.1 Objetivo geral	33
3.2 Objetivos específicos.....	33
4 REFERENCIAL TEÓRICO.....	34
4.1 Carcinoma epidermoide bucal	34
4.2 Desenvolvimento e progressão tumoral	36
4.3 Apoptose.....	42
4.4 Proteínas da família BCL-2	44
4.5 Compostos miméticos de BH3.....	46
4.6 Microambiente tumoral	49
4.7 Senescência celular e sua relação com o câncer	51
5 CAPÍTULO I.....	55
5.1 Apresentação.....	56
5.2 Artigo aceito para publicação	57
5.3 Considerações finais (Capítulo I).....	105
6 CAPÍTULO II	106
6.1 Apresentação.....	107
6.2 Material e Métodos	108
6.2.1 Aquisição da linhagem permanente de CEB	108
6.2.2 Aquisição da linhagem primária de fibroblastos orais	109
6.2.2.1 Aspectos éticos	109
6.2.2.2 Obtenção das amostras de tecido gengival.....	109
6.2.2.3 Isolamento dos fibroblastos orais e estabelecimento da cultura primária ...	109

6.2.3 Aquisição dos compostos experimentais	111
6.2.4 Procedimentos e protocolos	111
<u>6.2.4.1 Procedimentos e protocolos de rotina</u>	<u>111</u>
<u>6.2.4.2 Protocolo de indução da senescência (H₂O₂)</u>	<u>112</u>
<u>6.2.4.3 Quantificação das células com fenótipo senescente (SA-β-Gal)</u>	<u>113</u>
6.2.5 Experimentos	114
<u>6.2.5.1 Ensaio de citotoxicidade (Sulforrodamina B)</u>	<u>114</u>
<u>6.2.5.2 Ensaio de proliferação celular (CyQuant®)</u>	<u>115</u>
<u>6.2.5.3 Ensaio de migração celular ("Scratch")</u>	<u>116</u>
<u>6.2.5.4 Ensaio de apoptose celular (Anexina V e Iodeto de propídio)</u>	<u>118</u>
6.2.6 Análise estatística	120
6.3 Resultados	121
6.3.1 Ensaio de citotoxicidade (Sulforrodamina B)	122
<u>6.3.1.1 Linhagem de CEB (CAL27)</u>	<u>122</u>
<u>6.3.1.2 Linhagem de fibroblastos não-senescentes (HGF)</u>	<u>128</u>
<u>6.3.1.3 Linhagem de fibroblastos senescentes (HGF senescentes)</u>	<u>130</u>
6.3.2 Ensaio de proliferação (CyQuant)	132
<u>6.3.2.1 Linhagem de CEB (CAL27)</u>	<u>132</u>
<u>6.3.2.2 Linhagem de fibroblastos não-senescentes (HGF)</u>	<u>135</u>
6.3.3 Ensaio de migração ("Scratch")	137
<u>6.3.3.1 Linhagem de CEB (CAL27)</u>	<u>137</u>
<u>6.3.3.2 Linhagem de fibroblastos não-senescentes (HGF)</u>	<u>142</u>
6.3.4 Ensaio de apoptose (Anexina V e Iodeto de propídio)	147
<u>6.3.4.1 Linhagem de CEB (CAL27)</u>	<u>147</u>
<u>6.3.4.2 Linhagem de fibroblastos senescentes (HGF senescentes)</u>	<u>148</u>
6.4 Considerações finais (Capítulo II)	150
6.5 Metodologia expandida (Capítulo II)	151
6.5.1 Subcultivo celular	151

6.5.2 Contagem celular	151
6.5.3 Avaliação de infecção por micoplasma	152
6.5.4 Congelamento celular	153
6.5.5 Descongelamento e cultivo celular	153
6.6 Resultados complementares (Capítulo II)	154
6.6.1 Ensaio de citotoxicidade	154
<u>6.6.1.1 Linhagem de CEB (CAL27)</u>	<u>154</u>
<u>6.6.1.2 Linhagem de fibroblastos não-senescentes (HGF)</u>	<u>155</u>
<u>6.6.1.3 Linhagem de fibroblastos senescentes (HGF senescentes)</u>	<u>157</u>
6.6.2 Ensaio de proliferação celular	159
<u>6.6.2.1 Linhagem de CEB (CAL27)</u>	<u>159</u>
<u>6.6.2.2 Linhagem de fibroblastos não-senescentes (HGF)</u>	<u>161</u>
6.6.3 Ensaio de migração celular	162
<u>6.6.3.1 Linhagem de CEB (CAL27)</u>	<u>162</u>
<u>6.6.3.2 Linhagem de fibroblastos não-senescentes (HGF)</u>	<u>164</u>
7 DISCUSSÃO GERAL	166
8 CONCLUSÃO GERAL	175
REFERÊNCIAS	176
APÊNDICES	194
ANEXOS	196

1 INTRODUÇÃO

Dentre os cânceres que acometem a cavidade oral e a orofaringe, o carcinoma epidermoide bucal (CEB), também conhecido como carcinoma de células escamosas ou espinocelular, representa cerca de 90% de todas as lesões malignas (CHI, DAY e NEVILLE, 2015). O CEB é um tumor de origem epitelial que se desenvolve a partir dos queratinócitos, os quais, devido a uma gama de fatores como agentes químicos (p. ex. tabaco e/ou álcool), físicos (p. ex. radiação) ou biológicos (p. ex. infecções virais), podem acumular um número crítico de mutações gênicas do ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *deoxyribonucleic acid*) e adquirir um fenótipo maligno. Esse fenótipo é caracterizado por uma proliferação celular desordenada e exacerbada, invasão tecidual e, em casos mais avançados, metástase para outros sítios anatômicos (SCULLY e BAGAN, 2009).

No que tange as múltiplas alterações envolvidas no processo de carcinogênese, destaca-se a capacidade de evasão de apoptose, a qual é um dos mecanismos de morte celular mais alterados no desenvolvimento dos tumores malignos (MATSUURA *et al.*, 2016). A apoptose é considerada essencial para a homeostase de células e tecidos, entretanto, têm-se demonstrado que diversos tipos de cânceres apresentam resistência a morte celular através de uma superexpressão de proteínas antiapoptóticas (especialmente as da família BCL-2) (ELMORE, 2007). A superexpressão de proteínas antiapoptóticas apresenta não somente um potencial oncogênico, mas também está associada a quimiorresistência e prognósticos menos favoráveis (D'AGUANNO e DEL BUFALO, 2020).

O processo de carcinogênese não é determinado somente por alterações nas células tumorais, mas sim pelo resultado de uma complexa interação entre as células tumorais e do estroma. Dentre os componentes presentes no estroma tumoral, destaca-se a presença proeminente de fibroblastos, os quais exercem papel fundamental em processos de reparo e homeostase tecidual (KALLURI e ZEISBERG, 2006). Em lesões malignas, entretanto, os fibroblastos adquirem um fenótipo de ativação persistente, os quais permanecem no tecido e passam a ser descritos como fibroblastos associados ao câncer (FAC) (CIRRI e CHIARUGI, 2012).

A população de FACs é consideravelmente heterogênea e podem expressar diferentes fenótipos transcricionais, incluindo o fenótipo senescente, o qual é caracterizado por um estado de interrupção do ciclo celular, mas ainda

metabolicamente ativo (HASSONA *et al.*, 2013). É proposto que a presença de fibroblastos senescentes no microambiente tumoral possa contribuir para a progressão do tumor através de um secretoma característico, constituído por diversas citocinas, fatores de crescimento e proteases (PRIME *et al.*, 2017).

De modo geral, células senescentes apresentam resistência a morte celular, podendo se acumular no organismo, resultando em efeitos deletérios não somente em neoplasias malignas, mas também em outros tipos de patologias, especialmente aquelas relacionadas ao envelhecimento (CAMPISI, 2013). Nesse contexto, é sugerido que os mecanismos de resistência a morte celular sejam similares para as células senescentes e para as células tumorais, envolvendo a superexpressão de proteínas antiapoptóticas da família BCL-2 (YOSEF *et al.*, 2016).

Apesar dos avanços em relação às terapias convencionais para o câncer de cabeça e pescoço (p. ex. cirurgia, radioterapia e/ou quimioterapia), as sequelas funcionais, estéticas e outras reações adversas podem ter um impacto físico e psicossocial significativo (SCULLY e BAGAN, 2009). Além disso, com as terapias atualmente disponíveis, é estimado que a taxa de sobrevida em cinco anos para pacientes com CEB ou de orofaringe seja em torno de 63% (CHI, DAY e NEVILLE, 2015). Tendo em vista as limitações dos métodos convencionais e a insatisfatória taxa de sobrevida reportada, o desenvolvimento de novas terapias para o manejo de pacientes com CEB se faz necessário (ORD e BLANCHAERT, 2001).

Estudos recentes têm apresentado efeitos anticâncer proeminentes em relação às terapias com alvos moleculares, especialmente compostos com capacidade de antagonizar a ação antiapoptótica de proteínas da família BCL-2, os quais são caracterizados pelo seu efeito mimético de proteínas BH3-exclusivas (VELA e MARZO, 2015; YAMAGUCHI, LARTIGUE e PERKINS, 2019). Nesse contexto, determinados compostos miméticos de BH3 podem desempenhar função anticâncer diretamente nas células tumorais (YANG *et al.*, 2019), mas também um efeito anticâncer indireto através de propriedades senolíticas, atuando através da eliminação de células senescente do microambiente tumoral (ZHU *et al.*, 2016).

Diversas pesquisas têm sido conduzidas visando identificar moléculas (tanto de origem natural quanto sintética) com capacidade de mimetizar o efeito das proteínas BH3-exclusivas. A partir disso, diversos compostos experimentais têm sido propostos, tais como Gossipol (OLIVER *et al.*, 2004), ABT-737 (OLTERSODORF *et al.*,

2005), Navitoclax/ABT-263/ (TSE *et al.*, 2008) e Venetoclax/ABT-199 (SOUERS *et al.*, 2013). Entretanto, apesar desses compostos compartilharem a característica de mimetizar os efeitos das proteínas BH3, a literatura é consideravelmente heterogênea no que tange seus efeitos anticâncer uma vez que o padrão de expressão das proteínas BCL-2 antiapoptóticas é variável entre diferentes tipos de malignidades (TIMUCIN, BASAGA e KUTUK, 2019). Desse modo, uma revisão narrativa para identificar a abrangência e escopo da literatura atual sobre o efeito desses compostos sobre carcinomas de cabeça e pescoço, em particular, se faz necessária.

Além disso, estudos têm sugerido que os compostos miméticos de BH3, Navitoclax e Venetoclax, possam apresentar ação antitumoral especialmente por meio da indução de morte celular por apoptose em diversas neoplasias malignas, tais como leucemias (TSE *et al.*, 2008; SAMRA *et al.*, 2020), câncer de mama (LEE *et al.*, 2018), pulmão (SHOEMAKER *et al.*, 2008; TSE *et al.*, 2008) e cólon (EICHHORN *et al.*, 2014). Ainda, têm-se proposto que esses compostos possam apresentar propriedades senolíticas, ou seja, exibir capacidade de induzir a apoptose de células senescentes (ZHU *et al.*, 2016). Até o presente momento, poucos estudos investigaram os efeitos biológicos dos compostos Navitoclax (YANG *et al.*, 2019; GADSDEN *et al.*, 2021) e Venetoclax (XIONG *et al.*, 2016) sobre linhagens celulares de CEB, resultando em importantes lacunas no conhecimento. Além disso, potenciais efeitos senolíticos considerando componentes do microambiente tumoral, tais como fibroblastos senescentes, não foram investigados no contexto de CEB.

Desse modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar, através de uma revisão narrativa, a abrangência da literatura atual sobre os efeitos dos miméticos de BH3 sobre carcinomas de cabeça e pescoço e, também, investigar os efeitos biológicos de dois desses compostos (Navitoclax e Venetoclax) sobre a viabilidade, proliferação e migração de células de CEB, em comparação com fibroblastos orais não-senescentes. Ainda, foi investigada a capacidade desses compostos em induzir a morte celular por apoptose de células de CEB e de fibroblastos orais com fenótipo senescente.

2 JUSTIFICATIVA

O presente estudo se justifica tendo em vista a necessidade de aprofundar o conhecimento científico em relação aos efeitos anticâncer e senolíticos dos compostos investigados no contexto de câncer de boca. Ainda, espera-se estimular o desenvolvimento de novas linhas de pesquisas, contribuindo, portanto, para que novas alternativas terapêuticas para o tratamento de câncer de boca possam se tornar viáveis e disponíveis para a população.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar a abrangência da literatura atual sobre os compostos miméticos de BH3 e avaliar os efeitos biológicos de dois desses compostos (Navitoclax e Venetoclax) sobre células de carcinoma epidermoide bucal (CEB). Ainda, investigar os efeitos desses compostos sobre diferentes fenótipos de fibroblastos orais (não-senescentes e senescentes).

3.2 Objetivos específicos

- 1) Revisar a literatura acerca dos efeitos dos compostos miméticos de BH3 sobre carcinomas de cabeça e pescoço;
- 2) Avaliar o efeito citotóxico dos compostos Navitoclax e Venetoclax sobre células de CEB, fibroblastos orais não-senescentes e senescentes;
- 3) Avaliar o efeito dos compostos Navitoclax e Venetoclax sobre a proliferação de células de CEB e comparar com fibroblastos orais não-senescentes;
- 4) Avaliar o efeito dos compostos Navitoclax e Venetoclax sobre a migração de células de CEB e comparar com fibroblastos orais não-senescentes;
- 5) Investigar a capacidade dos compostos Navitoclax e Venetoclax em induzir morte celular por apoptose de células de CEB e fibroblasto orais senescentes;

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Carcinoma epidermoide bucal

De acordo com as estimativas mais recentes do Instituto Nacional do Câncer (INCA), a incidência de câncer da cavidade oral no Brasil é estimada em 11.180 novos casos em homens (ocupando a 5º posição entre os tipos de cânceres avaliados) e 4.010 em mulheres (ocupando a 13º posição) para cada ano do biênio 2020-2022 (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2020). Considerando o cenário global, as estimativas do projeto GLOBOCAN, que investiga taxas de incidência, prevalência e mortalidade relacionadas ao câncer em um grupo de 185 países, revelaram que a incidência de câncer de lábio e cavidade oral para o ano de 2020 seria de 377.713 novos casos e 177.757 óbitos, considerando ambos os sexos (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2020; SUNG *et al.*, 2021).

O CEB é a neoplasia maligna mais proeminente dentre os cânceres da cavidade oral, sendo usualmente responsável por 93 a 96% dos casos diagnosticados (PAI e WESTRA, 2009). De um modo geral, o CEB é precedido por distúrbios orais potencialmente malignos (OPMD, do inglês *oral potentially malignant disorders*), tais como leucoplasias e eritroplasias (REGEZI, SCIUBBA e JORDAN, 2016; GANESH *et al.*, 2018). Uma revisão sistemática (RS) demonstrou que a prevalência global de OPMD foi de 4,47%, entretanto, essa prevalência foi consideravelmente heterogênea entre as regiões geográficas investigadas, podendo atingir até 10% da população considerando apenas estudos de países asiáticos (MELLO *et al.*, 2018). A taxa de transformação maligna dessas lesões é bastante variável, sendo estimado que, para leucoplasias, essa taxa pode variar de 0,13 a 34% (WARNAKULASURIYA e ARIYAWARDANA, 2016), enquanto que para eritroplasias, de 14 a 50% (REICHART e PHILIPSEN, 2005).

A maioria dos casos de CEB é observado em indivíduos do sexo masculino a partir da quarta e quinta décadas de vida, tendo uma importante relação com determinados fatores etiológicos como: consumo de álcool e/ou tabaco e, também, com determinados tipos de infecção viral como, por exemplo, infecções pelo papilomavírus humano (HPV, do inglês *human papilloma virus*) (SCULLY e BAGAN, 2009). Apesar da literatura atual não corroborar a hipótese de que o consumo isolado de álcool possa contribuir com o desenvolvimento de CEB, é proposto que o consumo de álcool concomitantemente ao de tabaco possa exibir um efeito sinérgico,

resultando em uma razão de chances de ocorrência de CEB até 16 vezes maior comparada aos indivíduos abstêmios (MELLO *et al.*, 2019). No que tange exposições ambientais como as infecções virais, uma RS concluiu que a presença de DNA viral relacionada ao vírus HPV-16, em particular, foi significativamente maior em indivíduos diagnosticados com CEB, indicando uma possível associação entre essas condições (SMITHA, MOHAN e HEMAVATHY, 2017).

Considerando potenciais fatores etiológicos, é proposto que populações de países em desenvolvimento possam estar mais expostas a fatores de risco comparadas aos países desenvolvidos, afetando diretamente as taxas de ocorrência e, conseqüentemente, de mortalidade relacionadas ao câncer oral nessas regiões geográficas (WARNAKULASURIYA, 2009). Alguns estudos têm demonstrado uma correlação entre um baixo índice de desenvolvimento humano e uma maior incidência de câncer (FIDLER, SOERJOMATARAM e BRAY, 2016). Nesse contexto, do total de mortes ocasionadas por câncer da cavidade oral ao redor do globo, estima-se que em torno de 75% ocorram em países em desenvolvimento (DE CAMARGO CANCELA *et al.*, 2010). Apesar da possibilidade de autoexame e visualização direta das lesões no caso particular de CEB, os pacientes frequentemente são diagnosticados em estágios avançados do desenvolvimento do câncer, sendo este um fator decisivo no que se refere ao tempo de sobrevivência dos pacientes (MONTERO e PATEL, 2015).

O diagnóstico precoce de CEB e o início do tratamento em fases iniciais têm o potencial de reduzir sua morbidade e mortalidade; não obstante, é comum que pacientes com suspeita de lesões malignas se deparem com longos períodos de espera até a consulta com um especialista, enquanto aqueles diagnosticados com CEB em fase inicial possam enfrentar atrasos para o início do tratamento (OMAR, 2015). O atraso no tratamento por períodos relativamente curtos, como 30 a 40 dias, tem o potencial de aumentar significativamente o risco de falha local/regional relacionada aos carcinomas de cabeça e pescoço (FORTIN *et al.*, 2002).

As modalidades convencionais de tratamento para o câncer oral são a cirurgia e a radioterapia, associadas ou não a agentes quimioterápicos (ORD e BLANCHAERT, 2001). Em geral, agentes quimioterápicos convencionais (como cisplatina ou 5-fluorouracil), de modo isolado, não constituem um tratamento de primeira linha para carcinomas de cabeça e pescoço, no entanto desempenham um importante papel adjuvante para os casos avançados (LARAMORE *et al.*, 1992).

Apesar disso, os protocolos de tratamento disponíveis no contexto atual, principalmente aqueles que incluem procedimentos cirúrgicos envolvendo a língua e a mandíbula, podem resultar em sequelas funcionais e estéticas significativas para os pacientes, particularmente no que se refere à fala, eficiência mastigatória, deglutição e perdas dentárias (DAY *et al.*, 2003). Terapias emergentes têm visado alvos moleculares específicos considerando os diferentes mecanismos envolvidos no desenvolvimento e progressão tumoral, de modo a potencialmente promover um melhor prognóstico e qualidade de vida para os pacientes acometidos por lesões malignas (HUNTER, PARKINSON e THAKKER, 2011).

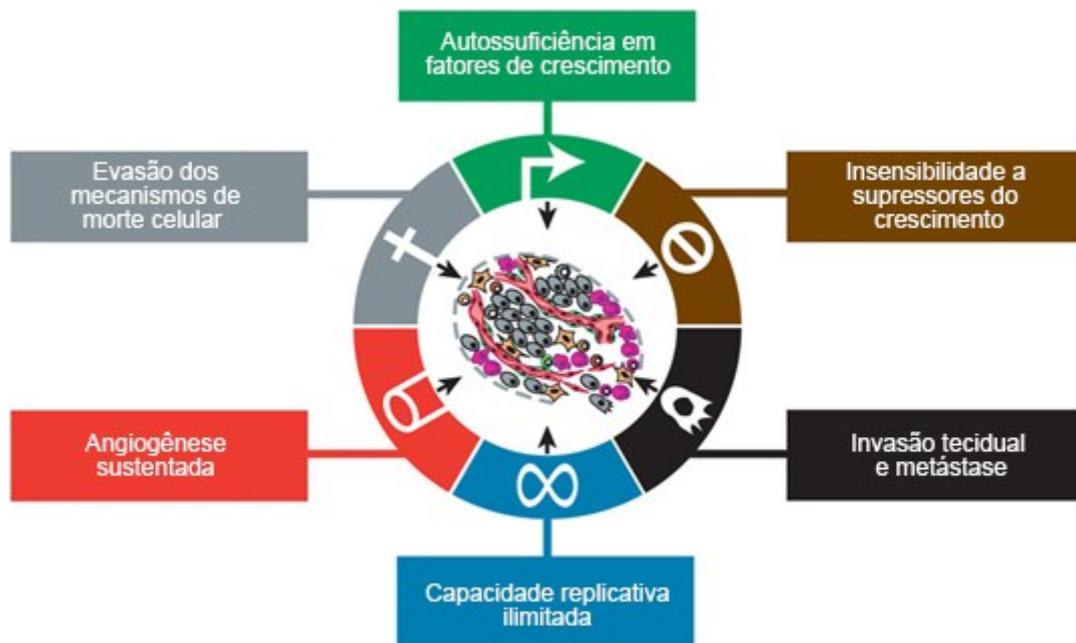
4.2 Desenvolvimento e progressão tumoral

As células tumorais adquirem capacidades peculiares e necessárias para que o câncer possa se estabelecer e desenvolver. Dentre elas, seis alterações essenciais na fisiologia celular regulam coletivamente o desenvolvimento de patologias malignas, sendo elas: 1) autossuficiência em fatores de crescimento; 2) insensibilidade a supressores do crescimento; 3) invasão tecidual e metástase; 4) capacidade replicativa ilimitada; 5) angiogênese sustentada; e 6) evasão dos mecanismos de morte celular (HANAHAN e WEINBERG, 2000) (**Figura 1**). Apesar das capacidades celulares envolvidas no potencial de malignização serem sintetizadas em seis alterações essenciais, existem múltiplas vias de sinalização através das quais a transformação maligna pode ocorrer (HUNTER, PARKINSON e THAKKER, 2011).

As células tumorais podem adquirir a capacidade de autossuficiência em fatores de crescimento de modo autócrino, no qual elas mesmas produzem esses fatores, ou de maneira parácrina, na qual elas sinalizam para que células do tecido conjuntivo adjacente produzam esses fatores (BHOWMICK, NEILSON e MOSES, 2004). A insensibilidade a inibidores do crescimento, por outro lado, está mais intimamente relacionada a disfunção da via de sinalização da proteína do retinoblastoma (pRb), a qual, quando hipofosforilada, bloqueia a proliferação celular através da inibição do fator de transcrição E2F, essencial para que ocorra a progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular (WEINBERG, 1995). Uma disfunção nessa via de sinalização resulta, portanto, na liberação de E2F, permitindo assim uma proliferação celular desordenada e desencadeando uma insensibilidade a

inibidores do crescimento que operam através desta via (HANAHAN e WEINBERG, 2000).

Figura 1 - Figura representativa das 6 principais alterações para o desenvolvimento e progressão do câncer, originalmente propostas no ano 2000, incluindo: 1) autossuficiência em fatores de crescimento; 2) insensibilidade a supressores do crescimento; 3) invasão tecidual e metástase; 4) capacidade replicativa ilimitada; 5) angiogênese sustentada; e 6) evasão dos mecanismos de morte celular.



Fonte: Adaptado de HANAHAN e WEINBERG (2011).

Ainda, a capacidade adquirida de invasão tecidual e metástase inevitavelmente ocorre na maioria dos tipos de câncer. Em nível de mecanismos celulares, esses eventos são intimamente inter-relacionados, uma vez que dependem da alteração de proteínas que regulam a adesão/interação célula-célula, notavelmente as moléculas da família das caderinas, e da interação célula-matriz extracelular, principalmente moléculas da família das integrinas (APLIN *et al.*, 1998). No que se refere as caderinas, a proteína e-caderina desempenha um papel fundamental na manutenção do contato célula-célula, sendo proposto que a sua supressão (e portanto disfunção) no caso de tumores epiteliais represente uma etapa importante na aquisição da capacidade de invasão tecidual e metástase (HANAHAN e WEINBERG, 2000).

A capacidade replicativa ilimitada está intimamente relacionada as vias descritas previamente, no entanto, outro importante mecanismo envolvendo os telômeros pode desempenhar papel fundamental no processo de tumorigênese (SEBASTIAN, GRAMMATICA e PARADISO, 2005). O encurtamento dos telômeros é resultado de sucessivos ciclos celulares, sendo que, quando um comprimento crítico é atingido, a célula pode entrar em senescência ou em processo de apoptose (LU *et al.*, 2013). Em células tumorais, no entanto, foi observado um aumento na atividade da enzima telomerase, a qual é responsável pela manutenção dos telômeros, promovendo, portanto, uma resposta celular inadequada a danos no DNA e, conseqüentemente, um fenótipo imortalizado (PARKINSON, FITCHETT e CERESER, 2008).

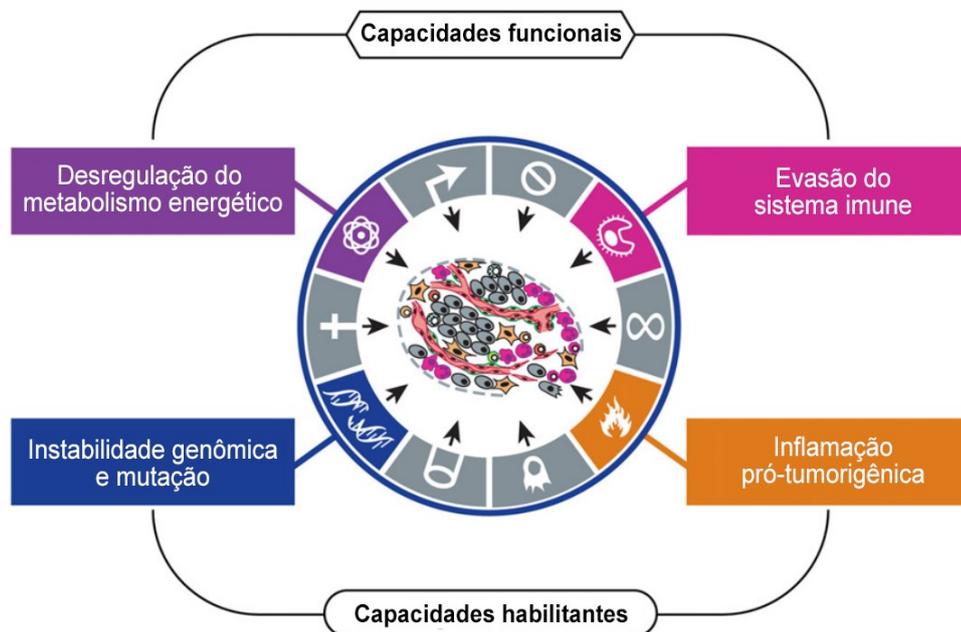
No que se refere a angiogênese sustentada, o principal mediador envolvido neste processo é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*), membro da superfamília do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF, do inglês *platelet-derived growth factor*). É proposto que a sinalização autócrina e parácrina de VEGF pelas células tumorais possa promover a neoformação vascular, proliferação celular, migração e invasão tecidual, além de exercer um importante papel de modular células do sistema imune no microambiente tumoral (VASSILAKOPOULOU, PSYRRI e ARGIRIS, 2015). Além disso, tem sido sugerido na literatura que o VEGF possa estar associado a resistência tumoral a quimioterapia, uma vez que modula o processo de autofagia, que consiste na eliminação de organelas danificadas para proteger a célula de eventos apoptóticos (STANTON *et al.*, 2013). O VEGF também têm sido associado a resistência à radioterapia no caso de tumores epiteliais, sendo proposto que esses tumores exibem um aumento na expressão desse fator e, conseqüente, um aumento na proliferação celular como uma resposta à radiação (BRIEGER *et al.*, 2007).

Por último, a apoptose é um mecanismo de defesa que os organismos desenvolveram para eliminar células em estágios avançados de desenvolvimento ou submetidas a algum tipo de estresse celular relevante. Esse fenômeno envolve uma série de eventos celulares que resultam na ativação de uma família de proteínas denominadas caspases, as quais podem efetuar a apoptose através de múltiplas rotas (ELMORE, 2007). Uma das rotas mais proeminentes é a mitocôndria-dependente, que ocorre através da permeabilização da membrana mitocondrial externa, que resulta na liberação de fatores proapoptóticos como o citocromo C, o qual, por sua vez, induz a

ativação das caspases (TROTТА e CHIPUK, 2017). Essa rota é ativada primariamente através do balanço entre proteínas proapoptóticas e antiapoptóticas da família BCL-2 (MATSUURA *et al.*, 2016). Nesse contexto, as células cancerígenas podem adquirir a capacidade de evadir a apoptose através de diversas vias, dentre elas destaca-se a superexpressão de proteínas antiapoptóticas da família BCL-2, induzida pela ativação de oncogenes e a inativação de genes supressores de tumor como o p53, o qual modula a apoptose através das proteínas BAX e NOXA (FERNALD e KUROKAWA, 2013).

Vale destacar que, no ano de 2011, foi sugerida a inclusão de outras quatro alterações essenciais para o desenvolvimento e progressão tumoral, sendo duas capacidades funcionais (desregulação do metabolismo energético e evasão do sistema imune) e duas características habilitantes (instabilidade e mutação genômica e inflamação como promotora do tumor) (HANAHAN e WEINBERG, 2011) (**Figura 2**).

Figura 2 - Figura representativa das capacidades funcionais e habilitantes, propostas no ano de 2011, para o desenvolvimento e progressão do câncer.



Fonte: Adaptado de HANAHAN e WEINBERG (2011).

A aquisição das capacidades celulares envolvidas no processo de tumorigênese ocorre principalmente através de dois mecanismos promotores, sendo

a instabilidade genética o mais proeminente, uma vez que gera um número aleatório de mutações e rearranjos cromossômicos, muitos dos quais orquestram a aquisição dessas capacidades. O segundo envolve o estado inflamatório de lesões pré-malignas ou malignas guiado por células do sistema imune, das quais algumas atuam como promotoras da progressão tumoral através de múltiplas vias de sinalização celular (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

No que se refere a instabilidade genética, as aberrações observadas em células tumorais incluem mutações, amplificações e superexpressão de proteínas, que podem resultar na ativação de oncogenes, tais como RAS, PRAD-1 e BCL-1 (ALI *et al.*, 2017). Determinados oncogenes podem desencadear uma produção excessiva de fatores de crescimento, uma superexpressão de seus receptores ou, ainda, um aumento na transdução de sinal para o interior da célula, que ocorre após a ligação da proteína com seu receptor (HUNTER, PARKINSON e THAKKER, 2011).

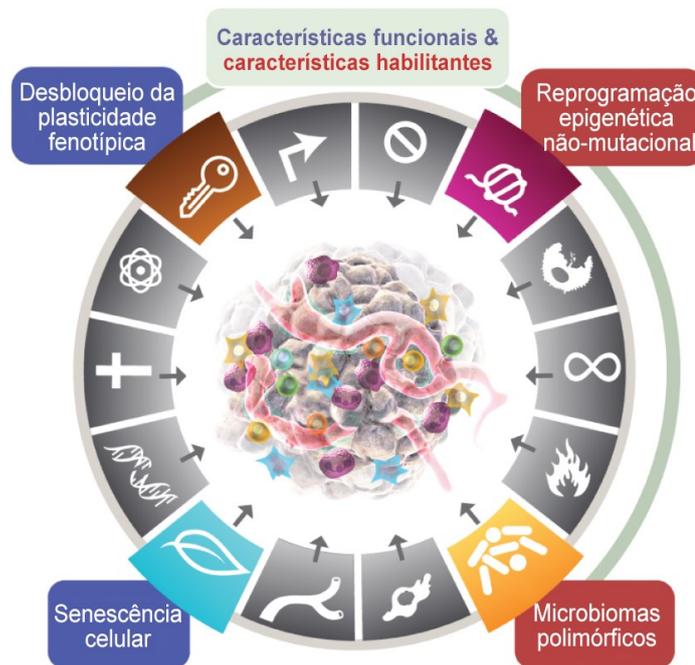
Além dessas alterações, outras como a perda de heterozigose, hipermetilação de sequências promotoras e sequestro de DNA por proteínas carreadoras estão relacionadas a disfunção de genes supressores de tumor (como os genes p16^{INK4a} e p53) (SCULLY, FIELD e TANZAWA, 2000). Esses genes participam da regulação da transição entre as fases do ciclo celular, que ocorre principalmente através da ativação/inibição de complexos ciclina/ciclina-quinases (FOSTER *et al.*, 2010). A disfunção desses genes tem o potencial de desregular o controle do ciclo celular, especialmente entre a fase G1 e S, resultando em um crescimento seletivo vantajoso para células tumorais (PRIME *et al.*, 1997).

Além disso, considerando o estado inflamatório das lesões pré-malignas e malignas como uma das principais características promotoras da tumorigênese, tem sido proposto que os mecanismos envolvidos estejam relacionados a capacidade da inflamação em providenciar moléculas bioativas para o microambiente tumoral, incluindo fatores de crescimento que promovem uma sinalização de proliferação celular sustentada, fatores de sobrevivência que limitam a morte celular, fatores pro-angiogênicos e enzimas modificadoras de matriz extracelular, que facilitam a invasão tecidual e metástase através da indução da transição epitélio-mesênquimal (KARNOUB e WEINBERG, 2006; QIAN e POLLARD, 2010; HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Além das 8 capacidades funcionais e duas habilitantes propostas nas últimas décadas, foram propostas, no ano de 2022, outras quatro alterações potencialmente

relacionadas ao desenvolvimento e progressão do câncer, sendo duas funcionais (desbloqueio da plasticidade fenotópica e senescência celular) e duas habilitantes (reprogramação epigenética não-mutacional e microbiomas polimórficos) (HANAHAN, 2022) (**Figura 3**).

Figura 3 - Figura representativa das capacidades funcionais e habilitantes, propostas no ano de 2022, para o desenvolvimento e progressão do câncer.



Fonte: Adaptado de HANAHAN (2022).

O desbloqueio da plasticidade fenotípica refere-se a capacidade de diferenciação, desdiferenciação ou mesmo de transdiferenciação celular, através da qual as células tumorais podem assumir características de tipos celulares heterogêneos, como nos casos de transição epitélio-mesênquimal ou de desdiferenciação em células progenitoras (YUAN, NORGDARD e STANGER, 2019). Já a senescência, caracterizada por um estado fisiológico de interrupção do ciclo celular, é considerada como uma barreira natural para o desenvolvimento do câncer, entretanto, tem-se proposto que esse fenômeno possa estimular a sua progressão devido ao fenótipo secretor característico dessas células (HE e SHARPLESS, 2017). Além disso, células tumorais podem entrar em um estado de senescência reversível, ou seja, um período

de dormência transitório que contribui para a evasão de estratégias terapêuticas que têm como alvo mecanismos relacionados a proliferação celular (DE BLANDER *et al.*, 2021).

No que tange as capacidades habilitantes, a reprogramação epigenética não-mutacional refere-se a mudanças na expressão gênica que são reguladas exclusivamente por fatores epigenéticos, ou seja, ocorrem independentemente da presença de instabilidade genômica e mutação (BAYLIN e JONES, 2016); essa característica pode influenciar no comportamento de células do microambiente tumoral (HANAHAN e COUSSENS, 2012), além de facilitar a aquisição de outras capacidades funcionais pelas células cancerígenas, especialmente o desbloqueio da plasticidade fenotípica (SERRANO-GOMEZ, MAZIVEYI e ALAHARI, 2016).

O papel dos microbiomas polimórficos em diferentes neoplasias ainda está sendo elucidado, entretanto, tem-se proposto que a presença de determinadas espécies bacterianas e/ou fúngicas tem a capacidade de contribuir ou interferir na aquisição de outras capacidades funcionais, além de exercer função imunomoduladora e/ou atuar na mutação do genoma (HELMINK *et al.*, 2019). A presença de diferentes microorganismos comensais pode resultar tanto em microbiomas protetores quanto promotores de tumor, sendo alvos terapêuticos promissores considerando cânceres nos quais há presença relevante de espécies bacterianas e/ou fúngicas, tais como cânceres que acometem a cavidade oral, útero ou cólon (DZUTSEV *et al.*, 2017).

Como o desenvolvimento e progressão do câncer estão relacionados a mecanismos celulares heterogêneos, múltiplas terapias emergentes com alvos moleculares específicos têm sido propostas, tais como os inibidores de fator de crescimento epidérmico (EGF, do inglês *epidermal growth factor*) (MYERS *et al.*, 2002), inibidores de telomerase (PARKINSON, 2003), neutralizadores de resposta inflamatória (KIM *et al.*, 2008), inibidores de angiogênese (LIN e SESSA, 2004) e, em especial, agentes senolíticos (ZHU *et al.*, 2016) e indutores de apoptose (D'AGUANNO e DEL BUFALO, 2020).

4.3 Apoptose

A morte celular regulada foi, historicamente, classificada em três grandes grupos com base em características morfológicas, sendo esses: 1) morte celular tipo

1 ou apoptose; 2) morte celular tipo 2 ou autofagia; 3) morte celular tipo 3 ou necrose (GALLUZZI *et al.*, 2007). Entretanto, diferentes classificações e subclassificações têm sido propostas pelo Comitê de Nomenclatura de Morte Celular com base em critérios genéticos, bioquímicos, farmacológicos e funcionais, incluindo: 1) apoptose intrínseca; 2) apoptose extrínseca; 3) necrose; 4) morte autofágica; 5) morte celular imonogênica; 6) morte celular dependente de lisossomo; 7) netose; 8) entose; 9) parthanatos, 10) piroptose; 11) ferroptose e 12) necroptose (GALLUZZI *et al.*, 2018).

A apoptose extrínseca é um tipo de morte celular iniciada a partir de perturbações no microambiente extracelular, sendo mediada por basicamente dois tipos de receptores de membrana, sendo eles 1) receptores de morte celular, nos quais a ativação depende da ligação com ligantes cognatos e 2) receptores de dependência, nos quais a ativação ocorre quando o nível de ligantes específicos reduz para além de um dado limiar (ASHKENAZI e DIXIT, 1998; FLUSBERG e SORGER, 2015). Após a ativação dos receptores de membrana, ocorre o recrutamento de proteínas adaptadoras, as quais desencadeiam a formação do complexo de sinalização de indução de morte celular (DISC, do inglês *death-inducing signaling complex*); nesse ponto, ocorre a ativação da proteína caspase-8, a qual inicia a cascata de caspases que culmina na apoptose celular (ELMORE, 2007).

A apoptose intrínseca é originada a partir de estresses intracelulares, tais como dano ao DNA, estresse replicativo, estresse oxidativo, sobrecarga de espécies reativas de oxigênio, entre outros (GALLUZZI *et al.*, 2018). Esse mecanismo é regulado majoritariamente pelo equilíbrio entre as proteínas antiapoptóticas e próapoptóticas da família BCL-2 e, uma vez que um estímulo apoptótico esteja presente, ocorre uma permeabilização da membrana mitocondrial externa, resultando na ativação da caspase-9 e, em última instância, na ativação da cascata de caspases responsável pela apoptose (CAVALCANTE *et al.*, 2019).

Tanto a apoptose extrínseca quanto intrínseca convergem na ativação das caspases efetoras (caspase-3 e caspase-7), as quais resultam na ativação de enzimas como proteases e nucleases. Essas enzimas são responsáveis pela degradação de proteínas citoplasmáticas e material nuclear, o que culmina em alterações citomorfológicas como diminuição do tamanho celular, condensação da cromatina, formação de corpos apoptóticos e, conseqüentemente, na fagocitose por outras células (ELMORE, 2007; CAVALCANTE *et al.*, 2019).

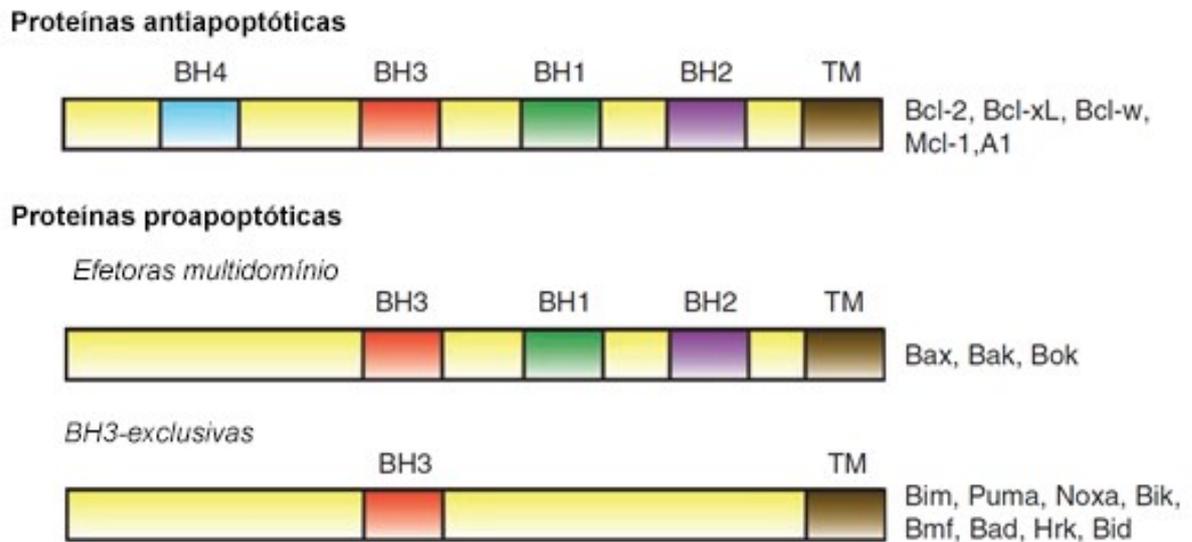
4.4 Proteínas da família BCL-2

Considerando os principais mecanismos de regulação da apoptose, as proteínas da família BCL-2 desempenham um papel importante, uma vez que podem desempenhar tanto funções antiapoptóticas quanto proapoptóticas (PLACZEK *et al.*, 2010). As proteínas antiapoptóticas (BCL-2, BCL-XL, BCL-W e MCL-1) são consideradas multi-domínio, uma vez que compartilham homologia considerando quatro domínios estruturais (BH1 a BH4) (LETAI, 2003).

Determinadas proteínas proapoptóticas da família BCL-2 (tais com BAX e BAK) também são consideradas multi-domínio, compartilhando homologia entre os domínios BH1 a BH3; entretanto, algumas proteínas proapoptóticas compartilham homologia somente com a região α -helicoidal BH3 (tais como BAD, BID, BIM, NOXA e PUMA), sendo consideradas proteínas BH3-exclusivas (DELBRIDGE e STRASSER, 2015) (**Figura 4**). As proteínas BH3-exclusivas podem interagir com as proteínas da família BCL-2 (BCL-2, BCL-XL, BCL-W e MCL-1) no seu domínio hidrofóbico, apresentando capacidade de antagonizar suas funções antiapoptóticas (BILLARD, 2013).

As proteínas da família BCL-2 regulam o mecanismo de apoptose principalmente pela via mitocôndria-dependente (apoptose intrínseca), que envolve uma série de eventos celulares que resultam na ativação de uma família de proteínas denominadas caspases (ELMORE, 2007). A partir de estímulos apoptóticos (tais como radiação ionizante, estresse oxidativo, danos ao DNA, entre outros), ocorre uma indução das proteínas proapoptóticas (direta- ou indiretamente, através da proteína p53), as quais passam a inibir a ação das proteínas antiapoptóticas (CORY *et al.*, 2016).

Figura 4 - Proteínas antiapoptóticas e proapoptóticas da família BCL-2. Proteínas antiapoptóticas compartilham homologia entre os domínios BH1 a BH4. Algumas proteínas proapoptóticas podem compartilhar homologia entre os domínios BH1 a BH3, entretanto, determinadas proteínas proapoptóticas apresentam somente homologia com a região BH3, sendo consideradas proteínas BH3-exclusivas.



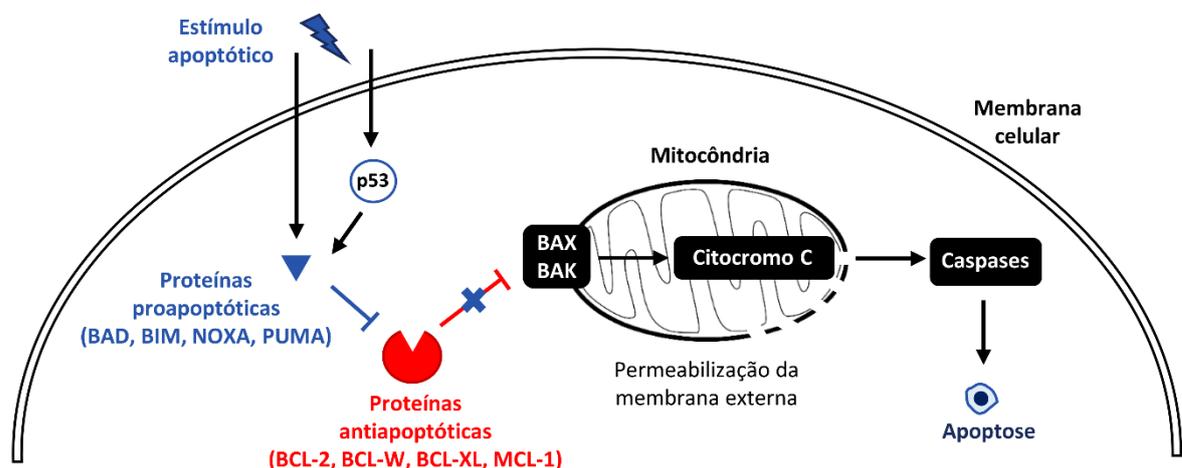
Fonte: Adaptado de GIAM, HUANG e BOUILLET (2008).

A inibição das proteínas antiapoptóticas resulta na ativação das proteínas efectoras da apoptose BAX e BAK, resultando na permeabilização da membrana mitocondrial externa e, conseqüentemente, na liberação de citocromo C para o citoplasma; esse processo culmina na ativação da cascata de proteínas caspases, as quais são responsáveis pela indução da fragmentação do DNA e iniciação do mecanismo de apoptose (KANG e REYNOLDS, 2009) (**Figura 5**).

Em células saudáveis, as proteínas antiapoptóticas da família BCL-2 mantêm a viabilidade celular através da inibição das proteínas efectoras BAX e BAK, entretanto, uma vez que um estímulo apoptótico esteja presente, a iniciação do mecanismo de indução de apoptose através das proteínas efectoras transcorre normalmente (CORY *et al.*, 2016). Em células cancerígenas, entretanto, pode ocorrer uma superexpressão de uma ou mais proteínas antiapoptóticas, o que resulta em uma resistência aumentada aos estímulos apoptóticos (DELBRIDGE e STRASSER, 2015). Além disso, mutações do gene que codifica a proteína p53 são eventos muito comuns em cânceres de cabeça e pescoço e podem resultar na inativação e perda de função

desta proteína (GASCO e CROOK, 2003), comprometendo ainda mais os mecanismos indutores de apoptose e contribuindo, assim, para a evasão da morte celular pelas células tumorais (DELBRIDGE e STRASSER, 2015).

Figura 5 - Diagrama representativo do mecanismo de apoptose pela via mitocôndria-dependente. A partir de estímulo apoptótico, ocorre indução das proteínas proapoptóticas da família BCL-2 (direta- ou indiretamente, através da proteína p53). Essas proteínas antagonizam a ação das proteínas BCL-2 antiapoptóticas, resultando na ativação das proteínas efetoras BAX e BAK e liberação de citocromo C para o citoplasma. Subsequentemente, ocorre a iniciação da cascata de proteínas caspases, as quais são responsáveis pela iniciação do mecanismo de apoptose.



Fonte: Elaborado pelo autor com base em CORY *et al.* (2016).

4.5 Compostos miméticos de BH3

Determinadas moléculas podem mimetizar o efeito das proteínas BH3-exclusivas e desempenhar um papel importante como indutores de apoptose, representando agentes terapêuticos promissores no que tange o desenvolvimento de tratamentos anticâncer com alvos moleculares específicos (KANG e REYNOLDS, 2009). Entretanto, o uso de moléculas com propriedades miméticas de BH3 somente foram propostas como potenciais estratégias terapêuticas no início dos anos 2000 (LETAI, 2003). Nesse contexto, os compostos miméticos de BH3 de primeira geração descritos na literatura foram o gossipol (OLIVER *et al.*, 2004) e o ABT-737 (OLTERSDORF *et al.*, 2005).

O composto gossipol e seus derivados, apesar de apresentarem ação anticâncer relevante em estudos pré-clínicos, também demonstraram importantes efeitos fora-do-alvo, tais como indução de autofagia, sendo, portanto, considerados compostos miméticos de BH3 putativos (VILLALOBOS-ORTIZ *et al.*, 2020). Já o composto ABT-737, apesar de considerado como um mimético de BH3 validado e de ter demonstrado efeitos anticâncer relevantes em estudos *in-vitro*, também apresentou biodisponibilidade por via oral insatisfatória (TSE *et al.*, 2008). Desse modo, a partir da estrutura molecular do ABT-737, foi desenvolvido o mimético de BH3 de segunda geração Navitoclax (também denominado ABT-263), o qual se demonstrou um composto com melhores propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas (VOGLER *et al.*, 2009)

O mecanismo de ação tanto do composto ABT-737 quanto do Navitoclax ocorre através de ligações de alta afinidade ($K_i \leq 1$ nM) a múltiplas proteínas antiapoptóticas da família BCL-2, incluindo as proteínas BCL-2, BCL-XL e BCL-W. Entretanto, esses compostos não exibem afinidade pela proteína MCL-1 e, portanto, em tumores nos quais essa proteína é usualmente superexpressa (p. ex. determinados tipos de câncer de pulmão de células não-pequenas, mielomas múltiplos e determinados cânceres de mama), a resistência terapêutica é uma implicação frequente (CORY *et al.*, 2016). Nesses casos, um regime combinado com outros agentes pode ser proposto (VELA e MARZO, 2015).

Diversos estudos *in-vitro* e em modelos animais têm investigado o Navitoclax em neoplasias malignas como câncer de mama (LEE *et al.*, 2018), cólon (EICHHORN *et al.*, 2014), esôfago (LIN *et al.*, 2017), ovário (WONG *et al.*, 2012) e pulmão (SHOEMAKER *et al.*, 2008; TSE *et al.*, 2008), demonstrando resultados satisfatórios em termos de efeito antitumorígeno. Ademais, esse fármaco está em fase de testes clínicos para determinados tipos de câncer, incluindo cânceres hematológicos (como leucemias e linfomas) (KIPPS *et al.*, 2015; ROBERTS *et al.*, 2015) e alguns tipos de tumores sólidos (GANDHI *et al.*, 2011; RUDIN *et al.*, 2012; TOLCHER *et al.*, 2015b).

De modo geral, o Navitoclax foi administrado em doses diárias de 100 mg (KIPPS *et al.*, 2015), 150 mg (GANDHI *et al.*, 2011; TOLCHER *et al.*, 2015b); e 200-325 mg (RUDIN *et al.*, 2012; ROBERTS *et al.*, 2015), sendo usualmente bem tolerado nas doses investigadas. O pico da concentração plasmática desse fármaco (como monoterapia) foi observado em aproximadamente 7 horas, sendo o período de meia

vida de 15 horas; dosagens iguais ou superiores a 225 mg resultaram em concentrações plasmáticas compatíveis com as determinadas em modelos animais para que o composto exiba efeito terapêutico (GANDHI *et al.*, 2011).

Um dos efeitos adversos consistentemente observados entre os estudos foi a ocorrência de trombocitopenia dose-dependente, que ocorre devido a inibição da proteína BCL-XL em plaquetas, no entanto, não foram observados eventos hemorrágicos clinicamente significativos nas doses avaliadas (RUDIN *et al.*, 2012; ROBERTS *et al.*, 2015). A efetividade desse composto foi variável entre os testes clínicos, apresentando resultados favoráveis em tumores linfoides e alguns tumores sólidos (tanto como monoterapia ou terapia combinada) (GANDHI *et al.*, 2011; KIPPS *et al.*, 2015; ROBERTS *et al.*, 2015; TOLCHER *et al.*, 2015b), porém pouco satisfatórios em tumores em estágios avançados ou recorrentes (RUDIN *et al.*, 2012; TOLCHER *et al.*, 2015a).

Visando minimizar efeitos adversos, especialmente sobre as plaquetas, foi desenvolvido o composto de terceira geração Venetoclax (ou ABT-199), o qual exibe ligação de alta afinidade somente a proteína BCL-2, sendo considerado, portanto, um composto monoseletivo (SOUERS *et al.*, 2013). Esse avanço foi particularmente importante para o seu uso em estudos clínicos para pacientes com cânceres hematológicos, como leucemias, nos quais uma trombocitopenia já está pré-estabelecida (SAMRA *et al.*, 2020).

Em razão de seus efeitos anticâncer em diversos estudos pré-clínicos e clínicos, até o presente momento, o Venetoclax foi o único mimético de BH3 aprovado pela agência estadunidense *Food and Drug Administration* (FDA) para uso em larga escala, especificamente para o tratamento de leucemia mieloide aguda (REX *et al.*, 2022). Apesar disso, vale ressaltar que a efetividade do Venetoclax como monoterapia pode ser restrita em tumores malignos nos quais outras proteínas antiapoptóticas (como BCL-W, BCL-XL e MCL-1) estejam superexpressas (BOSE, GANDHI e KONOPLEVA, 2017). No que tange especificamente carcinomas de cabeça e pescoço, a expressão da proteína BCL-2 encontra-se aumentada em aproximadamente 15-25% dos tumores (PENA *et al.*, 1999; TRASK *et al.*, 2002; REDONDO *et al.*, 2006), sugerindo que o Venetoclax pode apresentar eficácia limitada como monoterapia dependendo do tipo de malignidade presente (CARTER *et al.*, 2019).

4.6 Microambiente tumoral

O desenvolvimento de tumores não ocorre unicamente por um acúmulo de mutações genéticas nas células cancerígenas, mas também, por uma interação entre essas células e as células adjacentes, denominadas como células do microambiente do estroma tumoral (SUND e KALLURI, 2009). A coevolução do tumor e das células estromais pode ocorrer de duas maneiras: 1) as modificações no microambiente tumoral podem ocorrer primeiro e resultar na transformação maligna de células epiteliais; ou 2) as células epiteliais podem resultar na ativação de células estromais por meio de mecanismos parácrinos (POLYAK, HAVIV e CAMPBELL, 2009).

Os componentes celulares do microambiente tumoral consistem de fibroblastos, células inflamatórias, vasos sanguíneos (constituídos de células endoteliais e pericitos), células neuronais e adipócitos; os componentes não-celulares incluem a matriz extracelular (composta de colágenos, proteoglicanos e glicoproteínas) e outros metabólitos como citocinas inflamatórias, enzimas, fatores de crescimento, hormônios, entre outros (SPAW, ANANT e THOMAS, 2017). Dentre os componentes celulares do estroma tumoral, é destacada a presença proeminente dos fibroblastos. Os fibroblastos são células alongadas e fusiformes, sendo responsáveis pela deposição de matriz extracelular, regulação de processos inflamatórios e de mecanismos de reparo tecidual (TOMASEK *et al.*, 2002).

Durante o processo de reparo tecidual, os fibroblastos saem de um estado quiescente (no qual as células se encontram "dormentes") e se tornam fibroblastos ativados (ou miofibroblastos), passando a adquirir um fenótipo secretor caracterizado pela secreção de constituintes de matriz extracelular, fatores de crescimento e fatores de diferenciação celular (KALLURI e ZEISBERG, 2006). Após o reparo, os fibroblastos ativados entram em processo de apoptose e são removidos do tecido. No entanto, em lesões malignas, e em condições de fibrose tecidual, esse processo é desregulado e os fibroblastos passam a adquirir um fenótipo de ativação persistente, permanecendo no tecido e, conseqüentemente, levando a desmoplasia através da deposição excessiva de matriz extracelular (CIRRI e CHIARUGI, 2012). A presença de fibroblastos ativados no estroma tumoral pode favorecer o desenvolvimento e progressão tumoral, uma vez que as células cancerígenas podem se utilizar dos

fatores de crescimento secretados pelos fibroblastos para sua própria sobrevivência e proliferação (LEBLEU e KALLURI, 2018).

De um modo geral, as principais proteínas secretadas pelos fibroblastos associados ao câncer incluem: fatores de crescimento (p. ex. EGF, fator de crescimento de tecido conjuntivo e fator de crescimento insulínico), citocinas (p. ex. ciclooxigenase-2 e interleucina-6), vesículas extracelulares, metabólitos, componentes da matriz extracelular (particularmente colágenos, fibronectinas e glicoproteínas) e enzimas remodeladoras de matriz (p. ex. metaloproteinases da matriz, lisil oxidases e transglutaminases) (SANTI, KUGERATSKI e ZANIVAN, 2018). No entanto, vale ressaltar que, atualmente, não se é conhecido um marcador específico para fibroblastos associados ao câncer, sendo que os marcadores mais comumente utilizados para uma identificação inespecífica de fibroblastos ativados no estroma de tumores sólidos são α -actina de músculo liso (α -SMA, do inglês *α -smooth muscle actin*), proteínas ativadoras de fibroblastos (FAP, do inglês *fibroblast activation protein*) e vimentina (SHIGA *et al.*, 2015).

Ademais, é proposto ainda que mecanismos parácrinos das células tumorais possam influenciar a transdiferenciação de fibroblastos quiescentes em fibroblastos associados ao câncer através da secreção de fatores como o fator de crescimento tumoral β (TGF- β , do inglês *tumour growth factor- β*), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), e fator de necrose tumoral- α (TNF- α , do inglês *tumor necrosis- α*) (CIRRI e CHIARUGI, 2012). Em relação ao TGF- β em particular, além da capacidade de modificar o microambiente tumoral, essa proteína também regula a expressão de alguns fatores transcricionais relacionados à transição epitélio-mesênquima, tais como Snail, Slug, Twist, entre outros (IKUSHIMA e MIYAZONO, 2010; DRABSCH e TEN DIJKE, 2012). A transição epitélio-mesênquima é caracterizada pela perda do fenótipo epitelial, com a consequente diminuição da expressão de marcadores epiteliais como a e-caderina e o aumento da expressão de marcadores mesenquimais como a vimentina (KALLURI e WEINBERG, 2009). Esse fenômeno tem o potencial de favorecer a invasão tecidual pelas células cancerígenas uma vez que elas adquirem um fenótipo de célula mesenquimal (CAJA *et al.*, 2018).

Nesse contexto, vale destacar que os fibroblastos do estroma tumoral podem ser originados a partir de células-tronco mesenquimais, células endoteliais, adipócitos e pericitos (ANDERBERG e PIETRAS, 2009; HAVIV *et al.*, 2009). As diferentes origens celulares dos fibroblastos associados ao câncer podem estar relacionadas a

múltiplas alterações transcricionais que resultam, portanto, em uma população heterogênea de fibroblastos associados ao câncer e, conseqüentemente, fenótipos secretores distintos (PRIME et al., 2017). Dentre os fibroblastos presentes na heterogênea população do estroma tumoral, têm sido estudado o papel dos fibroblastos com fenótipo senescente, os quais podem exibir um secretoma diferenciado e, mesmo em reduzido número, podem estimular significativamente o crescimento de células epiteliais com mutações oncogênicas (KRTOLICA et al., 2001).

4.7 Senescência celular e sua relação com o câncer

A senescência celular foi primeiramente descrita por HAYFLICK (1965), o qual observou, *in vitro*, que células humanas podem se multiplicar por um número finito de vezes. Esse fenômeno é caracterizado por um estado de interrupção permanente do ciclo celular, o qual atua como um mecanismo de defesa, uma vez que estresses ambientais, metabolismo oxidativo e erros de replicação estão continuamente causando danos ao genoma das células (CAMPISI, 2001). Os sinais iniciadores de senescência incluem o encurtamento dos telômeros, ativação de oncogenes ou potencial disfunção de genes supressores de tumor, os quais atuam como mecanismos de segurança contra o câncer, sendo válido ressaltar que lesões malignas devem evadir esses pontos de checagem da senescência celular para que o seu desenvolvimento e progressão seja possível (DIMRI, 2005).

Fisiologicamente, a senescência ocorre em paralelo ao fenômeno da apoptose, no entanto, o modo como as células respondem aos estresses ambientais (como radiação ionizante, estresse oxidativo, hipóxia, entre outros) é consideravelmente variável, sendo proposto que em situações nas quais a apoptose possa desencadear dano ou disfunção aos tecidos, a senescência seria a via de escolha das células (GEORGAKOPOULOU et al., 2016). De modo geral, a senescência é desencadeada por meio da ativação de vias de sinalização que culminam na ativação de genes supressores tumorais que codificam proteínas como a p16^{INK4a}, p21 e p53, as quais induzem a interrupção permanente do ciclo celular (PARKINSON, 2010).

Ainda, vale destacar que células senescentes apresentam um aumento expressivo do seu conteúdo lisossomal e expressão da enzima β -Galactosidase associada a senescência (SA- β -Gal), a qual é detectável em células senescentes considerando um pH subótimo de 6.0, sendo um marcador muito utilizado em estudos

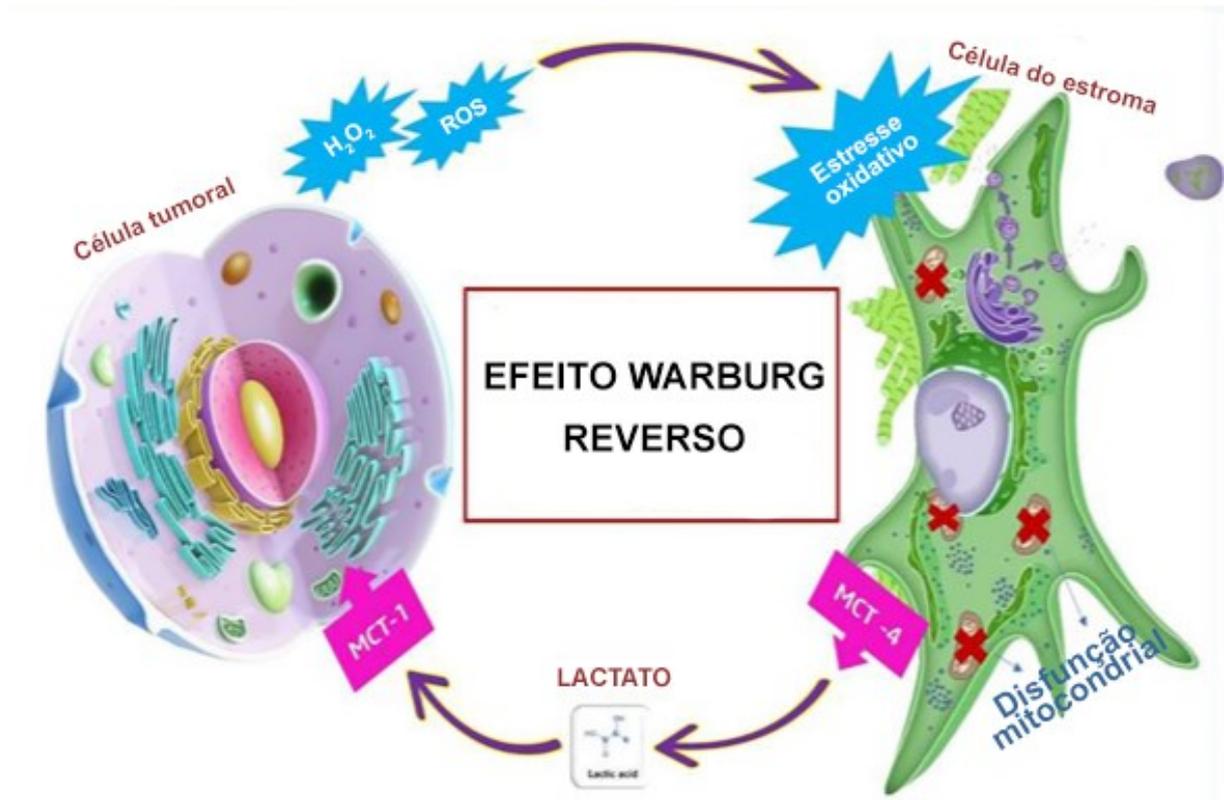
in-vitro e *in-vivo* para quantificação de células senescentes (COLLADO e SERRANO, 2006).

Apesar da senescência atuar fisiologicamente como um mecanismo de supressão tumoral, esse mecanismo também pode, paradoxalmente, contribuir para o desenvolvimento e progressão de lesões malignas (CAMPO-TRAPERO *et al.*, 2008). Nesse contexto, tem-se proposto que células cancerígenas apresentem uma produção e secreção exacerbada de peróxido de hidrogênio e espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), podendo ter consequências importantes para as células do microambiente tumoral, tais como alterações no metabolismo energético, autofagia e senescência celular (CAPPARELLI *et al.*, 2012)

Uma dessas consequências é o chamado "efeito Warburg reverso" (**Figura 6**), no qual as células cancerígenas induzem as células do estroma a alterar o seu metabolismo energético para retroalimentar a sua alta demanda energética (BENNY *et al.*, 2020). O estresse oxidativo presente no microambiente tumoral causa uma disfunção mitocondrial e induz as células do estroma a realizar glicólise, mesmo na disponibilidade de oxigênio (LISANTI *et al.*, 2011). O lactato produzido pelas células estromais através do processo de glicólise aeróbica é, então, utilizado pelas células cancerígenas, contribuindo para a progressão do tumor (WILDE *et al.*, 2017).

Entretanto, a produção exacerbada de peróxido de hidrogênio pelas células tumorais e a alteração do metabolismo energético das células do estroma podem contribuir para a que essas células entrem em um estado de senescência (CAPPARELLI *et al.*, 2012). As células senescentes, apesar de não se replicarem, se mantêm metabolicamente ativas e possuem um fenótipo secretor característico, denominado fenótipo secretor associado a senescência (FSAS), o qual é composto por numerosas citocinas, fatores de crescimento e proteases que apresentam uma ampla variedade de atividades autócrinas e parácrinas (CAMPISI, 2011).

Figura 6 - Efeito Warburg reverso. As células tumorais, através da produção e secreção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e espécies reativas de oxigênio (ROS), induzem estresse oxidativo em células do microambiente tumoral. Isso desencadeia uma disfunção mitocondrial e mudança no metabolismo energético nas células do estroma, as quais passam a produzir lactato a partir de glicólise aeróbia. O lactato produzido retroalimenta as células tumorais para suprir sua alta demanda energética.



Fonte: Adaptado de BENNY *et al.* (2020).

Além disso, células senescentes têm demonstrado resistência a estímulos apoptóticos, podendo acumular no organismo e resultar em efeitos deletérios em decorrência das proteínas e metabólitos provenientes do FSAS (CAMPO-TRAPERO *et al.*, 2008). Vale ressaltar que a superexpressão de determinadas proteínas antiapoptóticas da família BCL-2 é um dos mecanismos pelos quais as células senescentes resistem a morte celular, de mesma forma que as células tumorais (YOSEF *et al.*, 2016).

Particularmente em tumores sólidos, a presença de fibroblastos senescentes no estroma tumoral constitui um fator importante no que tange o seu desenvolvimento e progressão, uma vez que o FSAS pode estimular a proliferação e invasão de células

malignas, além de poder contribuir para a resistência terapêutica (PRIME *et al.*, 2017). Desse modo, tem-se sugerido que a eliminação de células senescentes do microambiente tumoral pode, portanto, ser um alvo terapêutico promissor (ZHANG e LIU, 2013).

Nesse contexto, destacam-se os indutores de apoptose miméticos de BH3, os quais atuam principalmente nas vias apoptóticas relacionadas a família de proteínas BCL-2 (TIMUCIN, BASAGA e KUTUK, 2019). Além desses agentes poderem apresentar um efeitos anticâncer direto através da indução de apoptose de células tumorais e sinergia com agentes quimioterápicos convencionais (CHEN *et al.*, 2015), determinados miméticos de BH3 também têm mostrado um potencial senolítico, podendo apresentar um efeito anticâncer indireto por meio da eliminação de células senescentes do microambiente tumoral (ZHU *et al.*, 2016).

5 CAPÍTULO I

REVISÃO DA LITERATURA ACERCA DOS EFEITOS ANTICÂNCER DE COMPOSTOS MIMÉTICOS DE BH3 SOBRE CARCINOMAS DE CABEÇA E PESCOÇO

5.1 Apresentação

Visando identificar a abrangência da literatura científica sobre o tema, foi realizada uma revisão narrativa em relação aos estudos que avaliaram o efeito anticâncer de compostos miméticos de BH3 sobre carcinomas de cabeça e pescoço. Foram considerados estudos que investigaram linhagens tumorais, modelos xenográficos e/ou participantes humanos acometidos por carcinomas de cabeça e pescoço. Os resultados obtidos nesta primeira fase da pesquisa foram compilados em formato de artigo, o qual foi aceito para publicação no periódico *Oral Oncology*. O manuscrito foi formatado de acordo com as normas do periódico, acessadas em fevereiro de 2022.

5.2 Artigo aceito para publicação

Title: Anticancer effects of putative and validated BH3-mimetic drugs in head and neck squamous cell carcinomas: an overview of current knowledge

Authors: Gilberto Melo^a; Carolina Amália Barcellos Silva^b; Angela Hague^c, Eric Kenneth Parkinson^d; Elena Riet Correa Rivero^e

^a**Dr. Melo, MsC.** Postgraduate Program in Dentistry, Federal University of Santa Catarina - Florianópolis, Brazil. ORCID: 0000-0001-5744-4954. E-mail: melo.gilberto@hotmail.com

^b**Professor Silva, PhD.** Department of Morphological Sciences, Biological Sciences Center, Federal University of Santa Catarina – Florianópolis, Brazil. ORCID: 0000-0002-2164-8856. E-mail: carolina.barcellos@ufsc.br

^c**Professor Hague, PhD.** Senior Lecturer, Bristol Dental School, Bristol, United Kingdom. E-mail: a.hague@bristol.ac.uk

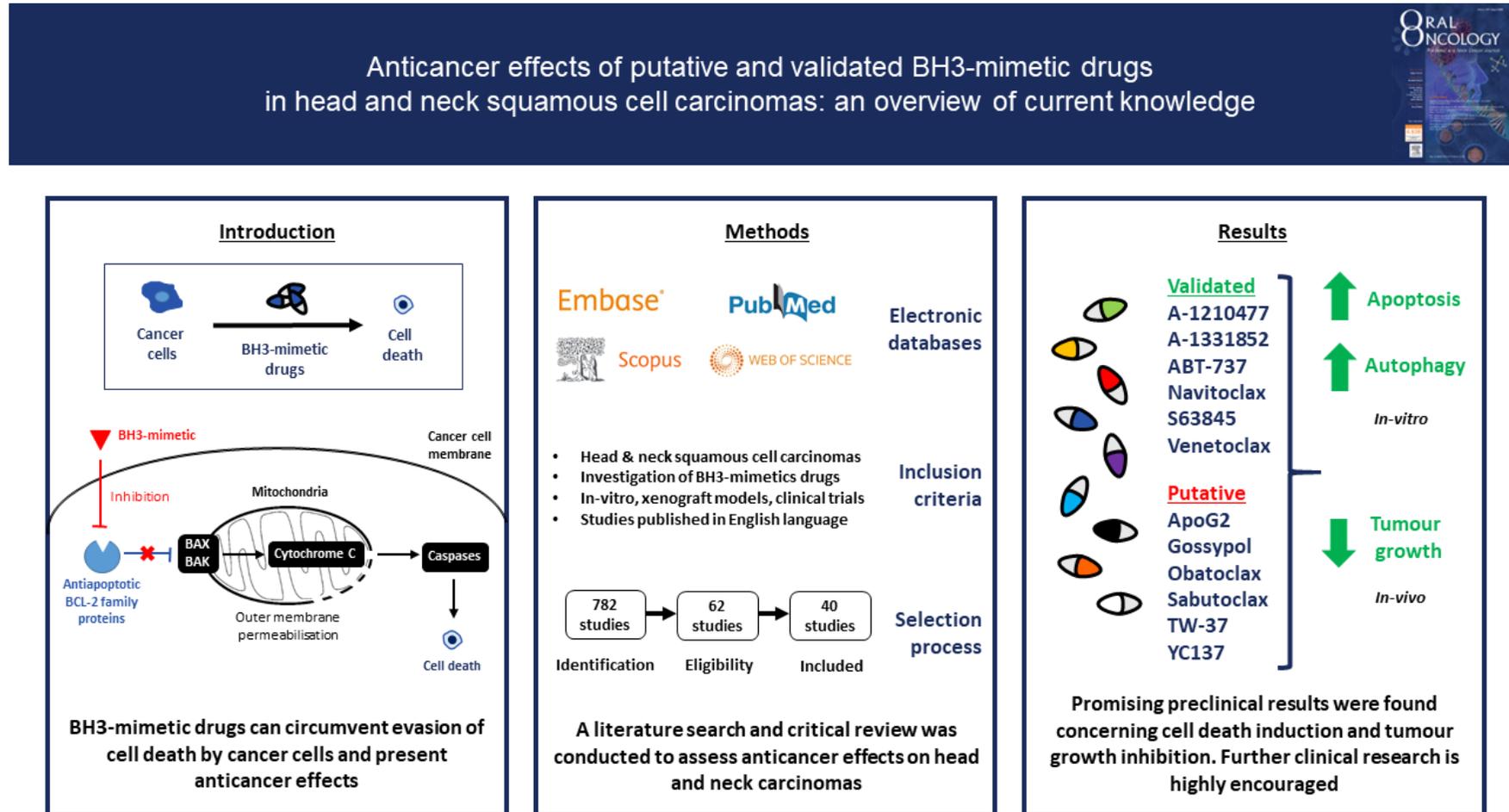
^d**Professor Parkinson, PhD.** Centre for Oral Immunobiology and Regenerative Medicine, Institute of Dentistry, Barts and the London School of Medicine and Dentistry, Queen Mary University of London, Turner Street, London, United Kingdom. ORCID: 0000-0003-4234-1658. E-mail: e.k.parkinson@qmul.ac.uk

^e**Professor Rivero, PhD.** Department of Pathology, Health Sciences Center, Federal University of Santa Catarina – Florianópolis, Brazil. ORCID: 0000-0002-8516-8771. E-mail: riet.elena@gmail.com

HIGHLIGHTS

- BH3-mimetics showed capabilities of inducing cell death in malignant cell lines
- BH3-mimetics presented tumour growth inhibition capabilities in xenograft models
- Response to BH3-mimetics is related to tumour expression of BCL-2 family proteins
- Combination with other drugs or ionising radiation promoted enhanced efficacy
- Available clinical data is incipient and further research is highly encouraged

Figura 7 - (do artigo publicado em língua inglesa) - Graphical abstract.



ABSTRACT

The purpose of this review was to summarise available literature concerning the anticancer effects of both putative and validated BH3-mimetics in head and neck squamous cell carcinomas. A literature search was performed and studies assessing malignant cell lines, xenograft models, and/or humans were considered eligible. A total of 501 studies were identified, of which 40 were included. One phase-II clinical trial assessing gossypol (combined with docetaxel) was found. The remaining 39 preclinical studies investigated cell lines and/or xenograft models involving the use of six validated BH3-mimetics (A-1210477, A-1331852, ABT-737, navitoclax, S63845, venetoclax) and six putative BH3-mimetics (ApoG2, gossypol, obatoclax, sabutoclax, TW-37, and YC137). In preclinical settings, most validated BH3-mimetics were capable of inducing apoptosis (*in-vitro*) and tumour growth inhibition (*in-vivo*). The majority of putative BH3-mimetics were also capable of inducing cell death, although important off-target effects, such as autophagy induction, were also described. Combinations with conventional anticancer drugs, ionising radiation, or multiple BH3-mimetics generally resulted in enhanced anticancer effects, such as increased sensitivity to apoptotic stimuli, especially considering some cell lines that showed resistance to either treatment alone. In conclusion, although clinical data are still insufficient to evaluate the anticancer effects of BH3-mimetics in head and neck squamous cell carcinomas, promising results in preclinical settings were observed concerning induction of cell death and inhibition of tumour growth. Therefore, further clinical trials are highly encouraged.

Keywords (MeSH Terms): "Head and Neck Neoplasms"; "Head and Neck Cancer"; "Drug Therapy"; "Apoptosis"; "BCL-2"; "BCL-XL"; "BCL-W"; "MCL-1"; "BH3"; "Targeted Therapy".

INTRODUCTION

Head and neck cancers comprise a heterogeneous group of malignancies. Most cancers in the head and neck are histologically characterised as squamous cell carcinomas, which can arise from the epithelium of the oral and nasal cavities, pharynx, and larynx [1]. Although available treatments can improve survival rates, serious consequences including disruption of vital anatomy, aesthetic impairments, and associated psychosocial issues may arise [2].

Aiming to improve treatment effectiveness and diminish complications, novel anticancer strategies are being developed, such as gene therapy, immunotherapy, and targeted therapy [3]. Molecularly targeted therapies focus on specific cancer-associated molecules (which are highly expressed in certain types of tumours) to disrupt cancer survival mechanisms and selectively induce malignant cell death [4].

Apoptosis inhibition is considered an essential step in the transition of normal to malignant cells. Amongst key regulators of apoptosis, the B-cell lymphoma 2 (BCL-2) family proteins play an important role [5]. The prosurvival BCL-2 family proteins (such as BCL-2, BCL-XL, BCL-W, and MCL-1) are considered multidomain, sharing homology throughout all four BCL-2 homology domains (BH1 to BH4) [6]. Several proapoptotic BCL-2 proteins are also considered multidomain, sharing homology within the BH1 to BH3 domains (such as BAX and BAK), although others only share homology with the α -helical BH3 region (such as BAD, BIM, NOXA, and PUMA) and are considered BH3-only proteins [7].

In otherwise healthy cells, BH3-only proteins can inhibit prosurvival BCL-2 family proteins if an apoptotic stimulus is present; this results in the release of signalling molecules that induce apoptosis through the mitochondrial pathway in a BAX/BAK dependant manner [8]. However, prosurvival BCL-2 family proteins were found to be strongly upregulated in many types of malignant tumours, which can contribute to their apoptosis evasion capabilities [9].

Extensive research has been conducted to identify molecules with BH3-mimetic capabilities, such as naturally occurring gossypol [10], ABT-737 [11], and venetoclax (or ABT-199) [12]. ABT-737 showed promising antitumour activities in preclinical settings, but it presented poor oral absorption, resulting in the development of the orally available second-generation navitoclax (or ABT-263)

[13]. Although these drugs share BH3-mimetic characteristics, the literature is considerably heterogeneous regarding their anticancer effects since the expression pattern of prosurvival BCL-2 proteins varies greatly across different types of cancers [14].

Notwithstanding their capability to bind to BCL-2 proteins, several compounds often considered as BH3-mimetics present relevant off-target effects. Obatoclax, gossypol and derivatives, for example, should be considered as putative BH3-mimetics since their off-target effects can induce cell death independently of BAX/BAK and caspase activation. On the other hand, ABT-737 and derivatives can be considered validated BH3-mimetic drugs since cell death induction occurs primarily through a BAX/BAK-dependent manner [15].

Some BH3-mimetic drugs are considered pan-inhibitors since they bind to a broad range of antiapoptotic BCL-2 family proteins (BCL-2, BCL-XL, BCL-W, and MCL-1). Nonetheless, several compounds bind to subsets of BCL-2 proteins and some newer drugs are considered monoselective, with high binding affinity to a single BCL-2 protein (Table 1/**Tabela 1**) [16]. Although monoselective compounds can result in lower toxicity, they can also present limited anticancer activity in tumours in which untargeted BCL-2 proteins are highly expressed [17].

In HNSCC, in particular, it is proposed that the BCL-XL and MCL-1 proteins are consistently upregulated [35]. Moreover, although the BCL-2 protein is not usually upregulated, it can be overexpressed in around 15-25% of HNSCC tumours [18-20]. In this regard, summarising currently available evidence can guide future studies concerning promising drugs for HNSCC treatment, thus contributing to novel therapeutic strategies to be made available for individuals with HNSCC in which BCL-2 family proteins are overexpressed. Therefore, this study aimed to provide an overview of available literature considering the anticancer effects of putative and validated BH3-mimetic drugs in HNSCC.

MATERIAL AND METHODS

Search strategy

Search strategies were elaborated and adapted for each of the following electronic databases: Embase, PubMed, Scopus, and Web of Science. Searches were simultaneously performed across all databases and encompassed

publications from the initial coverage date through October 05, 2021. In addition, the domain ClinicalTrials.gov was screened through the search engine of The Cochrane Library for relevant ongoing trials. Further details regarding the search strategies are provided in Supplementary Table 1. The "AND" operator was used according to the following structure: (BH3-mimetic synonyms) AND (HNSCC synonyms). The field related to HNSCC synonyms also included HNSCC cell lines. EndNote 20 was used for reference management (Clarivate Analytics, Pennsylvania, United States of America).

Study selection and data collection

After a pre-selection of articles by titles and abstracts, a full-text reading was conducted. Moreover, the following eligibility criteria were applied: articles published in the English language that evaluated the anticancer effects of BH3-mimetic drugs in HNSCC cell lines, xenograft models, and/or human participants. The main outcomes of this review were the effects of BH3-mimetic drugs on cell death mechanisms (*in-vitro*), tumour growth inhibition (*in-vivo*), and treatment efficacy considering clinical variables such as tumour regression or patient survival.

The data collection encompassed the following key features: author, year, BH3-mimetic drugs, tumour characteristics (such as type and original site); study sample (including cell lines and xenograft models), combined therapies (if any), assessment methods, treatment dose and duration, and main findings. Moreover, for each included study, detailed information concerning the origin of malignant cell lines (such as nasopharynx, larynx, and oral cavity), cell line identification (such as CAL27 and SCC9), and xenograft model characteristics (such as BALB/c and SCID mice) were extracted.

Validation status of BH3-mimetic drugs

Compounds must have been previously tested according to the following criteria to be considered as a validated BH3-mimetic drug: 1) Selective induction of mitochondrial outer membrane permeabilisation (MOMP) of cells with known dependence on the anti-apoptotic protein target; 2) Selective killing of cells with known dependence on the anti-apoptotic protein target; and 3) Absence of

MOMP induction and lack of killing of cells with BAX/BAK deficient mitochondria [21].

Validation status of malignant cell lines

The International Cell Line Authentication Committee (ICLAC) has developed an openly published database and, considering the latest report as of June 2021 (version 11) (iclac.org/databases/cross-contaminations/), a total of 576 misidentified cell lines were registered, of which reliable stocks of reference cell lines are not known to exist for 531 of these cell lines. The malignant cell lines used across HNSCC studies were cross-checked with the ICLAC database to verify their validation status.

RESULTS

Study selection

A total of 782 studies were identified from database searches (Embase: 123, PubMed: 308, Scopus: 312, Web of Science: 39), of which 608 remained following duplicates removal. After screening titles and abstracts, 62 studies remained for full text reading (reasons for exclusion available in Supplementary Table 2/**Tabela 2**). Thereafter, 40 articles met the eligibility criteria and were included in this review. In addition, as of April 2022, no records of ongoing clinical trials investigating the effects of BH3-mimetic drugs on HNSCC were found.

Validation status of BH3-mimetic drugs

Considering the 12 identified compounds across included HNSCC studies, only 6 can be considered as validated BH3-mimetic drugs according to the criteria previously described (ABT-737, navitoclax, venetoclax, A-1331852, A-1210477, and S63845) [21]. The remaining 6 drugs (ApoG2, gossypol, obatoclax, sabutoclax, TW-37, and YC137) should be considered as putative BH3-mimetics, with potential off-target effects.

Validation status of malignant cell lines

Seven of the 40 included studies investigated malignant cell lines that were listed as potentially misidentified or cross-contaminated by the ICLAC report,

namely the 5-8F, CNE-1, CNE-2, HEp-2, HONE-1, SUNE-1, and Tca8113 cell lines [22-28]. These cell lines were referred to as potentially HeLa contaminated and, since HeLa originated from human cervix carcinoma [29], these studies might present discrepancies compared to validated HNSCC cell lines. A summary of studies investigating cell lines listed as potentially cross-contaminated or misidentified is presented in Table 2.

Main findings

A summary of descriptive characteristics and main findings of included studies is presented as follows: validated BH3-mimetics (Table 3/**Tabela 3** and Table 4/**Tabela 4**) and putative BH3-mimetics (Table 5/**Tabela 5** and Table 6/**Tabela 6**). Moreover, only one clinical trial on HNSCC assessing the effects of gossypol was found [30].

Validated BH3-mimetic drugs

ABT-737 (single-agent or combined with chemotherapy/ionising radiation [IR])

Single-agent ABT-737 did not present remarkable cell death induction capabilities in several included studies [31-34], although mild [35] to favourable anticancer effects [36, 37] were found depending on the cell lines investigated. Nonetheless, anticancer effects in combination with chemotherapy/IR were more consistent across studies. Synergistic or additive effects were observed when ABT-737 was combined with cisplatin and etoposide (anticancer drug) [31], meayamycin B (modulator of the splicing factor 3b subunit 1) [37], AZD-2014 (a mTOR inhibitor) [35], fenretinide (retinoid derivative) [34], or IR [32].

Navitoclax (single-agent or combined with chemotherapy/IR)

Single-agent navitoclax showed prominent anticancer effects both *in-vitro* [38, 39] and *in-vivo* [38]. Similar to ABT-737, the combination with chemotherapy/IR often showed improved anticancer effects. Gadsden et al. [39] reported that the combination of navitoclax with palbociclib (CDK 4/6 inhibitor) resulted in lower cell viability (around 10-25%) compared to either drug alone (around 50-90%). Furthermore, Tuomainen et al. [40] reported that navitoclax showed moderate to strong synergy with IR, regardless of the p53 status of

investigated HNSCC cell lines. Lastly, Britt et al. [41] assessed navitoclax combined with either ectopic NOXA or fenretinide, reporting that apoptosis was potentiated compared to either treatment alone, regardless of the p53 status of HNSCC cell lines investigated.

Venetoclax (single-agent or combined with chemotherapy/IR)

Although venetoclax is currently the sole BH3-mimetic drug approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) [42] and has been extensively studied in drug combination trials for the treatment of acute myeloid leukaemia [43], only two preclinical studies were found concerning its effects on HNSCC. One showed that single-agent venetoclax presented apoptosis induction and tumour growth inhibition capabilities and that the combination with cisplatin resulted in augmented anticancer effects [22]. It is worth noting that 1 of the 4 cell lines used in this study (Tca8113) was found to be potentially HeLa contaminated by an earlier report, which stated that it is unclear whether an alternative authenticated stock ever existed [44]. In this context, although venetoclax showed anticancer effects in all 4 cell lines, Tca8113 was particularly more susceptible, which can be related to its higher expression of the BCL-2 protein compared to the validated HNSCC cell lines.

The second study found that single-agent venetoclax showed prominent anticancer capabilities concerning proliferation inhibition of SQ20B cancer stem cells; the combination with cetuximab and IR was particularly effective for this cell population [45]. Controversially, no relevant anticancer effects on SQ20B cells of the tumour bulk, possibly due to a lower BCL-2 protein expression. Nonetheless, the combination with cetuximab presented enhanced anticancer effects in SQB20 compared to either drug alone.

Combination of multiple BH3-mimetic drugs

Wang et al. [27] reported that venetoclax (BCL-2 inhibitor) and S63845 (MCL-1 inhibitor) were capable of inhibiting malignant cell proliferation as single-agents, although the combination of both BH3-mimetics was more effective, reducing the required concentration and time to achieve a similar effect compared to either drug alone. Moreover, the authors also reported that, *in-vivo*, venetoclax alone regressed tumour volumes by about 30% compared to controls. Of note,

the combination of venetoclax with S63845 was not assessed *in-vivo*. There are major concerns considering the cell lines used in this study. Growth inhibition was measured in three cell lines, and the two most sensitive cell lines were selected for further study of apoptosis (5-8F and CNE2). These two cell lines were found to be HeLa contaminated by three previous reports [44, 46, 47], which suggested that contamination likely occurred early in the cell line establishment. Therefore, these findings might not be representative of potential anticancer effects on HNSCC cells.

Carter et al. [48] assessed venetoclax, S63845, and A-1331852 (BCL-XL inhibitor) in the cell lines UM-SCC-1, -11B, -17A, -17AS, 74A, and -81B. As single-agents, none of these BH3-mimetics induced pronounced apoptosis *in-vitro*. Moreover, only in one cell line (UM-SCC-1) did these drugs synergise with cisplatin or IR in reducing the clonogenic potential. On the other hand, the combination of the BH3-mimetics A-1331852 and S63845 induced marked apoptosis in all six cell lines. Furthermore, *in-vivo*, the same combination resulted in dose-dependent reduction in the tumour size. Interestingly, this study also investigated the exposure of tumour tissues surgically resected from HNSCC patients to A-1331852 and S63845, reporting that although these drugs did not effectively induce apoptosis as single-agents (around 10% cleaved poly[ADP-ribose] polymerase [PARP]-positive tumour cells), significant apoptosis induction was obtained using the combination (around 40% cleaved PARP-positive tumour cells). Of note, although no prominent apoptosis induction effects were found considering BH3-mimetics as single-agents, the authors investigated concentrations up to 100 nM and exposure times up to 24h, which are amongst the lowest ranges across included studies.

The remaining two studies were conducted by Ow and collaborators, who assessed the effects of both navitoclax and A-1210477 [49, 50]. The first study reported that the combination of navitoclax with either IR or cisplatin did not increase treatment responses in the majority of cell lines, although combining navitoclax with A-1210477 resulted in an average 7-fold reduction in the IC₅₀ (dose needed for a 50% inhibitory effect) of navitoclax across all cell lines investigated [49]. The second study reported that the combination of navitoclax with A-1210477 or bortezomib resulted in apoptosis responses that approached

or exceeded treatment with staurosporine (positive control for apoptosis due to its potent inhibition of capability of different kinases) [50].

Summary of findings of validated BH3-mimetic drugs

Most studies assessing validated BH3-mimetic drugs often performed multiple assays to determine not only its cytotoxic effects but also the type of cell death, including evaluation of cleaved-caspase activity and/or annexin-V binding. In this regard, although ABT-737 showed inconsistent results as a single-agent, remarkable anticancer effects were found when combined with chemotherapy/IR. Both navitoclax and venetoclax showed more consistent anticancer effects as single-agents compared to ABT-737 and the combination with chemotherapy/IR once more resulted in enhanced effects, possibly due to a drug induced sensitisation to apoptotic stimuli. The combination of multiple BH3-mimetics was particularly useful for cancer cell lines that showed resistance to either drug alone, which is likely related to the wider range of targeted BCL-2 family proteins.

Putative BH3-mimetic drugs

Gossypol (clinical trial)

Only one phase-II clinical trial [30] was found. This was a randomised, open-label trial that assessed the effects of docetaxel alone or with the addition of (-)-gossypol (considering both pulsed and metronomic dosing strategies) for the treatment of unresectable, recurrent, or distantly metastatic HNSCC. A total of 35 individuals were enrolled and treatment response was evaluated primarily based on radiologic evidence of tumour status. Overall, although a favourable toxicity profile was reported, the addition of (-)-gossypol to docetaxel did not demonstrate evidence of incremental efficacy.

Gossypol (single-agent or combined with chemotherapy/IR)

The (-)-gossypol (or AT-101), that is the isolated (-)-enantiomer of the (\pm)-gossypol, was the most investigated drug across included preclinical studies (n=7). Of these, 5 assessed its effects exclusively in cell lines, reporting apoptosis induction capabilities either as a single-agent [10] or combined with cisplatin (anticancer drug) [51], N-acetyl-cysteine (antioxidant) [52], particles loaded with

anti-BCL-2 siRNA [53], or IR [54]. Two studies assessed both cell lines and xenograft models: one found that single-agent (-)-gossypol inhibited cell growth at IC₅₀ of 3-6 μM , whilst also increasing the percentage of apoptotic cells in tumours of xenograft models [55]. The second reported that the IC₅₀ for (-)-gossypol was around 2.5 μM and combination with docetaxel produced additive toxicity *in-vitro*; daily therapy in xenograft models also showed increased mouse survival and decreased tumour mitotic index compared to weekly therapy [56].

A total of 5 studies assessed (\pm)-gossypol (also described as racemic gossypol or naturally occurring gossypol), which is a mixture of (+)- and (-)-enantiomers [28, 57-60]. Konac et al. [28] reported an 23-26% increase in apoptotic cells using 50-75 μM of (\pm)-gossypol. Nonetheless, the authors investigated a single cell line (HEP2) that was found to be cross-contaminated with HeLa cells by early reports [61, 62], which assessed HEP2 cell lines from several sources [62]. Therefore, these findings might not be applicable to HNSCC cells. Benvenuto et al. [57] assessed single-agent (\pm)-gossypol, reporting IC₅₀ values of 4.75 μM for the FaDu and 5.02 μM for the CAL27 cell line; the authors suggested that this drug inhibited proliferation and induced both apoptosis and autophagy of HNSCC cells.

Two studies assessed (\pm)-gossypol combined with other drugs: Boehm et al. [58] reported that, compared with either treatment alone, (\pm)-gossypol presented additive/synergistic effects in inducing apoptosis when combined with STAT3 decoy (oncogenic transcription factor), which was further enhanced with the addition of erlotinib (anticancer drug). Wong et al. [59] investigated the combination of (\pm)-gossypol with gemcitabine, reporting additive/synergistic effects in HONE1 and CNE2 cell lines, although also describing antagonistic effects in CNE1 and HK1 cell lines. From cell lines investigated by Wong et al. [59], the CNE1/CNE2 [44] and HONE1 cell lines [47] were found to be HeLa contaminants by independent reports, with contamination likely occurring during initial establishment or subsequent cell passages. Thus, only the findings of the HK1 cell line might represent the effects on HNSCC cells, which indicated antagonistic effects of (\pm)-gossypol with gemcitabine. Lastly, Kasten-Pisula et al. [60] assessed the effects of (\pm)-gossypol combined with IR, reporting that this drug inhibited the proliferation of FaDu cells, also resulting in pronounced radiosensitisation.

TW-37 (single-agent or combined with chemotherapy/IR)

TW-37 is a gossypol derivative investigated in four included studies. Ahn et al. [63] reported that, as a single-agent, TW-37 showed inhibition of cell proliferation and tumour growth. The remaining three studies assessed TW-37 in combination with other drugs: Ashimori et al. [64] reported that TW-37, combined with cisplatin, showed enhanced cytotoxic effects *in-vitro*, as well as the ability to inhibit tumour angiogenesis and induce tumour apoptosis *in-vivo*, highlighting that combination with cisplatin extended the time for tumour failure (defined as a 4-fold increase of tumour volume compared with pre-treatment); Lu et al. [65] assessed TW-37 combined with cisplatin and 5-fluorouracil (anticancer drug), reporting that, *in-vitro*, TW-37 prominently promoted malignant cell apoptosis under chemotherapeutics treatments, whilst *in vivo*, TW-37 increased chemosensitivity of malignant tumours; and Yang et al. [66] found that the combination of TW-37 with cryptotanshinone (a cell-permeable diterpene quinone) inhibited the growth of HSC-3 cells more efficiently compared to either treatment alone.

ApoG2

ApoG2, which is another gossypol derivative, was assessed by three studies. Zheng et al. [25] investigated ApoG2 as a single-agent, reporting that this drug induced apoptosis in CNE2 cells and suppressed tumour growth in xenograft models [25]. Hu et al. [23] assessed ApoG2 combined with cisplatin, reporting that proliferation was inhibited in most cell lines, except for HONE1; this study also reported effective tumour growth suppression in xenograft models. The study of He et al. [24] assessed ApoG2 combined with IR, indicating that this drug induced cell death of the NPC cell line and radiosensitised the CNE1 and CNE2 cell lines. Major concerns were present in all studies assessing ApoG2, since all investigated cell lines (CNE1, CNE2, and HONE1) were found to be cross-contaminated with HeLa cells by two previous reports [46, 47].

Obatoclax (single-agent or combined with chemotherapy/IR)

From two studies assessing obatoclax (or GX15-070), Yazbeck et al. [67] assessed its effects exclusively *in-vitro*, reporting that all cell lines investigated

were highly sensitive to this drug as a single-agent; nonetheless, the combination with chloroquine enhanced obatoclox cytotoxicity. Furthermore, Sulkshane and Teni [68] showed that obatoclox induced necroptosis *in-vitro* and that the combination with IR promoted higher clonogenic inhibition as opposed to either treatment alone; moreover, xenograft models treated with obatoclox presented a reduced tumour mean volume compared to controls.

Sabutoclox (single-agent or combined with chemotherapy/IR)

Sabutoclox was assessed by Maji et al. [34], who reported that this drug resulted in a decrease in cell viability as a single-agent and suggested that it promoted cell death through activation of autophagy signalling pathways. Moreover, the authors reported that the combination of sabutoclox with celecoxib (nonsteroidal anti-inflammatory drug) resulted in synergistic inhibition of cell growth of the H357 cell line.

YC137 (single-agent or combined with chemotherapy/IR)

The effects of YC137 were investigated by Low et al. [26]. In HK1 and CNE1 cell lines, YC137 reduced cell proliferation as a single-agent and presented a synergistic effect when combined with cisplatin. In TW01 and SUNE1 cells, YC137 had no obvious synergistic effects with cisplatin, although it reduced the proliferation of SUNE1 cells as a single-agent. The combination of YC137 with paclitaxel (anticancer drug) did not present synergistic effects in any cell lines. Only the findings related to HK1 and TW01 cell lines should be considered representative of the anticancer effects of YC137 on HNSCC cells as there is the possibility of CNE1 and SUNE1 to be HeLa contaminated [44, 47].

Summary of findings of putative BH3-mimetic drugs

Although putative BH3-mimetics showed promising anticancer effects, either as single-agents or combined with other therapies, a large number of these studies did not perform assays to confirm cell death by the mitochondrial pathway of apoptosis (Table 7/**Tabela 7**). In this context, the results were often based on cell viability or DNA degradation assays, which are non-specific for the assessment of the type of cell death [69, 70]. In addition, some off-target effects were also described, including caspase-independent induction of cell death, such

as necroptosis or autophagy [24, 25, 34, 68]. There were also several concerns regarding the use of potentially cross-contaminated or misidentified cell lines. Results from ApoG2, for instance, might not be representative of the effects on HNSCC cells since all cell lines used across studies might be potentially HeLa contaminated.

DISCUSSION

The findings from studies included in this review support that both validated and putative BH3-mimetic drugs are capable of inducing cell death and inhibiting tumour growth of HNSCC in preclinical settings. The use of BH3-mimetics in cancer therapy is promising since these drugs directly engage mechanisms of mitochondrial-mediated apoptosis and act downstream of the p53 pathway. In this context, HNSCC might be particularly susceptible to BH3-mimetics compared to anticancer drugs acting upstream of the p53 pathway since the inactivation of one or more components of the p53 network is considered an extremely common event in HNSCC [71]. This was supported by two included studies in this review, which showed that the BH3-mimetics investigated showed relevant anticancer effects regardless of p53 status [40, 41]. Moreover, unlike IR and several chemotherapeutics, BH3-mimetics are not mutagenic, thus the likelihood of treatment-induced cancers is considerably mitigated [72].

Since cell death mechanisms are impaired in malignant tumours, cancer cells may evade apoptosis even when exposed to potentially lethal doses of chemoradiotherapy, which leads to treatment resistance and poorer patient survival [4]. Novel therapies targeting apoptosis have shown promising results on HNSCC as they can sensitise cancer cells to apoptotic stimuli. This was recently demonstrated in a phase-2 clinical trial, which showed that the addition of Debio 1143 (antagonist of inhibitor of apoptosis proteins) to conventional chemoradiotherapy resulted in a superior efficacy for the treatment of locoregionally advanced HNSCC [73]. In this context, BH3-mimetic drugs are promising treatment strategies as they can either sensitise cancer cells to apoptotic stimuli or directly activate apoptosis [74].

The susceptibility of different malignant tumours to BH3-mimetic drugs is suggested to be closely related to the expression pattern of BCL-2 family proteins [75]. By contrast to haematological malignancies, solid tumours often rely on

multiple BCL-2 proteins for survival and a heterogeneous BCL-2 expression pattern was found concerning HNSCC. Although BCL-XL and MCL-1 appear to be consistently upregulated [48], conflicting results were found for BCL-2, which was found to be upregulated in only 15-25% of patient tumours [18-20], as opposed to studies assessing cell lines, which often showed high BCL-2 expression [76, 77]. In this context, conducting BH3 profiling (*i.e.* an assay aiming to identify cellular dependence on prosurvival BCL-2 family proteins) for patients with malignant tumours might be useful to predict treatment responses considering different BH3-mimetics and, therefore, optimise the treatment planning [78].

Monoselective agents targeting the BCL-2 protein, such as venetoclax, might only be effective in a smaller number of patients with HNSCC. On the other hand, BH3-mimetics targeting BCL-XL and MCL-1 could also present dose-limiting side effects. BCL-XL inhibitors, for example, are likely to result in platelet death and an impaired haemostatic function [71]. Moreover, MCL-1 was also found to be essential for haemostasis of cardiac cells and its depletion leads to rapid cardiomyopathy, which raises concerns about the potential cardiotoxicity of MCL-1 inhibitors [79]. In this context, the combination with conventional chemotherapeutics or IR would allow the use of lower doses and not deny patients potentially beneficial treatments. In addition, since the efficacy of monoselective BH3-mimetics alone might be limited due to upregulation of untargeted BCL-2 family proteins or dose-limiting side effects, the combination of two or more monoselective BH3-mimetic drugs can also be considered as a viable treatment strategy.

The anticancer effects of both validated and putative BH3-mimetics were often dose and time-dependent. Overall, most *in-vitro* studies assessed final drug concentrations of 1-15 μM and cells were commonly exposed to BH3-mimetics from 8h up to 6 days. In xenograft models, treatment doses usually ranged from 10 mg/kg to 200 mg/kg (depending on the administration regimen, such as daily or weekly) and were administered over a course of 14 to around 40 days, although follow-up after pharmacological treatments could be longer. BH3-mimetics were usually more effective at higher doses and longer treatment durations, however, the risk of cytotoxicity to normal cells, such as fibroblasts [10] and keratinocytes [55], is also augmented. Therefore, further preclinical studies

and clinical trials are recommended to determine the efficacy and safety of promising BH3-mimetic drugs at clinically achievable plasma levels.

For solid tumours, the use of novel drug-delivery approaches might help to limit toxicity to healthy tissues and optimise treatment efficacy. Polymeric devices with drug-releasing capabilities, for example, constitute a viable alternative to the oral route, with the benefit of sustaining a local and prolonged release of the loaded drug to the targeted tissue [80]. Considering BH3-mimetics, the efficacy of polymeric nanovesicles loaded with navitoclax and doxorubicin was recently investigated for endometrial carcinoma; the encapsulated drugs were stably retained under neutral pH conditions (such as the blood circulation) but resulted in a rapid drug-release in the acidic condition of the endosome/lysosome compartment after uptake by cancer cells, potentially minimising the toxicity to healthy cells [81]. Another study used polymeric nanocarriers loaded with anti-BCL-2 siRNA and temozolomide, which specifically targeted glioma cells overexpressing folate receptors by incorporating folate to the nanocarrier surface, thus substantially improving drug-delivery [82]. Therefore, further studies assessing novel drug-delivery approaches for BH3-mimetic drugs are highly encouraged.

Understanding tumour heterogeneity might also help to improve treatment regimens. In this regard, two of the included studies assessed the effects of BH3-mimetics on tumour bulk and tumour stem cells. Gilormini et al. [32] reported that ABT-737 eliminated tumour stem cells more efficiently compared to tumour bulk cells, showing preferential cytotoxicity towards cancer stem cell sub-populations. Similarly, Guy et al [45] found that venetoclax inhibited the proliferation of tumour stem cells, arguing that this cell sub-population presented higher levels of BCL-2 compared to the cell population of the tumour bulk. Interestingly, the authors also reported an opposite effect considering treatment with cetuximab, in which tumour stem cells were found to be more resistant compared to bulk tumour cells. It is proposed that most cancer stem cell subpopulations are resistant to conventional treatments and that they might play pivotal roles in cancer metastasis and recurrence due to their self-renewal and tumourigenic capacity [83].

Therefore, further research on the effects of BH3-mimetics targeting stem cell subpopulations is recommended as these drugs might constitute an important treatment strategy in improving patients' survival and prognosis.

Some putative BH3-mimetics have been reported to induce autophagic cell death rather than apoptosis [67, 68], which is hypothesised to be related to a BCL-2/BECLIN-1 interaction in the endoplasmic reticulum [25]. Some compounds, such as ApoG2, may even induce cell cycle arrest by suppressing the c-Myc pathway, independently of BCL-2 binding. Although anticancer effects are ultimately achieved by putative BH3-mimetics, an in-depth understanding of the mechanisms by which these drugs induce cell death is necessary for them to be validated and also to optimise their use in therapeutic strategies.

Moreover, it is worth noting that both validated and putative BH3-mimetics can act as senolytic drugs [84], a mechanism that was not explored in-depth across included studies. In this context, the drug induced clearance of senescent cells from the tumour microenvironment may have contributed to some extent for the anticancer effects observed in xenograft models [85]. Since BH3-mimetics directly engage apoptotic pathways in HNSCC cells but also target components of the tumour microenvironment, further exploration of *in-vivo* models are highly encouraged to lead to informed clinical studies.

CONCLUSION

Validated BH3-mimetic drugs exhibited promising anticancer effects *in-vitro*, either as single-agents or combined with chemotherapy/IR, which often showed improved efficacy due to sensitisation of tumour cells to apoptotic stimuli. In xenograft models, marked reduction of tumour volume was also consistently observed. The combination of multiple BH3-mimetics generally presented superior effects in inducing apoptosis *in-vitro* (even in HNSCC resected tissue samples) and also in inhibiting tumour growth *in-vivo*. Most putative BH3-mimetics presented relevant anticancer effects, although some of these might be off-target, such as induction of autophagy. In addition, despite the lack of clinical data to evaluate possible therapeutic effects against HNSCC in human participants, further exploring animal models and refining treatment strategies using BH3-mimetics may allow clinical translation to improved outcomes for HNSCC patients.

ACKNOWLEDGMENTS

GM (grant number 88887.200723/2018-00) is supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, number 427464/2018-8).

REFERENCES

- [1] Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet* 2008;371:1695-709. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60728-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60728-X).
- [2] Simcock R, Simo R. Follow-up and Survivorship in Head and Neck Cancer. *Clin Oncol* 2016;28:451-8. <https://doi.org/10.1016/j.clon.2016.03.004>.
- [3] Pucci C, Martinelli C, Ciofani G. Innovative approaches for cancer treatment: current perspectives and new challenges. *Ecancermedicalscience* 2019;13:961. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2019.961>.
- [4] Lee YT, Tan YJ, Oon CE. Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. *Eur J Pharmacol* 2018;834:188-96. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.07.034>.
- [5] Placzek WJ, Wei J, Kitada S, Zhai D, Reed JC, Pellecchia M. A survey of the anti-apoptotic Bcl-2 subfamily expression in cancer types provides a platform to predict the efficacy of Bcl-2 antagonists in cancer therapy. *Cell Death Dis* 2010;1:e40. <https://doi.org/10.1038/cddis.2010.18>.
- [6] Letai A. BH3 domains as BCL-2 inhibitors: prototype cancer therapeutics. *Expert Opin Biol Ther* 2003;3:293-304. <https://doi.org/10.1517/14712598.3.2.293>.
- [7] Delbridge AR, Strasser A. The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy. *Cell Death Differ* 2015;22:1071-80. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.50>.

[8] Eichhorn JM, Alford SE, Sakurikar N, Chambers TC. Molecular analysis of functional redundancy among anti-apoptotic Bcl-2 proteins and its role in cancer cell survival. *Exp Cell Res* 2014;322:415-24. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.02.010>.

[9] Leber B, Geng F, Kale J, Andrews DW. Drugs targeting Bcl-2 family members as an emerging strategy in cancer. *Expert Rev Mol Med* 2010;12:e28. <https://doi.org/10.1017/S1462399410001572>.

[10] Oliver CL, Bauer JA, Wolter KG, Ubell ML, Narayan A, O'Connell KM, et al. In vitro effects of the BH3 mimetic, (-)-gossypol, on head and neck squamous cell carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2004;10:7757-63. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0551>.

[11] Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA, et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 2005;435:677-81. <https://doi.org/10.1038/nature03579>.

[12] Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, Ackler SL, Catron ND, Chen J, et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med* 2013;19:202-8. <https://doi.org/10.1038/nm.3048>.

[13] Tse C, Shoemaker AR, Adickes J, Anderson MG, Chen J, Jin S, et al. ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res* 2008;68:3421-8. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-07-5836>.

[14] Timucin AC, Basaga H, Kutuk O. Selective targeting of antiapoptotic BCL-2 proteins in cancer. *Med Res Rev* 2019;39:146-75. <https://doi.org/10.1002/med.21516>.

[15] Soderquist R, Eastman A. BCL2 Inhibitors as Anticancer Drugs: A Plethora of Misleading BH3 Mimetics. *Mol Cancer Ther* 2016;15:2011-7. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0031>.

[16] Vela L, Marzo I. Bcl-2 family of proteins as drug targets for cancer chemotherapy: the long way of BH3 mimetics from bench to bedside. *Curr Opin Pharmacol* 2015;23:74-81. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2015.05.014>.

[17] van Delft MF, Wei AH, Mason KD, Vandenberg CJ, Chen L, Czabotar PE, et al. The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell* 2006;10:389-99. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.08.027>.

[18] Trask DK, Wolf GT, Bradford CR, Fisher SG, Devaney K, Johnson M, et al. Expression of Bcl-2 family proteins in advanced laryngeal squamous cell carcinoma: correlation with response to chemotherapy and organ preservation. *Laryngoscope* 2002;112:638-44. <https://doi.org/10.1097/00005537-200204000-00009>.

[19] Pena JC, Thompson CB, Recant W, Vokes EE, Rudin CM. Bcl-xL and Bcl-2 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 1999;85:164-70. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0142\(19990101\)85:1<164::aid-cncr23>3.0.co;2-q](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0142(19990101)85:1<164::aid-cncr23>3.0.co;2-q).

[20] Redondo M, Esteban F, Gonzalez-Moles MA, Delgado-Rodriguez M, Nevado M, Torres-Munoz JE, et al. Expression of the antiapoptotic proteins clusterin and bcl-2 in laryngeal squamous cell carcinomas. *Tumour Biol* 2006;27:195-200. <https://doi.org/10.1159/000093055>.

[21] Villalobos-Ortiz M, Ryan J, Mashaka TN, Opferman JT, Letai A. BH3 profiling discriminates on-target small molecule BH3 mimetics from putative mimetics. *Cell Death Differ* 2020;27:999-1007. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0391-9>.

[22] Xiong L, Tang Y, Liu Z, Dai J, Wang X. BCL-2 inhibition impairs mitochondrial function and targets oral tongue squamous cell carcinoma. *Springerplus* 2016;5:1626. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3310-2>.

[23] Hu ZY, Zhu XF, Zhong ZD, Sun J, Wang J, Yang D, et al. ApoG2, a novel inhibitor of antiapoptotic Bcl-2 family proteins, induces apoptosis and suppresses tumor growth

in nasopharyngeal carcinoma xenografts. *Int J Cancer* 2008;123:2418-29. <https://doi.org/10.1002/ijc.23752>.

[24] He JH, Liao XL, Wang W, Li DD, Chen WD, Deng R, et al. Apogossypolone, a small-molecule inhibitor of Bcl-2, induces radiosensitization of nasopharyngeal carcinoma cells by stimulating autophagy. *Int J Oncol* 2014;45:1099-108. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2497>.

[25] Zheng R, Chen K, Zhang Y, Huang J, Shi F, Wu G, et al. Apogossypolone induces apoptosis and autophagy in nasopharyngeal carcinoma cells in an in vitro and in vivo study. *Oncol Lett* 2017;14:751-7. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6176>.

[26] Low SY, Tan BS, Choo HL, Tiong KH, Khoo AS, Leong CO. Suppression of BCL-2 synergizes cisplatin sensitivity in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Lett* 2012;314:166-75. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.09.025>.

[27] Wang Y, Wang Y, Fan X, Song J, Wu H, Han J, et al. ABT-199-mediated inhibition of Bcl-2 as a potential therapeutic strategy for nasopharyngeal carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2018;503:1214-20. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.07.027>.

[28] Konac E, Ekmekci A, Yurtcu E, Ergun MA. An in vitro study of cytotoxic effects of gossypol on human epidermoid larynx carcinoma cell line (HEp-2). *Exp Oncol* 2005;27:81-3.

[29] Lucey BP, Nelson-Rees WA, Hutchins GM. Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. *Arch Pathol Lab Med* 2009;133:1463-7. <https://doi.org/10.1043/1543-2165-133.9.1463>.

[30] Swiecicki PL, Bellile E, Sacco AG, Pearson AT, Taylor JM, Jackson TL, et al. A phase II trial of the BCL-2 homolog domain 3 mimetic AT-101 in combination with docetaxel for recurrent, locally advanced, or metastatic head and neck cancer. *Invest New Drugs* 2016;34:481-9. <https://doi.org/10.1007/s10637-016-0364-5>.

[31] Li R, Zang Y, Li C, Patel NS, Grandis JR, Johnson DE. ABT-737 synergizes with chemotherapy to kill head and neck squamous cell carcinoma cells via a Noxa-mediated pathway. *Mol Pharmacol* 2009;75:1231-9. <https://doi.org/10.1124/mol.108.052969>.

[32] Gilormini M, Malesys C, Armandy E, Manas P, Guy JB, Magne N, et al. Preferential targeting of cancer stem cells in the radiosensitizing effect of ABT-737 on HNSCC. *Oncotarget* 2016;7:16731-44. <https://doi.org/10.1155/2016/16731>

[33] Kim LH, Shin JA, Jang B, Yang IH, Won DH, Jeong JH, et al. Sorafenib potentiates ABT-737-induced apoptosis in human oral cancer cells. *Arch Oral Biol* 2017;73:1-6. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.08.034>.

[34] Maji S, Samal SK, Pattanaik L, Panda S, Quinn BA, Das SK, et al. Mcl-1 is an important therapeutic target for oral squamous cell carcinomas. *Oncotarget* 2015;6:16623-37. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3932>.

[35] Li Y, Cui JT. Inhibition of Bcl-2 potentiates AZD-2014-induced anti-head and neck squamous cell carcinoma cell activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2016;477:607-13. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.06.100>.

[36] Shin JA, Kim LH, Lee SJ, Jeong JH, Jung JY, Lee HN, et al. Targeting ERK1/2-bim signaling cascades by BH3-mimetic ABT-737 as an alternative therapeutic strategy for oral cancer. *Oncotarget* 2015;6:35667-83. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5523>.

[37] Gao Y, Trivedi S, Ferris RL, Koide K. Regulation of HPV16 E6 and MCL1 by SF3B1 inhibitor in head and neck cancer cells. *Sci Rep* 2014;4:6098. <https://doi.org/10.1038/srep06098>.

[38] Yang IH, Jung JY, Kim SH, Yoo ES, Cho NP, Lee H, et al. ABT-263 exhibits apoptosis-inducing potential in oral cancer cells by targeting C/EBP-homologous protein. *Cell Oncol* 2019;42:357-68. <https://doi.org/10.1007/s13402-019-00431-5>.

[39] Gadsden NJ, Fulcher CD, Li D, Shrivastava N, Thomas C, Segall JE, et al. Palbociclib renders human papilloma virus–negative head and neck squamous cell carcinoma vulnerable to the senolytic agent navitoclax. *Mol Cancer Res* 2021;19:862-73. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-20-0915>.

[40] Tuomainen K, Hyytiainen A, Al-Samadi A, Ianevski P, Ianevski A, Potdar S, et al. High-throughput compound screening identifies navitoclax combined with irradiation as a candidate therapy for HPV-negative head and neck squamous cell carcinoma. *Sci Rep* 2021;11:10. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94259-5>.

[41] Britt EL, Raman S, Leek K, Sheehy CH, Kim SW, Harada H. Combination of fenretinide and ABT-263 induces apoptosis through NOXA for head and neck squamous cell carcinoma treatment. *PLoS One* 2019;14:e0219398. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219398>.

[42] Merino D, Kelly GL, Lessene G, Wei AH, Roberts AW, Strasser A. BH3-Mimetic Drugs: Blazing the Trail for New Cancer Medicines. *Cancer Cell* 2018;34:879-91. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.11.004>.

[43] Andreozzi F, Massaro F, Wittnebel S, Spilleboudt C, Lewalle P, Salaroli A. New Perspectives in Treating Acute Myeloid Leukemia: Driving towards a Patient-Tailored Strategy. *Int J Mol Sci* 2022;23. <https://doi.org/10.3390/ijms23073887>.

[44] Ye F, Chen C, Qin J, Liu J, Zheng C. Genetic profiling reveals an alarming rate of cross-contamination among human cell lines used in China. *FASEB J* 2015;29:4268-72. <https://doi.org/10.1096/fj.14-266718>.

[45] Guy JB, Espenel S, Louati S, Gauthier A, Garcia MA, Vial N, 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. *J Cancer Res Clin Oncol* 2021;147:1905-16. <https://doi.org/10.1007/s00432-021-03593-8>.

[46] Chan SY, Choy KW, Tsao SW, Tao Q, Tang T, Chung GT, et al. Authentication of nasopharyngeal carcinoma tumor lines. *Int J Cancer* 2008;122:2169-71. <https://doi.org/10.1002/ijc.23374>.

[47] Strong MJ, Baddoo M, Nanbo A, Xu M, Puetter A, Lin Z. Comprehensive high-throughput RNA sequencing analysis reveals contamination of multiple nasopharyngeal carcinoma cell lines with HeLa cell genomes. *J Virol* 2014;88:10696-704. <https://doi.org/10.1128/JVI.01457-14>.

[48] Carter RJ, Milani M, Butterworth M, Alotibi A, Harper N, Yedida G, et al. Exploring the potential of BH3 mimetic therapy in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cell Death Dis* 2019;10. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2150-8>.

[49] Ow TJ, Fulcher CD, Thomas C, Broin P, López A, Reyna DE, et al. Optimal targeting of BCL-family proteins in head and neck squamous cell carcinoma requires inhibition of both BCL-xL and MCL-1. *Oncotarget* 2019;10:494-510. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26563>.

[50] Ow TJ, Thomas C, Fulcher CD, Chen J, López A, Reyna DE, et al. Apoptosis signaling molecules as treatment targets in head and neck squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 2020. <https://doi.org/10.1002/lary.28441>.

[51] Bauer JA, Trask DK, Kumar B, Los G, Castro J, Lee JSJ, et al. Reversal of cisplatin resistance with a BH3 mimetic, (-)-gossypol, in head and neck cancer cells: role of wild-type p53 and Bcl-X-L. *Mol Cancer Ther* 2005;4:1096-104. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-05-0081>.

[52] Sikora MJ, Bauer JA, Verhaegen M, Belbin TJ, Prystowsky MB, Taylor JC, et al. Anti-oxidant treatment enhances anti-tumor cytotoxicity of (-)-gossypol. *Cancer Biol Ther* 2008;7:767-76. <https://doi.org/10.4161/cbt.7.5.5767>.

[53] Lin YL, Durmaz YY, Nor JE, ElSayed MEH. Synergistic Combination of Small Molecule Inhibitor and RNA Interference against Antiapoptotic Bcl-2 Protein in Head and Neck Cancer Cells. *Mol Pharm* 2013;10:2730-8. <https://doi.org/10.1021/mp4001662>.

[54] Zerp SF, Stoter R, Hoebbers FJP, van den Brekel MWM, Dubbelman R, Kuipers GK, et al. Targeting anti-apoptotic Bcl-2 by AT-101 to increase radiation efficacy: data from in vitro and clinical pharmacokinetic studies in head and neck cancer. *Radiat Oncol* 2015;10. <https://doi.org/10.1186/s13014-015-0474-9>.

[55] Wolter KG, Wang SJ, Henson BS, Wang S, Griffith KA, Kumar B, et al. (-)-gossypol inhibits growth and promotes apoptosis of human head and neck squamous cell carcinoma in vivo. *Neoplasia* 2006;8:163-72. <https://doi.org/10.1593/neo.05691>.

[56] Imai A, Zeitlin BD, Visioli F, Dong Z, Zhang Z, Krishnamurthy S, et al. Metronomic dosing of BH3 mimetic small molecule yields robust antiangiogenic and antitumor effects. *Cancer Res* 2012;72:716-25. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2873>.

[57] Benvenuto M, Mattera R, Masuelli L, Taffera G, Andracchio O, Tresoldi I, et al. (±)-Gossypol induces apoptosis and autophagy in head and neck carcinoma cell lines and inhibits the growth of transplanted salivary gland cancer cells in BALB/c mice. *Int J Food Sci Nutr* 2017;68:298-312. <https://doi.org/10.1080/09637486.2016.1236077>.

[58] Boehm AL, Sen M, Seethala R, Gooding WE, Freilino M, Wong SM, et al. Combined targeting of epidermal growth factor receptor, signal transducer and activator of transcription-3, and Bcl-X(L) enhances antitumor effects in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Mol Pharmacol* 2008;73:1632-42. <https://doi.org/10.1124/mol.107.044636>.

[59] Wong FY, Liem N, Xie C, Yan FL, Wong WC, Wang L, et al. Combination Therapy with Gossypol Reveals Synergism against Gemcitabine Resistance in Cancer Cells with High BCL-2 Expression. *PLoS ONE* 2012;7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050786>.

[60] Kasten-Pisula U, Windhorst S, Dahm-Daphi J, Mayr G, Dikomey E. Radiosensitization of tumour cell lines by the polyphenol Gossypol results from depressed double-strand break repair and not from enhanced apoptosis. *Radiother Oncol* 2007;83:296-303. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2007.04.024>.

[61] Nelson-Rees WA, Daniels DW, Flandermeyer RR. Cross-contamination of cells in culture. *Science* 1981;212:446-52. <https://doi.org/10.1126/science.6451928>.

[62] Chen TR. Re-evaluation of HeLa, HeLa S3, and HEP-2 karyotypes. *Cytogenet Cell Genet* 1988;48:19-24. <https://doi.org/10.1159/000132579>.

[63] Ahn CH, Lee WW, Jung YC, Shin JA, Hong KO, Choi S, et al. Antitumor effect of TW-37, a BH3 mimetic in human oral cancer. *Lab Anim Res* 2019;35:27. <https://doi.org/10.1186/s42826-019-0028-7>.

[64] Ashimori N, Zeitlin BD, Zhang Z, Warner K, Turkienicz IM, Spalding AC, et al. TW-37, a small-molecule inhibitor of Bcl-2, mediates S-phase cell cycle arrest and suppresses head and neck tumor angiogenesis. *Mol Cancer Ther* 2009;8:893-903. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-1078>.

[65] Lu Y, Huang H, Yang H, Chen D, Wu S, Jiang Z, et al. Small molecule inhibitor TW-37 is tolerable and synergistic with chemotherapy in nasopharyngeal carcinoma. *Cell Cycle* 2017;16:1376-83. <https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1329066>.

[66] Yang IH, Hong SH, Jung M, Ahn CH, Yoon HJ, Hong SD, et al. Cryptotanshinone chemosensitivity potentiation by TW-37 in human oral cancer cell lines by targeting STAT3-Mcl-1 signaling. *Cancer Cell Int* 2020;20:405. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01495-2>

[67] Yazbeck VY, Li C, Grandis JR, Zang Y, Johnson DE. Single-agent obatoclax (GX15-070) potently induces apoptosis and pro-survival autophagy in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Oral Oncol* 2014;50:120-7. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2013.10.013>.

[68] Sulkshane P, Teni T. BH3 mimetic Obatoclax (GX15-070) mediates mitochondrial stress predominantly via MCL-1 inhibition and induces autophagy-dependent necroptosis in human oral cancer cells. *Oncotarget* 2017;8:60060-79. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11085>.

[69] Gandarillas A, Goldsmith LA, Gschmeissner S, Leigh IM, Watt FM. Evidence that apoptosis and terminal differentiation of epidermal keratinocytes are distinct processes. *Exp Dermatol* 1999;8:71-9. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.1999.tb00350.x>.

[70] Miller E. Apoptosis measurement by annexin v staining. *Methods Mol Med* 2004;88:191-202. <https://doi.org/10.1385/1-59259-406-9:191>.

[71] Gasco M, Crook T. The p53 network in head and neck cancer. *Oral Oncol* 2003;39:222-31. [https://doi.org/10.1016/s1368-8375\(02\)00163-x](https://doi.org/10.1016/s1368-8375(02)00163-x).

[72] Cory S, Roberts AW, Colman PM, Adams JM. Targeting BCL-2-like Proteins to Kill Cancer Cells. *Trends Cancer* 2016;2:443-60. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.07.001>.

[73] Sun XS, Tao Y, Le Tourneau C, Pointreau Y, Sire C, Kaminsky MC, et al. Debio 1143 and high-dose cisplatin chemoradiotherapy in high-risk locoregionally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: a double-blind, multicentre, randomised, phase 2 study. *Lancet Oncol* 2020;21:1173-87. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30327-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30327-2).

[74] Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2002;2:183-92. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(02\)00127-7](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(02)00127-7).

[75] Zhang L, Ming L, Yu J. BH3 mimetics to improve cancer therapy; mechanisms and examples. *Drug Resist Updat* 2007;10:207-17. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2007.08.002>.

[76] Kawakami K, Tsukuda M, Mizuno H, Nishimura G, Ishii A, Hamajima K. Alteration of the Bcl-2/Bax status of head and neck cancer cell lines by chemotherapeutic agents. *Anticancer Res* 1999;19:3927-32.

[77] Salo A, Servomaa K, Kiuru A, Pulkkinen J, Grenman R, Pekkola-Heino K, et al. The bcl-2 gene status of human head and neck cancer cell lines. *Acta Otolaryngol Suppl* 1997;529:233-6. <https://doi.org/10.3109/00016489709124131>.

[78] Deng J, Carlson N, Takeyama K, Dal Cin P, Shipp M, Letai A. BH3 profiling identifies three distinct classes of apoptotic blocks to predict response to ABT-737 and conventional chemotherapeutic agents. *Cancer Cell* 2007;12:171-85. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.07.001>.

[79] Thomas RL, Roberts DJ, Kubli DA, Lee Y, Quinsay MN, Owens JB, et al. Loss of MCL-1 leads to impaired autophagy and rapid development of heart failure. *Genes Dev* 2013;27:1365-77. <https://doi.org/10.1101/gad.215871.113>.

[80] Ferrari G, Thives Mello A, Melo G, de Mello Roesler CR, Salmoria GV, de Souza Pinto LP, et al. Polymeric implants with drug-releasing capabilities: a mapping review of laboratory research. *Drug Dev Ind Pharm* 2022;1-11. <https://doi.org/10.1080/03639045.2022.2043354>.

[81] Ding J, Zhang X, Chen C, Huang Y, Yu X, Li X. Ultra pH-sensitive polymeric nanovesicles co-deliver doxorubicin and navitoclax for synergetic therapy of endometrial carcinoma. *Biomater Sci* 2020;8:2264-73. <https://doi.org/10.1039/d0bm00112k>.

[82] Peng Y, Huang J, Xiao H, Wu T, Shuai X. Codelivery of temozolomide and siRNA with polymeric nanocarrier for effective glioma treatment. *Int J Nanomedicine* 2018;13:3467-80. <https://doi.org/10.2147/IJN.S164611>.

[83] Yu Z, Pestell TG, Lisanti MP, Pestell RG. Cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2012;44:2144-51. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.08.022>.

[84] Zhu Y, Tchkonina T, Fuhrmann-Stroissnigg H, Dai HM, Ling YY, Stout MB, et al. Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. *Aging Cell* 2016;15:428-35. <https://doi.org/10.1111/accel.12445>.

[85] Liu H, Zhao H, Sun Y. Tumor microenvironment and cellular senescence: Understanding therapeutic resistance and harnessing strategies. *Semin Cancer Biol* 2021. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.11.004>.

TABLES

Tabela 1 - (do artigo publicado em língua inglesa). Table 1 - BH3-mimetic drugs found across HNSCC studies. Validation status and molecular targets.

BH3-mimetic drug	Validation status	Molecular targets	References
A-1210477	Validated	MCL-1	[16, 21]
A-1331852	Validated	BCL-XL	[21, 48]
ABT-737	Validated	BCL-2, BCL-XL, BCL-W	[16, 21]
Navitoclax (ABT-263)	Validated	BCL-2, BCL-XL, BCL-W	[16, 21]
S63845	Validated	MCL-1	[21, 48]
Venetoclax (ABT-199)	Validated	BCL-2	[16, 21]
Apogossypolone (ApoG2)	Putative	BCL-2, BCL-XL, MCL-1	[16]
Gossypol (AT-101)	Putative	BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1	[16, 21]
Obatoclax (GX15-070)	Putative	BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1	[16, 21]
Sabutoclax (BI-97C1)	Putative	BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1	[16, 21]
TW-37	Putative	BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1	[16, 21]
YC137	Putative	BCL-2, MCL-1	[26]

Tabela 2 - (do artigo publicado em língua inglesa). Table 2 - Validation status of head and neck squamous cell carcinomas cell lines assessed across included studies, according to the latest report (June 2021, v11) of the International Cell Line Authentication Committee (ICLAC).

Study [reference]	BH3-mimetics assessed	Cell lines investigated	Problematic cell lines [reference]	Issue reported	Critical considerations
Hu et al. (2008) [23]	ApoG2	CNE1, CNE2, HONE1, and C666-1	CNE1 [46] CNE2 [46] HONE1 [47]	HeLa cross-contamination	Major concerns
He et al. (2014) [24]	ApoG2	CNE1, CNE2, NPC, SUNE1	CNE1 [46] CNE2 [46] HONE1 [47]	HeLa cross-contamination	Major concerns
Zheng et al. (2017) [25]	ApoG2	CNE2	CNE2 [46]	HeLa cross-contamination	Major concerns
Konac et al. (2005) [28]	(±) Gossypol	HEP2	HEP2 [62]	HeLa cross-contamination	Major concerns
Wong et al. (2012) [59]	(±) Gossypol	CNE1, CNE2, HONE1, HK1	CNE1 [46] CNE2 [46] HONE1 [47]	HeLa cross-contamination	Major concerns
Xiong et al. (2016) [22]	Venetoclax	SCC9, SCC25, Tca8113, CAL27	Tca8113 [44]	HeLa cross-contamination	Minor concerns
Low et al (2012) [26]	YC137	HK1, CNE1, TW01, SUNE1	CNE1 [46] SUNE1 [47]	HeLa cross-contamination	Moderate concerns
Wang et al. (2018) [27]	Venetoclax S63845	5-8F, CNE2	5-8F [44] CNE2 [46]	HeLa cross-contamination	Major concerns

Legend: Minor concerns (results potentially biased for less than 25% of investigated cell lines); Moderate concerns (results potentially biased for 25-50% of investigated cell lines); Major concerns (results potentially biased for more than 50% of investigated cell lines).

Tabela 3 - (do artigo publicado em língua inglesa). Table 3 Validated BH3-mimetic drugs. Characteristics and main findings of preclinical studies assessing ABT-737 and derivatives (navitoclax and venetoclax) in head and neck squamous cell carcinomas (either as single-agents or combined with chemotherapy/ionising radiation).

Study	Condition	Combined therapy	Study sample	Assessment methods	BH3-mimetic dose (duration)	Main findings
ABT-737						
Li et al. (2009) [31]	HNSCC	Cisplatin Etoposide	Cell-lines: UM-22A, UM-22B, 1483	In-vitro: Trypan blue assay (viability); annexin V-PI through flow cytometry (apoptosis); cleaved caspase-3 and cleaved PARP through WB (apoptosis)	In-vitro: 1 to 30 μ M (up to 48h)	In-vitro: - Single-agent ABT-737 was largely ineffective against HNSCC cell lines, exhibiting IC50 values ranging from 13.8 to 53.6 μ M. - Nonetheless, ABT-737 strongly synergized with cisplatin and etoposide to promote cell death and loss of clonogenic survival. - The combination of ABT-737 with either chemotherapy drugs induced synergistic activation of apoptosis signaling.
Gao et al. (2014) [37]	HNSCC	Meayamycin B	Cell-lines HPV positive (p53-inactive): UD-SCC2, UM-SCC47, 93-VU-147T, UPI:SCC90 HPV negative (p53-wild-type): PCI-13, PCI-15B, UM-SCC22B	In-vitro: MTS assay (viability); annexin-FITC/PI through FACS analysis (apoptosis); caspase-3 and caspase-7 activity through Caspase-Glo™ kit (apoptosis)	In-vitro: 0.05 to 50 μ M (up to 72h)	In-vitro: - IC50 values for ABT-737 as a single-agent ranged from 4.3 to 28 μ M in HPV-16 positive cell lines and from 11 to 19 μ M in HPV-16 negative cell lines. - IC50 values for meayamycin B as a single-agent ranged from 0.025 to 0.074 nM in HPV-16 positive cell lines and from 0.14 to 0.60 nM in HPV-16 negative cell lines. - The combination ABT-737 with meayamycin B triggered apoptosis in HNSCC cells and lowered the IC50 of ABT-737 by 1-2 orders of magnitude. - The IC50 values of ABT-737 with meayamycin B ranged from 0.14 to 0.50 μ M in HPV-16 positive cell lines and from 0.19 to 0.84 μ M in HPV-16 negative cell lines.
Maji et al. (2015) [34]	HNSCC	Fenretinide	Cell-lines: H357	In-vitro: MTT assay, trypan blue assays (viability); cleaved caspase-3, cleaved caspase-9, and cleaved PARP through WB (apoptosis)	In-vitro: 1 up to 50 μ M (up to 48h)	In-vitro: - At 8h, ABT-737 did not decrease cell viability, even at 50 μ M. - At 48h, considering the concentration of 10 μ M of ABT-737, a 30% induction of cell death was observed, as measured by the trypan blue assay. - Combination with fenretinide resulted in a synergistic effect, resulting in approximately 80 to 90% cell death at 48h considering the concentrations of 10 and 15 μ M.

Shin et al. (2015) [36]	OSCC	No	Cell-lines: HN22	In-vitro: MTS assay, trypan blue assay, and live/dead assays (viability); cleaved caspase-3, cleaved caspase-9, and cleaved PARP through WB (apoptosis); FITC and DAPI through IF (nuclear condensation and fragmentation)	In-vitro: 2.5 to 22.5 μM (up to 24h)	In-vitro: - ABT-737 inhibited the growth of oral cancer cells by inducing caspase-mediated apoptosis. - At 24h, cell viability was significantly lower than control in all doses tested. - Cell viability was reduced to approximately 80% at 2.5 μM , 50% at 7.5 μM , and 40% at 22.5 μM .
Gilormini et al. (2016) [32]	HNSCC	Ionising radiation	Cell-lines: SQ20B, SCC61, CAL27, CAL33 Xenograft model: NODE-SCID mice w/ SQ20B	In-vitro: Crystal violet assay (cell growth); activated caspases assay through CaspACE™ kit (apoptosis); subG1 DNA content through flow cytometer (cell cycle); and TUNEL assay (apoptosis) In-vivo: Tumour volume measurements	In-vitro: 2 to 20 μM (up to 72h) In-vivo: 20 mg/kg (treated for 5 days and followed up to 40 days)	In-vitro: - ABT-737, as a single-agent, was considered ineffective at promoting HNSCC cell death. - All the cell lines had IC50 values ranging from 2 μM to 14 μM . - Combining ABT-737 with ionising radiation resulted in a strong synergistic apoptosis induction in HNSCC cell lines. In-vivo: - As single therapies, ABT-737 had a similar effect as radiation on tumour growth inhibition. - On the other hand, the combination of ABT-737 with radiation was more effective than either treatment alone.
Li et al. (2016) [35]	HNSCC	AZD-2014	Cell-lines: SQ20B, A253, and SCC9; primary epithelial cells Xenograft model: Immunodeficient (SCID) mice w/ SQ20B	In-vitro: MTT assay (proliferation); caspase-3 activity assay (apoptosis), histone DNA ELISA assay (apoptosis); and TUNEL assay (apoptosis) In-vivo: Tumour volume measurements	In-vitro: 100 nM (up to 72h) In-vivo: 25 mg/kg (up to 28 days)	In-vitro: - Inhibition of BCL-2 by ABT-737 dramatically potentiated AZD-2014 lethality against HNSCC cells. In-vivo: - AZD-2014 anti-HNSCC activity <i>in-vivo</i> was potentiated with co-administration of ABT-737.
Kim et al. (2017) [33]	OSCC	Sorafenib	Cell-lines: HSC3	In-vitro: Trypan blue assay (growth inhibition); live/dead assays (cytotoxicity/viability); cleaved caspase-3 and cleaved PARP through WB (apoptosis); DAPI staining through IF (nuclear condensation and fragmentation)	In-vitro: 5 μM (up to 48h)	In-vitro: - Although ABT-737 induced a significant reduction in cell viability at 48h, the cell growth was reduced to approximately 80% compared to control. This indicate that ABT-737 at 5 μM presents limited effect as single-agent. - Combined use of ABT-737 and sorafenib synergistically suppressed cell viability and induced apoptosis compared with either compound individually. The combined therapy reduced cell growth to approximately 10% compared to control.
Navitoclax (ABT-263)						
Britt et al. (2019) [41]	HNSCC	Ectopic NOXA Fenretinide	Cell-lines: HN8, HN12, HN30, UMSCC1,	In-vitro: WST-1 assay (viability); annexin V-FITC/PI through FACS analysis (apoptosis); cleaved	In-vitro: 1 μM (up to 72h)	In-vitro: - The combination of either ectopic NOXA expression or fenretinide with navitoclax significantly enhanced apoptosis in HNSCC cells, regardless of p53 status.

			UMSCC47, UMSCC104	caspase-3 and cleaved PARP through WB (apoptosis)		
Yang et al. (2019) [38]	OSCC	No	Cell-lines: HSC3, HSC4 Xenograft model: Female nude mice w/ HSC4	In-vitro: Live/dead assay kit (citotoxicity/viability); cleaved caspase-3 and cleaved PARP through WB (apoptosis); FITC and DAPI through IF (nuclear condensation and fragmentation) In-vivo: Tumour volume measurements and TUNEL assay (apoptosis)	In-vitro: 1.5 to 24 μ M (up to 24h) In-vivo: 100 mg/kg (up to 21 days)	In-vitro: - Navitoclax significantly reduced the growth of both cell lines in a concentration- and time-dependent manner - The IC50 values in HSC3 and HSC4 cells were 10.17 and 5.01 μ M, respectively. - Results indicate that navitoclax may function as an apoptosis induction agent. In-vivo: - Navitoclax exhibited significant inhibition of tumour growth from day 19 forward. - Number of TUNEL positive cells in the tumour tissues were markedly increased in the navitoclax group.
Gadsden et al. (2020) [39]	HNSCC	Palbociclib	Cell-lines: CAL27, HN31, PCI15B	In-vitro: Cresyl violet (viability); annexin V-FITC/PI through FACS analysis (apoptosis)	In-vitro: 1 μ M (up to 72h)	In-vitro: - At 72h, 1 μ M of navitoclax alone decreased viability to around 95% in CAL27, 85% in HN31, and 45% in PCI15B. - In comparison to either agent alone, the combination of navitoclax with palbociclib led to lower levels of viable cells.
Tuomainen et al. (2021) [40]	HNSCC	Ionising radiation	Cell-lines: OU-SCC9B; UT-SCC42A; UT-SCC42B; UT-SCC24A; UT-SCC24B	In-vitro: CellTiter-Glo (viability); CellTrace Far Red and IncuCyte caspase-3/7 assay (apoptosis)	In-vitro: 100 to 10000 nM (up to 80h)	In-vitro: Navitoclax exhibited a strong synergy with ionising radiation in three of five cell lines (UT-SCC42A, UT-SCC42B and UT-SCC24B) and moderate synergy in two other cell lines (UT-SCC-24A and UT-SCC-9B). - Combination of navitoclax and irradiation exhibited a strong synergy regardless of the p53 mutation status. - The live cell apoptosis assay on two cell lines (UT-SCC42A and UT-SCC24B) showed that navitoclax substantially increased irradiation-induced apoptosis.
Venetoclax (ABT-199)						
Xiong et al. (2016) [22]	OSCC (tongue)*	Cisplatin	Cell-lines: SCC9, SCC25, Tca8113*, and CAL27; primary epithelial cells (NTEC) Xenograft model: SCID mice w/ SCC9	In-vitro: CellTiter 96R (proliferation); annexin V-FITC through Beckman Coulter (apoptosis) In-vivo: Tumour volume measurements	In-vitro: 0.5 to 5 μ M (up to 72h) In-vivo: 20 mg/kg (up to 30 days)	In-vitro: - Venetoclax inhibited proliferation, induced apoptosis and mitochondrial dysfunctions to a greater extent in OSCC cell lines compared to normal epithelial cells. - Venetoclax augmented the effects of cisplatin in eliminating OSCC cells. In-vivo: - Venetoclax or cisplatin alone caused tumour growth inhibition of approximately 30 and 40%, respectively. When combined, almost complete tumour irradiation was achieved.

Guy et al. (2021) [45]	HNSCC	Cetuximab Ionising radiation	Cell-lines: SQ20B Xenograft model: NODE-SCID mice w/ SQ20B	In-vitro: IncuCyteZOOM® live-cell imaging system (proliferation); activated caspase-3/7 apoptosis assay through IF (apoptosis) In-vivo: Tumour volume measurements	In-vitro: 10 µM (up to 120h) In-vivo: 50 mg/kg (up to 14 days)	In-vitro: - After 120h, venetoclax did not decrease confluence of SQ20B cells (93.9±9.7%), whereas it decreased it in SQ20B stem cells (19.7±7.2%) - In both cell populations, the combination with cetuximab drastically decreased proliferation, although the addition of radiation did not significantly reduced proliferation. - Venetoclax significantly increased apoptosis for SQ20B (51.5±0.4%) and SQ20B stem cells (69.2±6.6%). Cetoximab and radiation did not provide relevant additional benefits (except for SQB20 stem cells). In-vivo: Radiation alone had no inhibitory effect on tumour growth, venetoclax and cetuximab combination decreased tumour growth and increased life (D50: 28 days), while triple therapy yielded the same results considering tumour growth, although significantly increased life span (D50: 34 days).
------------------------	-------	------------------------------------	---	---	---	---

Legend: *Cell lines listed as potentially HeLa contaminated (originated from human cervix carcinoma); ApoG2: Apogossypolone; D50: time to 50% survival; DNA: Deoxyribonucleic acid; FACS: fluorescence-activated single cell sorting; FITC: fluorescein isothiocyanate; GAA: gossypol acetic acid; IC50: half maximal inhibitory concentration; IF: immunofluorescence; HNSCC: head and neck squamous cell carcinoma; HPV: human papillomavirus; LEC: larynx epidermoid carcinoma; MTS: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium; MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; NAC: N-acetyl-cysteine; NPC: Nasopharyngeal carcinoma; PARP: poly(ADP-ribose) polymerase; PI: propidium iodide; RNA: Ribonucleic acid; SCC: squamous cell carcinoma; OSCC: oral squamous cell carcinoma; TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling; WB: Western Blotting.

Tabela 4 - (do artigo publicado em língua inglesa). Table 4 - Validated BH3-mimetic drugs. Characteristics and main findings of preclinical studies assessing the combination of multiple BH3-mimetic drugs in head and neck squamous cell carcinomas.

Study	Condition	BH3-mimetic drugs	Combined therapy	Study sample	Assessment methods	BH3-mimetic dose (duration)	Main findings
Wang et al. (2018) [27]	NPC*	Venetoclax (ABT-199) S63845	- Multiple BH3 mimetics	Cell-lines: 5-8F*, CNE2*; NP69 (immortalised epithelial cells) Xenograft model: BALB/c nude mice w/ CNE2*	In-vitro: CCK8 assay (proliferation); annexin V-FITC/PI through FACS analysis (apoptosis) In-vivo: Tumour volume measurements; cleaved caspase-3 and Ki67 expression through IF (apoptosis); DAPI staining (nuclear condensation and fragmentation)	In-vitro: 0.25 to 20 μ M (up to 48h) In-vivo: 50 mg/kg (up to 21 days)	In-vitro: - In both CNE2 and 5-8F, venetoclax alone significantly decreased cell viability after 48h at a concentration of 10 μ M, resulting in a 15 to 20% viability compared to control. - After 48h at a concentration of 10 μ M, a mild decrease in cell viability was also observed considering epithelial cells, resulting in approximately 80% of viability compared to control. - S63845 alone also inhibited malignant cells (IC50: 6 μ M), while the combination of venetoclax with S63845 (molar ratio of 1:1) was more effective than either alone, with an IC50 of about 1.8 μ M after 24h of treatment. In-vivo: - After 21 days, venetoclax significantly regressed tumour volumes by about 30% compared to controls. - Venetoclax promoted an elevated expression of cleaved caspase-3 and decreased Ki67 expression, suggesting that venetoclax effectively induces CNE2 cell apoptosis <i>in-vivo</i> .
Carter et al. (2019) [48]	HNSCC	Ventoclax (ABT-199) A-1331852 S63845	- Multiple BH3 mimetics - Cisplatin	Cell-lines: UM-SCC1, UM-SCC-11B, UM-SCC-17A, UM-SCC-17AS, UM-SCC-74A, UM-SCC-81B Xenograft model: NC3Rs-compliant zebrafish w/ UM-SCC-81B	In-vitro: Phosphatidylserine externalization (apoptosis); BH3 profiling In-vivo: Tumour measurements through Leica MZ16F microscope and H2B-mRFP staining (red fluorescence) Human tissues: Exposure to BH3	In-vitro: 100 nM (up to 24h) In-vivo: 0 to 10 μ M (NR)	In-vitro: - No BH3 mimetic drug induced pronounced apoptosis as single-agents. - No BH3 mimetic drug synergized with cisplatin or radiation in reducing the clonogenic potential of the cell lines tested, except for UM-SCC-1. - A combination of A-1331852 and S63845 induced marked apoptosis in all cell lines. In-vivo: A combination of A-1331852 and S63845 resulted in a significant dose-dependent reduction in tumour size compared to controls.

				Human tissues: Tumour tissues surgically resected from HNSCC patients	mimetics for 48h, followed by embedding in paraffin and immunohistochemistry staining with cleaved PARP antibody		Human tissue: Exposure of tumour explants to either A-1331852 or S63845 alone did not induce apoptosis, whereas the combination resulted in a significant induction of apoptosis.
Ow et al. (2019) [49]	HNSCC	Navitoclax (ABT-263) A-1210477	- Multiple BH3 mimetics - Cisplatin - Radiation	Cell-lines: HN30, HN31, PCI15A, PCI15B, UMSCC6, MDA686LN, HN5, Detroit562	In-vitro: MTT and Cell Titer-Glo assays (viability); clonogenic survival	In-vitro: 1 to 20 μ M (up to 48h)	In-vitro: Consistent responses to navitoclax were noted in all cell lines tested at relatively high doses for each line. - The IC50 of navitoclax ranged from 4.77 μ M \pm 1.66 μ M (HN31) to 13.85 μ M \pm 1.95 μ M (MDA686LN), with an average overall IC50 of 8.9 μ M. - Adding A-1210477 to navitoclax treatment resulted in an average 7-fold reduction in the IC50 of navitoclax when measured across all 8 cell lines. - Combining ABT-263 with 2 Gy radiation or cisplatin did not increase treatment responses in the majority of cell lines. - In general, navitoclax did not appear to radiosensitize HNSCC cells, and combining radiation with ABT-263 yielded only modest benefit in two lines (HN30, PCI15A)
Ow et al. (2020) [50]	HNSCC	Navitoclax (ABT-263) A-1210477	- Multiple BH3 mimetics - Bortezomib	Cell-lines: HN30, HN31, Hn5, MDA686LN, UMSCC47	In-vitro: MTT and Cell Titer-Glo assays (viability); annexin V through flow cytometer (apoptosis)	In-vitro: 5 μ M (up to 48h)	In-vitro: Treatment with combined navitoclax / A-1210477 or with bortezomib demonstrated apoptosis responses that approached or exceeded treatment with staurosporine (positive control for apoptosis).

Legend: *Cell lines listed as potentially HeLa contaminated (originated from human cervix carcinoma); FACS: fluorescence-activated single cell sorting; FITC: fluorescein isothiocyanate; IC50: half maximal inhibitory concentration; IF: immunofluorescence; HNSCC: head and neck squamous cell carcinoma; MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; NPC: nasopharyngeal carcinoma; NR: not reported; PARP: poly(ADP-ribose) polymerase; PI: propidium iodide; SCC: squamous cell carcinoma; OSCC: oral squamous cell carcinoma; TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling; WB: western blotting.

Tabela 5 - (do artigo publicado em língua inglesa). Table 5 - Putative BH3-mimetic drugs. Characteristics and main findings of preclinical studies assessing Gossypol and derivatives (TW-37 and ApoG2) in head and neck squamous cell carcinomas (either as single-agents or combined with chemotherapy/ionising radiation).

Study	Condition	Combined therapy	Study sample	Assessment methods	BH3-mimetic dose (duration)	Main findings
(-) Gossypol (AT-101)						
Oliver et al. (2004) [10]	HNSCC	No	Cell-lines: UM-SCC1, UM-SCC-6, UM-SCC12, UM-SCC14A, UM-SCC17B, UM-SCC22A, UM-SCC23, UM-SCC25, UM-SCC74B, UM-SCC81B; primary fibroblasts, primary keratinocytes	In-vitro: MTT assay (growth inhibition); TUNEL assay (apoptosis)	In-vitro: 5 to 80 μ M (up to 6 days)	In-vitro: - The mean IC50 was $5.30 \pm 1.55 \mu$ M for the HNSCC cell lines. - Primary fibroblasts showed significantly higher resistance, with mean IC50 of $20.31 \pm 9.20 \mu$ M. - Primary keratinocytes also showed significant greater resistance, with a mean IC50 of 15.36 ± 0.28 . - (-)-Gossypol induces apoptosis more efficiently in HNSCC cell lines with wild-type p53 status (UM-SCC1 and UM-SCC6) compared to those with mutant p53 status.
Bauer et al. (2005) [51]	HNSCC	Cisplatin	Cell lines: UM-SCC-5, UM-SCC-10B, UM-SCC-5PT (cisplatin resistant subline), UM-SCC-10BPT (cisplatin resistant subline)	In-vitro: MTT assay (growth inhibition); TUNEL assay (apoptosis)	In-vitro: 5 to 25 μ M (up to 5 days)	In-vitro: - All four cell lines exhibit growth inhibition at physiologically achievable (-)-gossypol concentrations (less than 10μ M). - (-)-Gossypol induced apoptosis in 70% to 80% of the cisplatin-resistant cells but only in 25% to 40% of the parental cells. - (-)-Gossypol, may be useful adjunct to overcome cisplatin resistance
Wolter et al. (2006) [55]	HNSCC	No	Cell-lines: UM-SCC17B, UM-SCC1, primary keratinocytes Xenograft model: NCr-nu/nu mice w/ UM-SCC-17B and UM-SCC1	In-vitro: MTT assay (growth inhibition) In-vivo: Tumour volume measurements and TUNEL assay (apoptosis)	In-vitro: 5 to 30 μ M (up to 6 days) In-vivo: 5 to 15 mg/kg (up to 43 days with drug and up to 91 days after cessation of drug)	In-vitro: - Both tumour lines and normal keratinocytes showed dose-dependent inhibition of cell growth. - IC50 values for UM-SCC-1 (3μ M) and UM-SCC17B (6μ M), were considerably lower compared to keratinocytes (17μ M), indicating selective cell growth inhibition. In-vivo: - Tumours grew progressively in controls, whereas growth was significantly suppressed in (-)-gossypol group. - The mitotic rate in tumours from the (-)-gossypol group was significantly lower than in controls. - An increase in the percentage of apoptotic cells was observed in treated tumours vs. controls.

Sikora et al. (2008) [52]	HNSCC	Antioxidant N-acetylcysteine (NAC)	Cell-lines: UM-SCC5, UM-SCC74B, UM-SCC-74BxL, Pt-R; immortalised keratinocytes (HOK16B)	In-vitro: Trypan blue assay (viability); SubG1 DNA content (apoptosis)	In-vitro: 10 μ M (up to 96h)	<p>- Residual tumours remained growth-suppressed for 2 weeks after cessation of (-)-gossypol treatment.</p> <p>In-vitro: - Progressive loss of viability was observed for UM-SCC5 (~6% viability), UM-SCC74B (~6% of viability), and UM-SCC-74BxL (~54% of viability) over 96h.</p> <p>- In Pt-R (a subpopulation of cells that does not undergo apoptosis) no additional loss of viability over 96 hours was found.</p> <p>- Treatment with NAC alone did not adversely affect cell viability in any of the cell lines, although concurrent treatment with (-)-gossypol enhanced cytotoxicity in UM-SCC5 (~1% of viability), UM-SCC-74-BxL (~45% of viability), and Pt-R (~16%).</p> <p>- Normal keratinocytes were resistant to the combination of (-)-gossypol with NAC and to either treatments alone.</p>
Imai et al. (2012) [56]	HNSCC	Docetaxel	Cell-lines: UM-SCC17B, UM-SCC74A Xenograft model: Immunodeficient SCID mice w/ UM-SCC17B	In-vitro: Sulforhodamine B assay (cytotoxicity); PI through flow cytometry (apoptosis) In-vivo: Tumour volume measurements and mice survival time.	In-vitro: 1.7 to 3.4 μ M (up to 72h) In-vivo: 10 mg/kg daily or 70mg/kg weekly (up to 50 days)	<p>In-vitro: The IC50 for (-)-gossypol ranged from 2.13 to 2.54 μM for HNSCC cell lines.</p> <p>- Combinations of (-)-gossypol and docetaxel produced additive toxicity in HNSCC tumour cells.</p> <p>- The use of both drugs at the same time induced more apoptosis than any other experimental condition tested.</p> <p>In-vivo: - Daily (-)-gossypol therapy increased mouse survival, decreased tumour mitotic index, and decreased tumour microvessel density, compared with weekly therapy.</p>
Lin et al. (2013) [53]	HNSCC	"Smart" particles loaded with anti-Bcl-2 siRNA	Cell-lines: UM-SCC17B	In-vitro: Sulforhodamine B assay (cell survival); PI staining (apoptosis)	In-vitro: 0.1 to 8 μ M (up to 72h)	<p>In-vitro: - (-)-Gossypol caused a dose-dependent inhibition in cell viability and an increase in the fraction of apoptotic cells.</p> <p>- The IC50 value for UM-SCC-17B was 2.51 μM at 72h.</p> <p>- The combination of low-dose (-)-gossypol with "smart" particles loaded with anti-BCL-2 siRNA caused a substantial reduction in cell viability and an increase in apoptosis, indicating a synergistic therapeutic effect.</p>
Zerp et al. (2015) [54]	HNSCC	Ionising radiation	Cell-lines: UM-SCC14C, UM-SCC22A, UM-SCC11B, VU-SCC-OE	In-vitro: Crystal violet assay (clonogenic survival); bis-benzimide staining (nuclear morphology); PI through FACS analysis (apoptosis)	In-vitro: Up to 100 μ M (up to 72h)	<p>In-vitro: - All four cell lines showed responsiveness to both radiation and (-)-gossypol, with IC50 values between 16 μM and 44 μM.</p> <p>- (-)-Gossypol synergistically enhances radiation-induced apoptosis at clinically attainable plasma levels (0.6-1.35 μM)</p>

(\pm)-Gossypol

Konac et al. (2005) [28]	LEC*	No	Cell-lines: HEP2*	In-vitro: Trypan blue assay (cytotoxicity); Giemsa staining (nuclear morphology); DNA laddering (apoptosis)	In-vitro: 25 to 150 μ M (up to 6h)	In-vitro: - The cell viability according to (\pm)-gossypol doses were: 80 \pm 2.9% for 25 μ M; 84 \pm 2.4% for 50 μ M; 78 \pm 2.4% for 75 μ M; 50 \pm 5.4% for 100 μ M; 25 \pm 3.7% 150 μ M. - The rates of apoptosis according to (\pm)-gossypol doses were: 12 \pm 1.4% for 25 μ M; 26 \pm 1.5% for 50 μ M; 23 \pm 1.3% for 75 μ M; 10 \pm 1.4% for 100 μ M; and 8 \pm 1.8% for 150 μ M. - (\pm)-Gossypol at concentrations of 50 μ M and 75 μ M resulted in the highest rates of apoptosis, by 26% and 23%, respectively.
Kasten-Pisula et al. (2007) [60]	HNSCC	Ionising radiation	Cell-lines: FaDu	In-vitro: DAPI staining through IF (nuclear condensation and fragmentation); formation of cH2AX-foci through IF (double-strand break repair capacity)	In-vitro: 1 μ M (up to 4 days)	In-vitro: - (\pm)-Gossypol at 1 μ M significantly affected the proliferation of FaDu cells. - FaDu cells treated with (\pm)-gossypol at 1 μ M showed a pronounced radiosensitisation - (\pm)-Gossypol at 1 μ M resulted in a clear increase in the number of residual double-strand break already with low doses of irradiation, indicating a reduction in repair capacity
Boehm et al. (2008) [58]	HNSCC	Erlotinib STAT3 decoy	Cell-lines: UM-22B, PCI-15B, 1483	In-vitro: MTT assay (citotoxicity); trypan blue assays (viability); annexin V binding through IF (apoptosis) In-vivo: Tumour volume measurements and TUNEL assay (apoptosis)	In-vitro: Dose range not reported (up to 72h) In-vivo: 120 mg/kg (up to 21 days)	In-vitro: - The IC50 values for (\pm)-gossypol at 72h were 2.669 μ M for UM-22B, 2.968 μ M for PCI-15B, and 2.135 μ M for 1483 cell lines - Compared to either treatment alone, the combination of the STAT3 decoy and (\pm)-gossypol significantly enhanced the inhibition of cell proliferation in PCI-15B cells, but not in UM-22B cells (note: the 1473 cells were not included in this assay). - Triple combination of erlotinib, STAT3 decoy, and (\pm)-gossypol further enhanced cell growth inhibition and apoptosis in UM-22B cells (note: the PCI-15B and 1473 cells were not included in this assay).
Wong et al. (2012) [59]	NPC*	Gemcitabine	Cell-lines: CNE1*, CNE2*, HONE1*, HK1	In-vitro: MTS assay (viability and proliferation)	In-vitro: 0.1 to 100 μ M (up to 72h)	In-vitro: - The IC50 value for (\pm)-gossypol at 72h were 8.15 μ M for CNE1, 16.7 μ M for CNE2, 36.46 μ M for HONE1, and 18.71 μ M for HK1. - (\pm)-Gossypol presented antagonism with gemcitabine in CNE1 and HK1 cell lines, whilst exhibiting additive effect in HONE1 and synergistic effect in CNE2 cell lines.
Benvenuto et al. (2017) [57]	HNSCC	No	Cell-lines: CAL27, FaDu	In-vitro: Sulforhodamine B assay (cytotoxicity); PI through flow cytometry (apoptosis); cleaved caspase-3 and cleaved PARP through WB	In-vitro: 1.25 to 80 μ M (up to 72h)	In-vitro: - The IC50 values for (\pm)-gossypol at 72h were 4.75 μ M for FaDu cells and 5.02 μ M for CAL27. - (\pm)-Gossypol inhibited cell proliferation and induced apoptosis and autophagy of CAL27 and FaDu cells.

				(apoptosis); autophagic vacuoles formation observed through an electron microscope (autophagy); LC3-II expression through WB (autophagy)		
TW-37						
Ashimori et al. (2009) [64]	HNSCC	Cisplatin	Cell lines: OSCC3, UM-SCC1, UM-SCC74A Xenograft model: Immunodeficient mice (CB.17.SCID) w/ OSCC3	In-vitro: Sulforhodamine B assays (cytotoxicity); subG1 DNA content and PI through flow cytometry (apoptosis) In-vivo: Tumour volume measurements and TUNEL assay (apoptosis)	In-vitro: 0.1 to 100 μ M (up to 96h) In-vivo: 15 mg/kg (up to 20 days)	In-vitro: -The IC50 value for TW-37 at 72h was approximately 0.3 μ M in the three HNSCC cell lines. - Combination of TW-37 and cisplatin showed enhanced cytotoxic effects for endothelial cells and HNSCC <i>in-vitro</i> , compared with single-drug treatment. In-vivo: - TW-37 inhibited tumour angiogenesis and induced tumour apoptosis without significant systemic toxicities. The combination of TW-37 and cisplatin enhanced the time to tumour failure (4-fold increase in tumour volume compared with pretreatment tumour volume)
Lu et al. (2017) [65]	NPC	Cisplatin 5-Fluorouracil	Cell-lines: HNE1 and CNE-LMP1; immortalised epithelial cells (NP69) Xenograft model: BALB/c mice w/ HNE1 or CNE-LMP1	In-vitro: CCK8 (viability); annexin V-FITC/PtdIns through FACS analysis (apoptosis) In-vivo: Tumour volume measurements and TUNEL assay (apoptosis)	In-vitro: 0.5 to 4 μ M (pre-treatment for 24h) In-vivo: 15 mg/kg (up to 20 days)	In-vitro: - TW-37 alone at 2 μ M led to the reduction of NPC cell viabilities. - Both 1 and 2 μ M of TW-37 significantly enhanced the effect of cisplatin on NPC cell viabilities. - Although 4 μ M TW-37 could also decrease cell viabilities of cisplatin-treated normal epithelial cells, both 2 and 3 μ M of TW-37 had no prominent impact. - Both 1 and 2 μ M of TW-37 brought about a remarkable reduction of the IC50 value of 5-Fluoracin in the NPC cells, but not in NP69 cells. - TW-37 pre-treatment aggravated chemotherapeutics-induced apoptosis of NPC cells but not that ofNPE cells In-vivo: TW-37 observably increases chemosensitivity of NPC tumours, with increased tumour cell apoptosis and reduced tumour volume, but had no marked influence on the normal tissues in mice.
Ahn et al. (2019) [63]	OSCC	No	Cell lines: HSC3 Xenograft model: BALB/c nu/nu male mice w/ HSC3	In-vitro: Trypan blue (proliferation); live/dead assay (citotoxicity); annexin V-FITC through FACS analysis (apoptosis); cleaved caspase-3 and cleaved PARP through WB (apoptosis).	In-vitro: Up to 5 μ M (up to 48h) In-vivo: 15 mg/kg (up to 21 days)	In-vitro: -Treatment with TW-37 significantly reduced cell proliferation by more than 50% compared with the control. - The percentage of apoptotic cell population in TW-37-treated group (37%) dramatically increased compared with in control-treated group (13.54%) In-vivo: TW-37 inhibited tumour growth without any significant liver and kidney toxicities.

				In-vivo: Tumour volume measurements		
Yang et al. (2020) [66]	OSCC	Cryptotanshinone	Cell lines: HSC3, Ca9.22, HSC4, HN22	In-vitro: Trypan blue (proliferation); cleaved caspase-3 and cleaved PARP through WB (apoptosis); annexin V-FITC/PI through FACS analysis	In-vitro: Up to 5 μ M (up to 48h)	In-vitro: - At 48h, TW-37 exhibited a concentration-dependent cytotoxic effect on HSC3, decreasing viability to around 40% at 2.5 μ M and to around 30% at 5 μ M. Similar effects were observed considering the remaining cell lines. - The rate of annexin V-positive cell lines was increased from 11.29% in the vehicle control group to 22.78 to 42.15% in the TW-37 treatment group - The combined treatment of TW-37 and cryptotanshinone potently decreased the growth of HSC-3 cell lines compared with either TW-37 or cryptotanshinone alone
Apogossypolone (ApoG2)						
Hu et al. (2008) [23]	NPC*	Cisplatin	Cell-lines: CNE1*, CNE2*, HONE1*, and C666-1 Xenograft model: Athymic nude (nu/nu) mice w/ CNE1* and CNE2*	In-vitro: MTT assay (viability); total caspase activity through spectrophotometry (apoptosis), DAPI staining through IF (nuclear condensation and fragmentation); PI through flow cytometry (cell cycle). In-vivo: Tumour volume measurements and TUNEL assay (apoptosis)	In-vitro: 0.625 to 20 μ M (up to 72h) In-vivo: 200 mg/kg (up to 14 days)	In-vitro: - At 72h, the IC50 values in C666-1, CNE1, CNE2 and HONE1 cells were 1.7 \pm 0.792, 2.055 \pm 0.711, 4.915 \pm 2.044, and 50.178 \pm 15.832 IM, respectively -ApoG2 had no obvious inhibitory effects on HONE1 (low expression of BCL-2 family proteins). In-vivo: - Antitumour activity measurements for cisplatin alone and ApoG2 alone, as measured by T/C % ratios, were 54% and 78%, respectively, for CNE1 xenograft-bearing mice and 48% and 69%, respectively, for CNE2 xenograft-bearing mice. - When combined with cisplatin, ApoG2 showed greater antitumour activity, with T/C % ratios of 46% in CNE1 xenograft-bearing mice and 29% in CNE2 xenograft-bearing mice.
He et al. (2014) [24]	NPC*	Ionising radiation	Cell-lines: CNE1*, CNE2*, NPC, SUNE1*; immortalised epithelial cells (NP69) Xenograft model: Athymic nude nu/nu mice nude w/ CNE-2	In-vitro: MTT assay (viability); autophagic vacuoles formation observed through an electron microscope (autophagy); LC3-II expression through WB (autophagy)	In-vitro: 0.20 to 100 μ M (up to 48h) In-vivo: 120 mg/kg (up to 20 days)	In-vitro: - At 72h, the IC50 values of ApoG2 acting on CNE1, CNE2, and SUNE1 cells were 2.84 \pm 0.19, 2.18 \pm 0.38 and 5.64 \pm 0.65 μ M, respectively. - ApoG2 had no obvious effect on normal NP69 cells. In-vivo: Antitumour activity (inhibitory rate) measurements for the ApoG2 alone, ionising radiation alone, and the combined therapy were 46.89, 19.34, and 61.64%, respectively (measured by calculation of (C-T)/C percentage ratios).
Zheng et al. (2017) [25]	NPC*	No	Cell-lines: CNE2*	In-vitro: Cell counting kit (viability); annexin-FITC/PI through FACS analysis	In-vitro: 5 to 80 μ M (up to 72h)	In-vitro: - ApoG2 significantly decreased CNE2 cell viability. The IC50 for ApoG2 after a 72h exposure was 23.61 μ M.

Xenograft model: BALB/c nude mice w/ CNE-2	(apoptosis); uranyl acetate and lead citrate staining through IF (autophagy); acridine orange staining through FACS analysis (autophagy) In-vivo: Tumour volume measurements	In-vivo: 120 mg/kg (up to 21 days)	- ApoG2 was capable of inducing cell death through both apoptosis and autophagy. In-vivo: - ApoG2 suppressed tumour growth in the BALB/c-nu mice by 64.49%.
---	--	---	---

Legend: *Cell lines listed as potentially HeLa contaminated (originated from human cervix carcinoma); ApoG2: Apogossypolone; D50: time to 50% survival; DNA: Deoxyribonucleic acid; FACS: fluorescence-activated single cell sorting; FITC: fluorescein isothiocyanate; GAA: gossypol acetic acid; IC50: half maximal inhibitory concentration; IF: immunofluorescence; HNSCC: head and neck squamous cell carcinoma; HPV: human papillomavirus; LEC: larynx epidermoid carcinoma; MTS: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium; MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; NAC: N-acetyl-cysteine; NPC: Nasopharyngeal carcinoma; PARP: poly(ADP-ribose) polymerase; PI: propidium iodide; RNA: Ribonucleic acid; SCC: squamous cell carcinoma; OSCC: oral squamous cell carcinoma; TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling; WB: Western Blotting.

Tabela 6 - (do artigo publicado em língua inglesa). Table 6 - Putative BH3-mimetic drugs. Characteristics and main findings of preclinical studies assessing obatoclax, sabutoclax, and YC137 on head and neck squamous cell carcinomas (either as single-agents or combined with chemotherapy/ionising radiation).

Study	Condition	Combined therapy	Study sample	Assessment methods	BH3-mimetic dose (duration)	Main findings
Obatoclax (GX15-070)						
Yazbeck et al. (2014) [67]	HNSCC	Cloroquine	Cell-lines: UMSCC-1, CAL33, 1483, UMSCC-22A	In-vitro: MTT assay (viability/proliferation); annexin V staining through flow cytometry (apoptosis); cleaved-PARP through WB (apoptosis); Hoechst 33258 stained autophagic vacuoles through an electron microscope (autophagy); LC3-II expression through WB (autophagy)	In-vitro: Up to 200 nM (up to 48h)	In-vitro: - All cell lines were highly sensitive to single-agent obatoclax, with IC50 ranging from 46 to 177 nM. - The impact of obatoclax was dose-dependent, and UMSCC-22A cells, with the lowest MCL-1 expression levels, were found to be the least sensitive. - Obatoclax induced apoptosis in all cell lines as evidenced by increases in subG1 DNA content, Annexin-V staining, and PARP cleavage. - Treatment with Obatoclax (100 or 200 nM) for 24 or 48 h resulted in relocalization of the GFP-LC3 protein to punctate cytoplasmic dots, an indicator of autophagosome formation. - Treatment with the autophagy inhibitor chloroquine potentiated the cytotoxicity of obatoclax, demonstrating that the induced autophagy exerts a pro-survival effect.
Sulkshane et al. (2017) [68]	OSCC	Ionising radiation	Cell-lines: AW13516, AW8507, SCC29B Xenograft model: BALB/c nude mice w/ SCC29B	In-vitro: MTT and sulforhodamine B assays (viability); annexin V-FITC through FACS analysis (apoptosis); cleaved caspase-3, cleaved caspase-8 and cleaved PARP through WB (apoptosis); autophagic vacuoles formation observed through an electron microscope and (autophagy); LC3-II expression through WB (autophagy) In-vivo: Tumour volume measurements	In-vitro: Up to 1000nM (up to 72h) In-vivo: 1.25 mg/kg, 2.5mg/kg, and 5 mg/kg (up to 5 days)	In-vitro: -The IC50 values for Obatoclax at 72h were 110 nM for AW8507, 101 nM for AW13516, and 94.5 nM for SCC29B. - Obatoclax treated cells showed absence of caspase-3, caspase-8, and PARP cleavage, indicating a caspase-independent, nonapoptotic form of induced cell death - Obatoclax exhibited a significant clonogenic inhibition in combination with ionizing radiation as opposed to either treatment alone. In-vivo: Obatoclax resulted in a significant reduction in the mean tumour volume without a significant decrease in the weight of the animals.
Sabutoclax (BI-97C1)						

Maji et al. (2015) [34]	HNSCC	Celecoxib	Cell-lines: H357, SCC4, SCC9, FaDu; primary keratinocytes	In-vitro: MTT assay; trypan blue assays (viability); cleaved caspase-3, cleaved caspase-9, and cleaved PARP through WB (apoptosis); autophagic vacuoles formation observed through an electron microscope and (autophagy); LC3-II expression through WB (autophagy); monodansylcadaverine through flow cytometry (autophagy)	In-vitro: 1 up to 10 μ M (up to 48h)	In-vitro: At 48h considering the concentration of 2 μ M of sabutoclax, cell viability decreased to around 45 to 50% for SCC4 and SCC9 and around 15 to 20% for H357 and FaDu. - No significant decrease in cell viability was observed considering primary keratinocytes. - At 48h considering the concentration of 10 μ M of Sabutoclax, a 30% induction of cell death was observed, as measured by the trypan blue assay. - Sabutoclax resulted in formation of autophagic vacuoles, induced monodansylcadaverine staining and increased the conversion of LC3-I to LC3II, suggesting that this drug induced cell death by autophagy. - Sabutoclax and celecoxib synergistically inhibited the growth of H357 cells
YC137						
Low et al. (2012) [26]	NPC*	Cisplatin Paclitaxel	Cell-lines: HK1, CNE1*, TW01, SUNE1*; immortalised epithelial cells (NP69 and NP460)	In-vitro: MTT assay (viability); annexin V-PE through FACS analysis (apoptosis); caspase 3/7, caspase-8, and caspase-9 activity through spectrophotometry (apoptosis), histone/DNA ELISA assay kit (apoptosis)	In-vitro: Up to 100 μ M (up to 72h)	In-vitro: - The IC50 values for YC137 at 72h were 36.78 \pm 68.9 μ M for HK1, 54.92 \pm 6.14 μ M for CNE1, >100 μ M for TW-01, and 69.86 \pm 6.14 μ M for SUNE1. - YC137 potentiates cisplatin (but not paclitaxel) sensitivity in HK1 and CNE1 (NPC cells that overexpress BCL-2). - YC137 had no obvious inhibitory or synergistic effects on cisplatin in the TW01 and SUNE1 NPC cells (NPC cells that underexpress BCL-2).

Legend: *Cell lines listed as potentially HeLa contaminated (originated from human cervix carcinoma); ApoG2: Apogossypolone; D50: time to 50% survival; DNA: Deoxyribonucleic acid; FACS: fluorescence-activated single cell sorting; FITC: fluorescein isothiocyanate; GAA: gossypol acetic acid; IC50: half maximal inhibitory concentration; IF: immunofluorescence; HNSCC: head and neck squamous cell carcinoma; HPV: human papillomavirus; LEC: larynx epidermoid carcinoma; MTS: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium; MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; NAC: N-acetyl-cysteine; NPC: Nasopharyngeal carcinoma; PARP: poly(ADP-ribose) polymerase; PI: propidium iodide; RNA: Ribonucleic acid; SCC: squamous cell carcinoma; OSCC: oral squamous cell carcinoma; TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling; WB: Western Blotting.

Tabela 7 - (do artigo publicado em língua inglesa). Table 7 - Methods used for detection of cell death across included studies assessing the effects of validated and putative BH3-mimetics in head and neck squamous cell carcinomas.

BH3-mimetic	Study [reference]	Cell death assessment		
		<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	
(-) Gossypol	Oliver et al. (2004) [10]	DNA degradation	NA	
	Bauer et al. (2005) [51]	DNA degradation	NA	
	Wolter et al. (2006) [55]	Viability assay	DNA degradation	
	Sikora et al. (2008) [52]	DNA degradation	NA	
	Imai et al. (2012) [56]	Viability assay	Tumour volume	
	Lin et al. (2013) [53]	Propidium iodide	NA	
	Zerp et al. (2015) [54]	Propidium iodide	NA	
	Swiecicki et al. (2016) [30]	NA	NA	
(±) Gossypol	Konac et al. (2005) [28]	DNA degradation	NA	
	Kasten-Pisula et al. (2007) [60]	Multiple assays	NA	
	Boehm et al. (2008) [58]	Multiple assays	NA	
	Wong et al. (2012) [59]	Multiple assays	NA	
	Benvenuto et al. (2017) [57]	DNA degradation	NA	
TW-37	Ashimori et al. (2009) [64]	Propidium iodide	DNA degradation	
	Lu et al. (2017) [65]	Multiple assays	DNA degradation	
	Ahn et al. (2019) [63]	Multiple assays	Tumour volume	
	Yang et al. (2020) [66]	Multiple assays	NA	
ApoG2	Hu et al. (2008) [23]	Multiple assays	Tumour volume	
	He et al. (2014) [24]	NA	NA	
ABT-737	Zheng et al. (2017) [25]	Multiple assays	Tumour volume	
	Li et al. (2009) [31]	Multiple assays	NA	
	Gao et al. (2014) [37]	Multiple assays	NA	
	Maji et al. (2015) [34]	Multiple assays	NA	
	Shin et al. (2015) [36]	Multiple assays	DNA degradation	
	Gilormini et al. (2016) [32]	Multiple assays	Tumour volume	
	Li et al. (2016) [35]	Multiple assays	Tumour volume	
	Kim et al. (2017) [33]	Multiple assays	NA	
	Navitoclax	Britt et al. (2019) [41]	Multiple assays	NA
		Yang et al. (2019) [38]	Multiple assays	DNA degradation
Gadsden et al. (2020) [39]		Multiple assays	NA	
Tuomainen et al. (2021) [40]		Multiple assays	NA	
Venetoclax	Xiong et al. (2016) [22]	Multiple assays	Tumour volume	
	Guy et al. (2021) [45]	Multiple assays	Tumour volume	
Obatoclax	Yazbeck et al. (2014) [67]	Multiple assays	NA	
	Sulkshane et al. (2017) [68]	Multiple assays	Tumour volume	
Sabutoclax	Maji et al. (2015) [34]	Multiple assays	NA	
YC137	Low et al. (2012) [26]	Multiple assays	NA	
Multiple BH3	Wang et al. (2018) [27]	Multiple assays	No	
	Carter et al. (2019) [48]	Multiple assays	Tumour volume	
	Ow et al. (2019) [49]	Viability assay	NA	
	Ow et al. (2020) [50]	Viability assay	NA	

Legend: NA: not applicable.

5.3 Considerações finais (Capítulo I)

Os estudos analisados a partir da revisão da literatura indicaram um relevante efeito anticâncer dos compostos miméticos de BH3, tanto putativo quanto validados, sobre carcinomas de cabeça e pescoço. Esses compostos apresentaram capacidade de induzir morte celular por apoptose de células tumorais, exibindo pouco ou nenhum efeito citotóxico sobre células normais. Além disso, os estudos também demonstraram uma substancial redução do volume tumoral em modelos animais. Vale ressaltar, entretanto, que os efeitos anticâncer observados em miméticos de BH3 putativos podem estar relacionados, em maior ou menor extensão, a determinadas interações fora-do-alvo, tais como a indução de morte celular por autofagia.

6 CAPÍTULO II

ESTUDO *IN-VITRO* ACERCA DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DOS COMPOSTOS MIMÉTICOS DE BH3, NAVITOCCLAX E VENETOCCLAX, SOBRE CÉLULAS DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE BUCAL E FIBROBLASTOS ORAIS

6.1 Apresentação

Neste capítulo, são apresentados a metodologia e os resultados do estudo *in-vitro*, no qual foram investigados os efeitos biológicos de dois compostos miméticos de BH3 (Navitoclax e Venetoclax) sobre células de CEB e diferentes fenótipos de fibroblastos orais. De maneira geral, fibroblastos e outras células em estado de normalidade não dependem da superexpressão de proteínas da família BCL-2 para manterem-se viáveis (LAGARES *et al.*, 2017), desse modo, é proposta uma ação seletiva de compostos miméticos de BH3 sobre células que superexpressam proteínas da família BCL-2 para sua sobrevivência, tais como células tumorais (FERNALD e KUROKAWA, 2013). Assim, os ensaios realizados visaram investigar os efeitos desses compostos sobre a viabilidade, proliferação e migração de células de CEB. Para verificar se os efeitos foram seletivos às células tumorais nas concentrações e tempos avaliados, esses mesmos ensaios foram realizados em fibroblastos orais não-senescentes.

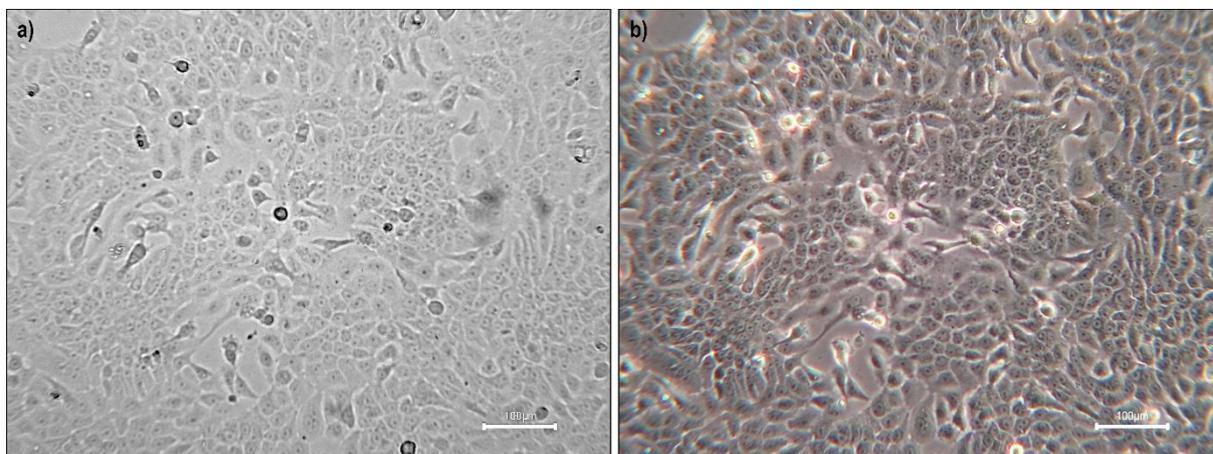
Além disso, também foi avaliada a capacidade desses compostos em induzir morte celular pelo mecanismo de apoptose em células de CEB e fibroblastos orais senescentes. Células senescentes são consideradas resistentes a morte celular, podendo se acumular no organismo e resultar em efeitos deletérios devido ao seu fenótipo secretor característico, especialmente quando presentes no microambiente tumoral (CAMPISI, 2011). Similarmente às células tumorais, o aumento da expressão de proteínas da família BCL-2 pode ser um dos mecanismos pelos quais as células senescentes podem evadir a morte celular (YOSEF *et al.*, 2016). Assim, determinados miméticos de BH3 podem exibir propriedades senolíticas e induzir apoptose de células senescentes presentes no microambiente tumoral (ZHU *et al.*, 2016), podendo desempenhar um efeito anticâncer indireto e impactar positivamente no prognóstico de diversos tipos de câncer de origem epitelial (ZHANG e LIU, 2013).

6.2 Material e Métodos

6.2.1 Aquisição da linhagem permanente de CEB

A linhagem tumoral CAL27 foi adquirida através do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e cultivada de acordo com as recomendações propostas pela *American Type Culture Collection* (ATCC). A linhagem CAL27 foi estabelecida em 1982 por J. Gianni (Centre Antoine Lacassagne, Nice Cedex, França), sendo originada de um paciente doador diagnosticado com um carcinoma epidermoide no terço médio da língua (GIOANNI *et al.*, 1988). As células da linhagem CAL27 são poligonais e com um citoplasma altamente granular (**Figura 8**).

Figura 8 - Fotomicrografia das células de CEB em cultivo (linhagem permanente CAL27). Observa-se células com fenótipo epitelial, morfologia poligonal, citoplasma granular e variados tamanhos (Zeiss AxioVert 40C, 10x, Zeiss, Oberkochen, Alemanha). a) Filtro de campo claro e b) filtro de contraste de fase.



Fonte: Fotomicrografias obtidas pelo autor.

6.2.2 Aquisição da linhagem primária de fibroblastos orais

6.2.2.1 Aspectos éticos

Um projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH-UFSC), com a finalidade de obtenção de fibroblastos gengivais humanos (HGF) para estabelecimento de cultura primária (Número do Parecer: 3.700.997; CAAE: 22712619.5.0000.0121) (**Anexo A**).

6.2.2.2 Obtenção das amostras de tecido gengival

A linhagem primária de HGF foi obtida pela técnica de explante de tecido gengival, o qual foi removido durante procedimento cirúrgico de cunha distal (com necessidade previamente estabelecida) realizado em pacientes atendidos no Centro de Ensino e Pesquisa em Implantes Dentários da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPID-UFSC). Aos pacientes que optaram por contribuir com os estudos, foi fornecido um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Apêndice A**), autorizando, por escrito, a utilização do tecido removido para fins de pesquisa.

6.2.2.3 Isolamento dos fibroblastos orais e estabelecimento da cultura primária

A linhagem primária de HGF utilizada no presente estudo foi estabelecida a partir de tecido gengival de um paciente doador com indicação para cirurgia de cunha distal. O tecido removido (explante) durante cirurgia foi acondicionado em um tubo tipo Falcon estéril de 15 mL, contendo 10 mL de solução salina de fosfato tamponada (PBS, do inglês *phosphate-buffered saline*) (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos da América [EUA]) e 4% de antibióticos e antifúngico (PSA, do inglês *penicillin-streptomycin-amphotericin*) (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil), mantida em temperatura entre 4°C e 8°C.

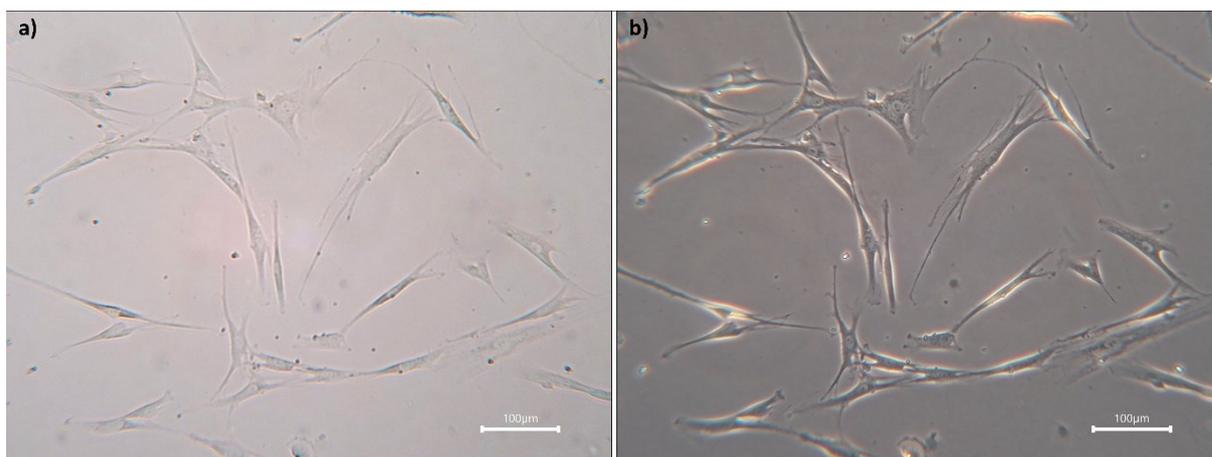
O explante foi transportado em recipiente com gelo ao Laboratório de Virologia Aplicada da Universidade Federal de Santa Catarina (LVA-UFSC), na área de cultivo celular, sendo processado em condições assépticas em uma cabine de fluxo laminar. Em seguida, o tecido foi lavado 2 vezes com PBS e a porção epitelial do explante foi

removida com o auxílio de um cabo de bisturi e lâmina número 15C.

A porção conjuntiva do explante foi fragmentada em porções com aproximadamente 1 mm². Subsequentemente, foram utilizados frascos de 25 cm² para o cultivo celular. Em cada frasco, foram inseridos cerca de 3 fragmentos do explante, além de 5 mL de meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (LGC Biotecnologia) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma-Aldrich) e 1% de PSA (LGC Biotecnologia). Os frascos contendo os explantes foram armazenados em estufa a temperatura de 37°C, em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de dióxido de carbono (CO₂). O crescimento celular no interior dos frascos foi observado a cada 1-2 dias com auxílio de um microscópio invertido (Olympus IX71, 40x, Tóquio, Japão).

O meio de cultivo foi trocado a cada 2-3 dias. Após atingirem a subconfluência, que ocorre quando as células ocupam 70% da área cultivável do frasco, o fragmento de tecido gengival foi descartado e as células foram enzimaticamente removidas pela adição de tripsina (Sigma-Aldrich). Para isso, cada frasco foi lavado 3 vezes com 2 mL de PBS. Posteriormente, foi acrescentado 500 µL de tripsina, a qual foi mantida em contato com as células durante aproximadamente 5 min a uma temperatura de 37°C. A tripsina foi neutralizada pela adição de 5 mL de DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de PSA. Cada frasco de cultura primária deu origem a uma nova subcultura na proporção de 1:1. O cultivo celular ocorreu até a #6 passagem para garantir que o único tipo celular presente nos frascos fossem fibroblastos (**Figura 9**), sendo posteriormente realizado o teste para avaliação de infecção por micoplasma e, subsequentemente, o congelamento celular.

Figura 9 - Fotomicrografias (Zeiss AxioVert 40C, 10x) dos fibroblastos gengivais humanos (linhagem primária HGF) em cultivo. Observa-se células com fenótipo mesenquimal, morfologia dendrítica, estrelada e/ou fusiforme, apresentando ainda diversos prolongamentos citoplasmáticos. a) Filtro de campo claro e b) filtro de contraste de fase.



Fonte: Fotomicrografias obtidas pelo autor.

6.2.3 Aquisição dos compostos experimentais

Os compostos Navitoclax e Venetoclax foram adquiridos da empresa MedChemExpress (Nova Jersey, EUA) através da representante local Veritas (São Paulo, Brasil). Seguindo as recomendações do fabricante, os compostos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) a uma concentração máxima de 10 mM (solução de estoque), sendo então armazenados em ultrafreezer -80°C . Após a diluição para as concentrações de trabalho, as soluções foram filtradas com auxílio de um filtro para seringa (membrana de polietersulfona de $0,22\ \mu\text{m}$) e armazenadas em freezer -20°C por até um mês.

6.2.4 Procedimentos e protocolos

6.2.4.1 Procedimentos e protocolos de rotina

Todos os procedimentos e protocolos foram realizados em cabines de fluxo laminar vertical (classe II) para manutenção da esterilidade dos materiais e das substâncias utilizadas. Uma descrição detalhada dos procedimentos de rotina como

contagem celular, avaliação de infecção por micoplasma, congelamento e descongelamento celular pode ser encontrada na seção de metodologia expandida, ao final deste capítulo. Além disso, as células não foram tratadas com antibióticos ou antifúngicos durante o período do estudo (com exceção dos HGF durante o período de estabelecimento da cultura primária, até a passagem #5).

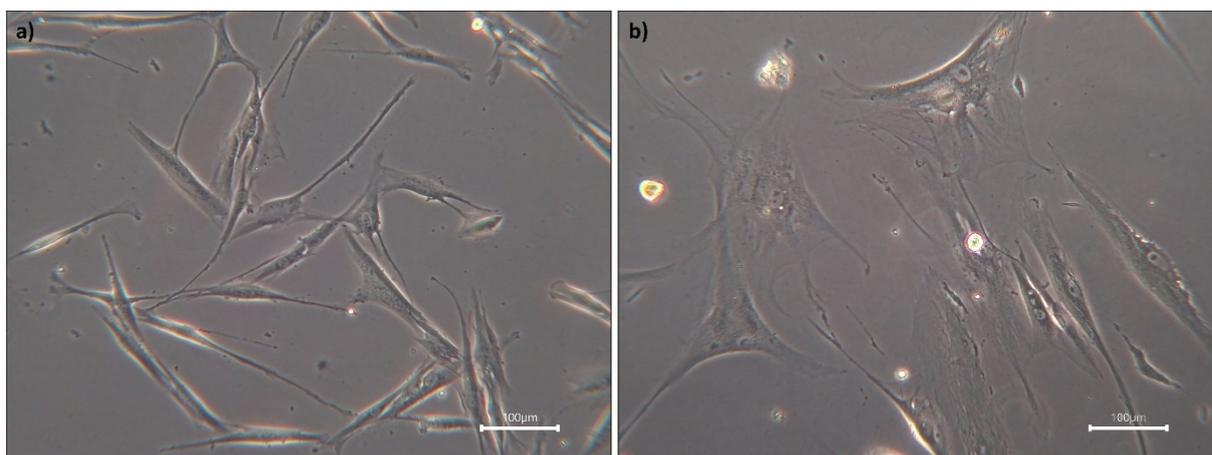
6.2.4.2 Protocolo de indução da senescência (H_2O_2)

Para experimentos nos quais foram utilizados HGF com fenótipo senescente, foi realizada a indução prematura da senescência por meio de estresse oxidativo. Para isso, foi utilizada uma solução de peróxido de hidrogênio 30% (H_2O_2) (Sigma-Aldrich), conforme protocolo previamente descrito na literatura (CHEN, OZANNE e HALES, 2007).

As células de HGF foram cultivadas em garrafas de 75 cm^2 e, ao atingirem aproximadamente 70% de confluência, o meio foi aspirado, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e, em seguida, foi adicionado 10 mL de solução de meio DMEM completo contendo uma concentração subtóxica de H_2O_2 (400 μM). As células foram expostas a solução de H_2O_2 durante um período de 2h, sendo mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 . Após esse período, foram realizadas 3 lavagens com PBS e, em seguida, acrescentado o meio DMEM completo, sendo as células mantidas em estufa de CO_2 durante 72h.

Para garantir uma população mais homogênea de células senescentes e inibir a sua reentrada no ciclo celular, foi realizado um segundo tratamento com H_2O_2 , seguindo todas as etapas descritas anteriormente. Após 72h da segunda exposição, as células foram, então, utilizadas para os experimentos previstos (**Figura 10**). Ainda, para inibir a proliferação da fração de células que não entraram em senescência, um tratamento prolongado com H_2O_2 (20 μM) foi realizado a cada troca de meio de cultivo (2-3 dias).

Figura 10 - Fotomicrografias (Zeiss AxioVert 40C, 10x, contraste de fase) demonstrando (a) HGF não-senescentes entre a #6 e #10 passagem (morfologia fusiforme e alongada) e (b) HGF com fenótipo senescente, após 72h do segundo tratamento com peróxido de hidrogênio (morfologia irregular e achatada, com aumento do tamanho do citoplasma e do número de prolongamentos citoplasmáticos).



Fonte: Fotomicrografias obtidas pelo autor.

6.2.4.3 Quantificação das células com fenótipo senescente (SA- β -Gal)

Para confirmação de que as células passaram a adquirir um fenótipo senescente após os tratamentos com H₂O₂, foi utilizado um kit comercial para detecção da atividade da enzima SA- β -Gal (Biovision, Califórnia, EUA). As células de HGF tratadas com H₂O₂ foram semeadas em uma densidade de $0,25 \times 10^4$ células/cavidade em placas de 96 cavidades. Como controle negativo, foram utilizadas células de HGF com baixo número de passagens (entre #6 e #10), as quais foram semeadas paralelamente e em igual densidade. As células foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ para garantir a adesão celular.

Após esse período, as células foram fixadas durante 10 min com o fixador disponibilizado pelo fabricante. Após a fixação, uma solução de X-Gal (20 mg/mL), preparada conforme as recomendações do fabricante, foi acrescentada nas cavidades e as placas foram mantidas em estufa a 37°C (dentro de embalagens hermeticamente fechadas e protegidas de fontes luminosas), durante um período de 24h. Ainda, como a marcação SA- β -Gal ocorre em um pH subótimo de 6,0 (GARY e KINDELL, 2005), após cada preparo da solução de X-Gal, o pH foi aferido e ajustado com solução de ácido cítrico, conforme necessário. Subsequentemente, foram realizadas

fotomicrografias com auxílio de microscópio invertido (Zeiss AxioVert 40C, 5x) e sistema de captura (câmera CMOS 5MP, ZZCAT).

Para cada amostra, foram realizadas duas fotomicrografias de campos distintos. O *software* ImageJ foi utilizado para a contagem de células e, subsequentemente, foi calculado o percentual de células positivas para a atividade da enzima SA- β -Gal. A linhagem foi considerada senescente quando pelo menos 50% das células apresentassem expressão positiva de SA- β -Gal.

6.2.5 Experimentos

Todos os experimentos descritos a seguir foram realizados em três repetições independentes, cada uma delas em triplicata.

6.2.5.1 Ensaio de citotoxicidade (Sulforrodamina B)

Este ensaio colorimétrico tem como base a capacidade do corante Sulforrodamina B (Sigma-Aldrich) em se ligar a aminoácidos presentes nas proteínas celulares. Em placas de 96 cavidades, esse ensaio exibe uma faixa linear dinâmica em densidades entre $7,5 \times 10^3$ e $1,8 \times 10^5$ células por cavidade, representando entre 1% e 200% de confluência. A leitura das placas foi realizada através da mensuração da absorbância, a qual representa a quantidade de componentes proteicos presentes em cada cavidade. Uma vez que a ligação da Sulforrodamina B é estequiométrica, a quantidade de corante extraído das células coradas é diretamente proporcional a massa celular (VICHAI e KIRTIKARA, 2006).

Para a realização deste experimento, as células foram semeadas em placas de 96 cavidades em densidades de $1,0 \times 10^4$ (HGF) e $1,5 \times 10^4$ (CAL27) células/cavidade, sendo 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. Subsequentemente, o meio das placas foi aspirado e foi realizado o acréscimo dos compostos experimentais nas concentrações e tempos previstos.

Ao final de cada tempo experimental, foi realizada a fixação das células com ácido tricloroacético (TCA), o qual foi adicionado em uma proporção de 1:1 em relação

ao volume presente em cada cavidade, resultando em uma concentração final de TCA 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, realizou-se a etapa de coloração das células com Sulforrodamina B, 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. As placas foram mantidas destampadas por pelo menos 24h visando a completa secagem das cavidades.

Em seguida, foram acrescentados 100 μ L 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 (510 nm) em leitora de microplacas (SpectraMax M2, Molecular Devices, Califórnia, EUA) com auxílio do *software* SoftMax Pro (Molecular Devices). 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, quando apropriado, foi calculada a concentração citotóxica para 50% das células (CC50).

6.2.5.2 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, foram utilizadas placas de 96 cavidades; as células foram semeadas em densidades de $1,0 \times 10^4$ (HGF) e $1,5 \times 10^4$ (CAL27) células/cavidade, sendo mantidas em estufa durante 24h para garantir a adesão celular. Após esse período, o meio foi aspirado e foram acrescentados os compostos experimentais nas concentrações e tempos previstos.

Ao final dos tempos experimentais, foi realizada uma etapa adicional de lavagem com PBS devido a interferência do vermelho fenol presente no meio DMEM com o corante fluorescente CyQuant® GR. Após a lavagem, as placas foram armazenadas em ultrafreezer -80°C por no mínimo de 24h e no máximo de 30 dias. A etapa de armazenamento em baixa temperatura auxilia no processo de lise celular, necessária para uma adequada ligação do corante fluorescente aos ácidos nucleicos. Após essa etapa, as placas foram retiradas do ultrafreezer e mantidas em bancada até atingirem a TA.

Subsequentemente, foi adicionado 200 µL de solução de CyQuant® GR e tampão de lise celular, preparada conforme as recomendações do fabricante. As placas foram incubadas à TA por um período de 5 min, protegidas da luz. As amostras resultantes foram levadas a uma leitora de microplacas (SpectramaxM2, Molecular Devices) com comprimentos de onda apropriados para fluorescência (480 nm excitação e 520 nm emissão), conforme recomendado pelo fabricante.

Além disso, para cada linhagem, foi estabelecida uma curva-padrão considerando um 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 partir da qual as medidas de fluorescência das amostras foram interpoladas para que se obtivesse o número correspondente de células. Subsequentemente, o número de células relativo a cada composto experimental foi comparado ao controle negativo (meio DMEM completo) e ao tempo 0h, os quais foram utilizados como referência para o cálculo da medida de efeito.

6.2.5.3 Ensaio de migração celular ("Scratch")

Para avaliação da migração celular, foi utilizado o método "Scratch", que tem como princípio a criação de uma interrupção da monocamada celular e acompanhamento do fechamento desta "ferida artificial" ao longo dos tempos experimentais pré-determinados. Para a realização desse experimento, as células da linhagem CAL27 foram semeadas em uma densidade de $1,0 \times 10^5$ células/cavidade em placas de 96 cavidades. Previamente ao plaqueamento, para minimizar o efeito da proliferação celular sobre ensaio de migração, 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 tanto a adesão celular quanto a inibição da proliferação. Esse procedimento, comumente denominado como "*serum starvation*", resulta em uma interrupção temporária do ciclo celular e sincroniza as células para uma mesma fase do ciclo GRADA *et al.* (2017).

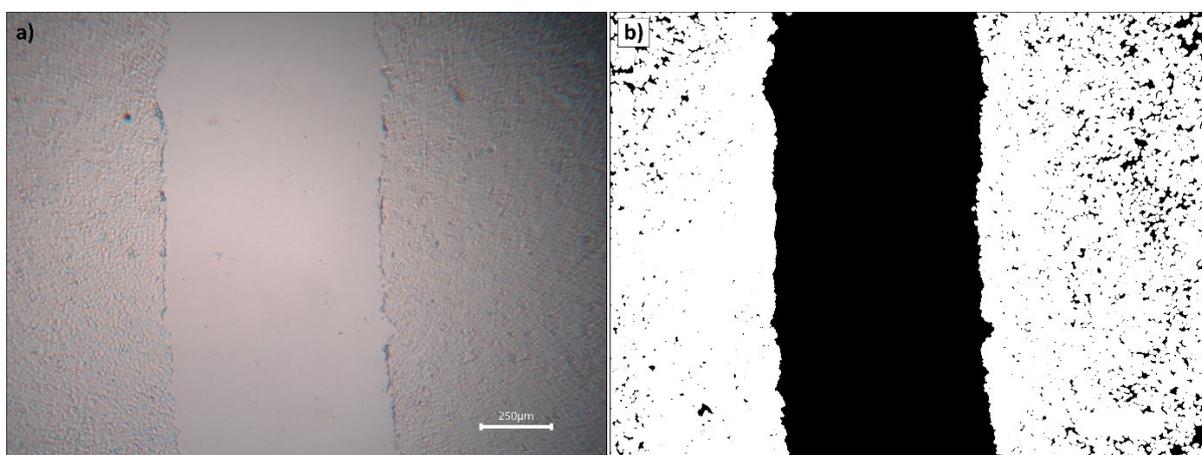
Para as células de HGF, foi realizado um protocolo alternativo de semeadura celular para permitir um maior tempo de adesão e evitar descolamentos excessivos durante a realização da ferida na monocamada celular. Primeiramente, os fibroblastos foram semeados em uma densidade de $1,0 \times 10^4$ células/cavidade em placas de 96 cavidades. Para que as células atingissem a confluência necessária para o experimento, as placas foram mantidas em estufa durante 72h. Após esse período, o meio foi aspirado e substituído por meio DMEM suplementado com baixa concentração de SFB (0,1%), visando minimizar o efeito da proliferação celular durante o período do experimento.

Após 24h do pré-tratamento com "*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%. Subsequentemente, foi realizada uma ferida retilínea e vertical na região central de cada cavidade com auxílio de uma ponteira estéril de 200 μ L. A passagem da ponteira resulta no descolamento das células subjacentes, permitindo que as células marginais ao espaço vazio recém-criado possam migrar. Após esse procedimento, o meio foi aspirado e as cavidades foram lavadas 2 vezes com 200 μ L de PBS. Os compostos experimentais foram, então, acrescentados nas concentrações pré-determinadas e o meio DMEM completo foi utilizado como controle.

Para avaliação do fechamento da ferida, 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, foram capturados os mesmos dois campos (região superior e inferior da cavidade). O acompanhamento foi realizado a cada 24h, desde o tempo 0h até o fechamento da ferida no grupo controle (48h ou 72h). Em cada imagem capturada, foi realizada a mensuração da área da ferida por meio do programa ImageJ (*software* de domínio público, *National Institutes of Health*, Maryland, EUA).

Para uma adequada mensuração da área da ferida pelo programa ImageJ, as imagens foram primeiramente convertidas para o formato 8-bits e em seguida processadas com o recurso "*Bandpass filter*". Posteriormente, foi aplicado o recurso "*Threshold*", sendo realizados ajustes até que a ferida artificial apresentasse um fundo completamente escuro. Subsequentemente, foi aplicado o recurso "*Minimum*" com um raio de 7,0 pixels, sendo o efeito complementado pelo recurso "*Fill holes*". A área da ferida foi então delimitada através da ferramenta "*Wand (tracing) tool*" e mensurada com o recurso "*Measure*". A **Figura 11** representa a imagem inicial e a mesma imagem após a aplicação dos filtros, recursos e ferramentas indicados. Por último, foi calculado o percentual de fechamento da ferida para cada composto e tempo experimental, tendo como referência área inicial mensurada no tempo de 0h.

Figura 11 - Painel representativo do ensaio de migração (linhagem CAL27). a) Fotomicrografia original (Zeiss AxioVert 40C, 4x, adaptador 0,5x) da ferida na monocamada celular, realizada com auxílio de uma ponteira de 200 μL e b) Imagem processada pelo software ImageJ para mensuração da área da ferida.



Fonte: Fotomicrografias obtidas pelo autor.

6.2.5.4 Ensaio de apoptose celular (Anexina V e Iodeto de propídio)

Para investigação da indução de morte celular pelo mecanismo de apoptose, foi utilizado um kit comercial para citometria de fluxo contendo os marcadores anexina V e iodeto de propídio (Dead Cell Apoptosis Kit®, Invitrogen, Thermo Fischer Scientific). Esse ensaio tem como princípio a translocação do lipídio fosfatidilserina da

superfície interna para a superfície externa da membrana celular em células apoptóticas. Nesse contexto, a anexina V apresenta uma ligação de alta afinidade a fosfatidilserina, sendo um marcador de células que entraram em processo de apoptose. O iodeto de propídio é impermeável em células vivas ou em processo de apoptose precoce, entretanto, em células mortas ou em processo de apoptose tardia, ocorre a permeabilização da membrana celular e o iodeto de propídio passa a apresentar forte marcação devido à sua ligação aos ácidos nucleicos (OANCEA *et al.*, 2006).

Para realização desse ensaio, as células foram semeadas em placas de 24 cavidades em densidades de $1,0 \times 10^5$ células/cavidade (HGF senescentes) e $2,0 \times 10^5$ células/cavidade (CAL27). As células foram mantidas durante 24h em estufa a 37°C e 5% de CO_2 para garantir a adesão celular. Subsequentemente, o meio foi aspirado e foram acrescentados os compostos experimentais. Como controle negativo da apoptose, foi utilizado o meio DMEM completo e, como controle positivo, foram utilizados os compostos H_2O_2 (600 μM ; Sigma-Aldrich) para a linhagem de HGF senescentes e camptotecina (1,5 μM ; Sigma-Aldrich) para a linhagem CAL27. Ainda, como controle positivo da necrose, as células foram submetidas a choque térmico, induzido da seguinte maneira: 1) exposição das células a uma temperatura de -80°C em ultrafreezer 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 o tempo do experimento, o sobrenadante foi coletado e armazenado em tubos de poliestireno específicos para citometria de fluxo. Subsequentemente, as células foram enzimaticamente removidas das cavidades 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. Subsequentemente, as células foram lavadas com PBS gelado (entre 4°C e 8°C) e novamente centrifugadas, conforme indicado. O PBS foi aspirado e as células foram ressuspensas em solução tampão (concentração de 1X), disponibilizada pelo fabricante. Em seguida, as células foram contadas em hemocítômetro e diluídas até uma concentração final entre $5,0 \times 10^5$ e $1,0 \times 10^6$ células/mL. Para cada 100 μL de

suspensão celular na concentração indicada, foram acrescentados 5 μ L de anexina V e 1 μ L de solução de iodeto de propídio (100 μ g/mL)

As células foram incubadas durante 15 min, à TA, e protegidas de fontes luminosas, sendo em seguida analisadas em citômetro de fluxo (FACSCANTO II, BD Bioscience, Nova Jersey, EUA) em parceria com o Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia da Universidade Federal de Santa Catarina (LAMEB/UFSC). Os parâmetros utilizados para leitura da fluorescência foram emissão de 530 nm (FL1) e >575 nm (FL3), conforme indicado pelo fabricante.

6.2.6 Análise estatística

A tabulação dos dados e as análises estatísticas descritivas foram realizadas através do programa Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, Washington, EUA). Os resultados foram expressos como médias e/ou medianas e suas respectivas medidas de dispersão (desvio padrão e/ou intervalo interquartil).

As análises estatísticas inferenciais foram realizadas com auxílio do programa SPSS Statistics 25 (IBM, Nova Iorque, EUA). Foram escolhidos testes paramétricos (ANOVA ou teste T de Student) ou não-paramétricos (Mann-Whitney, Kruskal-Wallis ou Friedman) apropriados para cada experimento com base nas hipóteses, quantidade de grupos e conformidade aos pressupostos estatísticos.

Para ensaios nos quais foram utilizados testes paramétricos, o pressuposto da normalidade foi verificado através dos testes Shapiro-Wilk ($n < 30$) ou Kolmogorov-Smirnov ($n \geq 30$). Ainda, considerando ANOVA para amostras independentes, o pressuposto da homoscedacidade (homogeneidade de variâncias) foi avaliado através do teste de Levene. A significância estatística foi fixada em $\alpha = 0,05$.

Para o ensaio de citotoxicidade, em particular, foi utilizado o programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia, EUA) para o cálculo da CC50. Além disso, para as análises de citometria de fluxo, foi utilizado o programa *Flowing Software* 2.5.1 (Turku Bioscience, Universidade de Turku, Finlândia).

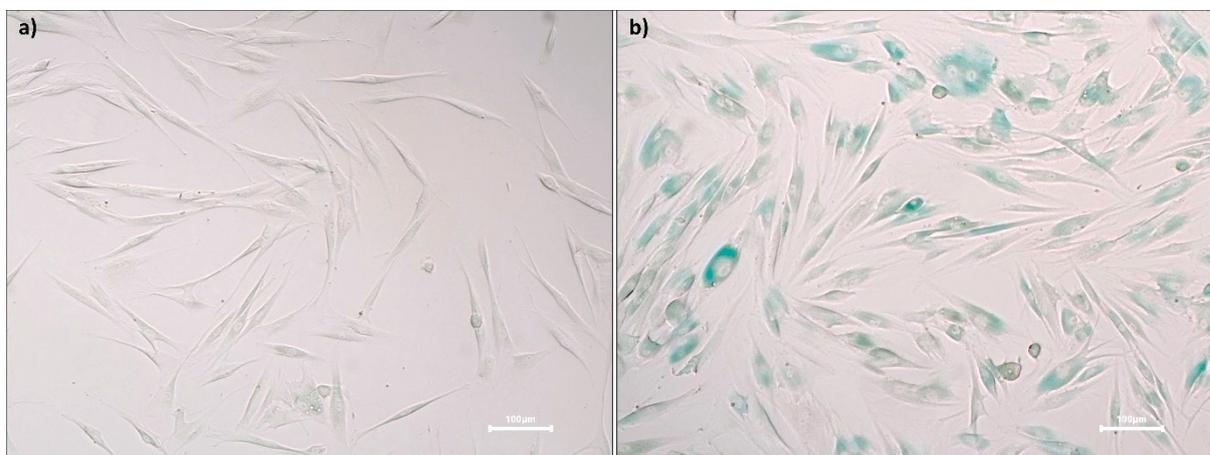
6.3 Resultados

Os dados relacionados ao efeito do solvente (DMSO) em diferentes concentrações (0,125%, 0,25%, 0,5% e 1,0%) sobre as linhagens celulares em estudo podem ser encontrados na seção de resultados complementares, ao final deste capítulo.

Comparado ao controle (DMEM), não foram observados efeitos citotóxicos relevantes nas concentrações de 0,125% e 0,25% considerando as linhagens celulares investigadas. Nesse contexto, destaca-se que a proporção de solvente na maior concentração testada (20 μ M) para ambos os compostos (Navitoclax e Venetoclax) foi menor do que 0,2%.

Além disso, para os experimentos nos quais foram investigados HGF senescentes (após dois tratamentos com H_2O_2), o percentual médio de células positivas para atividade da enzima SA- β -Gal foi de 85,48% (desvio padrão de 3,64%). Em contrapartida, em HGF não-senescentes (entre a #6 e #10 passagem), o percentual médio de células positivas foi de 6,06% (desvio padrão de 2,31%) (**Figura 12**).

Figura 12 - Fotomicrografias (Zeiss AxioVert 40C, 5x, campo claro) representando a marcação de β -galactosidase associada a senescência em (a) HGF não-senescentes, entre a #6 e #10 passagem e (b) HGF com fenótipo senescente, 72h após o segundo tratamento com H_2O_2 .



Fonte: Fotomicrografias obtidas pelo autor.

6.3.1 Ensaio de citotoxicidade (Sulforrodamina B)

6.3.1.1 Linhagem de CEB (CAL27)

Para a linhagem CAL27, ambos os compostos, Navitoclax e Venetoclax, foram testados nas concentrações de 5 μM , 10 μM e 20 μM e nos tempos experimentais de 24h, 48h e 72h. As estatísticas descritivas e suas respectivas medidas de dispersão em relação ao percentual de crescimento celular nas diferentes concentrações e tempos estão apresentadas na **Tabela 8**.

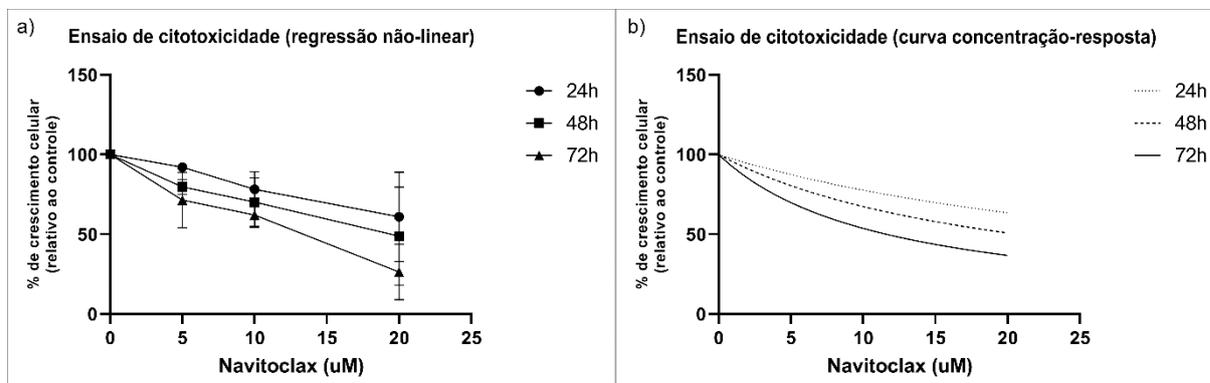
Tabela 8 - Ensaio de citotoxicidade (CAL27). Medidas sumárias (média e mediana) e respectivas medidas de dispersão (desvio padrão e intervalo interquartil) relativas ao percentual de crescimento celular considerando diferentes compostos (DMEM, Navitoclax e Venetoclax, concentrações (5 μM , 10 μM e 20 μM) e tempos experimentais (24h, 48h e 72h).

		DMEM (controle)	Navitoclax (5 μM)	Navitoclax (10 μM)	Navitoclax (20 μM)	Venetoclax (5 μM)	Venetoclax (10 μM)	Venetoclax (20 μM)
24h	Média (DP)	100,0 (8,1)	92,1 (4,9)	78,2 (17,4)	60,9 (24,7)	97,9 (4,9)	79,5 (14,5)	60,7 (13,6)
	Mediana [IQR]	99,62 [5,81]	92,92 [5,21]	83,78 [12,5]	68,61 [44,53]	98,25 [4,47]	75,2 [25,09]	57,56 [21,4]
48h	Média (DP)	100,0 (7,7)	79,7 (7,2)	70,2 (16,6)	48,8 (28,1)	93,4 (9,8)	72,4 (8,4)	38,4 (9,8)
	Mediana [IQR]	98,82 [12,93]	77,91 [8,78]	67,94 [22,39]	59,22 [56,95]	93,57 [9,41]	70,58 [15,86]	35,34 [10,36]
72h	Média (DP)	100,0 (5,5)	71,5 (15,6)	62 (10,6)	26,4 (15,2)	92,8 (7,9)	65,4 (17,15)	31,69 (7,1)
	Mediana [IQR]	100,01 [4,72]	78,33 [29,7]	61,78 [15,6]	16,49 [29,25]	93,36 [13,28]	69,43 [26,51]	30,86 [14,16]

Legenda: DP: desvio padrão; IQR: intervalo interquartil.

Com base nessas medidas de efeito, foi estimada a CC50, que corresponde a concentração citotóxica para 50% das células, conforme apresentado na **Figura 13**.

Figura 13 - Ensaio de citotoxicidade (CAL27). Gráficos de regressão linear e curva concentração-resposta considerando o percentual de crescimento celular das células de CEB em relação ao composto Navitoclax em diferentes tempos e concentrações.



A partir dessa curva, observou-se uma redução importante na CC50 nos diferentes tempos, conforme apresentado na **Tabela 9**. Essa redução sugere uma resposta tempo-dependente considerando a ação do Navitoclax sobre as células de CEB.

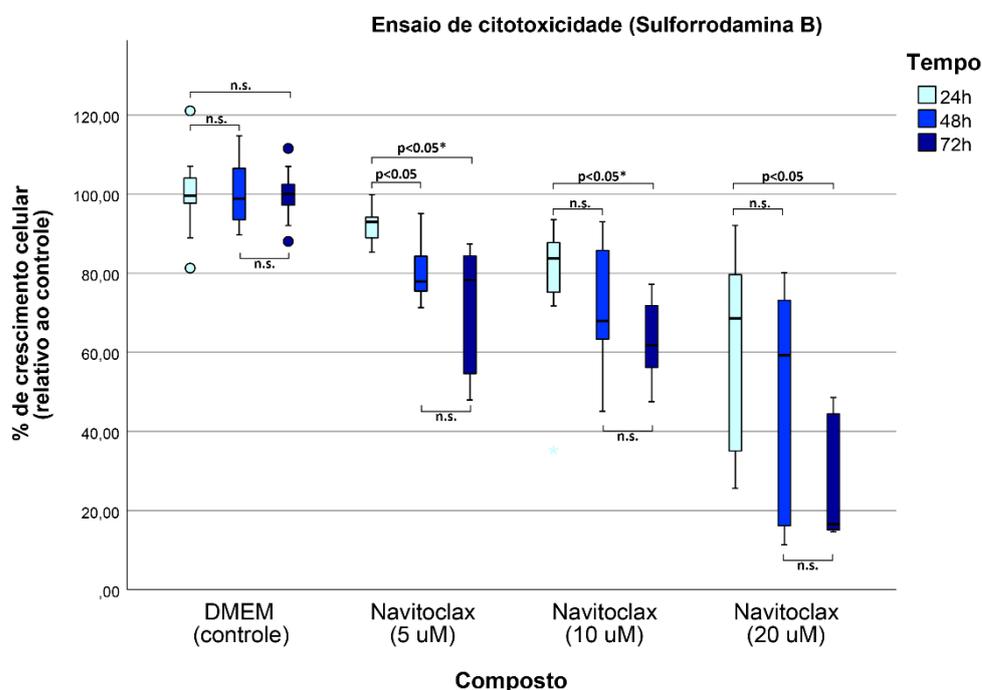
Tabela 9 - Ensaio de citotoxicidade (CAL27). Concentrações citotóxicas para 50% das células (CC50) e intervalo de confiança de 95% em relação ao composto Navitoclax nos tempos de 24h, 48h e 72h.

	24h	48h	72h
CC50 (95%CI)	> 20 μM	\cong 20 μM	11,60 μM (7,75-17,48 μM)

Legenda: 95%CI: Intervalo de confiança de 95%.

Nesse contexto, em comparação com o tempo de 24h, diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram observadas comparando com o tempo de 72h nas concentrações de 5 μM , 10 μM e 20 μM , indicando uma relação de efeito tempo-dependente relevante, conforme apresentado na **Figura 14**.

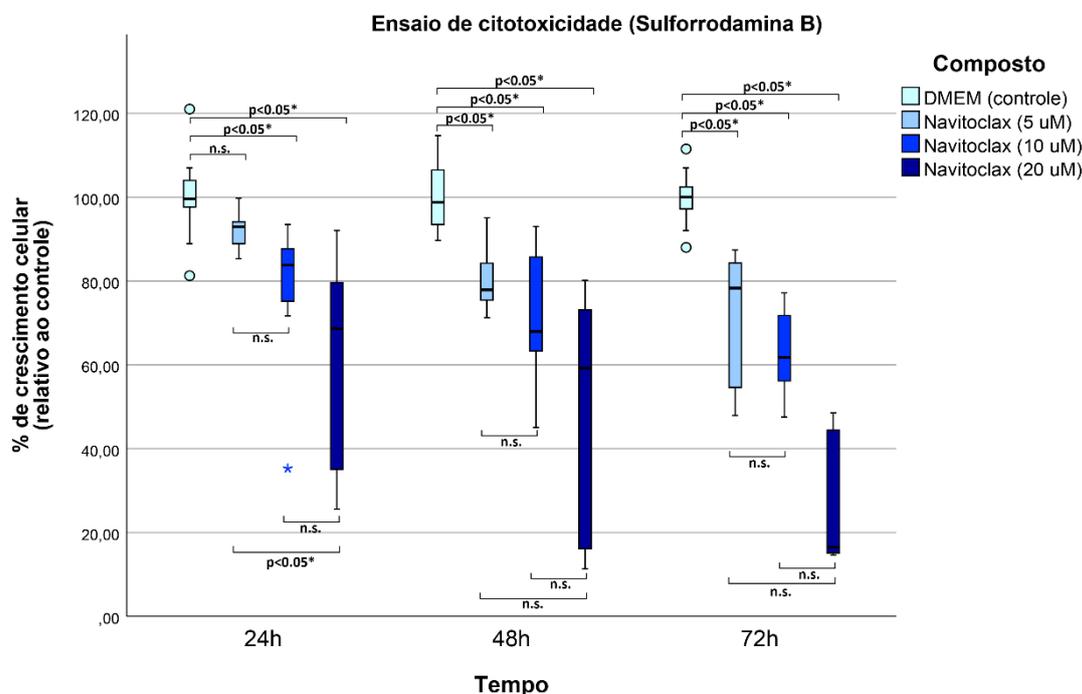
Figura 14 - Ensaio de citotoxicidade (CAL27). Gráfico Box-Plot apresentando o percentual de crescimento celular considerando o composto Navitoclax em diferentes tempos experimentais para cada concentração (relação tempo-dependente).



Legenda: n.s.: não significativo ($p > 0,05$); teste de Friedman para amostras dependentes (comparações *pairwise* pelo teste de Dunn-Bonferroni).

No que tange as diferentes concentrações do composto Navitoclax, todas apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em comparação com o controle negativo (DMEM) a partir de 48h; a concentração de 5 μM não exibiu diferenças significativas ($p < 0,05$) comparada ao controle DMEM em 24h. Nesse contexto, diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações testadas foram observadas somente entre 5 μM e 20 μM no tempo de 24h (**Figura 15**). Esses resultados indicam uma relação concentração-dependente menos proeminente.

Figura 15 - Ensaio de citotoxicidade (CAL27). Gráfico Box-Plot apresentando o percentual de crescimento celular considerando o composto Navitoclax em diferentes concentrações para cada tempo experimental (relação concentração-dependente).



Legenda: n.s.: não significativo ($p > 0,05$); teste Kruskal-Wallis para amostras independentes (comparações *pairwise* pelo teste de Dunn-Bonferroni).

Similarmente ao composto Navitoclax, observou-se uma redução na CC50 considerando o efeito do composto Venetoclax nos diferentes tempos testados, conforme apresentado na **Figura 16** e **Tabela 10**.

Figura 16 - Ensaio de citotoxicidade (CAL27). Gráficos de regressão linear e curva concentração-resposta considerando o percentual de crescimento celular das células de CEB considerando o composto Venetoclax em diferentes tempos e concentrações.

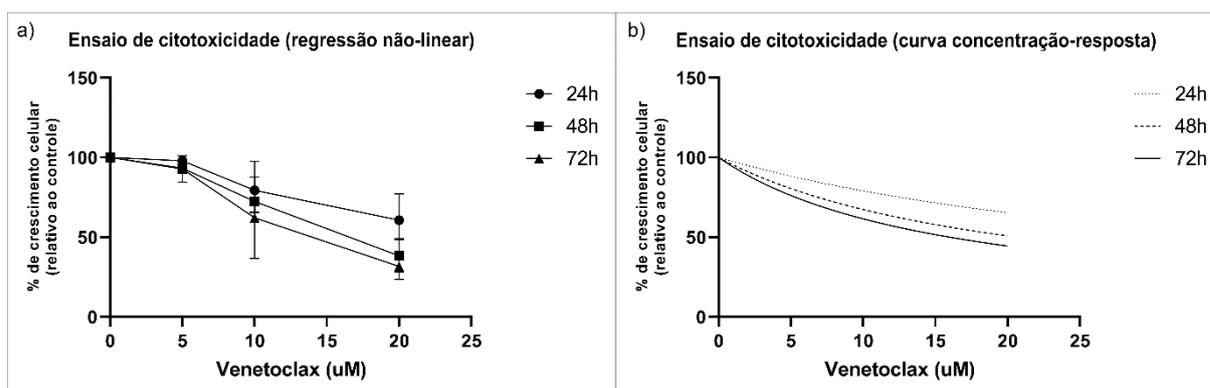


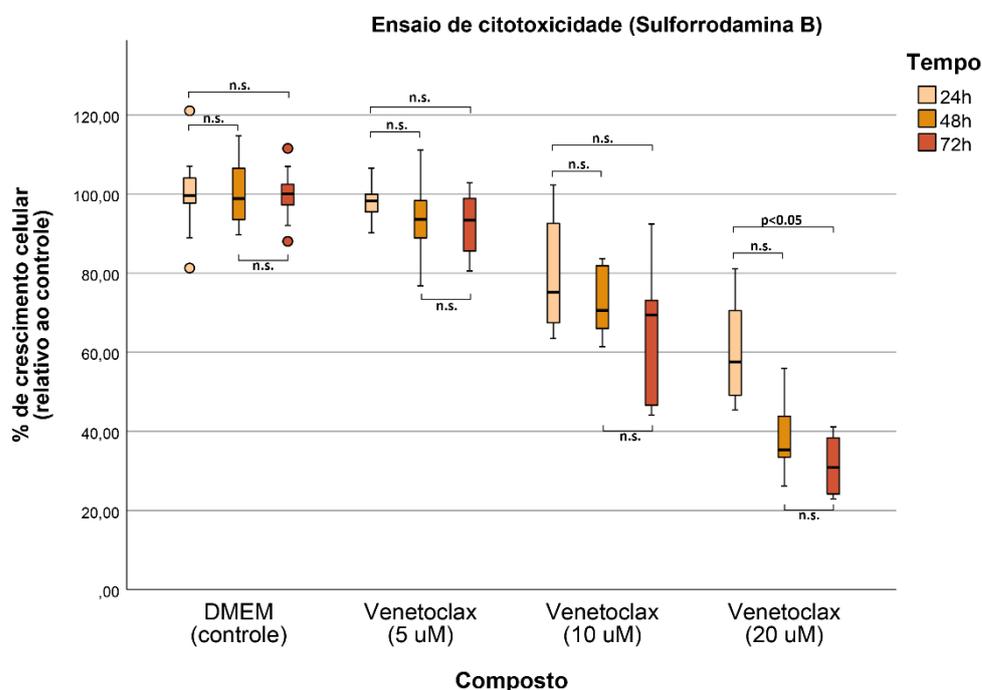
Tabela 10 - Ensaio de citotoxicidade (CAL27). Concentrações citotóxicas para 50% das células (CC50) e intervalo de confiança de 95% considerando o composto Venetoclax nos tempos de 24h, 48h e 72h.

	24h	48h	72h
CC50 (95%CI)	> 20 μ M	\cong 20 μ M	16,01 μ M (9,82-27,24 μ M)

Legenda: 95%CI: Intervalo de confiança de 95%.

Apesar da redução na CC50, somente foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os tempos experimentais de 24h e 72h na concentração de 20 μ M (**Figura 17**), indicando uma relação tempo-dependente menos proeminente.

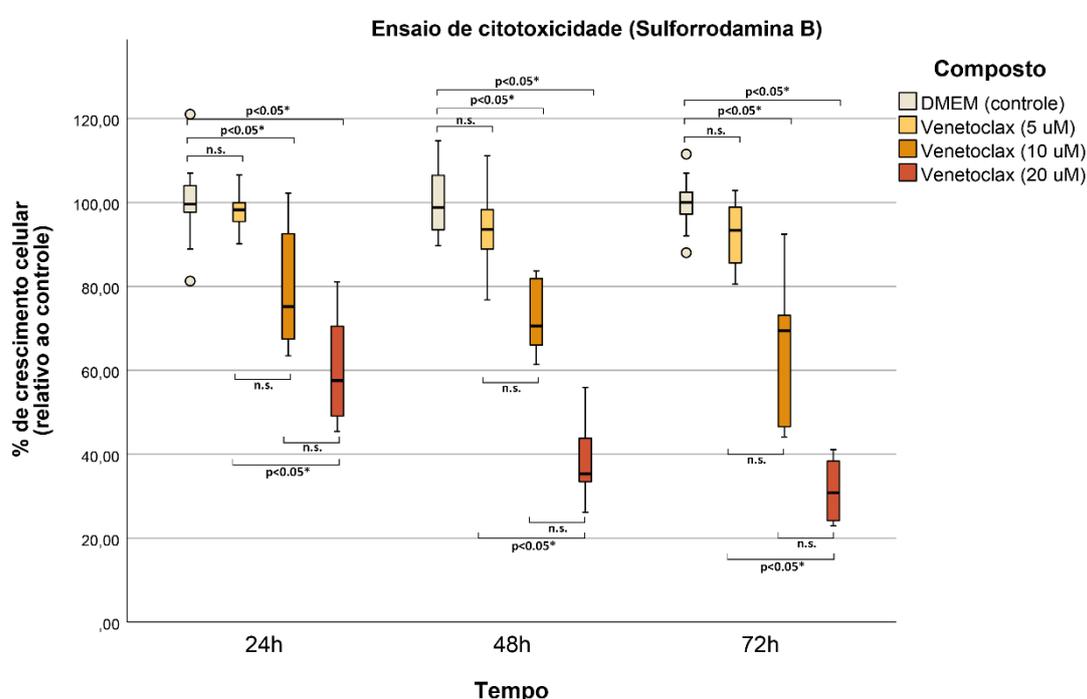
Figura 17 - Ensaio de citotoxicidade (CAL27). Gráfico Box-Plot apresentando o percentual de crescimento celular considerando o composto Venetoclax em diferentes tempos experimentais para cada concentração (relação tempo-dependente).



Legenda: n.s.: não significativo ($p > 0,05$); teste de Friedman para amostras dependentes (comparações *pairwise* pelo teste de Dunn-Bonferroni).

Em contrapartida, o composto Venetoclax exibiu uma relação concentração-dependente mais acentuada, conforme apresentado na **Figura 18**. Em comparação com o controle negativo (DMEM), somente as concentrações de 10 μM e 20 μM apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Ainda, diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes concentrações foram observadas considerando a concentração de 5 μM e 20 μM em todos os tempos experimentais.

Figura 18 - Ensaio de citotoxicidade (CAL27). Gráfico Box-Plot apresentando o percentual de crescimento celular considerando o composto Venetoclax em diferentes concentrações para cada tempo experimental (relação concentração-dependente).



Legenda: n.s.: não significativo ($p > 0,05$); teste Kruskal-Wallis para amostras independentes (comparações *pairwise* pelo teste de Dunn-Bonferroni).

No que tange a comparação entre Navitoclax e Venetoclax, diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram observadas somente entre as concentrações de 5 μM e 20 μM (**Tabela 11**). Esses resultados sugerem um efeito citotóxico potencialmente comparável entre os compostos em concentrações entre 10 μM e 20 μM considerando a linhagem de CEB investigada.

Tabela 11 - Ensaio de citotoxicidade (CAL27). Probabilidades de significância (valores de p) considerando os compostos Navitoclax e Venetoclax em diferentes concentrações (5 μ M, 10 μ M e 20 μ M) e tempos experimentais (24h, 48h e 72h).

	24h	48h	72h
Navitoclax (5 μ M) - Venetoclax (5 μ M)	n.s	n.s.	n.s.
Navitoclax (5 μ M) - Venetoclax (10 μ M)	n.s	n.s.	n.s.
Navitoclax (5 μ M) - Venetoclax (20 μ M)	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Navitoclax (10 μ M) - Venetoclax (5 μ M)	n.s	n.s.	n.s.
Navitoclax (10 μ M) - Venetoclax (10 μ M)	n.s	n.s.	n.s.
Navitoclax (10 μ M) - Venetoclax (20 μ M)	n.s	n.s.	n.s.
Navitoclax (20 μ M) - Venetoclax (5 μ M)	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Navitoclax (20 μ M) - Venetoclax (10 μ M)	n.s	n.s.	n.s.
Navitoclax (20 μ M) - Venetoclax (20 μ M)	n.s	n.s.	n.s.

Legenda: n.s.: não significativo ($p>0,05$); teste Kruskal-Wallis para amostras independentes (comparações *pairwise* pelo teste de Dunn-Bonferroni).

6.3.1.2 Linhagem de fibroblastos não-senescentes (HGF)

As estatísticas descritivas em relação ao percentual de crescimento celular para o controle negativo (DMEM) e os compostos experimentais (Navitoclax e Venetoclax) em diferentes concentrações estão descritas na **Tabela 12**.

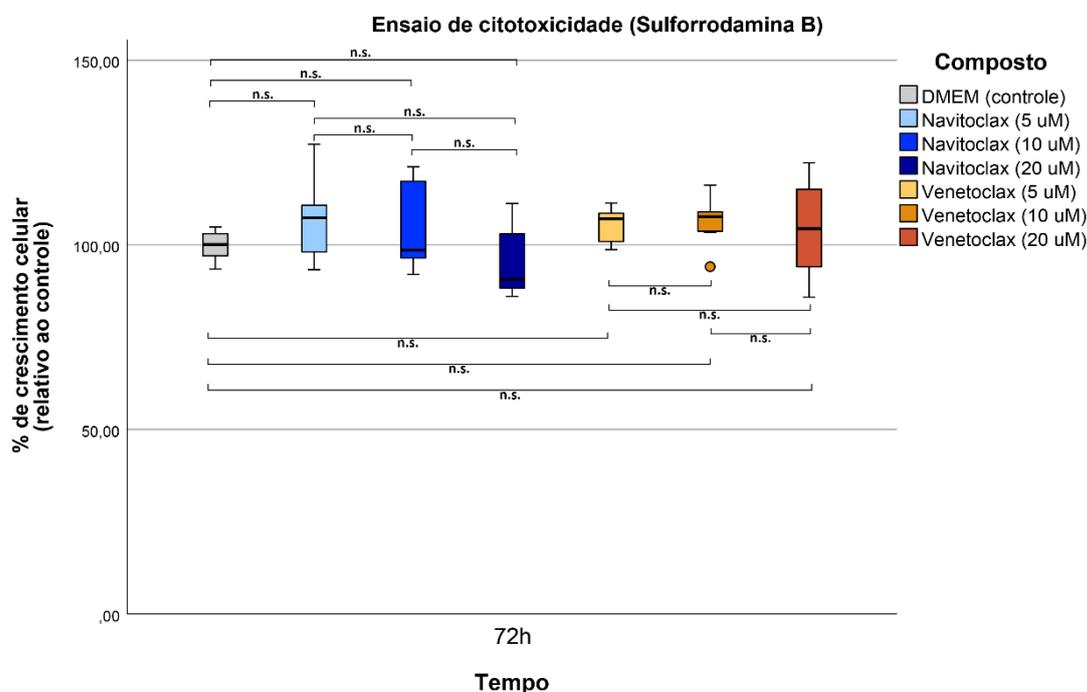
Tabela 12 - Ensaio de citotoxicidade (HGF). Medidas sumárias (média e mediana) e respectivas medidas de dispersão (desvio padrão e intervalo interquartil) relativas ao percentual de crescimento celular considerando diferentes compostos (DMEM, Navitoclax e Venetoclax) e concentrações (5 μ M, 10 μ M e 20 μ M) no tempo experimental de 72h.

	DMEM (controle)	Navitoclax (5 μ M)	Navitoclax (10 μ M)	Navitoclax (20 μ M)	Venetoclax (5 μ M)	Venetoclax (10 μ M)	Venetoclax (20 μ M)
72h							
Média (DP)	100,00 (4,05)	106,41 (10,16)	104,55 (11,37)	94,98 (9,2)	105,376 (4,5)	106,43 (6,23)	104,81 (12,38)
Mediana [IQR]	100,09 [6,05]	107,33 [12,61]	98,53 [20,75]	90,66 [14,68]	107,03 [7,65]	107,64 [5,24]	104,37 [20,98]

Legenda: DP: desvio padrão; IQR: intervalo interquartil.

No tempo de 72h, os compostos Navitoclax e Venetoclax não exibiram efeitos citotóxicos significativos ($p > 0,05$) sobre HGF não-senescentes (**Figura 19**), logo, os tempos de 24h e 48h não foram avaliados. Esses resultados sugerem que células de HGF em situação de normalidade não foram susceptíveis aos miméticos de BH3 nas concentrações citotóxicas para células de CEB.

Figura 19 - Ensaio de citotoxicidade (HGF não-senescentes). Gráfico Box-Plot apresentando o percentual de crescimento celular considerando diferentes compostos (DMEM, Navitoclax e Venetoclax) em diferentes concentrações (5 μ M, 10 μ M e 20 μ M) no tempo de 72h.



Legenda: n.s.: não significativo ($p > 0,05$); teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes.

Além disso, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre os compostos Navitoclax e Venetoclax considerando as concentrações de 5 μ M, 10 μ M ou 20 μ M.

6.3.1.3 Linhagem de fibroblastos senescentes (HGF senescentes)

A **Tabela 13** apresenta os dados descritivos em relação ao percentual de crescimento celular de HGF senescentes considerando o controle negativo (DMEM) e os compostos Navitoclax e Venetoclax, em diferentes concentrações.

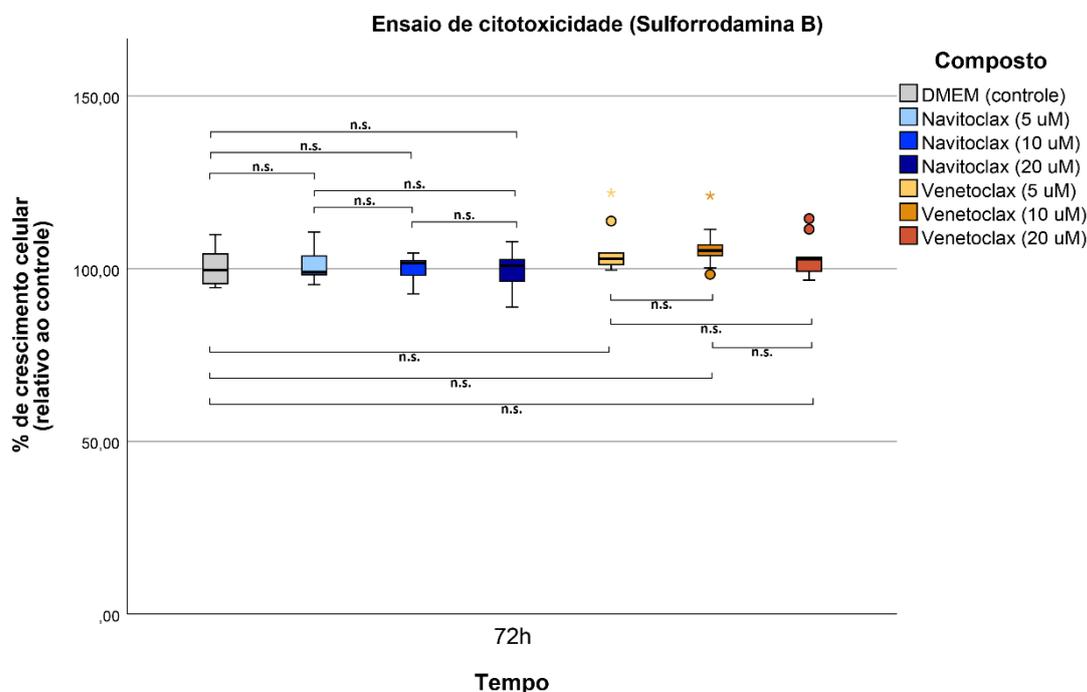
Tabela 13 - Ensaio de citotoxicidade (HGF senescentes). Medidas sumárias (média e mediana) e respectivas medidas de dispersão (desvio padrão e intervalo interquartil) relativas ao percentual de crescimento celular considerando diferentes compostos (DMEM, Navitoclax e Venetoclax) e concentrações (5 μ M, 10 μ M e 20 μ M) no tempo experimental de 72h.

	DMEM (controle)	Navitoclax (5 μ M)	Navitoclax (10 μ M)	Navitoclax (20 μ M)	Venetoclax (5 μ M)	Venetoclax (10 μ M)	Venetoclax (20 μ M)	
72h	Média (DP)	100 (5,31)	100,98 (5,36)	99,98 (3,65)	99,79 (5,46)	100 (5,31)	105,54 (7,46)	106,42 (6,71)
	Mediana [IQR]	99,57 [8,62]	98,95 [5,39]	101,63 [4,23]	100,86 [6,25]	99,57 [8,62]	102,81 [3,4]	105,23 [3,06]

Legenda: DP: desvio padrão; IQR: intervalo interquartil.

Similarmente aos HGF não-senescentes, não foram observados efeitos citotóxicos significativos ($p > 0,05$) após 72h de tratamento considerando ambos os compostos nas concentrações testadas (**Figura 20**). Desse modo, os tempos de 24h e 48h não foram investigados. Esses resultados sugerem que células de HGF com fenótipo senescente também não demonstraram susceptibilidade aos miméticos de BH3 nas concentrações citotóxicas para células de CEB.

Figura 20 - Ensaio de citotoxicidade (HGF senescentes). Gráfico Box-Plot apresentando o percentual de crescimento celular considerando diferentes compostos (DMEM, Navitoclax e Venetoclax) em diferentes concentrações (5 μ M, 10 μ M e 20 μ M) no tempo de 72h.



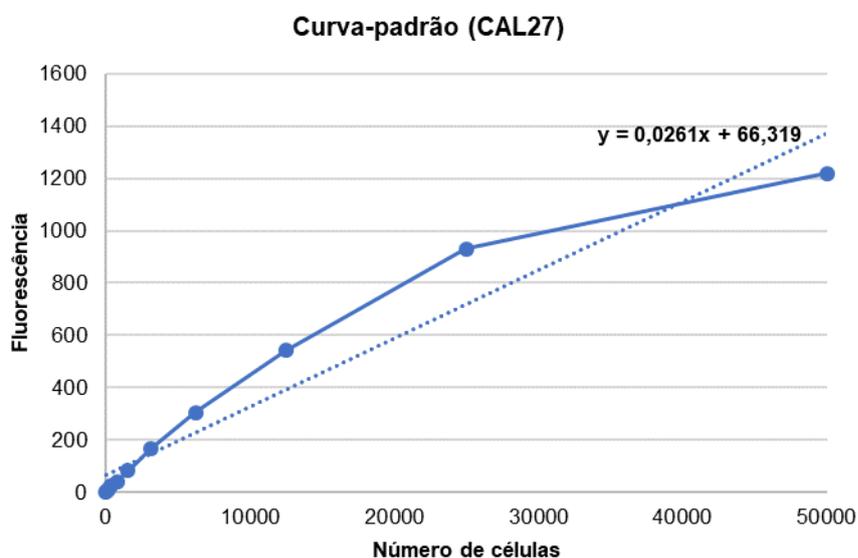
Legenda: n.s.: não significativo ($p > 0,05$); teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes.

6.3.2 Ensaio de proliferação (CyQuant)

6.3.2.1 Linhagem de CEB (CAL27)

Para o ensaio de proliferação, foram investigados as concentrações e tempos com efeitos biológicos mais relevantes, tendo como base os resultados do ensaio de citotoxicidade. Desse modo, foram avaliadas as concentrações de 10 μ M e 20 μ M no tempo de 72h. A curva-padrão considerando a intensidade de fluorescência e números de células de CEB está apresentada na **Figura 21**.

Figura 21 - Ensaio de proliferação (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. As estatísticas descritivas estão apresentadas na **Tabela 14**.

Tabela 14 - Ensaio de proliferação (CAL27). Medidas sumárias (média e mediana) e respectivas medidas de dispersão (desvio padrão e intervalo interquartil) em relação ao número de células para o controle (DMEM) nos tempos de 0h e 72h e para os compostos experimentais Navitoclax e Venetoclax (10 μM e 20 μM) no tempo de 72h.

	0h		72h			
	DMEM (controle)	DMEM (controle)	Navitoclax (10 μM)	Navitoclax (20 μM)	Venetoclax (10 μM)	Venetoclax (20 μM)
Média (DP)	14.257,14 (1082,69)	18.364,91 (3.245,32)	12.281,38 (2.399,81)	10.347,04 (769,6)	12.588,56 (2.311,53)	12.933,21 (1.678,22)
Mediana [IQR]	14.143,80 [1.750,72]	16.918,43 [4.868,98]	11.370,34 [1.111,49]	10.237,39 [458,83]	13.449,07 [3.747,19]	13.285,3 [1.272,81]

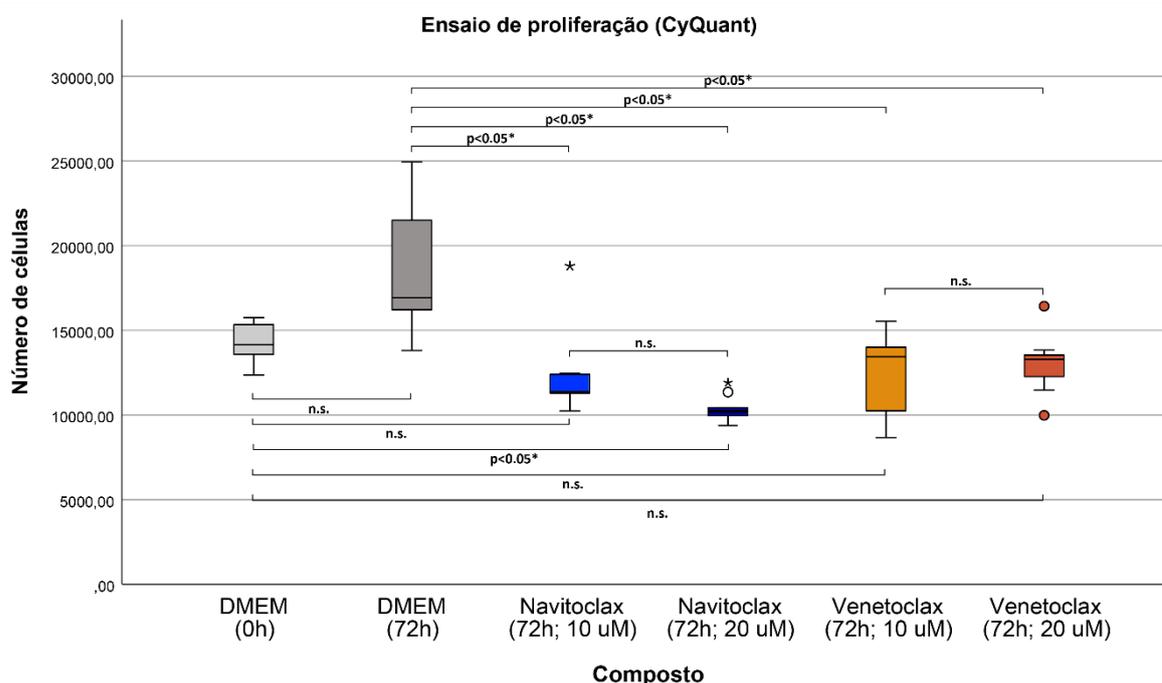
Legenda: DP: desvio padrão; IQR: intervalo interquartil.

Em comparação com o controle negativo (DMEM) no tempo 72h, uma inibição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na proliferação celular foi observada considerando ambos os compostos nas concentrações avaliadas (10 μM e 20 μM).

Além disso, em relação ao controle negativo (DMEM) no tempo de 0h, diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram observadas considerando Navitoclax na concentração de 20 μM (**Figura 22**).

Esse resultado sugere que, além de inibir a proliferação celular, o composto Navitoclax apresentou um efeito citotóxico relevante nessa concentração, uma vez que o número de células foi significativamente menor no tempo de 72h comparado ao tempo de 0h (densidade aproximada da semeadura celular).

Figura 22 - Ensaio de proliferação (CAL27). Gráfico Box-Plot apresentando o número de células para o controle (DMEM) nos tempos de 0h e 72h e para os compostos experimentais Navitoclax e Venetoclax (10 μM e 20 μM) no tempo de 72h.



Legenda: n.s.: não significativo ($p > 0,05$); teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes.

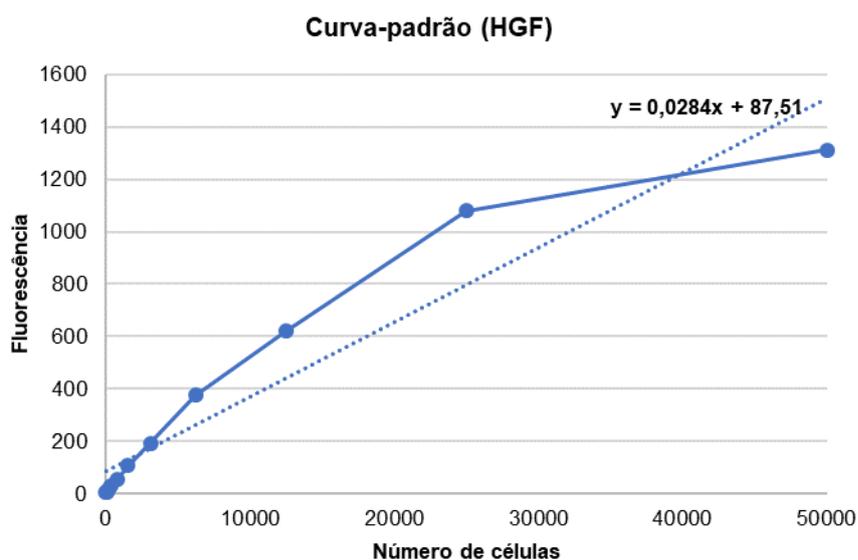
Ainda, considerando o efeito entre os diferentes compostos, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) considerando a proliferação celular nas concentrações investigadas. Esse resultado indica que ambos os miméticos de BH3 (nas concentrações de 10 μM e 20 μM) apresentaram efeito

inibitório comparável considerando a proliferação celular na linhagem de CEB investigada.

6.3.2.2 Linhagem de fibroblastos não-senescentes (HGF)

Para fins de comparação, o ensaio de proliferação foi realizado em HGF não-senescentes nas mesmas concentrações (10 μ M e 20 μ M) e tempos experimentais (0h, 72h). Do mesmo modo, uma curva-padrão foi elaborada considerando intensidade de fluorescência e números de células de HGF (**Figura 23**).

Figura 23 - Ensaio de proliferação (HGF não-senescentes). Gráfico de linhas apresentando a curva-padrão com base na intensidade de fluorescência e número correspondente de células.



Similarmente, as medidas de fluorescência foram convertidas para número de células de HGF não-senescentes nas diferentes concentrações e tempos avaliados. As estatísticas descritivas estão apresentadas na **Tabela 15**.

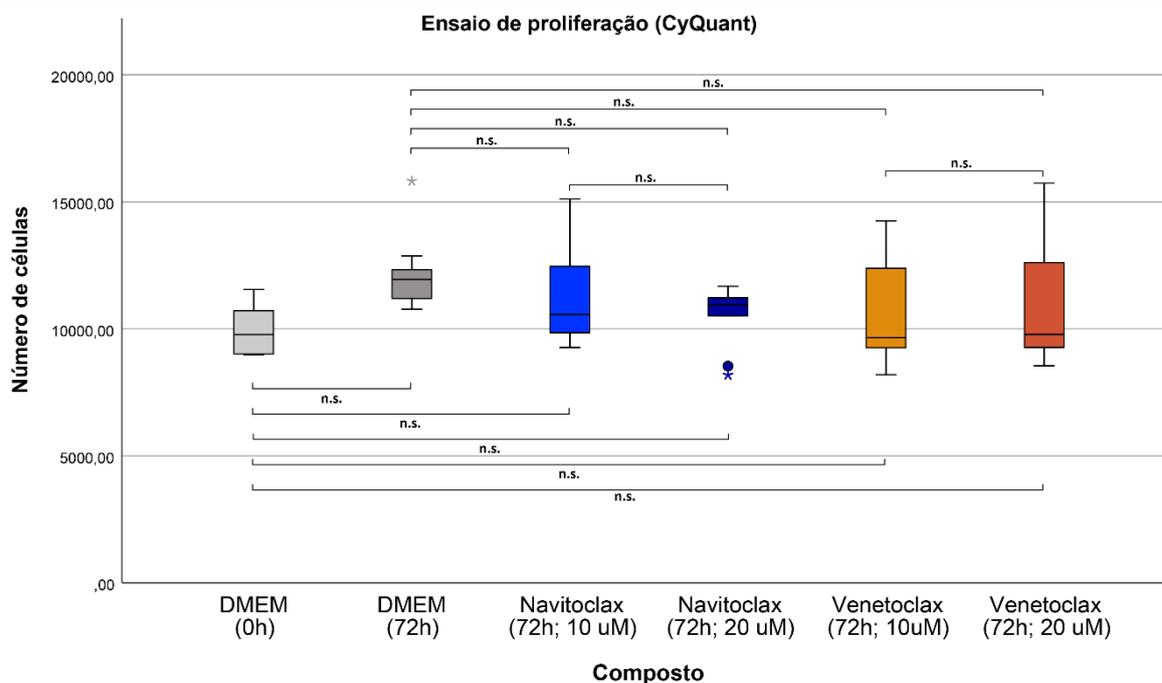
Tabela 15 - Ensaio de proliferação (HGF não-senescentes). Medidas sumárias (média e mediana) e respectivas medidas de dispersão (desvio padrão e intervalo interquartil) em relação ao número de células para o controle (DMEM) nos tempos de 0h e 72h e para os compostos experimentais Navitoclax e Venetoclax (10 μ M e 20 μ M) no tempo de 72h.

	0h		72h			
	DMEM (controle)	DMEM (controle)	Navitoclax (10 μ M)	Navitoclax (20 μ M)	Venetoclax (10 μ M)	Venetoclax (20 μ M)
Média (DP)	9.960,91 (941,38)	12.187,52 (1.433,14)	11.446,26 (1.983,64)	10.493,58 (1201,11)	10.478,44 (1.963,44)	11.014,28 (2.329,59)
Mediana [IQR]	9.768,16 [1.704,93]	11.949,05 [1.132,99]	10.564,66 [2.610,59]	10.947,57 [703,23]	9656,34 [3.127,59]	9779,84 [3.340,87]

Legenda: DP: desvio padrão; IQR: intervalo interquartil.

Nesse contexto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre os compostos Navitoclax e Venetoclax e os controles negativos (DMEM em 0h e 72h). Esse resultado sugere que os compostos não apresentaram capacidade inibitória considerando a proliferação de HGF não-senescentes (**Figura 24**).

Figura 24 - Ensaio de proliferação (HGF não-senescentes). Gráfico Box-Plot apresentando o número de células para o controle (DMEM) nos tempos de 0h e 72h e para os compostos experimentais Navitoclax e Venetoclax (10 μ M e 20 μ M) no tempo de 72h.



Legenda: n.s.: não significativo ($p > 0,05$); teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes.

Ainda, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) considerando a proliferação celular entre os diferentes compostos nas concentrações testadas.

6.3.3 Ensaio de migração ("Scratch")

6.3.3.1 Linhagem de CEB (CAL27)

Para a linhagem CAL27, ambos os compostos miméticos de BH3 foram testados nas concentrações de 10 μ M e 20 μ M. As feridas foram acompanhadas por até 48h (tempo necessário para o completo fechamento da ferida no grupo controle). As estatísticas descritivas e suas respectivas medidas de dispersão em relação ao percentual de fechamento da área da ferida, nas diferentes concentrações e tempos experimentais, estão apresentadas na **Tabela 16**.

Tabela 16 - Ensaio de migração (CAL27). Medidas sumárias (média e mediana) e respectivas medidas de dispersão (desvio padrão e intervalo interquartil) relativas ao percentual de fechamento da área da ferida considerando diferentes compostos (DMEM, Navitoclax e Venetoclax), concentrações (10 μM e 20 μM) e tempos experimentais (24h e 48h).

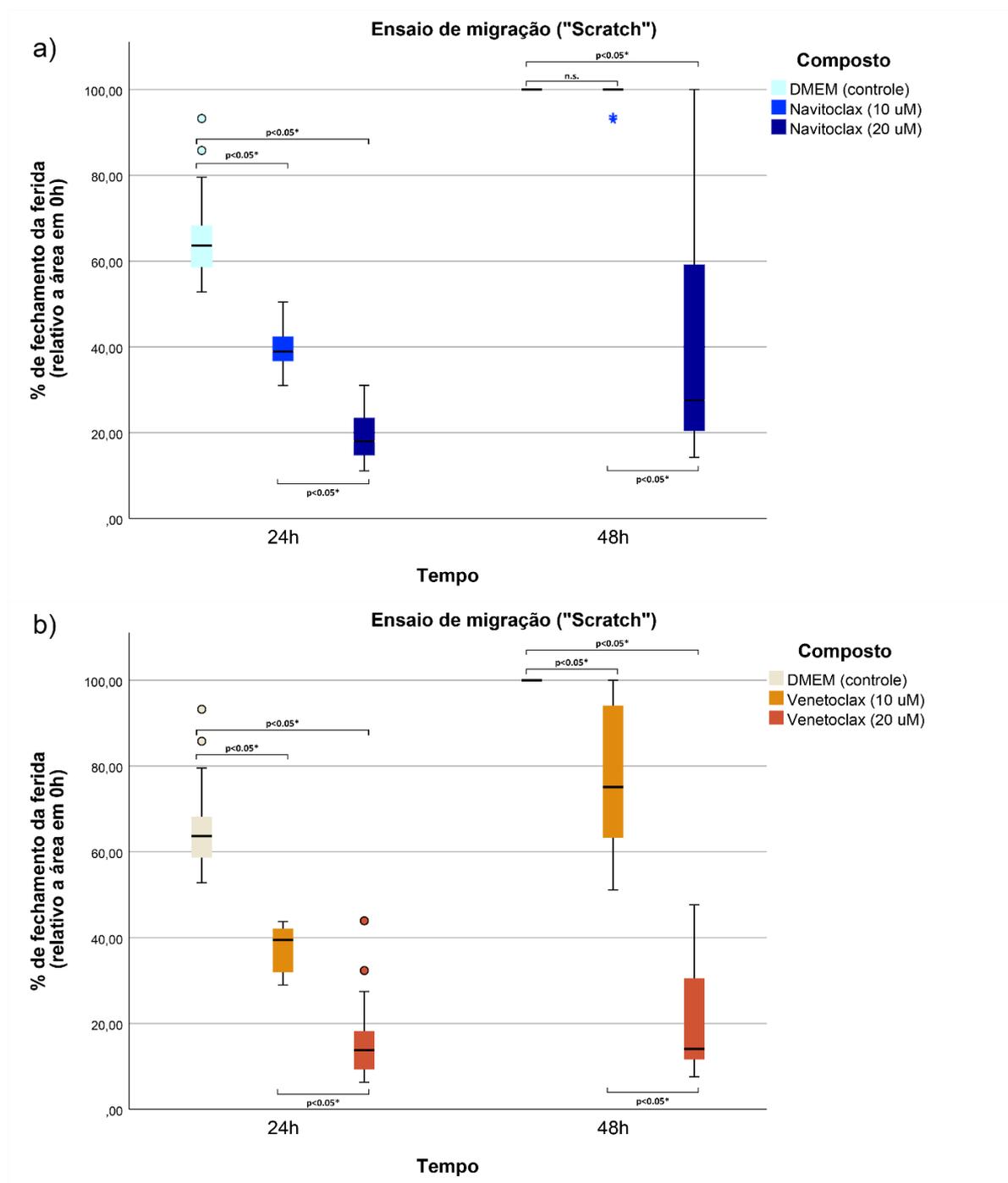
		DMEM (controle)	Navitoclax (10 μM)	Navitoclax (20 μM)	Venetoclax (10 μM)	Venetoclax (20 μM)
24h	Média (DP)	65,94 (11,16)	39,77 (5,08)	19,38 (5,82)	37,49 (5,24)	16,14 (10,09)
	Mediana [IQR]	63,67 [8,88]	38,94 [5,15]	18 [8,5]	39,46 [9,94]	13,77 [8,2]
48h	Média (DP)	100 (0)	99,25 (2,18)	37,21 (23,03)	77,21 (16,15)	20,64 (12,25)
	Mediana [IQR]	100 [0]	100 [0]	27,58 [33,98]	75,12 [26,73]	14,06 [18,21]

Legenda: DP: desvio padrão; IQR: intervalo interquartil.

Em comparação com o controle negativo (DMEM), ambas as concentrações do composto Navitoclax inibiram significativamente ($p < 0,05$) a migração das células de CEB. Em 48h, entretanto, somente a concentração de 20 μM inibiu de modo significativo ($p < 0,05$) a migração dessas células, enquanto a concentração de 10 μM apresentou percentual de fechamento equivalente ao controle negativo (DMEM) (**Figura 25a** e **Figura 26**).

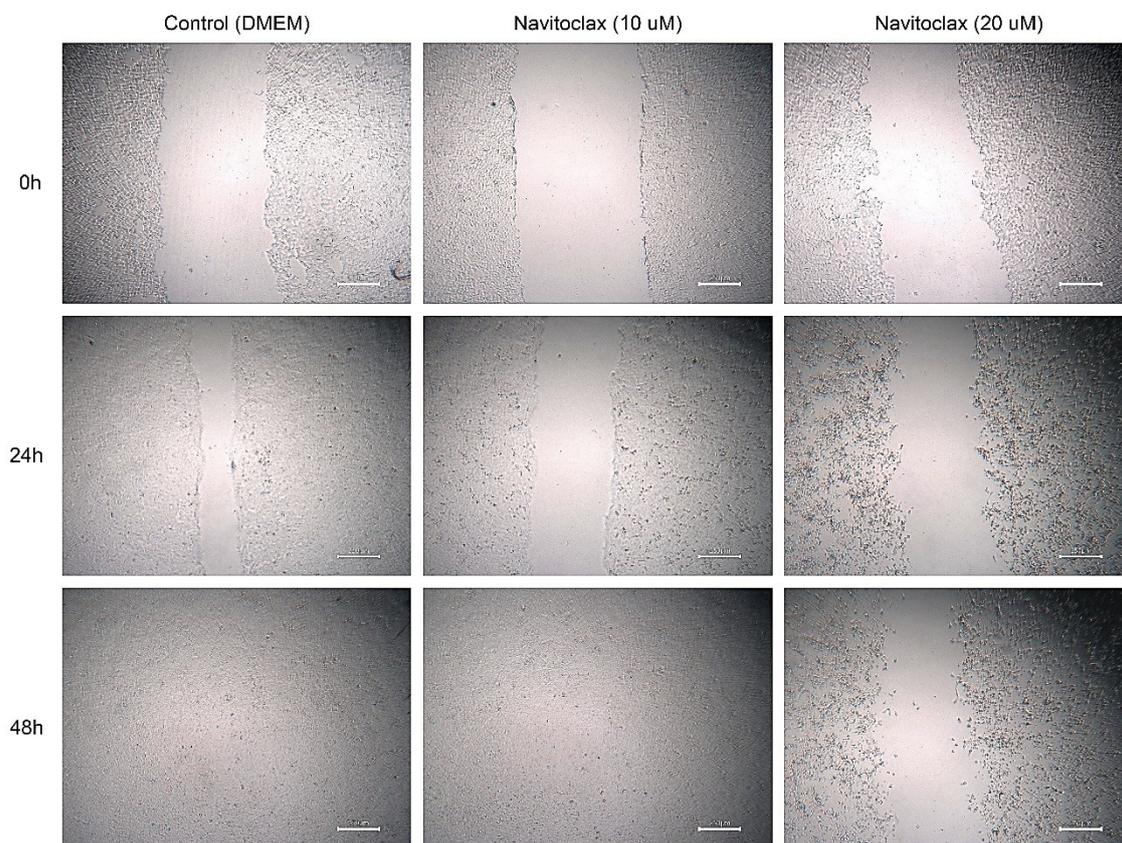
De modo similar ao Navitoclax, ambas as concentrações do composto Venetoclax inibiram significativamente ($p < 0,05$) a migração das células de CEB em relação ao controle negativo (DMEM) no tempo de 24h (**Figura 25b** e **Figura 27**). Entretanto, diferentemente do composto Navitoclax, uma inibição significativa ($p < 0,05$) da migração celular se mostrou presente em 48h para ambas as concentrações de Venetoclax em comparação com o controle (DMEM).

Figura 25 - Ensaio de migração (CAL27). Gráfico Box-Plot apresentando o percentual de fechamento da área da ferida para o controle negativo (DMEM) e os compostos a) Navitoclax (10 μ M e 20 μ M) e b) Venetoclax (10 μ M e 20 μ M) nos tempos de 24h e 48h.



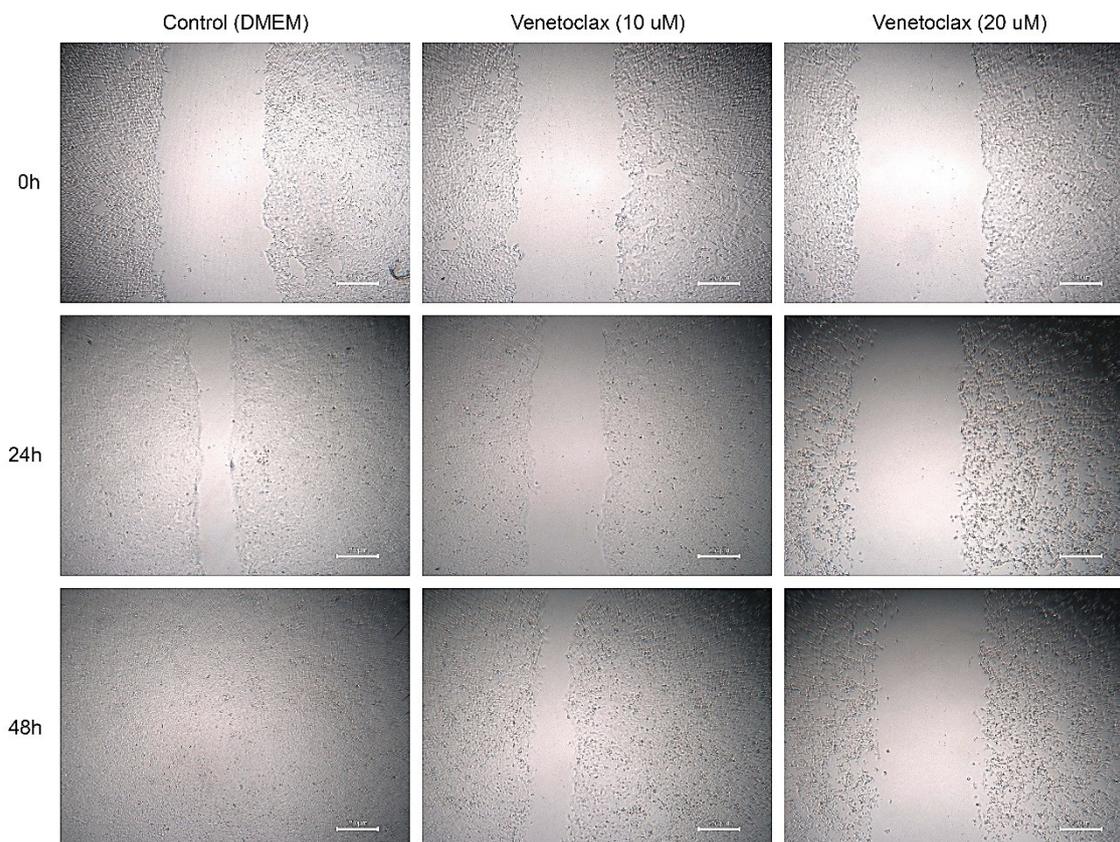
Legenda: n.s.: não significativo ($p > 0,05$); teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes (comparações *pairwise* pelo teste de Dunn-Bonferroni).

Figura 26 - Painel de fotomicrografias (Zeiss AxioVert 40C, 4x, adaptador 0,5x) do ensaio de migração ("Scratch") representativo em relação à linhagem de CEB (CAL27). As imagens representam o fechamento da área da ferida para o controle (DMEM) e o composto Navitoclax (10 μ M e 20 μ M) nos tempos de 24h e 48h.



Fonte: Fotomicrografias obtidas pelo autor.

Figura 27 - Painele de fotomicrografias (Zeiss AxioVert 40C, 4x, adaptador 0,5x) representativo do ensaio de migração ("Scratch") em relação à linhagem de CEB (CAL27). As imagens representam o fechamento da área da ferida para o controle (DMEM) e o composto Venetoclax (10 μ M e 20 μ M) nos tempos de 24h e 48h.



Fonte: Fotomicrografias obtidas pelo autor.

Apesar do composto Venetoclax ter inibido de modo significativo a migração de células de CEB, comparado ao controle (DMEM), na concentração de 10 μ M e em 48h, não houve diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) considerando os mesmos tempos e concentrações comparado ao composto Navitoclax, indicando um efeito inibitório comparável. Diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os compostos foram observadas somente considerando diferentes concentrações, conforme apresentado na **Tabela 17**.

Tabela 17 - Ensaio de migração (CAL27). Probabilidades de significância (valores de p) considerando os compostos Navitoclax e Venetoclax em diferentes concentrações (10 μ M e 20 μ M) e tempos experimentais (24h, 48h).

	24h	48h
Navitoclax (10 μ M) - Venetoclax (10 μ M)	n.s.	n.s.
Navitoclax (10 μ M) - Venetoclax (20 μ M)	p<0,05	p<0,05
Navitoclax (20 μ M) - Venetoclax (10 μ M)	p<0,05	n.s.
Navitoclax (20 μ M) - Venetoclax (20 μ M)	n.s.	n.s.

Legenda: n.s.: não significativo ($p>0,05$); teste Kruskal-Wallis para amostras independentes (comparações *pairwise* pelo teste de Dunn-Bonferroni).

6.3.3.2 Linhagem de fibroblastos não-senescentes (HGF)

Para fins de comparação, o ensaio de migração foi realizado em HGF não-senescentes nas mesmas concentrações (10 μ M e 20 μ M) que as utilizadas nas células de CEB. Entretanto, o período de acompanhamento para o total fechamento da ferida foi de 72h. As estatísticas descritivas e suas respectivas medidas de dispersão em relação ao percentual de fechamento da área da ferida, nas diferentes concentrações e tempos experimentais, estão apresentadas na **Tabela 18**.

Tabela 18 - Ensaio de migração (HGF não-senescentes). Medidas sumárias (média e mediana) e respectivas medidas de dispersão (desvio padrão e intervalo interquartil) relativas ao percentual de fechamento da área da ferida considerando diferentes compostos (DMEM, Navitoclax e Venetoclax), concentrações (10 μM e 20 μM) e tempos experimentais (24h, 48h e 72h).

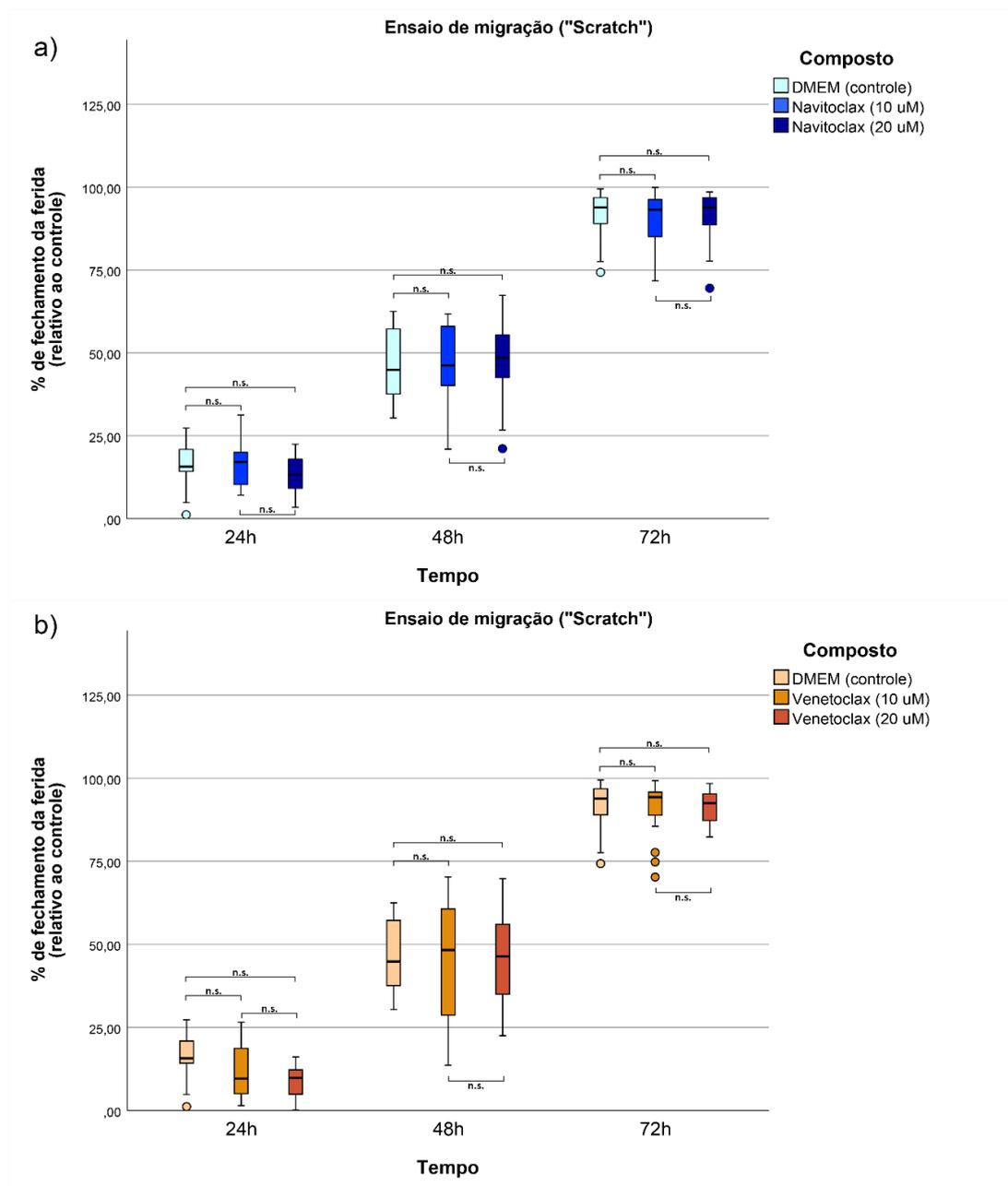
		DMEM (controle)	Navitoclax (10 μM)	Navitoclax (20 μM)	Venetoclax (10 μM)	Venetoclax (20 μM)
24h	Média (DP)	15,87 (6,95)	16,27 (6,33)	11,93 (8,29)	11,97 (8,1)	8,72 (4,49)
	Mediana [IQR]	15,69 [6,02]	17,08 [8,99]	13,25 [7,98]	9,54 [12,68]	9,8 [6,78]
48h	Média (DP)	45,72 (10,52)	47,01 (10,65)	47,14 (11,68)	45,79 (16,9)	45,54 (13,34)
	Mediana [IQR]	44,84 [18,36]	46,18 [17,39]	48,47 [11,65]	48,29 [29,38]	46,34 [20,18]
72h	Média (DP)	91,49 (7,4)	90,85 (7,25)	91,12 (7,75)	90,65 (8,35)	91,61 (4,85)
	Mediana [IQR]	93,88 [7,21]	93,16 [10,34]	93,88 [7]	94,26 [6,21]	92,56 [7,95]

Legenda: DP: desvio padrão; IQR: intervalo interquartil.

Os compostos Navitoclax e Venetoclax não exibiram efeitos inibitórios significativos ($p > 0,05$) sobre HGF não-senescentes em nenhuma das concentrações ou tempos avaliados (**Figura 28**, **Figura 29** e **Figura 30**). Esses resultados sugerem que a capacidade de migração dos HGF em situação de normalidade não é afetada pelos compostos miméticos de BH3 nas concentrações inibitórias para as células de CEB.

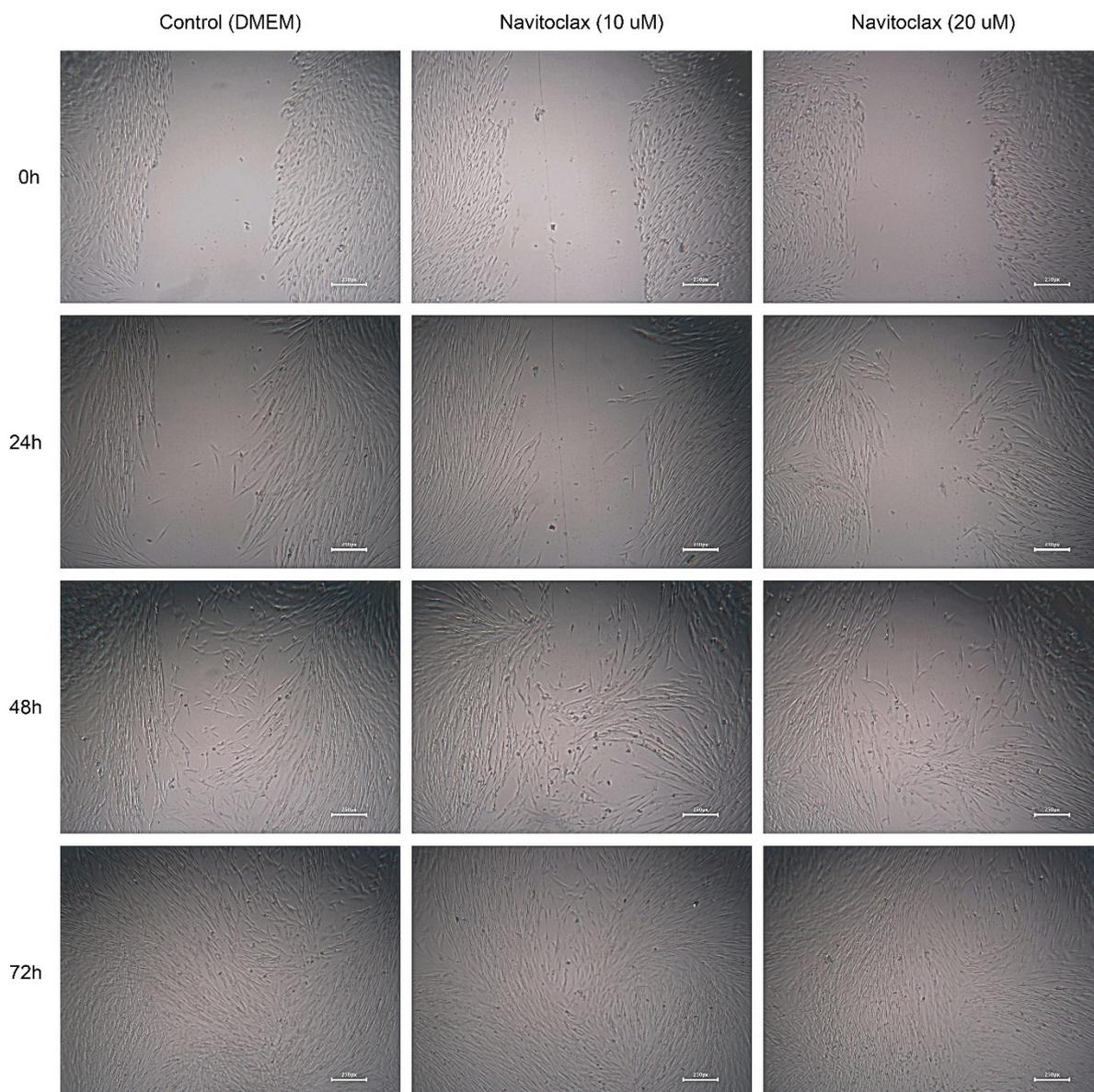
Ainda, vale ressaltar que não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os compostos Navitoclax e Venetoclax em nenhuma concentração ou tempo avaliado.

Figura 28 - Ensaio de migração (HGF não-senescentes). Gráfico Box-Plot apresentando o percentual de fechamento da área da ferida para o controle negativo (DMEM) e os compostos a) Navitoclax (10 μ M e 20 μ M) e b) Venetoclax (10 μ M e 20 μ M) nos tempos de 24h, 48h e 72h.



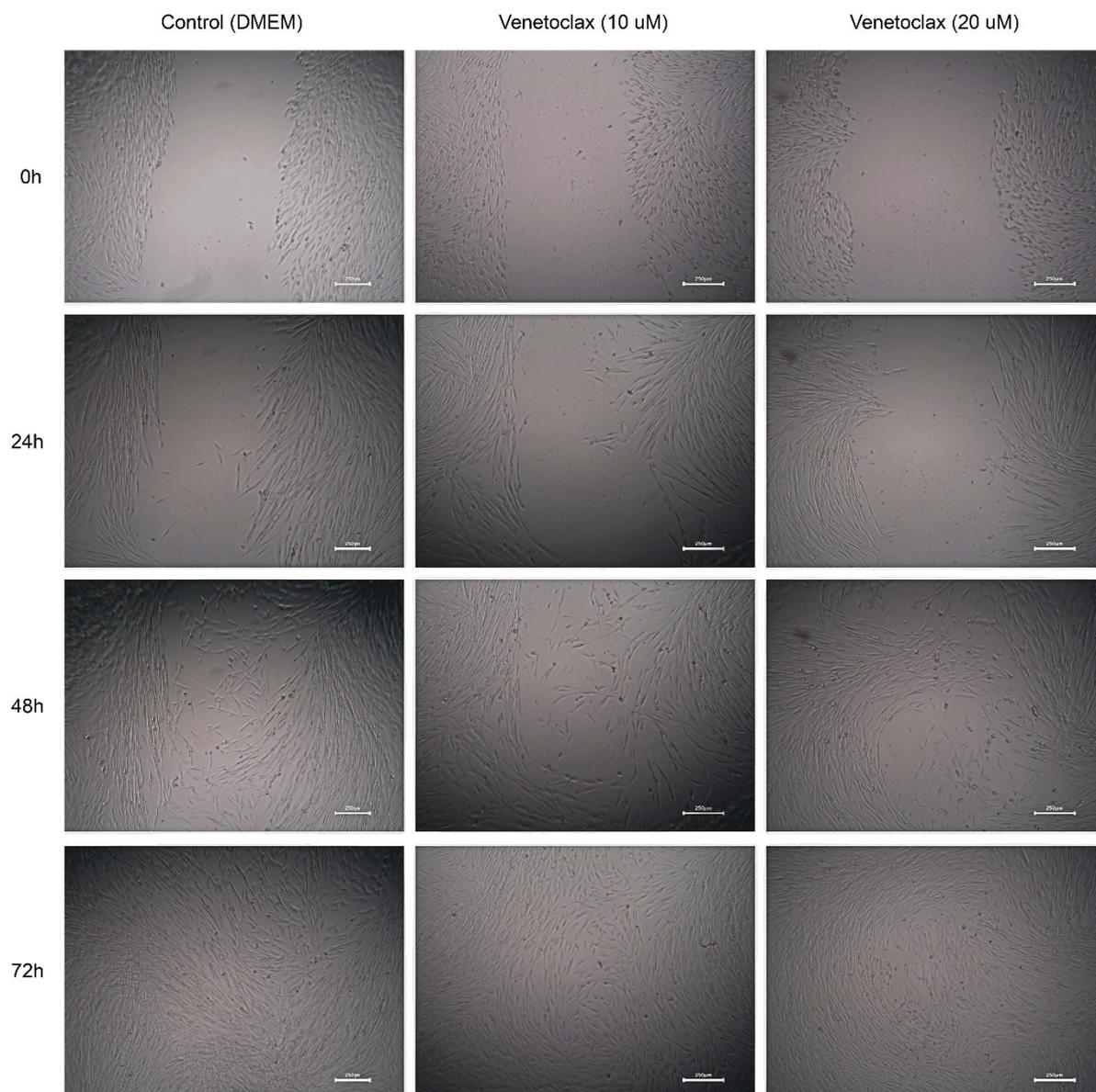
Legenda: n.s.: não significativo ($p > 0,05$); teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes.

Figura 29 - Painele de fotomicrografias (Zeiss AxioVert 40C, 4x, adaptador 0,5x) representativo do ensaio de migração (HGF não-senescentes). As imagens representam o fechamento da área da ferida para o controle (DMEM) e o composto Navitoclax (10 μ M e 20 μ M) nos tempos de 24h, 48h e 72h.



Fonte: Fotomicrografias obtidas pelo autor.

Figura 30 - Paineis representativos de fotomicrografias (Zeiss AxioVert 40C, 4x, adaptador 0,5x) do ensaio de migração (HGF não-senescentes). As imagens representam o fechamento da área da ferida para o controle (DMEM) e o composto Venetoclax (10 μ M e 20 μ M) nos tempos de 24h, 48h e 72h.



Fonte: Fotomicrografias obtidas pelo autor.

6.3.4 Ensaio de apoptose (Anexina V e Iodeto de propídio)

6.3.4.1 Linhagem de CEB (CAL27)

Para a linhagem CAL27, ambos os compostos, Navitoclax e Venetoclax, foram testados na concentração de 20 μM e no tempo experimental de 48h. As estatísticas descritivas e suas respectivas medidas de dispersão em relação a intensidade de fluorescência dos marcadores estão apresentadas na **Tabela 19**.

Tabela 19 - Ensaio de apoptose (CAL27). Medidas sumárias (média geométrica) e respectivas medidas de dispersão (desvio padrão) relativas à intensidade de fluorescência de anexina V e iodeto de propídio para os compostos DMEM, Navitoclax (20 μM) e Venetoclax (20 μM) no tempo experimental de 48h.

Média geométrica (DP)	DMEM (controle)	Navitoclax (20 μM)	Venetoclax (20 μM)	Significância*
Anexina V	6,10 (1,26) ^A	64,26 (26,00) ^B	47,04 (21,07) ^{AB}	P<0.05
Iodeto de propídio	2,77 (0,34) ^A	18,33 (5,01) ^B	11,16 (4,02) ^{AB}	P<0.05

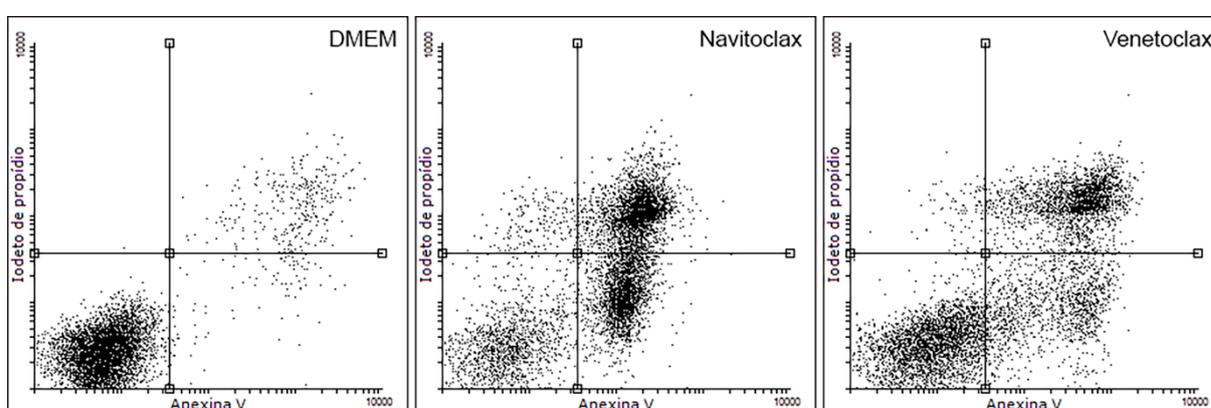
Legenda: DP: desvio padrão; *teste ANOVA (one-way) para amostras independentes; Letras superscritas diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) através do teste post-hoc de Bonferroni.

Apesar do aumento da intensidade de fluorescência considerando ambos os compostos miméticos de BH3 (**Figura 31**), diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$) foram observadas somente para o composto Navitoclax (20 μM) comparado ao controle (DMEM).

No que tange o composto Navitoclax, o aumento da intensidade de fluorescência da anexina V foi na ordem de 10,5 vezes, enquanto o aumento da intensidade de iodeto de propídio foi na ordem de 6,6 vezes. Esses resultados sugerem um aumento substancial na expressão isolada de anexina V, indicando apoptose precoce. Além disso, vale ressaltar que uma fração reduzida das células tiveram expressão isolada de iodeto de propídio (necrose). Em sua maioria, a expressão de iodeto de propídio ocorreu de modo combinado com a anexina V (dupla marcação), podendo indicar apoptose tardia ou necrose.

Ainda, apesar dos testes não indicarem diferenças significativas ($p > 0.05$) entre Venetoclax e o controle (DMEM), não é possível descartar um potencial efeito indutor de apoptose, uma vez que diferenças significativas na comparação entre Venetoclax e Navitoclax também não foram observadas para ambos os marcadores (anexina V e iodeto de propídio), o que indica potencial comparabilidade.

Figura 31 - 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), Navitoclax e Venetoclax no tempo de 48h.



6.3.4.2 Linhagem de fibroblastos senescentes (HGF senescentes)

Para a linhagem de HGF senescentes, também foi utilizada a concentrações de 20 μM para ambos os compostos (Navitoclax e Venetoclax) no tempo experimental de 48h. As estatísticas descritivas e suas respectivas medidas de dispersão em relação a intensidade de fluorescência estão apresentadas na **Tabela 20**.

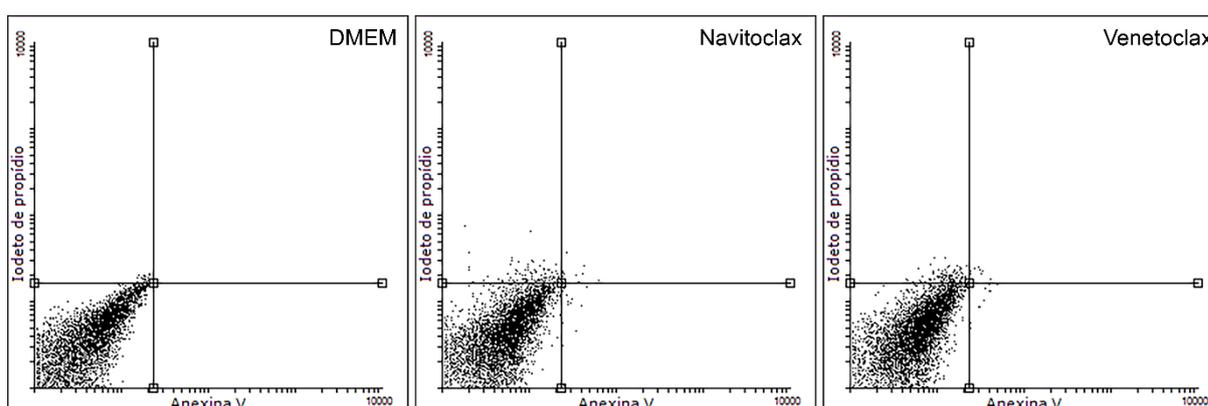
Tabela 20 - Ensaio de apoptose (HGF senescentes). Medidas sumárias (média geométrica) e respectivas medidas de dispersão (desvio padrão) relativas ao a intensidade de fluorescência para os compostos DMEM, Navitoclax (20 μ M) e Venetoclax (20 μ M) no tempo experimental de 48h.

Média geométrica (DP)	DMEM (controle)	Navitoclax (20 μ M)	Venetoclax (20 μ M)	Significância*
Anexina V	4,05 (0,77)	4,94 (0,94)	5,35 (0,68)	n.s.
Iodeto de propídio	3,55 (0,67)	3,83 (0,75)	4,13 (0,58)	n.s.

Legenda: DP: desvio padrão; n.s.: não significativo ($p > 0.05$); *teste ANOVA (one-way) para amostras independentes.

Corroborando os resultados do ensaio de citotoxicidade, não foi observado um aumento significativo ($p > 0,05$) da intensidade de fluorescência dos marcadores anexina V e iodeto de propídio (**Figura 32**), indicando que os miméticos de BH3 investigados não exibiram capacidade de induzir apoptose e/ou necrose nessas células.

Figura 32 - Ensaio de apoptose (HGF senescentes). Gráficos Dot-Plot para intensidade de fluorescência considerando os marcadores anexina V e iodeto de propídio para o controle negativo (DMEM), Navitoclax e Venetoclax no tempo de 48h.



6.4 Considerações finais (Capítulo II)

A partir dos resultados observados no estudo *in-vitro*, é possível sugerir um efeito citotóxico relevante dos compostos Navitoclax e Venetoclax sobre células de CEB, especialmente em concentrações entre 10 μ M e 20 μ M, nas quais os efeitos foram, em geral, estatisticamente comparáveis entre os miméticos de BH3 investigados. Ainda, houve uma inibição significativa da proliferação e migração celular das células de CEB nessas concentrações. Esses efeitos não foram observados em HGF não-senescentes, sugerindo um efeito seletivo dos compostos sobre as células tumorais em estudo. No que tange a capacidade de induzir morte celular por apoptose, o composto Navitoclax demonstrou um aumento expressivo do marcador anexina V em células de CEB. Considerando o composto Venetoclax, apesar do aumento de expressão dos marcadores de morte celular não ter atingido significância estatística em relação ao controle, não é possível descartar seu potencial efeito anticâncer para células de CEB considerando os resultados observados nos ensaios de citotoxicidade, proliferação e migração. Em relação aos HGF com fenótipo senescente, não foi observado um efeito citotóxico relevante e nem um aumento expressivo dos marcadores de morte celular, indicando que essas células não foram susceptíveis aos efeitos dos miméticos de BH3 investigados em concentrações citotóxicas para células de CEB. Desse modo, recomendam-se futuras pesquisas envolvendo uma possível associação com compostos miméticos de BH3 com alvos moleculares complementares (tais como MCL-1), tanto para células tumorais quanto senescentes. Estudos envolvendo possíveis combinações com tratamentos convencionais, como quimioterapia e radioterapia, também são encorajados para células de CEB em particular.

6.5 Metodologia expandida (Capítulo II)

Nesta seção, estão presentes informações adicionais sobre os procedimentos de rotina realizados durante o período dos experimentos.

6.5.1 Subcultivo celular

Não foram utilizados antibióticos e antifúngicos para o subcultivo da linhagem de CEB (CAL27) e para os HGF (exceto durante o processo de estabelecimento da cultura primária). Se uma eventual contaminação bacteriana ou fúngica fosse detectada, as células em cultivo devem ser descartadas, os experimentos interrompidos e/ou refeitos e protocolos apropriados de desinfecção/esterilização de cabines, estufas e pipetadores devem ser seguidos.

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 subconfluência, as células em cultivo foram enzimaticamente removidas dos frascos com volume apropriado de tripsina e contadas em um hemocítmetro. Subsequentemente, as células foram subcultivadas em garrafas adicionais seguindo uma proporção de 1:2 ou 1:3. Em caso de excedente de células, as mesmas foram descartadas ou congeladas.

6.5.2 Contagem celular

Para contagem de células, foi utilizado o 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 de 4 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi aspirado e o precipitado de células resultante da centrifugação foi ressuscitado em 1 mL de meio de cultivo. Subsequentemente, 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 2). As células da suspensão celular corada foram brevemente ressuscitadas e um total de 10 µL desta solução foi inserido em um hemocítmetro (câmara de Neubauer, Fisher Scientific, Hampton, Nova Hampshire, EUA) e levado 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:

$$\text{N}^\circ \text{ total de células/mL} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células contadas} \times \text{fator de diluição} \times 10^4}{\text{N}^\circ \text{ de quadrados usados para contagem}}$$

6.5.3 Avaliação de infecção por micoplasma

Para todos os tipos celulares utilizados na pesquisa, foram realizadas avaliações semestrais (ou quando houvesse suspeita de contaminação) de infecção por micoplasma através do método de coloração de DNA com bisbenzimidazol (Hoeschst 33258) (Sigma-Aldrich). Para isso, foi preparada uma suspensão celular com quantidade ideal para que se obtivesse 50-60% de confluência em 24h. Em seguida, as células foram tripsinizadas, contadas e semeadas em placas de 24 cavidades em uma densidade de 5×10^5 células/cavidade. As placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ durante 24h.

Após incubação, as cavidades foram lavados 2 vezes com PBS e em seguida foi adicionada uma solução fixadora (3 partes de metanol para 1 de ácido acético glacial) diluída em PBS gelado (entre 4 °C e 8 °C) na proporção de 1:1. A solução fixadora foi mantida em contato durante 10 min, em geladeira. Após o tempo previsto, as cavidades foram lavados 2 vezes com PBS e foram acrescentados 300 µL de solução de uso de Hoeschst, a qual foi mantida em contato por mais 10 min, protegido da luz e à TA.

Posteriormente, o corante foi aspirado e a placa foi observada em microscópio invertido de fluorescência (Olympus IX71, filtros de 330-380 nm excitação e 440 nm emissão). Foi realizada inspeção visual das culturas para identificação de estruturas filamentosas e/ou em forma de cocos, as quais apresentam coloração azul fluorescente em caso de contaminação positiva com micoplasma. Em caso de infecção positiva por micoplasma, as células em cultivo devem ser descartadas, os experimentos interrompidos e/ou refeitos e a desinfecção/esterilização de cabines, estufas e pipetadores deve ser realizado.

6.5.4 Congelamento celular

Para o congelamento celular, foi preparado 1,8 mL de meio de congelamento para cada criotubo, sendo o mesmo mantido em um recipiente com gelo. O meio de congelamento é composto por 50% de DMEM, 40% de SFB e 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich). Para o congelamento, o tapete celular foi lavado 3 vezes com PBS 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 estéril de 15mL, o qual foi centrifugado a 1000 rpm durante 4 min. Em seguida, o sobrenatante foi aspirado e as células ressuspendidas em 1,8 mL de meio de congelamento (mantido em recipiente com gelo). Se 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), permanendo 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.

6.5.5 Descongelamento e cultivo celular

Para o descongelamento celular, os criotubos foram removidos do botijão criogênico, acondicionados em um recipiente com gelo e rapidamente levados ao banho-maria a 37°C. Após o descongelamento rápido, foram retirados 20 µL para avaliação de viabilidade celular. O restante do conteúdo foi transferido para um tubo tipo Falcon estéril de 15 mL, ao qual foi adicionado meio DMEM suplementado com 10% de SFB, o qual foi centrifugado a 1000 rpm durante de 4 min. O sobrenatante foi aspirado, as células novamente ressuspendidas meio DMEM suplementado com 10% de SFB, e transferida para frascos de cultura, sendo mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

6.6 Resultados complementares (Capítulo II)

Nesta seção, são apresentadas informações complementares sobre o efeito do solvente (DMSO) em diferentes concentrações sobre as linhagens celulares em estudo.

6.6.1 Ensaio de citotoxicidade

6.6.1.1 Linhagem de CEB (CAL27)

Para a linhagem CAL27, o solvente (DMSO) foi testado em diferentes concentrações (0,125%, 0,25%, 0,5% e 1,0%) nos tempos experimentais de 24h, 48h e 72h. Na **Tabela 21**, estão apresentadas as estatísticas descritivas e suas respectivas medidas de dispersão em relação ao percentual de crescimento celular.

Tabela 21 - Ensaio de citotoxicidade (CAL27). Medidas sumárias (média e mediana) e respectivas medidas de dispersão (desvio padrão e intervalo interquartil) relativas ao percentual de crescimento celular considerando o controle negativo (DMEM) e o solvente (DMSO) em diferentes tempos experimentais (24h, 48h e 72h).

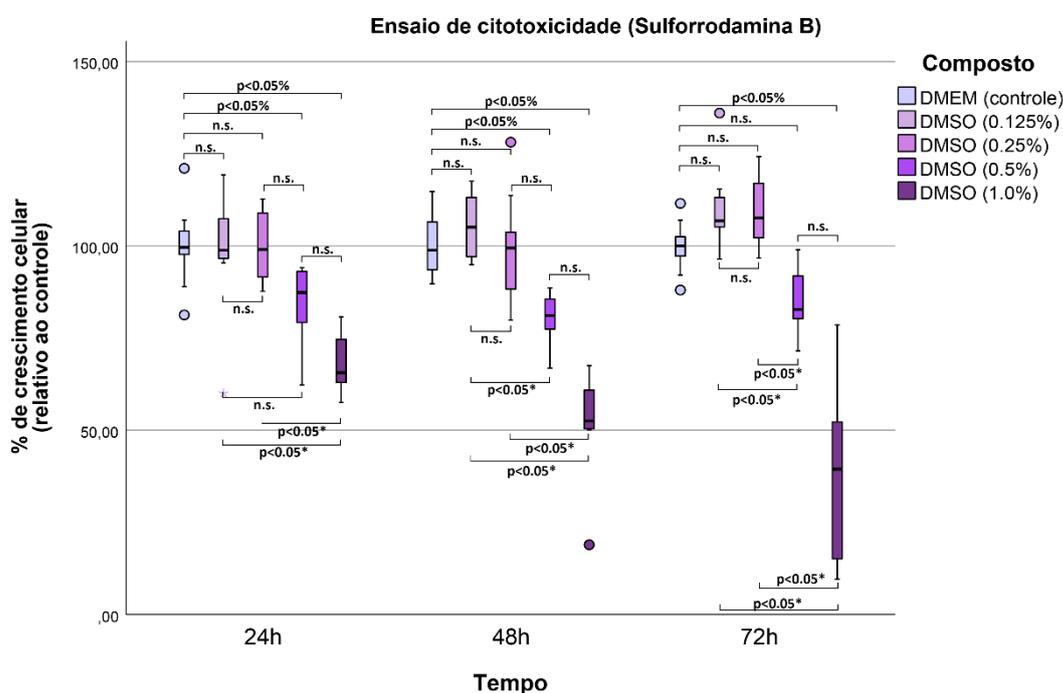
		DMEM (controle)	DMSO (0.125%)	DMSO (0.25%)	DMSO (0.5%)	DMSO (1.0%)
24h	Média (DP)	100 (8,1)	98,9 (16,6)	99,44 (9,51)	84,5 (10,8)	68 (7,7)
	Mediana [IQR]	99,62 [5,81]	98,79 [10,72]	99,01 [17,37]	87,35 [13,84]	65,61 [11,68]
48h	Média (DP)	100 (7,7)	105,1 (8,7)	99,49 (14,66)	80,6 (6,8)	52,6 (14,2)
	Mediana [IQR]	98,82 [12,93]	105,08 [16,04]	99,44 [15,44]	81,11 [8,14]	52,52 [10,49]
72h	Média (DP)	100 (5,5)	110,4 (11)	109,36 (9,6)	85,5 (9,1)	39 (23,7)
	Mediana [IQR]	100,01 [4,72]	106,79 [7,96]	107,58 [14,79]	82,74 [11,55]	39,44 [37,13]

Legenda: DP: desvio padrão; IQR: intervalo interquartil.

De modo geral, diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em comparação com o controle (DMEM) foram observadas nas concentrações de 0,5% e

1,0% nos tempos experimentais avaliados (**Figura 33**). As concentrações de 0,125% e 0,25% não demonstraram efeitos citotóxicos significativos ($p>0,05$), indicando que os efeitos citotóxicos observados em relação aos compostos miméticos de BH3 não podem ser atribuídos ao solvente em concentrações menores que 0,25%.

Figura 33 - Ensaio de citotoxicidade (CAL27). Gráfico Box-Plot apresentando o percentual de crescimento celular considerando o solvente (DMSO) em diferentes concentrações para cada tempo experimental (24h, 48h e 72h).



Legenda: n.s.: não significativo ($p>0,05$); teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes (comparações *pairwise* pelo teste de Dunn-Bonferroni).

6.6.1.2 Linhagem de fibroblastos não-senescentes (HGF)

Para a linhagem de HGF não-senescentes, o solvente (DMSO) foi testado em diferentes concentrações (0,125%, 0,25%, 0,5% e 1,0%) e no tempo experimental de 72h. As estatísticas descritivas e suas respectivas medidas de dispersão em relação ao percentual de crescimento celular estão dispostas na **Tabela 22**.

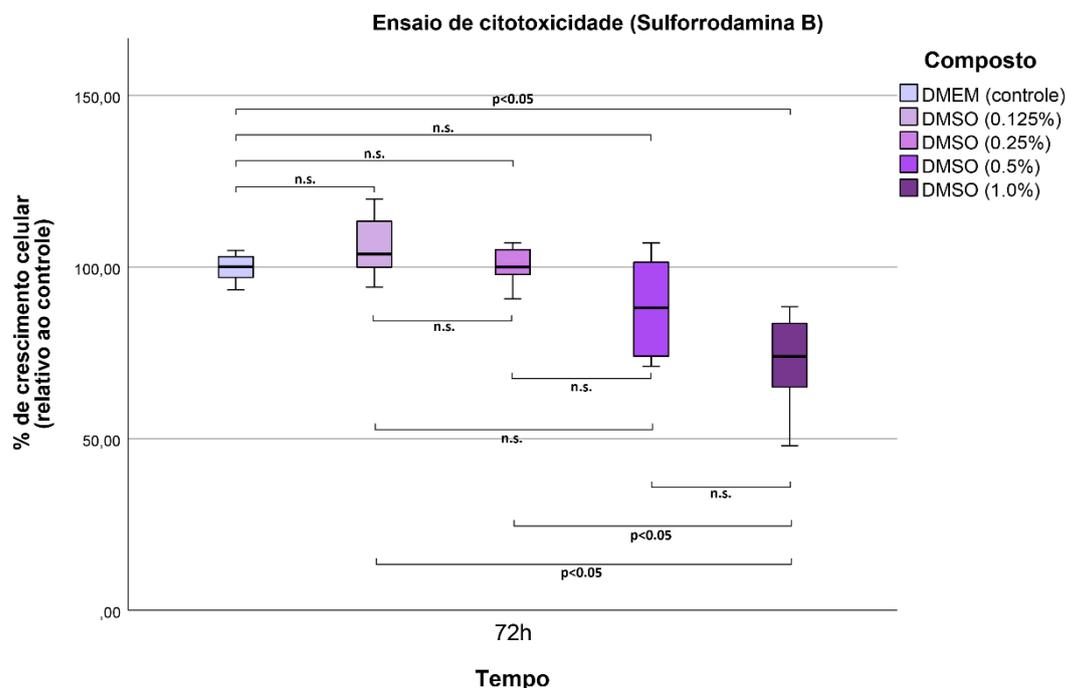
Tabela 22 - Ensaio de citotoxicidade (HGF não-senescentes). Medidas sumárias (média e mediana) e respectivas medidas de dispersão (desvio padrão e intervalo interquartil) relativas ao percentual de crescimento celular considerando o controle negativo (DMEM) e o solvente (DMSO) no tempo de 72h.

	DMEM (controle)	DMSO (0,125%)	DMSO (0,25%)	DMSO (0,5%)	DMSO (1,0%)
72h					
Média (DP)	100 (4,05)	106,08 (8,63)	100,58 (5,25)	87,63 (13,79)	72,03 (13,92)
Mediana [IQR]	100,09 [6,05]	103,78 [13,39]	100,01 [7,27]	88,13 [27,39]	73,97 [18,53]

Legenda: DP: desvio padrão; IQR: intervalo interquartil.

Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em comparação com o controle (DMEM) foram observadas somente na concentração de 1,0%. As concentrações de 0,125%, 0,25% e 0,5% não demonstraram efeitos citotóxicos significativos (**Figura 34**). Comparações entre as concentrações, no entanto, demonstraram que os efeitos citotóxicos da concentração de 1,0% foram significativamente ($p < 0,05$) maiores do que as de 0,125% e 0,25%, mas não de 0,5% ($p > 0,05$), indicando um potencial efeito citotóxico desta última.

Figura 34 - Ensaio de citotoxicidade (HGF não-senescentes). Gráfico Box-Plot apresentando o percentual de crescimento celular considerando o solvente (DMSO) em diferentes concentrações no tempo experimental de 72h.



Legenda: n.s.: não significativo ($p > 0,05$); teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes.

6.6.1.3 Linhagem de fibroblastos senescentes (HGF senescentes)

Para a linhagem de HGF com fenótipo senescente, o solvente (DMSO) foi testado em diferentes concentrações (0,125%, 0,25%, 0,5% e 1,0%) e no tempo experimental de 72h. Na **Tabela 23** constam as estatísticas descritivas e suas respectivas medidas de dispersão em relação ao percentual de crescimento celular.

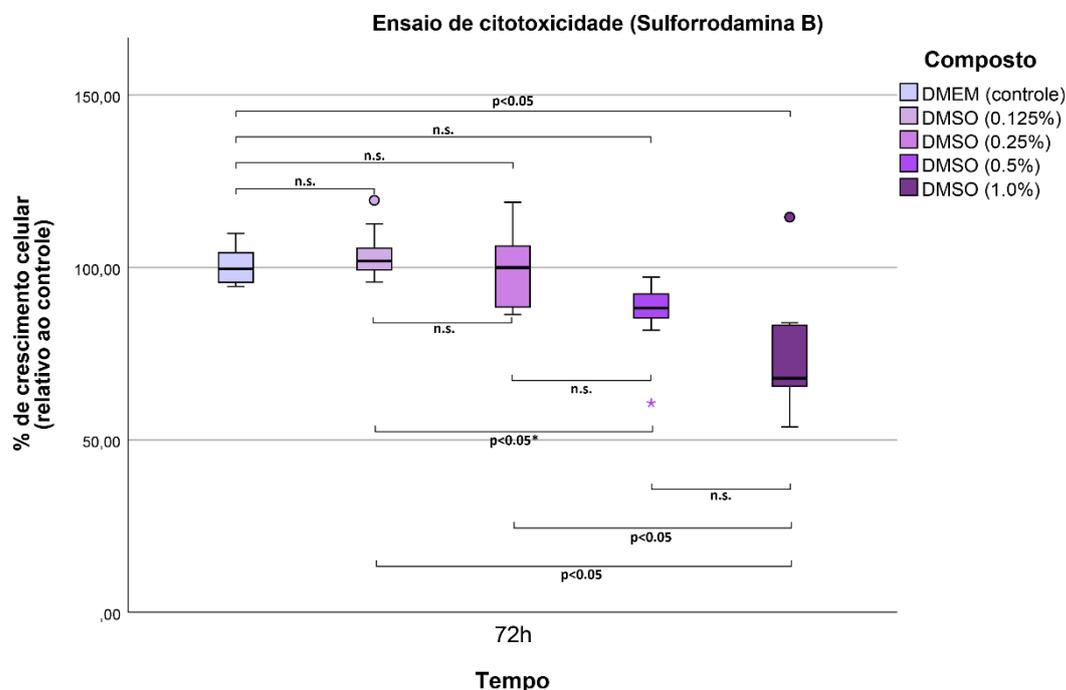
Tabela 23 - Ensaio de citotoxicidade (HGF senescentes). Medidas sumárias (média e mediana) e respectivas medidas de dispersão (desvio padrão e intervalo interquartil) relativas ao percentual de crescimento celular considerando o controle negativo (DMEM) e o solvente (DMSO) no tempo de 72h.

	DMEM (controle)	DMSO (0,125%)	DMSO (0,25%)	DMSO (0,5%)	DMSO (1,0%)
72h					
Média (DP)	100 (5,31)	104,22 (7,5)	100,12 (11,2)	86,33 (10,76)	74,29 (17,86)
Mediana [IQR]	99,57 [8,62]	101,83 [6,31]	99,92 [17,66]	88,19 [6,92]	67,85 [17,67]

Legenda: DP: desvio padrão; IQR: intervalo interquartil.

Similarmente aos HGF não-senescentes, diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em comparação com o controle (DMEM) foram observadas somente na concentração de 1,0% (**Figura 35**). A concentração de 0,5% foi ligeiramente mais citotóxica se comparado aos HGF não-senescentes, uma vez que uma diferença significativa ($p < 0,05$) foi observada também se comparado com a concentração de 0,125%.

Figura 35 - Ensaio de citotoxicidade (HGF senescentes). Gráfico Box-Plot apresentando o percentual de crescimento celular considerando o solvente (DMSO) em diferentes concentrações no tempo experimental de 72h.



Legenda: n.s.: não significativo ($p > 0,05$); teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes.

6.6.2 Ensaio de proliferação celular

6.6.2.1 Linhagem de CEB (CAL27)

Para o ensaio de proliferação, foi testada somente a concentração de solvente (DMSO) mais próxima da concentração máxima utilizada para solubilização dos compostos (0,25%), nos mesmos tempos experimentais previamente descritos. Os dados descritivos podem ser encontrados na **Tabela 24**.

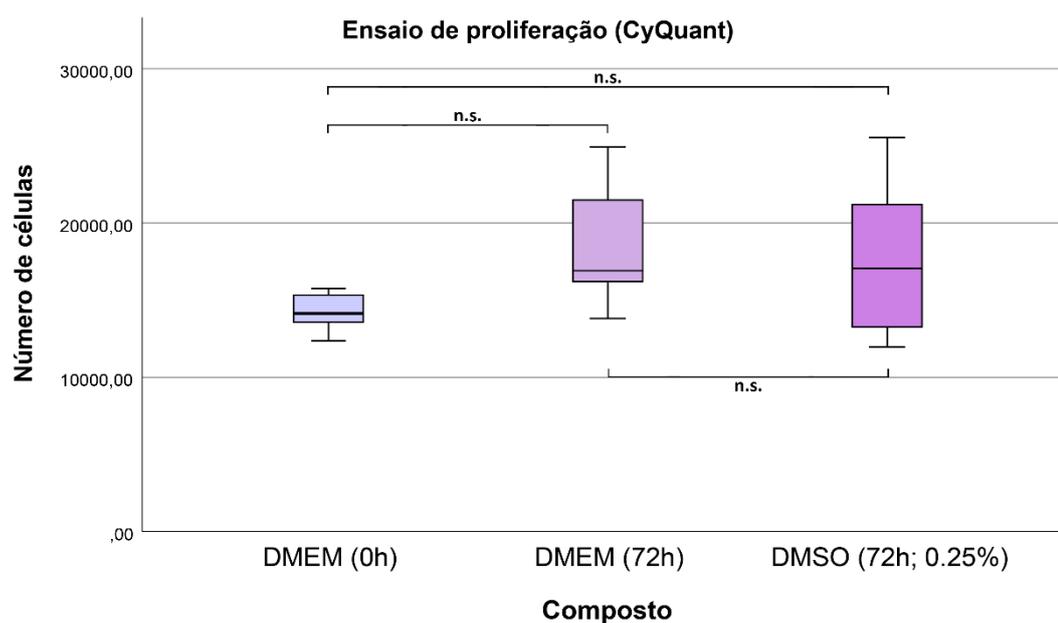
Tabela 24 - Ensaio de proliferação (CAL27). Medidas sumárias (média e mediana) e respectivas medidas de dispersão (desvio padrão e intervalo interquartil) em relação ao número de células para o controle (DMEM) nos tempos de 0h e 72h e para o solvente (DMSO) na concentração de 0,25% e no tempo de 72h.

	0h	72h	
	DMEM (controle)	DMEM (controle)	DMSO (0,25%)
Média (DP)	14.257,14 (1082,69)	18.364,91 (3.245,32)	17.422,64 (4711,13)
Mediana [IQR]	14.143,80 [1.750,72]	16.918,43 [4.868,98]	17.065,59 [7949,54]

Legenda: DP: desvio padrão; IQR: intervalo interquartil.

Na concentração de 0,25% e considerando o tempo experimental de 72h, o solvente DMSO não exibiu efeitos inibitórios significativos ($p > 0,05$) sobre a linhagem de CEB investigada (**Figura 36**). Esses resultados sugerem que os efeitos observados no ensaio de proliferação envolvendo os compostos miméticos de BH3 não estão relacionados ao efeito solvente.

Figura 36 - Ensaio de proliferação (CAL27). Gráfico Box-Plot apresentando o número de células para o controle (DMEM) nos tempos de 0h e 72h e para o solvente DMSO (0,25%) no tempo de 72h.



Legenda: n.s.: não significativo ($p > 0,05$); teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes.

6.6.2.2 Linhagem de fibroblastos não-senescentes (HGF)

Para células de HGF não-senescentes, foi utilizada a mesma concentração de solvente (0,25%) e o ensaio foi realizado nos mesmos tempos experimentais previamente descritos para a linhagem de CEB. A **Tabela 25** apresenta os dados descritivos acerca do efeito do solvente sobre os HGF não-senescentes.

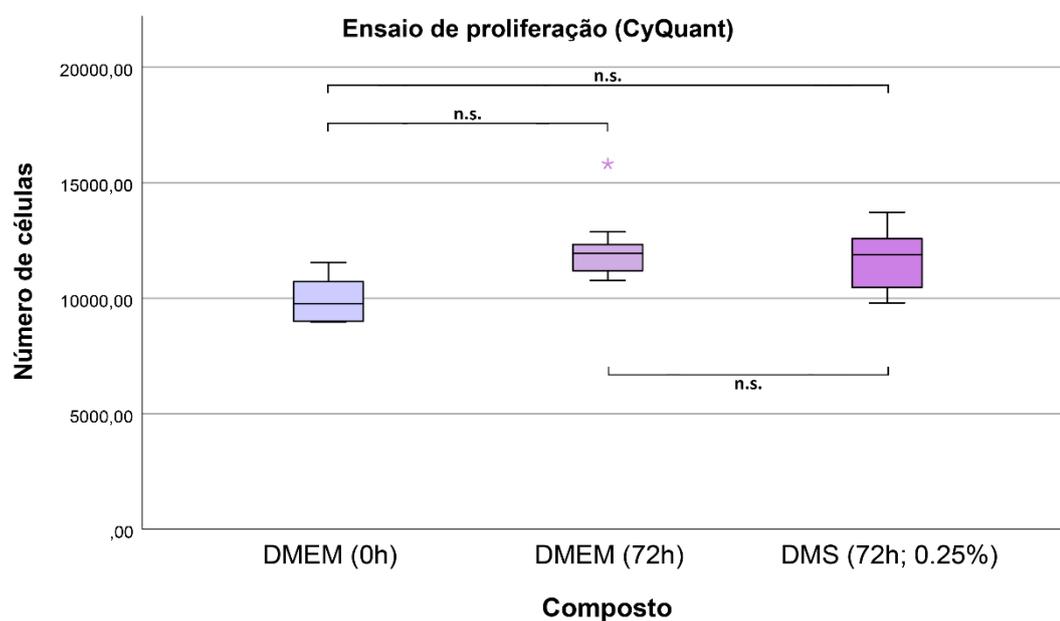
Tabela 25 - Ensaio de proliferação (HGF). Medidas sumárias (média e mediana) e respectivas medidas de dispersão (desvio padrão e intervalo interquartil) em relação ao número de células para o controle (DMEM) nos tempos de 0h e 72h e para o solvente (DMSO) na concentração de 0,25% e no tempo de 72h.

	0h	72h	
	DMEM (controle)	DMEM (controle)	DMSO (0,25%)
Média (DP)	9.960,91 (941,38)	12.187,52 (1.433,14)	11.659,96 (1.293,14)
Mediana [IQR]	9.768,16 [1.704,93]	11.949,05 [1.132,99]	11.884,37 [2.112,9]

Legenda: DP: desvio padrão; IQR: intervalo interquartil.

De modo similar as células de CEB, o solvente DMSO não exibiu efeitos inibitórios significativos ($p > 0,05$) sobre HGF não-senescentes na concentração de 0,25% considerando o tempo experimental de 72h (**Figura 37**). Esses resultados sugerem que os efeitos observados no ensaio de proliferação envolvendo os compostos miméticos de BH3 não estão relacionados ao efeito solvente.

Figura 37 - Ensaio de proliferação (HGF não-senescentes). Gráfico Box-Plot apresentando o número de células para o controle (DMEM) nos tempos de 0h e 72h e para o solvente DMSO (0,25%) no tempo de 72h.



Legenda: n.s.: não significativo ($p > 0,05$); teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes.

6.6.3 Ensaio de migração celular

6.6.3.1 Linhagem de CEB (CAL27)

Para a linhagem de CEB, foi testada a concentração de solvente de 0,25%, nos mesmos tempos experimentais previamente descritos. Os dados descritivos podem ser apresentados na **Tabela 26**.

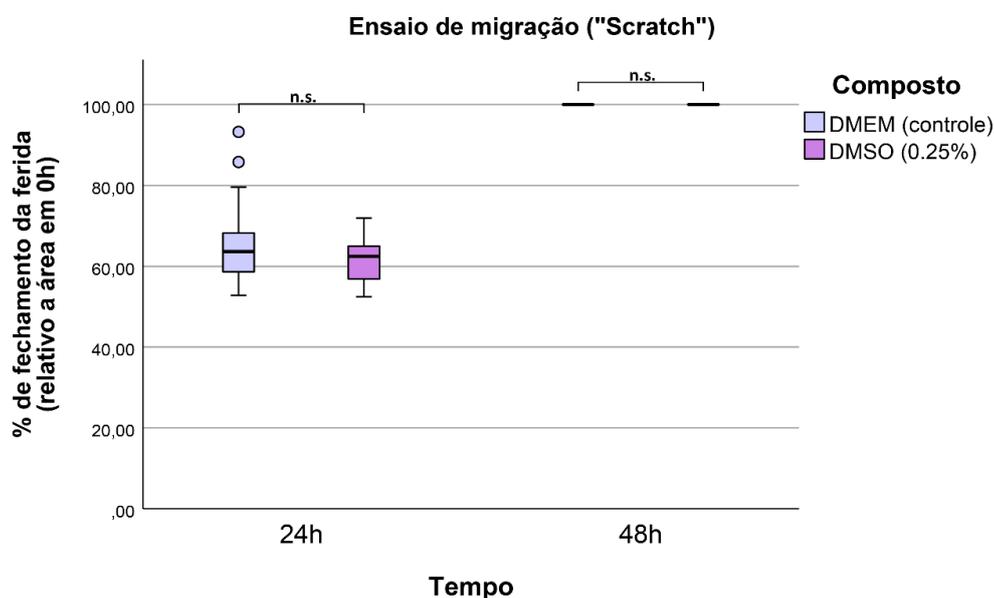
Tabela 26 - Ensaio de migração (CAL27). Medidas sumárias (média e mediana) e respectivas medidas de dispersão (desvio padrão e intervalo interquartil) relativas ao percentual de fechamento da área da ferida considerando o solvente DMSO (0,25%) e os tempos experimentais de 24h e 48h.

		DMEM (controle)	DMSO (0,25%)
24h	Média (DP)	65,94 (11,16)	61,16 (5,97)
	Mediana [IQR]	63,67 [8,88]	62,46 [8,04]
48h	Média (DP)	100 (0)	100 (0)
	Mediana [IQR]	100 [0]	100 [0]

Legenda: DP: desvio padrão; IQR: intervalo interquartil.

Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) em relação ao controle (DMEM nos tempos de 24h e 48h (**Figura 38**)). Desse modo, qualquer efeito inibitório na migração das células de CEB considerando os compostos miméticos de BH3 não pode ser atribuído ao efeito do solvente DMSO em concentrações menores que 0,25%.

Figura 38 - Ensaio de migração (CAL27). Gráfico Box-Plot apresentando o percentual de fechamento da área da ferida para o controle negativo (DMEM) e o solvente DMSO (0,25%) nos tempos de 24h e 48h.



Legenda: n.s.: não significativo ($p > 0,05$); teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes.

6.6.3.2 Linhagem de fibroblastos não-senescentes (HGF)

Para a linhagem de HGF não-senescentes, foi testada a concentração de solvente de 0,25% nos tempos de 24h, 48h e 72h, de acordo com os tempos descritos para os miméticos de BH3 investigados. Os dados descritivos estão apresentados na **Tabela 27**.

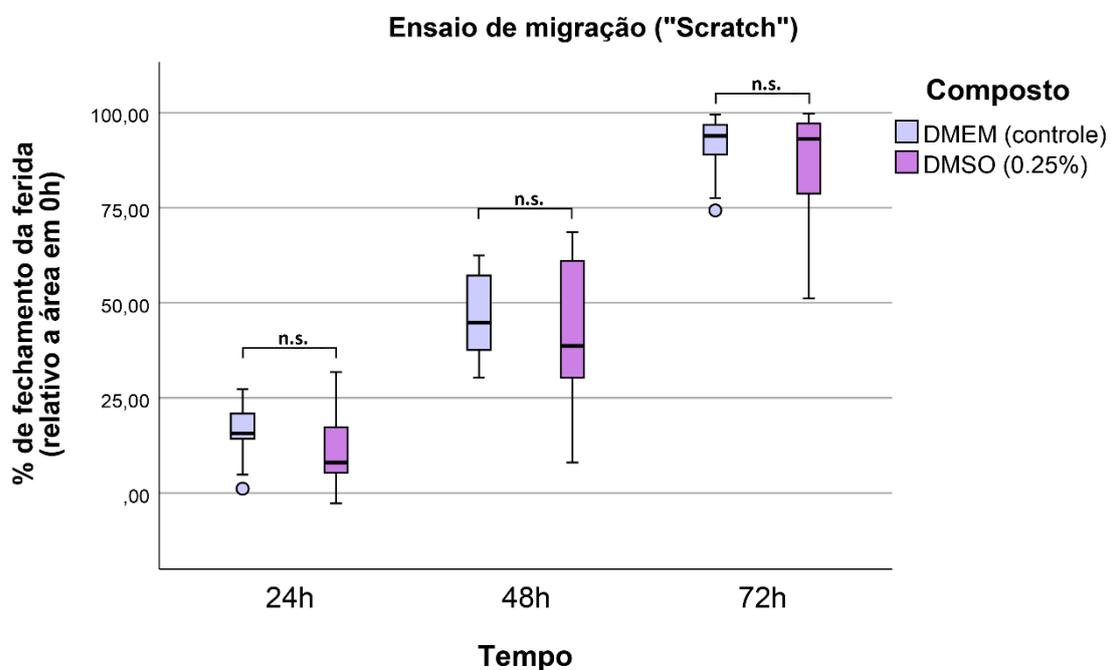
Tabela 27 - Ensaio de migração (HGF não-senescentes). Medidas sumárias (média e mediana) e respectivas medidas de dispersão (desvio padrão e intervalo interquartil) relativas ao percentual de fechamento da área da ferida considerando o solvente DMSO (0,25%) e os tempos experimentais de 24h, 48h e 72h.

		DMEM (controle)	DMSO (0,25%)
24h	Média (DP)	15,87 (6,95)	11,2 (9,73)
	Mediana [IQR]	15,69 [6,02]	8,02 [11,97]
48h	Média (DP)	45,72 (10,52)	41,6 (18,73)
	Mediana [IQR]	44,84 [18,36]	38,68 [30,72]
72h	Média (DP)	91,49 (7,4)	87,32 (13,6)
	Mediana [IQR]	93,88 [7,21]	93,1 [18,39]

Legenda: DP: desvio padrão; IQR: intervalo interquartil.

Similarmente as células de CEB, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) em relação ao controle (DMEM) em nenhum dos tempos experimentais (24h, 48h e 72h) (**Figura 39**).

Figura 39 - Ensaio de migração (HGF não-senescentes). Gráfico Box-Plot apresentando o percentual de fechamento da área da ferida para o controle negativo (DMEM) e o solvente DMSO (0,25%) nos tempos de 24h, 48h e 72h.



Legenda: n.s.: não significativo ($p > 0,05$); teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes.

7 DISCUSSÃO GERAL

Os achados do presente estudo *in-vitro* corroboram dados prévios da literatura no que tange potenciais efeitos anticâncer dos compostos miméticos de BH3 (BILLARD, 2013). No contexto de células de CEB, em particular, os compostos Navitoclax e Venetoclax apresentaram efeitos citotóxicos relevantes, além da capacidade de inibição da proliferação e migração celular. Esses efeitos não foram observados em células saudáveis do tecido conjuntivo, representadas no presente estudo pelos fibroblastos gengivais, o que corrobora um efeito seletivo dos compostos miméticos de BH3 sobre células dependentes de mecanismos como a superexpressão de determinadas proteínas antiapoptóticas da família BCL-2 para evasão de estímulos apoptóticos e manutenção da viabilidade celular (FERNALD e KUROKAWA, 2013).

Além disso, é proposto na literatura que o mecanismo de ação dos compostos miméticos de BH3 seja independente da via p53, o que pode representar uma vantagem terapêutica comparando com terapias anticâncer p53-dependentes (como a cisplatina) (HIENTZ *et al.*, 2017), uma vez que, em carcinomas de cabeça e pescoço, mutações do gene TP53 e consequente disfunção da proteína p53 são eventos celulares extremamente comuns (GASCO e CROOK, 2003). Nesse contexto, a linhagem utilizada no presente estudo (CAL27) foi previamente caracterizada como portadora de mutações do tipo "missense" no gene TP53, o que pode resultar em disfunção da proteína p53 (MARTIN *et al.*, 2014). No presente estudo *in-vitro*, os compostos Navitoclax e Venetoclax demonstraram ação citotóxica relevante sobre a linhagem de CEB investigada, o que corrobora uma ação anticâncer independente da via p53. Ainda, estudos prévios também sugeriram que compostos miméticos de BH3 em estudo apresentaram efeitos anticâncer sobre células de carcinoma de cabeça e pescoço, independentemente do status funcional da proteína p53 (BRITT *et al.*, 2019; TUOMAINEN *et al.*, 2021).

Os miméticos de BH3 também podem atuar de modo sinérgico com terapias anticâncer convencionais (como radioterapia e quimioterapia) através da sensibilização das células tumorais aos estímulos apoptóticos (LI *et al.*, 2009; LI e CUI, 2016). A sensibilização aos estímulos apoptóticos é uma estratégia particularmente importante para cânceres que apresentem resistência aos tratamentos convencionais, uma vez que uma combinação com miméticos de BH3

pode contribuir para que a dose e toxicidade das terapias anticâncer sejam reduzidas, apresentando eficácia e efetividade equivalentes ou superiores (GUY *et al.*, 2021).

Entretanto, algumas ressalvas devem ser feitas no que tange a toxicidade dos miméticos de BH3 propriamente ditos. No presente estudo *in-vitro*, apesar das células saudáveis investigadas (fibroblastos gengivais) não terem apresentado redução em nenhum dos parâmetros biológicos investigados (viabilidade, proliferação e migração), esse resultado não deve ser extrapolado para outros tipos celulares. Nesse contexto, tem sido proposto na literatura que miméticos de BH3 que tenham como alvo molecular a proteína BCL-XL podem apresentar um efeito citotóxico em plaquetas, o que pode acarretar em uma trombocitopenia dose-dependente (KAEFER *et al.*, 2014). Como o composto Navitoclax tem como alvos moleculares as proteínas BCL-2, BCL-XL e BCL-W (VELA e MARZO, 2015), os efeitos sobre plaquetas devem ser levados em consideração, de modo a viabilizar a translação das concentrações citotóxicas propostas em estudos *in-vitro* para concentrações plasmáticas seguras em estudos com modelos animais e em ensaios clínicos.

Até o presente momento, apesar de estudos clínicos não terem sido conduzidos considerando miméticos de BH3 validados no tratamento de cânceres de cabeça e pescoço, estudos clínicos de fase I e II considerando cânceres em outros sítios anatômicos têm sugerido um efeito anticâncer promissor no que tange o Navitoclax, em particular, e que esse efeito é dependente da origem e estágio do desenvolvimento do tumor (GANDHI *et al.*, 2011; KIPPS *et al.*, 2015; ROBERTS *et al.*, 2015; TOLCHER *et al.*, 2015b). Entretanto, a consistente ocorrência de trombocitopenia dose-dependente (RUDIN *et al.*, 2012; ROBERTS *et al.*, 2015) têm sugerido que o Navitoclax, como monoterapia, pode ter uma aplicabilidade limitada para tratamento de tumores sólidos, mas que combinações com outras terapias devem ser encorajadas (RUDIN *et al.*, 2012).

De modo geral, tem sido proposto que o composto Navitoclax é bem tolerado pela maioria dos pacientes em doses diárias de até 225 mg, não resultando em eventos adversos clinicamente significantes (XIONG *et al.*, 2014). Em doses superiores, entretanto, uma trombocitopenia dose-dependente é frequentemente relatada, sendo recomendada uma diminuição na dose diária ou interrupção do tratamento em pacientes nos quais esses eventos são observados para minimizar o risco de sangramentos acentuados (GANDHI *et al.*, 2011; JOLY *et al.*, 2022).

Nesse contexto, estudos clínicos recentes têm investigado combinações entre doses reduzidas de Navitoclax (até 150 mg por dia) com outras terapias, tais como erlotinib (TOLCHER *et al.*, 2015a), irinotecan (TOLCHER *et al.*, 2015b), rituximab (KIPPS *et al.*, 2015; ROBERTS *et al.*, 2015) e docetaxel (PUGLISI *et al.*, 2021). Estudos pré-clínicos também têm proposto a incorporação do Navitoclax em nanovesículas poliméricas sensíveis ao pH, as quais possibilitam um maior controle sobre a liberação do composto, que pode ocorrer somente após a incorporação das nanovesículas no compartimento lisossomal com pH ácido das células tumorais (DING *et al.*, 2020).

Outra alternativa recentemente proposta é o uso da tecnologia quimera de direcionamento de proteólise (PROTAC), através da qual o Navitoclax pode ser convertido em moléculas heterobifuncionais como a PZ15227, a qual resulta na degradação da proteína BCL-XL via proteassomas (HE *et al.*, 2020). Nesse contexto, a inibição da proteína BCL-XL passa a ocorrer através da ligação da molécula PZ15227 à proteína cereblon (componente do complexo E3 ubiquitina ligase), que é pobremente expressa em plaquetas; isso resulta na manutenção da ação proapoptótica em tipos celulares susceptíveis a ação do Navitoclax, mas minimizando a trombocitopenia dose-dependente relacionada a ligação direta desse composto à proteína BCL-XL (NEGI e VOISIN-CHIRET, 2022).

O composto Venetoclax, por ser um inibidor monoseletivo da proteína BCL-2, não apresenta efeitos citotóxicos em plaquetas, constituindo uma estratégia terapêutica importante para cânceres nos quais já existe uma trombocitopenia previamente estabelecida, como em leucemias (TIMUCIN, BASAGA e KUTUK, 2019). Por esse motivo, o Venetoclax vem sendo amplamente investigado em estudos pré-clínicos e clínicos e constitui o primeiro mimético de BH3 a ser aprovado pela FDA para uso em larga escala (REX *et al.*, 2022). Em tumores sólidos, entretanto, a expressão das múltiplas proteínas antiapoptóticas da família BCL-2 é bastante variável e, portanto, a eficácia e efetividade do Venetoclax pode ser mais limitada quando comparado as neoplasias linfoides (CARTER *et al.*, 2019).

No presente estudo *in-vitro*, o composto Venetoclax foi, de maneira geral, comparável ao Navitoclax em concentrações entre 10 μ M e 20 μ M, mas não em 5 μ M, concentração na qual o composto Navitoclax demonstrou efeitos citotóxicos significativamente superiores. No estudo de XIONG *et al.* (2016), a linhagem celular CAL27 apresentou a menor expressão da proteína BCL-2 dentre as linhagens de

carcinoma investigadas, o que pode estar relacionado ao efeito citotóxico menos proeminente observado no presente estudo *in-vitro* no que tange particularmente o composto Venetoclax.

Vale ressaltar, entretanto, que linhagens celulares de carcinoma com menor expressão da proteína BCL-2 podem fornecer dados mais acurados em relação ao potencial efeito anticâncer do composto Venetoclax para carcinomas de cabeça e pescoço no contexto de estudos clínicos. De maneira geral, resultados conflitantes são observados na literatura em relação particularmente a expressão da proteína BCL-2 entre linhagens celulares e amostras de tumores de cabeça e pescoço. Em estudos *in-vitro*, a proteína BCL-2 é usualmente superexpressa entre diferentes linhagens celulares de carcinomas de cabeça e pescoço (SALO *et al.*, 1997; KAWAKAMI *et al.*, 1999), ao passo que, em estudos com amostras de pacientes portadores de tumores de cabeça e pescoço, uma superexpressão da proteína BCL-2 é encontrada em apenas 15 a 25% dos casos (PENA *et al.*, 1999; TRASK *et al.*, 2002; REDONDO *et al.*, 2006).

A variabilidade na expressão das proteínas antiapoptóticas da família BCL-2 entre diferentes tumores é uma das principais dificuldades no que tange a resistência aos efeitos dos compostos miméticos de BH3, especialmente os monoseletivos como o Venetoclax (MAJI *et al.*, 2019). Ainda, apesar do composto Navitoclax ter como alvo múltiplas proteínas da família BCL-2, esse composto não possui afinidade a proteína MCL-1, sendo uma das principais razões para a resistência tumoral a esse composto (DELBRIDGE e STRASSER, 2015). No presente estudo *in-vitro*, apesar de efeitos citotóxicos relevantes terem sido observados para ambos os compostos experimentais, possíveis associações com miméticos de BH3 com alvos moleculares complementares (por exemplo inibidores da proteína MCL-1, tais como os compostos A1210477 e S63845) podem contribuir para que um mesmo efeito seja alcançado através do uso de menores concentrações (OW *et al.*, 2019), o que pode contribuir para a redução de efeitos adversos em estudos *in-vivo*. Desse modo, futuros estudos no contexto de carcinomas orais são encorajados no que tange a investigação de combinações terapêuticas entre múltiplos miméticos de BH3 com alvos moleculares complementares.

Vale ressaltar, entretanto, que a heterogeneidade na expressão das proteínas BCL-2 (e conseqüente variabilidade na resposta dos tumores sólidos aos diferentes miméticos de BH3) pode compor um obstáculo considerando o delineamento de quais

possíveis associações terapêuticas seriam plausíveis em termos de efeito sinérgico. Nesse contexto, o ensaio de "*BH3-profiling*" assume um papel importante, uma vez que pode identificar a dependência celular em relação as proteínas da família BCL-2, indicando quais são as principais responsáveis pela manutenção da viabilidade (DENG *et al.*, 2007). Esse ensaio apresenta, ainda, uma capacidade preditora importante no que tange os miméticos de BH3, podendo guiar o delineamento de quais associações podem apresentar um potencial efeito sinérgico, contribuindo, portanto, para o refinamento e otimização de estratégias terapêuticas.

Combinações com alvos moleculares complementares podem, ainda, resultar em um maior efeito no que tange a indução especificamente da morte celular por apoptose. No presente estudo *in-vitro*, apesar do composto Venetoclax ter exibido efeitos citotóxicos e capacidade de inibição da proliferação e migração celular relevantes, não foi observado um aumento significativo dos marcadores específicos de morte celular (anexina V e iodeto de propídio). O composto Navitoclax, por outro lado, apresentou uma fração significativa das células em processo de apoptose precoce (marcação isolada de anexina V), indicando que a inibição das proteínas antiapoptóticas complementares (BCL-XL e BCL-W) desempenharam papel importante nesse processo.

Ainda no que tange o composto Venetoclax e a indução de morte celular por apoptose, vale ressaltar que resultados conflitantes foram observados entre o presente estudo *in-vitro* e o estudo de XIONG *et al.* (2016). No estudo prévio, os autores observaram um aumento estatisticamente significativo do marcador anexina V para linhagem CAL27, o que não foi observado no presente estudo *in-vitro*. Essa heterogeneidade nas estimativas de efeito pode estar relacionada aos diferentes métodos e tempos experimentais aplicados. No presente estudo *in-vitro*, o tempo de 48h foi investigado, de modo que a fração de células com marcação única de anexina V fosse observável, independentemente da dupla marcação tardia com iodeto de propídio, que ocorre tanto em células em processo de apoptose tardia quanto em células necróticas (OANCEA *et al.*, 2006). No estudo de XIONG *et al.* (2016), o marcador iodeto de propídio não foi utilizado e os autores avaliaram o efeito do Venetoclax no tempo de 72h. Entretanto, recomenda-se cautela na interpretação desses achados uma vez que a ausência do marcador iodeto de propídio limita a capacidade de discriminação entre células em processo de apoptose precoce,

apoptose tardia ou necrose. Desse modo, para a validação desses achados, futuros estudos com múltiplos tempos experimentais são encorajados.

Além dos efeitos biológicos já apresentados, tem-se proposto, ainda, que as proteínas da família BCL-2 podem atuar além da regulação de mecanismos de morte celular, com possíveis efeitos na capacidade de migração e invasão de células tumorais (UM, 2016). No presente estudo *in-vitro*, apesar de diferenças estatisticamente significativas não terem sido observadas entre os compostos Venetoclax e Navitoclax, o composto Venetoclax inibiu de modo significativo a migração celular em relação ao controle (tempo de 24h e concentração de 10 μ M), diferença a qual não foi observada considerando o Navitoclax nos mesmos parâmetros experimentais. Esse resultado pode sugerir um papel relevante da proteína BCL-2, em particular, na capacidade de migração das células de CEB investigadas. Nesse contexto, um estudo prévio investigando a capacidade de migração e invasão de células de carcinoma colorretal indicou que houve redução significativa na capacidade de migração frente ao *knockdown* (através de ácido ribonucleico [RNA, do inglês *ribonucleic acid*] silenciador) das proteínas BCL-2, BCL-XL e MCL-1; dentre elas, o *knockdown* da proteína BCL-2 resultou na inibição mais proeminente da capacidade de migração (KOEHLER *et al.*, 2013).

Os efeitos das proteínas da família BCL-2 sobre as capacidades de migração e invasão celular ainda são pouco compreendidos na literatura, entretando, tem-se proposto que elas possam estar envolvidas na regulação da respiração mitocondrial e produção de ROS pelas células tumorais (UM, 2016). Uma produção aumentada de ROS tem sido relacionada ao rearranjo do citoesqueleto, regulação de vias de sinalização e atividades transcricionais que podem favorecer a migração e invasão celular (TOCHHAWNG *et al.*, 2013). Nesse contexto, tem-se sugerido que compostos miméticos de BH3 possam atuar como supressores da produção de ROS através da ativação das proteínas BAX/BAK, as quais apresentam efeitos inibitórios sobre a atividade do complexo-I da cascata respiratória da mitocôndria, o qual é uma das principais fontes de produção de ROS em células tumorais (KIM *et al.*, 2014).

Similarmente, vale destacar que a evidência científica atual acerca do papel das proteínas BCL-2 sobre a regulação da capacidade de proliferação celular ainda é incipiente. Nesse contexto, o presente estudo *in-vitro* demonstrou que os compostos Navitoclax e Venetoclax apresentaram capacidade de inibir a proliferação celular comparado ao controle no tempo de 72h. Apesar de metodologias distintas para

quantificação da proliferação celular, resultados similares foram observados em estudos prévios considerando linhagens de carcinoma de cabeça e pescoço tanto para o composto Navitoclax (TUOMAINEN *et al.*, 2021) quanto Venetoclax (XIONG *et al.*, 2016). Esse é um efeito paradoxal dos compostos miméticos de BH3 uma vez que a literatura sugere que as proteínas antiapoptóticas da família BCL-2, em circunstâncias fisiológicas, exercem uma função antiproliferativa através do prolongamento das fases G0-G1 do ciclo celular (JANUMYAN *et al.*, 2003).

É possível sugerir, portanto, que a inibição da proliferação celular pelos miméticos de BH3 possa estar relacionada a outros mecanismos, tais como supressão da produção de ROS, um mecanismo já discutido no que tange a inibição da migração celular. Entretanto, considerando a proliferação celular, tem-se sugerido que uma alta concentração endógena de ROS em células tumorais possa estar relacionada a ativação das vias proteíno-quinases ativadas por mitógenos (MAPK, do inglês *mitogen-activated protein kinase*) e quinases reguladas por sinal extracelular 1/2 (ERK 1/2, do inglês *extracellular-regulated kinase 1/2*), as quais estão relacionadas a um aumento da capacidade de proliferação celular (LIOU e STORZ, 2010). Vale ressaltar que esses mecanismos ainda são pouco explorados e futuros estudos são sugeridos para elucidar as vias pelas quais os miméticos de BH3 possam atuar sobre a capacidade de migração e proliferação de células tumorais.

Além dos efeitos anticâncer diretos sobre células tumorais, potenciais efeitos anticâncer indiretos têm sido propostos considerando a ação de determinados miméticos de BH3 sobre componentes do microambiente tumoral, especialmente células que expressam um fenótipo senescente (SCHOSSERER, GRILLARI e BREITENBACH, 2017). Os potenciais efeitos senolíticos dos miméticos BH3 sobre células senescentes pode estar relacionado a dependência dessas células considerando a superexpressão de proteínas da família BCL-2 para manutenção da viabilidade celular (GHOLIZADEH *et al.*, 2016; YOSEF *et al.*, 2016). Estudos prévios têm sugerido que o composto Navitoclax possa exibir um potente efeito senolítico sobre células senescentes de diferentes origens (ZHU *et al.*, 2016). Entretanto, no presente estudo *in-vitro*, os fibroblastos orais senescentes não apresentaram susceptibilidade aos compostos Navitoclax e Venetoclax nas concentrações citotóxicas para células de CEB, sugerindo que mecanismos de resistência subjacentes possam estar presentes nessas células.

Nesse contexto, tem-se sugerido que, assim como em tumores sólidos, a expressão das múltiplas proteínas BCL-2 em células senescentes é variável, podendo conferir resistência aos miméticos de BH3 em decorrência da superexpressão de proteínas fora-do-alvo (HU *et al.*, 2022). Resultados da literatura corroboram essa hipótese, uma vez que o composto Navitoclax se apresenta como um potente agente senolítico para fibroblastos senescentes originados do pulmão (ZHU *et al.*, 2016), porém não exibe efeitos citotóxicos sobre fibroblastos senescentes originados do prepúcio (CHO *et al.*, 2020), sugerindo que a heterogeneidade na expressão das proteínas BCL-2 pode estar relacionada ao tecido de origem. Nesse contexto, com base nos achados do presente estudo *in-vitro*, uma das hipóteses é que fibroblastos senescentes originados da cavidade oral possam apresentar relação de dependência com a proteína MCL-1, uma vez que não é um alvo molecular dos compostos Navitoclax ou Venetoclax.

Vale ressaltar que, além da possível influência do tecido de origem, o método de indução de senescência em estudos *in-vitro* também pode ser um fator que contribui para a heterogeneidade na expressão das proteínas BCL-2. Um estudo prévio identificou que diferentes métodos de indução de senescência (p. ex. exaustão replicativa, indução por oncogenes e tratamento com etoposídeo [agente indutor de dano ao DNA]) resultaram em diferentes expressões das proteínas da família BCL-2, especialmente da proteína MCL-1 (YOSEF *et al.*, 2016). A indução da senescência por estresse oxidativo não foi avaliada nesse estudo prévio, entretanto, com base nos achados do presente estudo *in-vitro*, é possível hipotetizar que a indução da senescência por meio de tratamento com peróxido de hidrogênio possa estar associada a um aumento de expressão da proteína MCL-1 em fibroblastos orais, conferindo, assim, a resistência aos compostos Navitoclax e Venetoclax observada.

Tem-se proposto, entretanto que outras vias podem estar envolvidas no mecanismo de resistência a morte celular pelas células senescentes, incluindo a participação de componentes pós-mitocondriais, como uma disfunção na cascata de caspases, em particular a perda de atividade da caspase-3 (MARCOTTE, LACELLE e WANG, 2004). Esses achados sugerem que a resistência a morte celular presente em células senescentes pode não ser unicamente dependente da superexpressão de proteínas antiapoptóticas da família BCL-2, o que pode afetar diretamente a susceptibilidade aos miméticos de BH3 e outras terapias com ação em componentes pré- ou trans-mitocondriais (HU *et al.*, 2022). Desse modo, futuros estudos são

indicados visando aprofundar os conhecimentos acerca dos mecanismos moleculares que conferem resistência a morte celular (e aos miméticos de BH3 investigados) no contexto dos fibroblastos senescentes originados da cavidade oral.

Vale apontar que o presente estudo apresenta determinadas limitações. Apesar dos efeitos anticâncer relevantes de ambos os compostos sobre linhagem de CEB investigada, a dependência celular em relação a expressão da proteína MCL-1, em particular, não foi explorada. A mesma limitação se aplica aos HGF com fenótipo senescente, os quais podem ter apresentado resistência aos efeitos dos miméticos de BH3 investigados através da superexpressão da proteína MCL-1. Uma associação com compostos inibidores dessa proteína pode, portanto, apresentar um efeito sinérgico importante, tanto para células de CEB quanto para HGF senescentes. Uma maior elucidação acerca da expressão das proteínas BCL-2 frente aos diferentes métodos de indução da senescência também é encorajada no contexto de fibroblastos orais.

No que tange as limitações em relação aos ensaios realizados, destaca-se que, apesar da técnica "*serum starvation*" minimizar o efeito da proliferação celular no ensaio de migração, o uso de inibidores de proliferação, como a Mitomicina C, pode resultar em resultados mais acurados, especialmente em tempos de acompanhamento mais longos (GRADA *et al.*, 2017). Ainda, considerando a linhagem CAL27, em particular, uma vez que a CC50 dos compostos Navitoclax e Venetoclax é de aproximadamente 20 μ M em 48h, destaca-se que o efeito observado nessa concentração e tempo pode ser atribuído, em parte, a citotoxicidade dos compostos.

Por último, ressalta-se que, no presente estudo, foram utilizados fibroblastos orais obtidos a partir de cultura primária. O uso de culturas primárias apresenta determinadas vantagens comparado a linhagens imortalizadas, tais como uma resposta biológica mais comparável aos modelos *in-vivo* frente a intervenções farmacológicas (PAN *et al.*, 2009). No entanto, linhagens primárias apresentam baixa reprodutibilidade entre diferentes estudos e, apesar do processo de imortalização poder desencadear alterações fenotípicas e em determinadas vias moleculares (ALGE *et al.*, 2006), a investigação de linhagens imortalizadas também é encorajada tendo em vista o maior potencial de replicabilidade e comparabilidade dos achados entre diferentes grupos de pesquisa.

8 CONCLUSÃO GERAL

A partir da análise de estudos da literatura, concluiu-se que os compostos miméticos de BH3 apresentaram uma proeminente capacidade de indução da morte celular e inibição do crescimento tumoral em pesquisas pré-clínicas. Alguns desses compostos apresentaram efeitos anticâncer fora-de-alvo considerando o mecanismo de ação dos miméticos de BH3 (tais como indução de autofagia), devendo ser considerados, portanto, miméticos de BH3 putativos. Outros, como ABT-737, Navitoclax e Venetoclax, foram considerados como miméticos de BH3 validados, exibindo efeitos anticâncer proeminentes, especialmente através da indução da apoptose de células tumorais.

Considerando o estudo *in-vitro* realizado, concluiu-se que tanto o composto Navitoclax quanto o Venetoclax demonstraram efeitos citotóxicos relevantes considerando a linhagem de CEB investigada. Ainda, esses compostos apresentaram substancial inibição da capacidade de proliferação e migração dessas células. Esses efeitos biológicos não foram observados em HGF não-senescentes, sugerindo que o efeito dos miméticos de BH3 investigados foi seletivo às células tumorais em estudo.

Ainda, o composto Navitoclax apresentou capacidade relevante de induzir morte celular pelo mecanismo de apoptose. Apesar do composto Venetoclax não ter apresentado aumento significativo dos marcadores de morte celular, não se pode desconsiderar outros potenciais efeitos anticâncer observados. No que tange os HGF com fenótipo senescente, nenhum dos compostos investigados apresentou efeito citotóxico relevante, o que foi corroborado pela ausência de marcadores de morte celular. Esses achados sugerem que HGF com fenótipo senescente podem apresentar expressão aumentada de proteínas da família BCL-2 que não são alvos moleculares dos compostos em estudo (como a MCL-1) ou, ainda, depender majoritariamente de mecanismos distintos de resistência a morte celular, como uma perda de atividade de determinadas caspases.

Recomendam-se, portanto, futuros estudos para a validação desses achados e também para aprofundar o conhecimento científico acerca dos mecanismos de resistência a morte celular dos fibroblastos orais com fenótipo senescente.

REFERÊNCIAS

ALGE, C. S. *et al.* Differential protein profiling of primary versus immortalized human RPE cells identifies expression patterns associated with cytoskeletal remodeling and cell survival. **J Proteome Res**, v. 5, n. 4, p. 862-78, 2006.

ALI, J. *et al.* Genetic etiology of oral cancer. **Oral Oncol**, v. 70, p. 23-28, 2017.

ANDERBERG, C.; PIETRAS, K. On the origin of cancer-associated fibroblasts. **Cell Cycle**, v. 8, n. 10, p. 1461-2, 2009.

APLIN, A. E. *et al.* Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. **Pharmacol Rev**, v. 50, n. 2, p. 197-263, 1998.

ASHKENAZI, A.; DIXIT, V. M. Death receptors: signaling and modulation. **Science**, v. 281, n. 5381, p. 1305-8, 1998.

BAYLIN, S. B.; JONES, P. A. Epigenetic Determinants of Cancer. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 8, n. 9, 2016.

BENNY, S. *et al.* From Warburg effect to Reverse Warburg effect; the new horizons of anti-cancer therapy. **Med Hypotheses**, v. 144, p. 110216, 2020.

BHOWMICK, N. A.; NEILSON, E. G.; MOSES, H. L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 332-7, 2004.

BILLARD, C. BH3 mimetics: status of the field and new developments. **Mol Cancer Ther**, v. 12, n. 9, p. 1691-700, 2013.

BOSE, P.; GANDHI, V.; KONOPLEVA, M. Pathways and mechanisms of venetoclax resistance. **Leuk Lymphoma**, v. 58, n. 9, p. 1-17, 2017.

BRIEGER, J. *et al.* Impact of vascular endothelial growth factor release on radiation resistance. **Oncol Rep**, v. 18, n. 6, p. 1597-601, 2007.

BRITT, E. L. *et al.* Combination of fenretinide and ABT-263 induces apoptosis through NOXA for head and neck squamous cell carcinoma treatment. **PLoS One**, v. 14, n. 7, p. e0219398, 2019.

CAJA, L. *et al.* TGF-beta and the Tissue Microenvironment: Relevance in Fibrosis and Cancer. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 5, 2018.

CAMPISI, J. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. **Trends Cell Biol**, v. 11, n. 11, p. S27-31, 2001.

_____. Cellular senescence: putting the paradoxes in perspective. **Curr Opin Genet Dev**, v. 21, n. 1, p. 107-12, 2011.

_____. Aging, cellular senescence, and cancer. **Annu Rev Physiol**, v. 75, p. 685-705, 2013.

CAMPO-TRAPERO, J. *et al.* Cellular senescence in oral cancer and precancer and treatment implications: a review. **Acta Oncol**, v. 47, n. 8, p. 1464-74, 2008.

CAPPARELLI, C. *et al.* Autophagy and senescence in cancer-associated fibroblasts metabolically supports tumor growth and metastasis via glycolysis and ketone production. **Cell Cycle**, v. 11, n. 12, p. 2285-302, 2012.

CARTER, R. J. *et al.* Exploring the potential of BH3 mimetic therapy in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Cell Death Dis**, v. 10, n. 12, 2019.

CAVALCANTE, G. C. *et al.* A Cell's Fate: An Overview of the Molecular Biology and Genetics of Apoptosis. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 17, 2019.

CHEN, J. H.; OZANNE, S. E.; HALES, C. N. Methods of cellular senescence induction using oxidative stress. **Methods Mol Biol**, v. 371, p. 179-89, 2007.

CHEN, Q. *et al.* ABT-263 induces apoptosis and synergizes with chemotherapy by targeting stemness pathways in esophageal cancer. **Oncotarget**, v. 6, n. 28, p. 25883-96, 2015.

CHI, A. C.; DAY, T. A.; NEVILLE, B. W. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma--an update. **CA Cancer J Clin**, v. 65, n. 5, p. 401-21, 2015.

CHO, H. J. *et al.* Identification of SYK inhibitor, R406 as a novel senolytic agent. **Aging (Albany NY)**, v. 12, n. 9, p. 8221-8240, 2020.

CIRRI, P.; CHIARUGI, P. Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: a diabolic liaison driving cancer progression. **Cancer Metastasis Rev**, v. 31, n. 1-2, p. 195-208, 2012.

COLLADO, M.; SERRANO, M. The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 6, p. 472-6, 2006.

CORY, S. *et al.* Targeting BCL-2-like Proteins to Kill Cancer Cells. **Trends Cancer**, v. 2, n. 8, p. 443-460, 2016.

D'AGUANNO, S.; DEL BUFALO, D. Inhibition of Anti-Apoptotic Bcl-2 Proteins in Preclinical and Clinical Studies: Current Overview in Cancer. **Cells**, v. 9, n. 5, 2020.

DAY, T. A. *et al.* Oral cancer treatment. **Curr Treat Options Oncol**, v. 4, n. 1, p. 27-41, 2003.

DE BLANDER, H. *et al.* Cellular Plasticity: A Route to Senescence Exit and Tumorigenesis. **Cancers (Basel)**, v. 13, n. 18, 2021.

DE CAMARGO CANCELA, M. *et al.* Oral cavity cancer in developed and in developing countries: population-based incidence. **Head Neck**, v. 32, n. 3, p. 357-67, 2010.

DELBRIDGE, A. R.; STRASSER, A. The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy. **Cell Death Differ**, v. 22, n. 7, p. 1071-80, 2015.

DENG, J. *et al.* BH3 profiling identifies three distinct classes of apoptotic blocks to predict response to ABT-737 and conventional chemotherapeutic agents. **Cancer Cell**, v. 12, n. 2, p. 171-85, 2007.

DIMRI, G. P. What has senescence got to do with cancer? **Cancer Cell**, v. 7, n. 6, p. 505-12, 2005.

DING, J. *et al.* Ultra pH-sensitive polymeric nanovesicles co-deliver doxorubicin and navitoclax for synergetic therapy of endometrial carcinoma. **Biomater Sci**, v. 8, n. 8, p. 2264-2273, 2020.

DRABSCH, Y.; TEN DIJKE, P. TGF-beta signalling and its role in cancer progression and metastasis. **Cancer Metastasis Rev**, v. 31, n. 3-4, p. 553-68, 2012.

DZUTSEV, A. *et al.* Microbes and Cancer. **Annu Rev Immunol**, v. 35, p. 199-228, 2017.

EICHHORN, J. M. *et al.* Molecular analysis of functional redundancy among anti-apoptotic Bcl-2 proteins and its role in cancer cell survival. **Exp Cell Res**, v. 322, n. 2, p. 415-24, 2014.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

FERNALD, K.; KUROKAWA, M. Evading apoptosis in cancer. **Trends Cell Biol**, v. 23, n. 12, p. 620-33, 2013.

FIDLER, M. M.; SOERJOMATARAM, I.; BRAY, F. A global view on cancer incidence and national levels of the human development index. **Int J Cancer**, v. 139, n. 11, p. 2436-46, 2016.

FLUSBERG, D. A.; SORGER, P. K. Surviving apoptosis: life-death signaling in single cells. **Trends Cell Biol**, v. 25, n. 8, p. 446-58, 2015.

FORTIN, A. *et al.* Effect of treatment delay on outcome of patients with early-stage head-and-neck carcinoma receiving radical radiotherapy. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 52, n. 4, p. 929-36, 2002.

FOSTER, D. A. *et al.* Regulation of G1 Cell Cycle Progression: Distinguishing the Restriction Point from a Nutrient-Sensing Cell Growth Checkpoint(s). **Genes Cancer**, v. 1, n. 11, p. 1124-31, 2010.

GADSDEN, N. J. *et al.* Palbociclib renders human papilloma virus–negative head and neck squamous cell carcinoma vulnerable to the senolytic agent navitoclax. **Mol Cancer Res**, v. 19, n. 5, p. 862-873, 2021.

GALLUZZI, L. *et al.* Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. **Cell Death Differ**, v. 14, n. 7, p. 1237-43, 2007.

GALLUZZI, L. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death Differ**, v. 25, n. 3, p. 486-541, 2018.

GANDHI, L. *et al.* Phase I study of Navitoclax (ABT-263), a novel Bcl-2 family inhibitor, in patients with small-cell lung cancer and other solid tumors. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 7, p. 909-16, 2011.

GANESH, D. *et al.* Potentially Malignant Oral Disorders and Cancer Transformation. **Anticancer Res**, v. 38, n. 6, p. 3223-3229, 2018.

GARY, R. K.; KINDELL, S. M. Quantitative assay of senescence-associated beta-galactosidase activity in mammalian cell extracts. **Anal Biochem**, v. 343, n. 2, p. 329-34, 2005.

GASCO, M.; CROOK, T. The p53 network in head and neck cancer. **Oral Oncol**, v. 39, n. 3, p. 222-31, 2003.

GEORGAKOPOULOU, E. *et al.* Apoptosis or senescence? Which exit route do epithelial cells and fibroblasts preferentially follow? **Mech Ageing Dev**, v. 156, p. 17-24, 2016.

GHOLIZADEH, P. *et al.* Role of oral microbiome on oral cancers, a review. **Biomed Pharmacother**, v. 84, p. 552-558, 2016.

GIAM, M.; HUANG, D. C.; BOUILLET, P. BH3-only proteins and their roles in programmed cell death. **Oncogene**, v. 27 Suppl 1, p. S128-36, 2008.

GIOANNI, J. *et al.* Two new human tumor cell lines derived from squamous cell carcinomas of the tongue: establishment, characterization and response to cytotoxic treatment. **Eur J Cancer Clin Oncol**, v. 24, n. 9, p. 1445-55, 1988.

GRADA, A. *et al.* Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. **J Invest Dermatol**, v. 137, n. 2, p. e11-e16, 2017.

GUY, J. B. *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. **J Cancer Res Clin Oncol** v. 147, n. 7, p. 1905-1916, 2021.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discov**, v. 12, n. 1, p. 31-46, 2022.

HANAHAN, D.; COUSSENS, L. M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. **Cancer Cell**, v. 21, n. 3, p. 309-22, 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

_____. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, 2011.

HASSONA, Y. *et al.* Progression of genotype-specific oral cancer leads to senescence of cancer-associated fibroblasts and is mediated by oxidative stress and TGF-beta. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 6, p. 1286-95, 2013.

HAVIV, I. *et al.* Origin of carcinoma associated fibroblasts. **Cell Cycle**, v. 8, n. 4, p. 589-95, 2009.

HAYFLICK, L. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. **Exp Cell Res**, v. 37, p. 614-36, 1965.

HE, S.; SHARPLESS, N. E. Senescence in Health and Disease. **Cell**, v. 169, n. 6, p. 1000-1011, 2017.

HE, Y. *et al.* Using proteolysis-targeting chimera technology to reduce navitoclax platelet toxicity and improve its senolytic activity. **Nat Commun**, v. 11, n. 1, p. 1996, 2020.

HELMINK, B. A. *et al.* The microbiome, cancer, and cancer therapy. **Nat Med**, v. 25, n. 3, p. 377-388, 2019.

HIENTZ, K. *et al.* The role of p53 in cancer drug resistance and targeted chemotherapy. **Oncotarget**, v. 8, n. 5, p. 8921-8946, 2017.

HU, L. *et al.* Why Senescent Cells Are Resistant to Apoptosis: An Insight for Senolytic Development. **Front Cell Dev Biol**, v. 10, p. 822816, 2022.

HUNTER, K.; PARKINSON, E. K.; THAKKER, N. An overview of the molecular pathology of head and neck cancer, and its clinical implications. **Periodontol 2000**, v. 57, n. 1, p. 132-49, 2011.

IKUSHIMA, H.; MIYAZONO, K. TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 6, p. 415-24, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**. Brasil: INCA 2020.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **GLOBOCAN 2020: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2020** 2020.

JANUMYAN, Y. M. *et al.* Bcl-xL/Bcl-2 coordinately regulates apoptosis, cell cycle arrest and cell cycle entry. **EMBO J**, v. 22, n. 20, p. 5459-70, 2003.

JOLY, F. *et al.* A phase II study of Navitoclax (ABT-263) as single agent in women heavily pretreated for recurrent epithelial ovarian cancer: The MONAVI - GINECO study. **Gynecol Oncol**, v. 165, n. 1, p. 30-39, 2022.

KAEFER, A. *et al.* Mechanism-based pharmacokinetic/pharmacodynamic meta-analysis of navitoclax (ABT-263) induced thrombocytopenia. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 74, n. 3, p. 593-602, 2014.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **J Clin Invest**, v. 119, n. 6, p. 1420-8, 2009.

KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 5, p. 392-401, 2006.

KANG, M. H.; REYNOLDS, C. P. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 4, p. 1126-32, 2009.

KARNOUB, A. E.; WEINBERG, R. A. Chemokine networks and breast cancer metastasis. **Breast Dis**, v. 26, p. 75-85, 2006.

KAWAKAMI, K. *et al.* Alteration of the Bcl-2/Bax status of head and neck cancer cell lines by chemotherapeutic agents. **Anticancer Res**, v. 19, n. 5B, p. 3927-32, 1999.

KIM, E. M. *et al.* Nuclear and cytoplasmic p53 suppress cell invasion by inhibiting respiratory complex-I activity via Bcl-2 family proteins. **Oncotarget**, v. 5, n. 18, p. 8452-65, 2014.

KIM, S. Y. *et al.* Inhibition of the CXCR4/CXCL12 chemokine pathway reduces the development of murine pulmonary metastases. **Clin Exp Metastasis**, v. 25, n. 3, p. 201-11, 2008.

KIPPS, T. J. *et al.* A phase 2 study of the BH3 mimetic BCL2 inhibitor navitoclax (ABT-263) with or without rituximab, in previously untreated B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Leuk Lymphoma**, v. 56, n. 10, p. 2826-33, 2015.

KOEHLER, B. C. *et al.* Beyond cell death - antiapoptotic Bcl-2 proteins regulate migration and invasion of colorectal cancer cells in vitro. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e76446, 2013.

KRTOLICA, A. *et al.* Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 21, p. 12072-7, 2001.

LAGARES, D. *et al.* Targeted apoptosis of myofibroblasts with the BH3 mimetic ABT-263 reverses established fibrosis. **Sci Transl Med**, v. 9, n. 420, 2017.

LARAMORE, G. E. *et al.* Adjuvant chemotherapy for resectable squamous cell carcinomas of the head and neck: report on Intergroup Study 0034. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 23, n. 4, p. 705-13, 1992.

LEBLEU, V. S.; KALLURI, R. A peek into cancer-associated fibroblasts: origins, functions and translational impact. **Dis Model Mech**, v. 11, n. 4, 2018.

LEE, E. Y. *et al.* Human breast cancer cells display different sensitivities to ABT-263 based on the level of survivin. **Toxicol In Vitro**, v. 46, p. 229-236, 2018.

LETAI, A. BH3 domains as BCL-2 inhibitors: prototype cancer therapeutics. **Expert Opin Biol Ther**, v. 3, n. 2, p. 293-304, 2003.

LI, R. *et al.* ABT-737 synergizes with chemotherapy to kill head and neck squamous cell carcinoma cells via a Noxa-mediated pathway. **Mol Pharmacol**, v. 75, n. 5, p. 1231-9, 2009.

LI, Y.; CUI, J. T. Inhibition of Bcl-2 potentiates AZD-2014-induced anti-head and neck squamous cell carcinoma cell activity. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 477, n. 4, p. 607-613, 2016.

LIN, M. I.; SESSA, W. C. Antiangiogenic therapy: creating a unique "window" of opportunity. **Cancer Cell**, v. 6, n. 6, p. 529-31, 2004.

LIN, Q. H. *et al.* ABT-263 induces G1/G0-phase arrest, apoptosis and autophagy in human esophageal cancer cells in vitro. **Acta Pharmacol Sin**, v. 38, n. 12, p. 1632-1641, 2017.

LIOU, G. Y.; STORZ, P. Reactive oxygen species in cancer. **Free Radic Res**, v. 44, n. 5, p. 479-96, 2010.

LISANTI, M. P. *et al.* Hydrogen peroxide fuels aging, inflammation, cancer metabolism and metastasis: the seed and soil also needs "fertilizer". **Cell Cycle**, v. 10, n. 15, p. 2440-9, 2011.

LU, W. *et al.* Telomeres-structure, function, and regulation. **Exp Cell Res**, v. 319, n. 2, p. 133-41, 2013.

MAJI, S. *et al.* STAT3- and GSK3beta-mediated Mcl-1 regulation modulates TPF resistance in oral squamous cell carcinoma. **Carcinogenesis**, v. 40, n. 1, p. 173-183, 2019.

MARCOTTE, R.; LACELLE, C.; WANG, E. Senescent fibroblasts resist apoptosis by downregulating caspase-3. **Mech Ageing Dev**, v. 125, n. 10-11, p. 777-83, 2004.

MARTIN, D. *et al.* The head and neck cancer cell oncogenome: a platform for the development of precision molecular therapies. **Oncotarget**, v. 5, n. 19, p. 8906-23, 2014.

MATSUURA, K. *et al.* Metabolic Regulation of Apoptosis in Cancer. **Int Rev Cell Mol Biol**, v. 327, p. 43-87, 2016.

MELLO, F. W. *et al.* The synergistic effect of tobacco and alcohol consumption on oral squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. **Clin Oral Investig**, v. 23, n. 7, p. 2849-2859, 2019.

MELLO, F. W. *et al.* Prevalence of oral potentially malignant disorders: A systematic review and meta-analysis. **J Oral Pathol Med**, v. 47, n. 7, p. 633-640, 2018.

MONTERO, P. H.; PATEL, S. G. Cancer of the oral cavity. **Surg Oncol Clin N Am**, v. 24, n. 3, p. 491-508, 2015.

MYERS, J. N. *et al.* Targeted molecular therapy for oral cancer with epidermal growth factor receptor blockade: a preliminary report. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 128, n. 8, p. 875-9, 2002.

NEGI, A.; VOISIN-CHIRET, A. S. Strategies to Reduce the On-Target Platelet Toxicity of Bcl-xL Inhibitors: PROTACs, SNIPERs and Prodrug-Based Approaches. **Chembiochem**, v. 23, n. 12, p. e202100689, 2022.

OANCEA, M. *et al.* Apoptosis assays. **Methods Mol Med**, v. 129, p. 279-90, 2006.

OLIVER, C. L. *et al.* In vitro effects of the BH3 mimetic, (-)-gossypol, on head and neck squamous cell carcinoma cells. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 22, p. 7757-63, 2004.

OLTERSODORF, T. *et al.* An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. **Nature**, v. 435, n. 7042, p. 677-81, 2005.

OMAR, E. Current concepts and future of noninvasive procedures for diagnosing oral squamous cell carcinoma--a systematic review. **Head Face Med**, v. 11, p. 6, 2015.

ORD, R. A.; BLANCHAERT, R. H., JR. Current management of oral cancer. A multidisciplinary approach. **J Am Dent Assoc**, v. 132 Suppl, p. 19S-23S, 2001.

OW, T. J. *et al.* Optimal targeting of BCL-family proteins in head and neck squamous cell carcinoma requires inhibition of both BCL-xL and MCL-1. **Oncotarget**, v. 10, n. 4, p. 494-510, 2019.

PAI, S. I.; WESTRA, W. H. Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. **Annu Rev Pathol**, v. 4, p. 49-70, 2009.

PAN, C. *et al.* Comparative proteomic phenotyping of cell lines and primary cells to assess preservation of cell type-specific functions. **Mol Cell Proteomics**, v. 8, n. 3, p. 443-50, 2009.

PARKINSON, E. K. Telomerase as a novel and potentially selective target for cancer chemotherapy. **Ann Med**, v. 35, n. 7, p. 466-75, 2003.

_____. Senescence as a modulator of oral squamous cell carcinoma development. **Oral Oncol**, v. 46, n. 12, p. 840-53, 2010.

PARKINSON, E. K.; FITCHETT, C.; CERESER, B. Dissecting the non-canonical functions of telomerase. **Cytogenet Genome Res**, v. 122, n. 3-4, p. 273-80, 2008.

PENA, J. C. *et al.* Bcl-xL and Bcl-2 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Cancer**, v. 85, n. 1, p. 164-70, 1999.

PLACZEK, W. J. *et al.* A survey of the anti-apoptotic Bcl-2 subfamily expression in cancer types provides a platform to predict the efficacy of Bcl-2 antagonists in cancer therapy. **Cell Death Dis**, v. 1, p. e40, 2010.

POLYAK, K.; HAVIV, I.; CAMPBELL, I. G. Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. **Trends Genet**, v. 25, n. 1, p. 30-8, 2009.

PRIME, S. S. *et al.* Fibroblast activation and senescence in oral cancer. **J Oral Pathol Med**, v. 46, n. 2, p. 82-88, 2017.

PRIME, S. S. *et al.* Early genetic and functional events in the pathogenesis of oral cancer. **Radiat Oncol Investig**, v. 5, n. 3, p. 93-6, 1997.

PUGLISI, M. *et al.* A Phase I study of the safety, pharmacokinetics and efficacy of navitoclax plus docetaxel in patients with advanced solid tumors. **Future Oncol**, v. 17, n. 21, p. 2747-2758, 2021.

QIAN, B. Z.; POLLARD, J. W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 39-51, 2010.

REDONDO, M. *et al.* Expression of the antiapoptotic proteins clusterin and bcl-2 in laryngeal squamous cell carcinomas. **Tumour Biol**, v. 27, n. 4, p. 195-200, 2006.

REGEZI, J. A.; SCIUBBA, J.; JORDAN, R. C. **Oral pathology: clinical pathologic correlations**. Elsevier Health Sciences, 2016.

REICHART, P. A.; PHILIPSEN, H. P. Oral erythroplakia--a review. **Oral Oncol**, v. 41, n. 6, p. 551-61, 2005.

REX, M. R. *et al.* Targeting mitochondrial metabolism in acute myeloid leukemia. **Leuk Lymphoma**, v. 63, n. 3, p. 530-537, 2022.

ROBERTS, A. W. *et al.* Phase 1 study of the safety, pharmacokinetics, and antitumour activity of the BCL2 inhibitor navitoclax in combination with rituximab in patients with relapsed or refractory CD20+ lymphoid malignancies. **Br J Haematol**, v. 170, n. 5, p. 669-78, 2015.

RUDIN, C. M. *et al.* Phase II study of single-agent navitoclax (ABT-263) and biomarker correlates in patients with relapsed small cell lung cancer. **Clin Cancer Res**, v. 18, n. 11, p. 3163-9, 2012.

SALO, A. *et al.* The bcl-2 gene status of human head and neck cancer cell lines. **Acta Otolaryngol Suppl**, v. 529, p. 233-6, 1997.

SAMRA, B. *et al.* Venetoclax-Based Combinations in Acute Myeloid Leukemia: Current Evidence and Future Directions. **Front Oncol**, v. 10, p. 562558, 2020.

SANTI, A.; KUGERATSKI, F. G.; ZANIVAN, S. Cancer Associated Fibroblasts: The Architects of Stroma Remodeling. **Proteomics**, v. 18, n. 5-6, p. e1700167, 2018.

SCHOSSERER, M.; GRILLARI, J.; BREITENBACH, M. The Dual Role of Cellular Senescence in Developing Tumors and Their Response to Cancer Therapy. **Front Oncol**, v. 7, p. 278, 2017.

SCULLY, C.; BAGAN, J. Oral squamous cell carcinoma overview. **Oral Oncol**, v. 45, n. 4-5, p. 301-8, 2009.

SCULLY, C.; FIELD, J. K.; TANZAWA, H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 2: chromosomal aberrations. **Oral Oncol**, v. 36, n. 4, p. 311-27, 2000.

SEBASTIAN, S.; GRAMMATICA, L.; PARADISO, A. Telomeres, telomerase and oral cancer (Review). **Int J Oncol**, v. 27, n. 6, p. 1583-96, 2005.

SERRANO-GOMEZ, S. J.; MAZIVEYI, M.; ALAHARI, S. K. Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications. **Mol Cancer**, v. 15, p. 18, 2016.

SHIGA, K. *et al.* Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth. **Cancers (Basel)**, v. 7, n. 4, p. 2443-58, 2015.

SHOEMAKER, A. R. *et al.* Activity of the Bcl-2 family inhibitor ABT-263 in a panel of small cell lung cancer xenograft models. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 11, p. 3268-77, 2008.

SMITHA, T.; MOHAN, C. V.; HEMAVATHY, S. Prevalence of human papillomavirus16 DNA and p16(INK4a) protein in oral squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. **J Oral Maxillofac Pathol**, v. 21, n. 1, p. 76-81, 2017.

SOUERS, A. J. *et al.* ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. **Nat Med**, v. 19, n. 2, p. 202-8, 2013.

SPAW, M.; ANANT, S.; THOMAS, S. M. Stromal contributions to the carcinogenic process. **Mol Carcinog**, v. 56, n. 4, p. 1199-1213, 2017.

STANTON, M. J. *et al.* Autophagy control by the VEGF-C/NRP-2 axis in cancer and its implication for treatment resistance. **Cancer Res**, v. 73, n. 1, p. 160-71, 2013.

SUND, M.; KALLURI, R. Tumor stroma derived biomarkers in cancer. **Cancer Metastasis Rev**, v. 28, n. 1-2, p. 177-83, 2009.

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

TIMUCIN, A. C.; BASAGA, H.; KUTUK, O. Selective targeting of antiapoptotic BCL-2 proteins in cancer. **Med Res Rev**, v. 39, n. 1, p. 146-175, 2019.

TOCHHAWNG, L. *et al.* Redox regulation of cancer cell migration and invasion. **Mitochondrion**, v. 13, n. 3, p. 246-53, 2013.

TOLCHER, A. W. *et al.* Safety, efficacy, and pharmacokinetics of navitoclax (ABT-263) in combination with erlotinib in patients with advanced solid tumors. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 76, n. 5, p. 1025-32, 2015a.

TOLCHER, A. W. *et al.* Safety, efficacy, and pharmacokinetics of navitoclax (ABT-263) in combination with irinotecan: results of an open-label, phase 1 study. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 76, n. 5, p. 1041-9, 2015b.

TOMASEK, J. J. *et al.* Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 3, n. 5, p. 349-63, 2002.

TRASK, D. K. *et al.* Expression of Bcl-2 family proteins in advanced laryngeal squamous cell carcinoma: correlation with response to chemotherapy and organ preservation. **Laryngoscope**, v. 112, n. 4, p. 638-44, 2002.

TROTTA, A. P.; CHIPUK, J. E. Mitochondrial dynamics as regulators of cancer biology. **Cell Mol Life Sci**, v. 74, n. 11, p. 1999-2017, 2017.

TSE, C. *et al.* ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. **Cancer Res**, v. 68, n. 9, p. 3421-8, 2008.

TUOMAINEN, K. *et al.* High-throughput compound screening identifies navitoclax combined with irradiation as a candidate therapy for HPV-negative head and neck squamous cell carcinoma. **Sci Rep**, v. 11, n. 1, p. 10, 2021.

UM, H. D. Bcl-2 family proteins as regulators of cancer cell invasion and metastasis: a review focusing on mitochondrial respiration and reactive oxygen species. **Oncotarget**, v. 7, n. 5, p. 5193-203, 2016.

VASSILAKOPOULOU, M.; PSYRRI, A.; ARGIRIS, A. Targeting angiogenesis in head and neck cancer. **Oral Oncol**, v. 51, n. 5, p. 409-15, 2015.

VELA, L.; MARZO, I. Bcl-2 family of proteins as drug targets for cancer chemotherapy: the long way of BH3 mimetics from bench to bedside. **Curr Opin Pharmacol**, v. 23, p. 74-81, 2015.

VICHAJ, V.; KIRTIKARA, K. J. N. P. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. v. 1, n. 3, p. 1112-1116, 2006.

VILLALOBOS-ORTIZ, M. *et al.* BH3 profiling discriminates on-target small molecule BH3 mimetics from putative mimetics. **Cell Death Differ**, v. 27, n. 3, p. 999-1007, 2020.

VOGLER, M. *et al.* Bcl-2 inhibitors: small molecules with a big impact on cancer therapy. **Cell Death Differ**, v. 16, n. 3, p. 360-7, 2009.

WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncol**, v. 45, n. 4-5, p. 309-16, 2009.

WARNAKULASURIYA, S.; ARIYAWARDANA, A. Malignant transformation of oral leukoplakia: a systematic review of observational studies. **J Oral Pathol Med**, v. 45, n. 3, p. 155-66, 2016.

WEINBERG, R. A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. **Cell**, v. 81, n. 3, p. 323-30, 1995.

WILDE, L. *et al.* Metabolic coupling and the Reverse Warburg Effect in cancer: Implications for novel biomarker and anticancer agent development. **Semin Oncol**, v. 44, n. 3, p. 198-203, 2017.

WONG, M. *et al.* Navitoclax (ABT-263) reduces Bcl-x(L)-mediated chemoresistance in ovarian cancer models. **Mol Cancer Ther**, v. 11, n. 4, p. 1026-35, 2012.

XIONG, H. *et al.* Studying navitoclax, a targeted anticancer drug, in healthy volunteers-ethical considerations and risk/benefit assessments and management. **Anticancer Res**, v. 34, n. 7, p. 3739-46, 2014.

XIONG, L. *et al.* BCL-2 inhibition impairs mitochondrial function and targets oral tongue squamous cell carcinoma. **Springerplus**, v. 5, n. 1, p. 1626, 2016.

YAMAGUCHI, R.; LARTIGUE, L.; PERKINS, G. Targeting Mcl-1 and other Bcl-2 family member proteins in cancer therapy. **Pharmacol Ther**, v. 195, p. 13-20, 2019.

YANG, I. H. *et al.* ABT-263 exhibits apoptosis-inducing potential in oral cancer cells by targeting C/EBP-homologous protein. **Cell Oncol (Dordr)**, v. 42, n. 3, p. 357-368, 2019.

YOSEF, R. *et al.* Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. **Nat Commun**, v. 7, p. 11190, 2016.

YUAN, S.; NORGDARD, R. J.; STANGER, B. Z. Cellular Plasticity in Cancer. **Cancer Discov**, v. 9, n. 7, p. 837-851, 2019.

ZHANG, J.; LIU, J. Tumor stroma as targets for cancer therapy. **Pharmacol Ther**, v. 137, n. 2, p. 200-15, 2013.

ZHU, Y. *et al.* Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. **Aging Cell**, v. 15, n. 3, p. 428-35, 2016.

APÊNDICES

Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) a participar da pesquisa intitulada "**Estabelecimento de cultura primária de fibroblastos humanos a partir de tecido gengival**". Este documento visa providenciar informações sobre a pesquisa a qual você está sendo convidado (a) a participar. Além disso, visa firmar um acordo, por escrito, mediante o qual você autoriza a participação com pleno conhecimento da natureza dos procedimentos, sem qualquer coação. Sua participação nesse estudo é importante, mas a decisão de participar é voluntária, o que significa que você terá o direito de decidir se deseja ou não participar. Você poderá retirar seu consentimento de participação a qualquer momento, sem prejuízos de qualquer natureza, bastando para isso fazer contato por e-mail e/ou telefone que estão no fim deste termo.

OBJETIVO DO ESTUDO

Esta pesquisa visa estabelecer uma cultura primária de fibroblastos humanos a partir de tecido gengival. A sua participação na pesquisa ocorrerá através da doação do tecido proveniente de cirurgia de cunha distal, gengivectomia ou qualquer outra cirurgia bucal com necessidade previamente determinada e que resultará em tecido gengival que seria descartado ao final do procedimento. O tecido removido será processado no Laboratório de Virologia Aplicada (LVA) para que os fibroblastos (células que estão presentes em abundância na gengiva) sobrevivam em meio de cultura e sejam congelados para serem empregados em pesquisas futuras.

PROCEDIMENTOS

- Localizar pacientes com necessidade de procedimento cirúrgico de cunha distal, gengivectomia ou outros na clínica de pós-graduação do Centro de Ensino e Pesquisa em Implantes Dentários (CEPID), Departamento de Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).
- Explicar os propósitos da presente pesquisa aos voluntários, convidando-os a participar.
- Solicitar a leitura e preenchimento do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
- Processar o tecido gengival humano explantado em condições adequadas.
- Estabelecer uma cultura primária de fibroblastos a partir do tecido explantado.
- Cultivar a linhagem de cultura primária dos fibroblastos humanos até a sexta passage.
- Congelar as células da cultura primária estabelecida em condições adequadas.

RISCOS E DESCONFORTOS

Esta pesquisa não envolve riscos ou desconforto físicos ADICIONAIS, uma vez que a necessidade de cirurgia foi previamente determinada. Caso você sinta algum desconforto, pedimos que use a medicação prescrita pelo cirurgião-dentista que realizou o procedimento cirúrgico e nos comunique para que possamos ouvi-lo. Garantimos que será mantida a confidencialidade e o anonimato das informações, portanto, o seu nome não será divulgado nas publicações em eventos científicos e/ou artigos oriundos da pesquisa. Existe, entretanto, o risco de quebra de sigilo, ainda que involuntário e não intencional.

ARMAZENAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO

Informamos que estamos seguindo todas as orientações da Resolução 441/2011 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) no que diz respeito ao armazenamento e à utilização de material biológico humano com finalidade de pesquisa. Os dados fornecidos, coletados e obtidos a

partir deste projeto poderão ser utilizados em pesquisas futuras. O material biológico coletado será armazenado em local de acesso restrito, nas dependências do LVA, localizado no Centro de Ciências Biológicas da UFSC. As informações que poderão ser obtidas a partir da utilização do material biológico estão relacionadas ao estudo de eventos/respostas celulares e da expressão de genes/proteínas. Será garantido o seu acesso aos resultados das pesquisas mediante contato com o pesquisador responsável conforme descrito ao final deste termo. A cessão dos direitos sobre o material armazenado poderá ser realizada em qualquer tempo por você ou, em caso de óbito/condição incapacitante, por seus sucessores ou outros por você indicados.

ASPECTOS ÉTICOS

Informamos que todas as orientações da Resolução 466/2012 do CNS estão sendo seguidas. A sua participação no estudo não acarretará custos para o (a) senhor (a) e não será disponibilizada nenhuma compensação financeira adicional. Diante de eventuais custos adicionais e/ou danos decorrentes da pesquisa, desde que devidamente comprovados, você será ressarcido e/ou indenizado conforme garante a Resolução 466/2012. Este documento será elaborado em duas vias e você receberá uma cópia deste termo assinado e rubricado em todas as suas folhas.

INFORMAÇÕES PARA CONTATO

Em qualquer momento, você poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável (Ariadne Cristiane Cabral da Cruz) pelo telefone (48) 98406-1859, pelo e-mail ariadnecruz@hotmail.com ou pelo endereço Campus Florianópolis, Delfino Conti, s/n – Trindade, Departamento de Odontologia, Florianópolis-SC. Dúvidas sobre a pesquisa envolvendo princípios éticos poderão ser questionadas ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFSC localizado no Prédio Reitoria II, 4º andar, sala 401, Rua Desembargador Vitor Lima, nº 222, Trindade, Florianópolis/SC. Telefone para contato (48) 3721-6094, cep.propesq@contato.ufsc.br. Horário de funcionamento de 2ª a 6ª feira das 10h00 às 12h00 e das 16h00 às 18h00.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Eu, _____, portador do RG de número _____, fui informado (a) dos objetivos da pesquisa de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim o desejar. Em caso de dúvidas, poderei fazer contato com a pesquisadora Ariadne Cristiane Cabral da Cruz. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas. Declaro que concordo em participar deste estudo. Se não há qualquer dúvida em relação a esta pesquisa e se concorda em participar, solicitamos que assine este Termo de Consentimento. Agradecemos a sua atenção e sua colaboração, colocamo-nos a sua disposição para quaisquer esclarecimentos.

Florianópolis, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Participante da Pesquisa/Responsável Legal

Ariadne Cristiane Cabral da Cruz – Pesquisadora/Docente de Odontologia

ANEXOS

Anexo A - Aprovação do projeto no comitê de ética (CEPSH-UFSC)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estabelecimento de cultura primária de fibroblastos humanos a partir de tecido gengival.

Pesquisador: ARIADNE CRISTIANE CABRAL DA CRUZ

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 22712619.5.0000.0121

Instituição Proponente: Departamento de Odontologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.700.997

Apresentação do Projeto:

" Estabelecimento de cultura primária de fibroblastos humanos a partir de tecido gengival.". A pesquisa se baseia na obtenção de amostras de tecido gengival e estabelecimento de culturas primárias de fibroblastos humanos a partir de tecido de dez voluntários, não havendo necessidade de cegamento ou desenhos experimentais. O emprego das técnicas de cultivo celular apresenta inúmeras vantagens, como a possibilidade de controlar o ambiente físico-químico da análise, tais como pH, temperatura e osmolaridade; controlar as condições fisiológicas, através do controle das concentrações de nutrientes; permitir homogeneidade da linhagem celular, utilizando-se meios seletivos; realizar a caracterização celular, através de métodos enzimáticos e citoquímicos; conservar as células mantendo-as em nitrogênio líquido; economizar reagentes; controlar a concentração e o tempo, definindo-se assim doses terapêuticas; e principalmente reduzir o uso de animais, já que algumas vezes o teste em cultura celular mostra que não é interessante proceder a testes posteriores, como análise em animais e humanos, além de que certos tipos de teste podem substituir o emprego de animais

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Estabelecer culturas primárias de fibroblastos a partir de tecido gengival humano.

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vítor Lima, nº 222, sala 401
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: 3.700.997

Objetivo Secundário:

Etapa 1:

- Localizar dez pacientes na clínica de Pós-graduação do Centro de Ensino e Pesquisa em Implantes Dentários (CEPID), Departamento de Odontologia, Centro de Ciências da Saúde, que necessite de um procedimento de cunha distal;
- Explicar aos pacientes os objetivos e etapas da presente pesquisa e solicitar que ele autorize a utilização deste tecido removido da cunha distal (explante), que seria descartado;- Obter as amostras de tecido gengival humano.

Etapa 2:

- Processar os tecidos (explantes) em condições adequadas para estabelecer culturas primárias de fibroblastos;
- Cultivar as linhagens de cultura primária de fibroblastos humanos até a sexta passagem.

Etapa 3:

- Congelar os fibroblastos humanos da cultura primária estabelecida e utilizá-los posteriormente para avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade de produtos e compostos em fase experimental.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A pesquisa não envolve riscos nem desconfortos ADICIONAIS ao paciente, uma vez que o tecido gengival humano que será empregado para estabelecer a cultura primária será obtido de procedimentos cirúrgicos, em pacientes que necessitem deste procedimento e no qual este tecido seria posteriormente descartado.

Benefícios:

As culturas primárias estabelecidas poderão ser empregadas futuramente em ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade preliminares, reduzindo e em alguns casos eliminando a utilização de animais nas pesquisas. Além disso, a utilização dessas células em pesquisas pode contribuir

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
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: 3.700.997

para o conhecimento generalizável acerca dos ensaios realizados, especialmente no que tange o uso de produtos e fármacos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata o presente de um projeto de pesquisa da Profa. Dra. Ariadne Cristiane Cabral da Cruz do Departamento de Odontologia da UFSC. Projeto que visa estudar técnicas de cultivo celular, empregadas para vários propósitos dentro da área biotecnológica, sendo um deles os testes de citotoxicidade e genotoxicidade de produtos e fármacos. A realização deste trabalho permitirá o estabelecimento de uma cultura primária de fibroblastos a partir do tecido gengival humano. A linhagem celular estabelecida poderá ser empregada para testes de citotoxicidade e genotoxicidade de produtos e fármacos, diminuindo e em alguns casos eliminando o uso de animais em pesquisas desta natureza. O tema tem relevância científica para a área, entretanto não se encontra devidamente constituído uma vez que o propósito da pesquisa é cultivo de células a partir de amostras de tecido gengival de dez voluntários para posterior armazenamento e utilização em pesquisas futuras. O tema tem relevância científica, a documentação está completa e o TCLE apresentado além de cumprir todas as exigências da Resolução CNS nº466/12 e suas complementares, também atende a Resolução CNS nº441/12 que trata do uso de materiais biológicos para posterior armazenamento em Bio Banco e seu uso em pesquisas futuras. Assim, recomendamos a sua aprovação.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados os seguintes documentos obrigatórios:

- 1) PB - INFORMAÇÕES BÁSICAS DO PROJETO;
- 2) PROJETO DE PESQUISA;
- 3) TCLE;
- 4) DECLARAÇÃO DOS PESQUISADORES;
- 5) FOLHA DE ROSTO (ASSINADA PELA CHEFE DO DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA)

O TCLE atende na íntegra as Resoluções CNS nº466/12 e nº441/12.

Recomendações:

Por recomendação da CONEP, retirar do TCLE a palavras doação do tecido , substituindo ceder ou fornecer o material proveniente de cirurgia de cunha distal, ou qualquer outra cirurgia bucal. Cabe esclarecer que a legislação brasileira tem regras bem definidas para a doação de células, tecido e

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
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: 3.700.997

órgãos para a assistência à saúde, mas não para o cenário da pesquisa. Desta forma, o participante de pesquisa não “doa” o material biológico, mas o cede ou o fornece para a pesquisa (consultar o MANUAL DE ORIENTAÇÃO: PENDÊNCIAS FREQUENTES EM PROTOCOLOS DE PESQUISA CLÍNICA).

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram detectadas pendências ou inadequações neste projeto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1437266.pdf	24/10/2019 08:37:34		Aceito
Outros	RESPOSTA_AS_PENDENCIAS.docx	24/10/2019 08:35:51	ARIADNE CRISTIANE CABRAL	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	24/10/2019 08:35:29	ARIADNE CRISTIANE CABRAL DA CRUZ	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_pesquisa.docx	24/10/2019 08:35:15	ARIADNE CRISTIANE CABRAL DA CRUZ	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_pesquisadores.doc	26/09/2019 15:49:19	ARIADNE CRISTIANE CABRAL	Aceito
Folha de Rosto	Folha_Rosto.pdf	26/09/2019 15:46:25	ARIADNE CRISTIANE CABRAL	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FLORIANOPOLIS, 12 de Novembro de 2019

**Assinado por:
Maria Luiza Bazzo
(Coordenador(a))**

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
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: 3.700.997

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Anexo B - Artigos científicos aceitos ou publicados durante o período do doutorado (agosto de 2018 até agosto de 2022).

Dentomaxillofacial Radiology (2018) 47, 20180112
 © 2018 The Authors. Published by the British Institute of Radiology
birpublications.org/dmfr

SYSTEMATIC REVIEW

Prevalence of radiographic findings on jaws exposed to antiresorptive therapy: a meta-analysis

¹Kamile Leonardi Dutra, ¹Letícia Fernanda Haas, ²Glaucia S Zimmermann, ¹Gilberto Melo, ³Mariana Comparotto Minamisako, ⁴Carlos Flores-Mir and ²Márcio Corrêa

¹School of Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil; ²Department of Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil; ³CEPON, Oncological Research Center, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil; ⁴School of Dentistry, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Alberta, Edmonton, AB, Canada

Objectives: Determine the prevalence of radiographic findings (RF) on both jaws among patients receiving antiresorptive bone therapy.

Methods: Six electronic databases and partial grey literature were searched. Data was collected based on predetermined criteria. The key features from the included studies were extracted. The MASTARI tool assessed the potential risk of bias (RoB) among the studies, while the GRADE approach determined the level of evidence.

Results: 29 studies were identified and included in the qualitative analysis, totalling 1133 patients. 27 studies had sufficient data to be included in a series of meta-analysis reporting 12 types of radiographic findings, and were split in two groups based on their study design. G1 comprised descriptive observational studies and G2 analytical cross-sectional studies. Two studies presented a high RoB, 16 had a moderate RoB, and 11 had low RoB. The overall level of evidence identified was very low. The most frequent RF were mixed lytic-sclerotic areas (73.88%), followed by osteolytic changes (66.18%), osteosclerosis (65.75%), cortical bone erosion (50.83%), persisting alveolar socket (45.77%), periodontal ligament (PDL) widening (44.69%), and inferior alveolar canal (IAC) involvement (43.40%). Less frequent, but equally important, were the periosteal reaction (34.27%), lamina dura thickening (32.97%), sequestrum (29.94%), pathologic fracture (20.90%), and density confluence of cortical and cancellous bone (16.61%). 20 patients reported no signs.

Conclusions: RF prevalence was high and mainly included mixed lytic-sclerotic areas, osteolysis, osteosclerosis, cortical bone erosion, persisting alveolar socket, PDL-widening, IAC-involvement. Due to the very low level of evidence (GRADE) caution should be exercised when considering these findings.

Dentomaxillofacial Radiology (2018) 47, 20180112. doi: [10.1259/dmfr.20180112](https://doi.org/10.1259/dmfr.20180112)

Cite this article as: Dutra KL, Haas LF, Zimmermann GS, Melo G, Minamisako MC, Flores-Mir C, et al. Prevalence of radiographic findings on jaws exposed to antiresorptive therapy: a meta-analysis. *Dentomaxillofac Radiol* 2018; 47: 20180112.

Keywords: antiresorptive Agents; dental radiography; jaw; systematic review

Introduction

Antiresorptive bone therapy consists of regularly administration of antiresorptive drugs, such as bisphosphonates (BP). BP are synthetic drugs commonly prescribed intravenously for treating many osseous diseases involving lytic bone, such as multiple

myeloma, bone metastasis of solid tumors, osteitis deformans (Paget's disease), and osteogenesis imperfecta, as well as prescribed orally for treatment and prevention of osteoporosis.^{1,2} These drugs are potent inhibitors of osteoclast-mediated bone resorption acting through the inhibition of bone remodeling capability, and indirectly preventing the loss of bone mass, pathologic fractures, pain or hypocalcemia; all

Correspondence to: Kamile Leonardi Dutra, E-mail: kamileldutra@gmail.com
 Received 19 March 2018; revised 08 October 2018; accepted 09 October 2018

Journal section: Oral Medicine and Pathology
 Publication Types: Review

doi:10.4317/jced.55133
<http://dx.doi.org/10.4317/jced.55133>

Actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma: Literature review and new data from Brazil

Fernanda-Weber Mello ¹, Gilberto Melo ¹, Filipe Modolo ², Elena-Riet-Correa Rivero ²

¹ Postgraduate Program in Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

² Department of Pathology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

Correspondence:
 Department of Pathology
 Health Sciences Center
 Federal University of Santa Catarina
 University Campus, Trindade
 Florianópolis, 88.040-370, SC, Brazil
riet.elena@gmail.com

Mello FW, Melo G, Modolo F, Rivero ERC. Actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma: Literature review and new data from Brazil. J Clin Exp Dent. 2019;11(1):e62-9.
<http://www.medicinaoral.com/odo/volumenes/v11i1/jcedv11i1p62.pdf>

Received: 10/07/2018
 Accepted: 10/12/2018

Article Number: 55133 <http://www.medicinaoral.com/odo/indice.htm>
 © Medicina Oral S. L. C.I.F. B 96689336 - eISSN: 1989-5488
 eMail: jced@jced.es
 Indexed in:
 Pubmed
 Pubmed Central® (PMC)
 Scopus
 DOI® System

Abstract

Background: To investigate the prevalence of malignant and potentially malignant lesions of the lip in an oral pathology service and to compare these data with a literature review.

Material and Methods: A total of 3173 biopsy reports and histopathological records were analyzed. Cases with a histological diagnosis of actinic cheilitis (AC) with or without epithelial dysplasia, in situ carcinoma, or lip squamous cell carcinoma (LSCC) were included. A comprehensive literature review was conducted to investigate the prevalence of AC and/or LSCC.

Results: 124 cases (3.91%) were included, 75 (60.5%) had some degree of epithelial dysplasia and 31 (25.0%) were LSCC. Clinically, most of the lesions were diagnosed as AC (50.8%); however, eight cases clinically reported as AC were histologically diagnosed as LSCC. Regarding clinical characteristics, most individuals were fair-skinned male, with mean age of 54.3±12.3 years, and with a history of long-term solar exposure. Furthermore, 18 articles were selected from the literature, showing that the lower lip was predominantly affected and that most individuals were males, fair-skinned, and older than 40 years.

Conclusions: Since most of the cases diagnosed clinically as AC presented some degree of epithelial dysplasia, it is important to emphasize the value of biopsy and the histological evaluation of this lesion.

Key words: Actinic cheilitis, Precancerous conditions, In situ carcinoma, Oral diagnosis, Mouth neoplasms.

Introduction

Oral cancer is one of the most frequent malignant neoplasia among Brazilian individuals, this malignancy is the fifth more frequent among Brazilian males and the twelfth among Brazilian females (1). In 2018, 11.2 new cases were estimated per 100.000 male Brazilians (1);

furthermore, the survival rate of this disease is approximately 50% in five years (2). Considering only lip squamous cell carcinoma (LSCC), the survival rate increases; however, the treatment can have several consequences, especially whenever surgery is necessary, since it can cause deformation and, consequently, affect the patient's

Prevalence of oral mucosal disorders during pregnancy: A systematic review and meta-analysis

João Victor Silva Bett¹  | Elis Ângela Batistella¹  | Gilberto Melo¹  |
 Etiene de Andrade Munhoz² | Carolina Amália Barcellos Silva³ |
 Eliete Neves da Silva Guerra⁴  | André Luís Porporatti^{1,2}  | Graziela De Luca Canto^{1,2} 

¹Brazilian Centre for Evidence-Based Research, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

²Department of Dentistry, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

³Department of Morphological Sciences, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

⁴Laboratory of Oral Histopathology, Health Sciences Faculty, University of Brasília (UNB), Brasília, Brazil

Correspondence

João Victor Silva Bett, Federal University of Santa Catarina, University Campus, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.
 Email: jvsbett@gmail.com

Objective: To assess the prevalence of oral mucosal disorders during pregnancy.

Methods: Observational studies were selected by two reviewers in a two-phase process. Search strategies were applied at CINAHL, LILACS, LIVIVO, PubMed, Scopus, Web of Science, Google Scholar, OpenGrey, and ProQuest. The risk of bias was assessed using the Joanna Briggs Institute's Critical Appraisal Checklist for Studies Reporting Prevalence Data. Synthesis of results was calculated by the software R Statistics version 3.5.1 (The R Foundation, Vienna, Austria). Confidence in cumulative evidence was assessed by using the Grading of Recommendations Assessment, Development, and Evaluation (GRADE) criteria.

Results: Fifteen studies met the eligibility criteria and were selected for qualitative synthesis and meta-analysis, of which 5935 participants were enrolled. The overall prevalence of oral mucosal disorders was 11.8%. Gingival hyperplasia (17.1%), morsicatio buccarum (10%), oral candidiasis (4.4%), pyogenic granuloma (3%), and benign migratory glossitis (2.8%) were the most prevalent lesions. The overall risk of bias was considered moderate, and the quality of evidence was very low.

Conclusion: Disorders of the oral mucosa were present in approximately 1 out of 10 pregnant women. Gingival hyperplasia was the most prevalent lesion. Further studies should apply homogeneous methodology to improve the quality of evidence.

KEYWORDS

evidence-based dentistry, oral disorders, pregnancy, systematic review

1 | INTRODUCTION

During pregnancy period, female's body passes through many alterations for the fetus development. Some of these changes increase the susceptibility of disorders in the organism. Oral complications are mostly related to immune and hormonal changes.¹

The innate immune defense of periodontal tissues is affected by the reduction of peripheral neutrophils activity, thereby facilitating the inflammatory state of oral mucosa.² Progesterone, estrogen, and chorionic gonadotropin are related to increased vascular permeability and proliferation.³ Augmented concentration of chemical mediators, such as prostaglandins, and changes in the fibrinolytic system

may lead to a proinflammatory state.⁴ The association between increase of hormonal levels and chemical factors can lead to modifications in vascular response and connective tissue turnover of the periodontium that can explain a higher inflammation during pregnancy.² Augmented hormonal levels can be related to changes in the oral microbiota during pregnancy, with an increased proportion of anaerobic and aerobic bacteria, such as *Bacteroidesmelaninogenicus*, *Prevotellaintermedia*, and *Porphyromonasgingivalis*.^{1,5}

Stress and anxiety during pregnancy contribute to poor oral hygiene, potentially resulting in an increase in the number of intraoral lesions.^{6,7}

The most prevalent oral lesions during pregnancy cited in the literature are pyogenic granuloma, gingival hyperplasia, oral

Received: 6 August 2018 | Revised: 2 January 2019 | Accepted: 21 February 2019
 DOI: 10.1111/joor.12785

REVIEW

WILEY Journal of ORAL
REHABILITATION

Association between sleep bruxism and anxiety symptoms in adults: A systematic review

Helena Polmann¹  | Fabio Luiz Domingos¹ | Gilberto Melo¹  |
 Juliana Stuginski-Barbosa²  | Eliete Neves da Silva Guerra³  | André Luís Porporatti¹  |
 Bruce D. Dick⁴ | Carlos Flores-Mir⁴  | Graziela De Luca Canto¹ 

¹Department of Dentistry, Brazilian Centre for Evidence-Based Research, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil

²Bauru School of Dentistry, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil

³Laboratory of Oral Histopathology, Health Sciences Faculty, University of Brasília (UnB), Brasília, Brazil

⁴Faculty of Medicine and Dentistry, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada

Correspondence

Helena Polmann, Department of Dentistry, Brazilian Centre for Evidence-Based Research, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil.
 Email: hpolmann@hotmail.com

Funding information

Helena Polmann is supported by CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel), Ministry of Education, Brazil, under the grant number 1804059. Gilberto Melo is supported by FAPESC (Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina), Ministry of Education, Brazil, under the grant number 88887.200723/2018-00.

Summary

Background: The purpose of this systematic review was to evaluate the association between sleep bruxism (SB) and anxiety symptoms in adults.

Methods: A systematic review was performed and studies assessing SB by means of questionnaires, clinical examination and/or polysomnography (PSG), and validated questionnaires to assess anxiety, were included. Search strategies were developed for seven main electronic databases. Risk of bias was assessed using the Joanna Briggs Institute Critical Appraisal Checklist for Analytical Cross-Sectional Studies, and confidence in cumulative evidence was evaluated using the Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation criteria.

Results: Eight cross-sectional studies were included, of which five were judged with low and three with moderate risk of bias. No association with SB was observed in three studies that investigated generic levels of anxiety, while other two papers that evaluated generic anxiety levels through the State-Trait Anxiety Inventory (STAI) found a positive association with probable and definite SB in both STAI-1 and STAI-2 subscales. Only one study evaluated dental anxiety in particular and an association with probable SB was observed regarding very anxious or extremely anxious scores. Two studies assessed specific symptoms of anxiety using the panic-agoraphobic spectra evaluation (PAS-SR) questionnaire. Significantly higher PAS-SR total scores were observed in both studies with regard to SB. No study with definitive assessment of SB was identified.

Conclusion: Current literature is controversial regarding an association between SB and generic symptoms of anxiety in adults. It seems that some specific symptoms of the anxiety disorders spectrum might be associated with probable SB.

KEYWORDS

anxiety, evidence-based dentistry, sleep bruxism, systematic review



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery

journal homepage: www.jcmfs.com

Review

Prevalence of odontogenic cysts and tumors associated with impacted third molars: A systematic review and meta-analysis

Fernanda Weber Mello^a, Gilberto Melo^a, Pedro Vitali Kammer^b, Paul M. Speight^c, Elena Riet Correa Rivero^{d,*}^a Postgraduate Program in Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil^b Dental School, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil^c School of Clinical Dentistry, University of Sheffield, Sheffield, United Kingdom^d Department of Pathology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Paper received 20 November 2018

Accepted 25 March 2019

Available online 30 March 2019

Keywords:

Molar

Third

Pathology

Jaw cysts

Jaw neoplasms

Systematic review

ABSTRACT

Purpose: This systematic review aimed to investigate the prevalence of odontogenic cysts and tumors associated with impacted third molars (ITM).**Methods:** Only studies that performed histopathological diagnosis of lesions were eligible for inclusion. Five main electronic and three grey literature databases were searched. Risk of bias (RoB) of included articles was assessed using the Joanna Briggs Institute Critical Appraisal Checklist for Studies Reporting Prevalence Data.**Results:** From 1,300 studies identified, 16 met the inclusion criteria. Seven studies were classified as high, seven as moderate, and two as low RoB. The prevalence of odontogenic cysts and tumors associated with ITM was 5.3% (95%CI: 3.1%–8.1%) of ITM. Odontogenic cysts in particular were found in 4.4% (95%CI: 2.5–6.8%) of the extracted ITM, whilst odontogenic tumors in 0.5% (95%CI: 0.2–0.9%). The dentigerous cyst was mentioned in eleven studies with a pooled prevalence of 2.1% (95%CI: 1.4–3.1%). The odontogenic keratocyst was cited by nine studies and had a prevalence of 0.5% (95%CI: 0.2–0.7%). The radicular cyst was mentioned only in three articles and the pooled prevalence was 4.7% (95%CI: 0.0–19.4%).**Conclusion:** Odontogenic cysts and tumors were found in 5.3% of ITM extracted. The most common lesions were the radicular cyst, dentigerous cyst, and odontogenic keratocyst.

© 2019 European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Tooth impaction is a frequent dental condition with prevalence rates ranging from 0.8 to 3.6% in the general population (Kaszor-Urbanowicz et al., 2016). Impacted teeth can be classified as entirely or partially unerupted teeth (Shoshani-Dror et al., 2018). The most common impacted teeth are the third molars since they are the last to erupt and usually remain impacted due to the lack of space in the dental arch (Kaszor-Urbanowicz et al., 2016). Partially erupted impacted third molars (ITM) have been associated with

odontogenic infections, such as caries, periodontal diseases, and pericoronitis. Due to difficulties in reaching partially erupted teeth during oral hygiene, dental caries and endodontic illnesses are more frequently observed in comparison to entirely unerupted teeth (Shoshani-Dror et al., 2018). On the other hand, non-inflammatory conditions such as the dentigerous cysts (DC), odontogenic keratocysts (OKC), and ameloblastomas are mostly related to entirely unerupted ITM (Rakprakitkul, 2001).

In the United States, approximately 3 billion dollars are spent yearly on the extraction of third molars (Friedman, 2007). The prophylactic removal of asymptomatic ITM is a commonly performed procedure in oral surgery clinics worldwide (Rafetto, 2015; Alves-Pereira et al., 2017). Reasons for extracting ITM include the risk of developing dental caries, pericoronitis, periodontal defects, crowding, and occurrence of different odontogenic cysts and tumors (Steed, 2014). However, there is a lack of substantial evidence supporting the extraction of asymptomatic

* Corresponding author. Department of Pathology, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Catarina, University Campus, Trindade, Florianópolis, 88040-370, Santa Catarina, Brazil.

E-mail addresses: fernanda.wmello@gmail.com (F.W. Mello), melo.gilberto@hotmail.com (G. Melo), pedrovkammer@gmail.com (P.V. Kammer), p.speight@sheffield.ac.uk (P.M. Speight), riet.elena@gmail.com (E.R.C. Rivero).

<https://doi.org/10.1016/j.jcms.2019.03.026>

1010-5182/© 2019 European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Received: 16 October 2018 | Revised: 4 April 2019 | Accepted: 10 April 2019

DOI: 10.1111/joor.12801

REVIEW

WILEY Journal of ORAL
REHABILITATION

Bruxism: An umbrella review of systematic reviews

Gilberto Melo¹  | Joyce Duarte¹  | Patrícia Pauletto¹  | André Luís Porporatti¹  |
Juliana Stuginski-Barbosa²  | Ephraim Winocur³  | Carlos Flores-Mir⁴  |
Graziela De Luca Canto¹ 

¹Department of Dentistry, Brazilian Centre for Evidence-Based Research, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

²Department of Dentistry, Bauru School of Dentistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

³Department of Oral Rehabilitation, Tel Aviv University, Tel Aviv, Israel

⁴Department of Dentistry, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada

Correspondence

Gilberto Melo, Department of Dentistry, Federal University of Santa Catarina, University Campus, Mailbox 476 - Trindade, Zip code: 88040900, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.
Email: melo.gilberto@hotmail.com

Funding information

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES); Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina, Grant/Award Number: 88887.200723/2018-00

Abstract

Objectives: To synthesise available knowledge about both sleep (SB) and awake bruxism (AB) as depicted by previous published systematic reviews (SR).

Methods: SR investigating any bruxism-related outcome were selected in a two-phase process. Searches were performed on seven main electronic databases and a partial grey literature search on three databases. Risk of bias of included SR was assessed using the "University of Bristol's tool for assessing risk of bias in SR".

Results: From 1038 studies, 41 SR were included. Findings from these SR suggested that (a) among adults, prevalence of AB was 22%-30%, SB (1%-15%), and SB among children and adolescents (3%-49%); (b) factors consistently associated with bruxism were use of alcohol, caffeine, tobacco, some psychotropic medications, oesophageal acidification and second-hand smoke; temporomandibular disorder signs and symptoms presented a plausible association; (c) portable diagnostic devices showed overall higher values of specificity (0.83-1.00) and sensitivity (0.40-1.00); (d) bruxism might result in biomechanical complications regarding dental implants; however, evidence was inconclusive regarding other dental restorations and periodontal impact; (e) occlusal appliances were considered effective for bruxism management, although current evidence was considered weak regarding other therapies.

Conclusions: Current knowledge from SR was mostly related to SB. Higher prevalence rates were found in children and adolescents than in adults. Associated factors and bruxism effects on stomatognathic structures were considerably heterogeneous and inconsistent. Overall good accuracy regarding portable diagnostic devices was found. Interventions' effectiveness was mostly inconclusive regarding the majority of available therapies, with the exception of occlusal appliances.

KEYWORDS

awake bruxism, bruxism, evidence-based dentistry, sleep bruxism, systematic review, umbrella review



The synergistic effect of tobacco and alcohol consumption on oral squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis

Fernanda Weber Mello¹ · Gilberto Melo¹ · Júlia Jacoby Pasetto² · Carolina Amália Barcellos Silva³ · Saman Warnakulasuriya⁴ · Elena Riet Correa Rivero⁵

Received: 21 March 2019 / Accepted: 8 May 2019 / Published online: 20 May 2019
 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Objectives This systematic review (SR) aimed to summarise and critically appraise available evidence about the association between the synergistic consumption of alcohol and tobacco and the occurrence of oral squamous cell carcinoma (OSCC).

Materials and methods Observational studies investigating the association between the synergistic consumption of alcohol and tobacco and OSCC occurrence were included. Studies were selected in a two-phase process and searches were conducted on five main electronic databases, complemented by three grey literature databases.

Results From 3260 records identified, 33 articles were included for qualitative analysis, of which 15 were included in the meta-analyses. Overall, the synergistic consumption was positively associated with the occurrence of OSCC (odds ratio [OR] = 5.37; 95% confidence interval [95%CI] = 3.54–8.14). Increased odds for OSCC occurrence were observed regarding the synergistic consumption of alcohol and smoked tobacco (OR = 4.74; 95%CI = 3.51–6.40), alcohol and smokeless tobacco (OR = 7.78; 95%CI = 2.86–21.14), and alcohol, smoked tobacco, and smokeless tobacco (OR = 16.17; 95%CI = 7.97–32.79).

Conclusions According to the results of this SR, the synergistic consumption of alcohol and tobacco (both smoked and smokeless) significantly increased the odds for the occurrence of OSCC.

Clinical relevance The knowledge provided by this SR may be useful for a better understanding of differences in the effect of synergistic consumption of alcohol and tobacco products in OSCC development. These data might aid healthcare authorities to develop measures for tobacco and alcohol control considering the needs of their population.

Keywords Tobacco · Alcohol-related disorders · Mouth neoplasm · Systematic review

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00784-019-02958-1>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Fernanda Weber Mello
 fernanda.wmello@gmail.com

Gilberto Melo
 melo.gilberto@hotmail.com

Júlia Jacoby Pasetto
 juliajpasetto@gmail.com

Carolina Amália Barcellos Silva
 cabs.barcellos@hotmail.com

Saman Warnakulasuriya
 s.warne@kcl.ac.uk

Elena Riet Correa Rivero
 riet.elena@gmail.com

¹ Postgraduate Program in Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

² Dental School, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

³ Department of Morphology, Biology Center, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

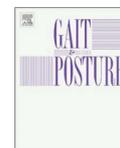
⁴ Department of Oral Medicine, King's College London and WHO Collaborating Centre for Oral Cancer, London, UK

⁵ Department of Pathology, Health Sciences Center, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil



Contents lists available at ScienceDirect

Gait & Posture

journal homepage: www.elsevier.com/locate/gaitpost

Review

Effects of total hip arthroplasty for primary hip osteoarthritis on postural balance: A systematic review



Fernando de Lima^a, Daniel A. Fernandes^{b,*}, Gilberto Melo^c, Carlos R. de M. Roesler^d,
Fabrício de S. Neves^e, Francisco Rosa Neto^f

^a Baía Sul Hospital, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

^b Department of Surgery, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

^c Postgraduate Program in Dentistry, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

^d Department of Mechanical Engineering, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

^e Department of Clinical Medicine, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

^f Centre of Health and Sports Sciences, State University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Evidence-based medicine
Total hip arthroplasty
Postural balance
Systematic review

ABSTRACT

Background: Hip osteoarthritis is one of the major causes of disability worldwide, and although total hip arthroplasty is considered effective in the management of this condition, its effects on postural balance remain unclear.

Research Question: What are the effects of total hip arthroplasty for primary hip osteoarthritis on the postural balance compared to preoperative status and/or to healthy controls?

Method: A systematic review was conducted, and the Embase, Latin American and Caribbean Health Sciences (LILACS), PubMed, Scopus, The Cochrane Library, and Web of Science databases were searched. Randomized and non-randomized studies were considered eligible for inclusion. The risk of bias of included studies was assessed using the Joanna Briggs Institute critical appraisal tools.

Results: Among the 41 potentially eligible studies, 13 studies were included for qualitative synthesis—8 studies had low risk of bias and 5 had moderate risk of bias. Ten studies compared the effects of total hip arthroplasty on the postural balance in healthy controls. Meanwhile, the remaining 3 studies compared such effects to the preoperative status only. Comparable results on the postural balance between the intervention and control groups were observed in 5 studies, whereas 3 studies showed better scores among healthy controls. The other 2 studies reported that postural balance could still be impaired at 6 months to 3 years postoperatively. All 3 studies with no healthy controls reported an improvement in the postural balance compared to the preoperative status.

Conclusions: Major post-surgical improvements were consistently observed compared to preoperative status, although postural balance impairment was still noted compared to healthy controls.

Significance: The results of this study might be a useful guide for clinicians on the extent of the therapeutic effects of hip arthroplasty on postural balance. Furthermore, the standardization of balance assessment tools could strengthen the certainty of cumulative evidence in future studies.

1. Introduction

Hip osteoarthritis (OA) is a chronic disease with a multifactorial etiology, and it is generally characterized by cartilage loss, stiffness, and pain, which might often lead to disability [1]. According to the Global Burden of Disease Study 2010, which aimed to estimate the epidemiological levels of 291 diseases across 187 countries, hip and knee OA was ranked as the 11th highest contributor to global disability

[2]. Problems with balance and postural stability are likely to occur in patients with hip OA due to several reasons. Firstly, damage to joint capsule receptors that control posture might occur in an arthritic condition [3]. In addition, since degenerative disorders are usually unilateral in most patients, the position of the pelvis and spine might be affected in individuals with hip OA, resulting in asymmetric loading of the lower limbs [4]. Moreover, individuals with hip OA often present muscular strength loss in the affected limb, which may lead to

* Corresponding author at: Department of Surgery, Federal University of Santa Catarina, University Campus, Mailbox 476 – Trindade, Florianópolis, Santa Catarina, 88040900, Brazil.

E-mail address: danielortopediafernandes@gmail.com (D.A. Fernandes).

<https://doi.org/10.1016/j.gaitpost.2019.07.124>

Received 20 February 2019; Received in revised form 29 May 2019; Accepted 1 July 2019
0966-6362/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.



Prevalence of dentofacial injuries among combat sports practitioners: A systematic review and meta-analysis

Helena Polmann^{1,2} | Gilberto Melo^{1,2} | Jéssica Conti Réus^{1,2} |
 Fabio Luiz Domingos² | Beatriz Dulcinea Mendes de Souza^{2,3} |
 Ana Clara Padilha¹ | Thais Mageste Duque³ | André Luís Porporatti^{2,3} |
 Carlos Flores-Mir³ | Graziela De Luca Canto^{2,4}

¹Postgraduate Program in Dentistry, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil

²Brazilian Centre for Evidence-Based Research, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil

³Faculty of Medicine and Dentistry, Department of Dentistry, University of Alberta, Edmonton, AB, Canada

⁴Department of Dentistry, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil

Correspondence

Helena Polmann, Federal University of Santa Catarina, University Campus, Mailbox 476 – Trindade, Zip code: 88040900, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.
 Email: hpolmann@hotmail.com

Funding information

Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina, Grant/Award Number: 88887.200723/2018-00; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Abstract

Background/Aim: Combat sports might result in injuries to the face and teeth. However, it is unclear how often they occur and which sports presents the highest rates. The aim of this study was to investigate the prevalence of dentofacial injuries in combat sports participants.

Material and Methods: A systematic review was performed. Six main electronic databases and three grey literature databases were searched. Studies were blindly selected by two reviewers based on pre-defined eligibility criteria. Studies that evaluated the prevalence of dentofacial injuries (teeth, alveolar bone, jaw, lips, and/or cheekbones) among combat sports participants were considered eligible. Risk of bias was assessed using the Joanna Briggs Institute Critical Appraisal Checklist. The software R STATISTICS version was used to perform all meta-analyses. Cumulative evidence of the included articles was evaluated using GRADE criteria (Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation).

Results: From 1104 articles found on all databases, 27 were finally included. Eighteen studies were judged at low, seven at moderate, and two at high risk of bias. The following sports were investigated: boxing, capoeira, fencing, jiu-jitsu, judo, karate, kendo, kick-boxing, kung fu, muay thai, sumo, taekwondo, wrestling, and wushu. Results from the meta-analysis suggested a dental pooled prevalence of 25.2% (12.3%–40.8%, $i^2 = 100\%$) and dentofacial pooled prevalence of 30.3 (18.1%–44.1%, $i^2 = 100\%$). Considering the sports' categories individually, jiu-jitsu had the highest pooled prevalence of dentofacial injuries (52.9% [37.9%–67.8%, $i^2 = 92\%$]), while judo was the sport with the lowest pooled prevalence (25.0% [7.6%–48.2%, $i^2 = 98\%$]). Among Panamerican sports, boxing had the highest prevalence of dental injuries (73.7% [58.7%–86.3%, $i^2 = 0\%$]). For dentofacial injuries, the GRADE criteria were considered low.

Conclusions: Overall pooled prevalence of dentofacial injuries in combat sports was approximately 30%. Raising awareness regarding the frequency of these injuries might encourage the use of protective devices and reduce complications related to these incidents.

Journal section: Oral Medicine and Pathology
 Publication Types: Review

doi:10.4317/jced.56143
<http://dx.doi.org/10.4317/jced.56143>

Effects of sclerosing agents on head and neck hemangiomas: A systematic review

Rúbia-Teodoro Stuepp ^{1,2}, Fernanda-Marcello Scotti ^{1,2}, Gilberto Melo ¹, Etiene-de Andrade Munhoz ², Filipe Modolo ³

¹ Postgraduate Program in Dentistry, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil

² Department of Dentistry, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil

³ Department of Pathology, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil

Correspondence:

Department of Dentistry
 Center of Health Sciences
 Federal University of Santa Catarina
 University Campus
 Trindade, Florianópolis, 88.040-900
 Santa Catarina, Brazil
rubia_ts@hotmail.com

Stuepp RT, Scotti FM, Melo G, Munhoz EA, Modolo F. Effects of sclerosing agents on head and neck hemangiomas: A systematic review. J Clin Exp Dent. 2019;11(11):e1033-44.
<http://www.medicinaoral.com/odo/volumenes/v11i11/jcedv11i11p1033.pdf>

Received: 30/07/2019
 Accepted: 09/09/2019

Article Number: 56143 <http://www.medicinaoral.com/odo/indice.htm>
 © Medicina Oral S. L. C.I.F. B 96689336 - eISSN: 1989-5488
 eMail: jced@jced.es
 Indexed in:
 Pubmed
 Pubmed Central® (PMC)
 Scopus
 DOI® System

Abstract

Background: the aim of this study was to systematically review the literature for studies that investigated the effects of sclerosing agents on head and neck hemangiomas.

Material and Methods: clinical trials, cohort studies, and descriptive studies were considered eligible and selected in a two-phase process. Six main electronic databases, in addition to three grey literature databases, were searched. Risk of bias (RoB) was assessed using the “Meta-Analysis of Statistics Assessment and Review Instrument” checklist. From fifty-six considered eligible, five were finally included.

Results: one article were judged at low, one at moderate, and three at high RoB. The sclerosing agents investigated were sodium tetradecyl sulphate (n=2), ethanolamine oleate (n=1), pingyangmycin (n=1) and bleomycin (n=1). Overall, good results were achieved on the treatment of head and neck hemangiomas with intralesional sclerotherapy. Most commonly reported adverse effects included pain, swelling, fever, necrosis, transient facial palsy, and anorexia. **Conclusions:** considering the limited number of included studies, intralesional sclerotherapy on the management of HN hemangiomas presented overall good results with minor adverse reactions, especially in regards to smaller lesions.

Key words: Sclerotherapy, sclerosing solutions, vascular neoplasms, hemangioma.

Introduction

Vascular anomalies comprise a heterogeneous group of lesions that have been classified by the International Society for the Study of Vascular Anomalies (ISSVA) into vascular malformations and vascular tumors (1). Hemangioma is a common type of benign vascular tumor

that usually affects newborns and infants, although in some cases it might persist into adulthood (2). It should be mentioned that misdiagnosed of vascular tumors and vascular malformations is still recurrent and this can lead to misconduct, therefore, caution should be exercised regarding assessment of these conditions.



Laser therapy for recurrent aphthous stomatitis: an overview

Juliana Amorim dos Santos¹ · Ana Gabriela Costa Normando¹ · Isabela Porto de Toledo^{1,2} · Gilberto Melo² · Graziela De Luca Canto² · Alan Roger Santos-Silva³ · Eliete Neves Silva Guerra¹

Received: 11 February 2019 / Accepted: 6 November 2019
 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Objectives To evaluate therapeutic effects of laser therapy on patients with recurrent aphthous stomatitis assessing evidences from previously published systematic reviews.

Materials and methods An overview of systematic reviews was conducted based on PRISMA checklist. Search strategies were developed and adapted for six different electronic databases and a gray literature search was also performed. The methodology quality of the included systematic reviews was assessed by the Measurement Tool to Assess the Methodological Quality of Systematic Reviews 2 (AMSTAR 2).

Results After a two-step selection, five systematic reviews were included. Methodology quality was considered as a high risk of bias in two systematic reviews, while in the other three were graded as moderate. The systematic reviews' conclusions demonstrated that all included systematic reviews showed positive effects of laser therapy for pain relief, and most of them demonstrated healing improvement. A meta-analysis was not feasible due to heterogeneity in treatments parameters.

Conclusions Evidence suggested that laser therapy is an effective tool to treat recurrent aphthous stomatitis; nevertheless, more randomized clinical trials should be conducted to compare different lasers parameters.

Clinical relevance The present overview evaluated recent evidence about laser therapy for recurrent aphthous stomatitis management in order to contribute for evidence-based dentistry and decision-making. This overview suggests that laser therapy is a safe and promising alternative to treat recurrent aphthous stomatitis, since it promotes wound healing and pain relief.

Keywords Lasers · Oral ulcer · Oral medicine · Systematic review · Evidence-based medicine · Overview

Introduction

Recurrent aphthous stomatitis (RAS) is a common chronic inflammatory disease of the oral mucosa characterized by rounded ulcers that usually present first in childhood or adolescence [1, 2]. These lesions might disturb speaking and eating activities and even impact the quality of life [2]. RAS can

be classified into three subtypes: minor (MiRAS), major (MjRAS), and herpetiformis ulcers (HUs) [3, 4]. MiRAS is the most common subtype, comprising about 80–90% of RAS cases. MiRAS usually presents with less than 1 cm in diameter and healing time usually takes 4–14 days without scarring. MiRAS occurs on non-keratinized mucosa; therefore, it is uncommon on gingiva, palate or dorsum of tongue surfaces, appearing more often in labial, buccal and floor of mouth mucosa. MjRAS ulcers arise in approximately 10% of cases, they exceed 1 cm in diameter, persist up to 6 weeks and may heal with scarring. HUs affect about 1–10% of individuals with RAS and it is characterized by multiple ulcers with 2–3 mm in diameter that can coalesce into a large and irregular ulcer, taking approximately 15 days to heal, with or without scarring [1].

RAS therapy aims to alleviate pain sensation and decrease wound healing time, trying to reduce frequency and acute phases [5]. Conventional treatments are topical or systemic interventions including analgesics, systemic immunomodulators, anti-inflammatory drugs, chemical cauterizers, and

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00784-019-03144-z>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Eliete Neves Silva Guerra
 elieteneves.unb@gmail.com

¹ Laboratory of Oral Histopathology, Health Sciences Faculty, University of Brasilia, Asa Norte, Brasilia, DF 70910-900, Brazil

² Brazilian Centre for Evidence-Based Research, Department of Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

³ Oral Diagnosis, Piracicaba Dental School, University of Campinas (UNICAMP), São Paulo, Brazil

Prognostic biomarkers for malignant transformation of oral potentially malignant disorders: a scoping review protocol

Fernanda Weber Mello¹ • Gilberto Melo¹ • Eliete Neves da Silva Guerra² • Saman Warnakulasuriya^{3,4} • Cathie Garnis^{5,6} • Elena Riet Correa Rivero⁷

¹Postgraduate Program in Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil, ²Laboratory of Oral Histopathology, School of Health Sciences, University of Brasília, Brasília, Brazil, ³Department of Oral Medicine, Kings College, London, United Kingdom, ⁴World Health Organization Collaborating Center for Oral Cancer, London, United Kingdom, ⁵Department of Integrative Oncology, British Columbia Cancer Research Center, Vancouver, Canada, ⁶Department of Surgery, Division of Otolaryngology, University of British Columbia, Vancouver, Canada, and ⁷Department of Pathology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

ABSTRACT

Objective: This scoping review aims to identify and systematically map the available evidence concerning the prognostic biomarkers for malignant transformation of oral potentially malignant disorders (OPMDs), and to identify and analyze possible knowledge gaps in this field of literature.

Introduction: It is hypothesized that diagnosis and treatment of oral cancer in its early stages may be the key to improving the prognosis and reducing treatment-related consequences. Oral potentially malignant disorders represent tissue alterations with a higher risk of malignant transformation compared to the normal mucosa. Therefore, the study of prognostic biomarkers for OPMD could represent new diagnosis and therapeutic targets and, consequently, contribute to the reduction of oral cancer burden worldwide.

Inclusion criteria: Longitudinal studies investigating prognostic biomarkers regarding the malignant transformation of OPMD will be included. The initial OPMD diagnosis and the malignant transformation must have been confirmed by histopathological analysis. To achieve minimal heterogeneity, studies that assess biomarkers in other locations (blood, plasma or others) will be excluded.

Methods: Five electronic databases and three grey literature databases will be consulted. No restrictions regarding publication date will be applied. Only studies published in the Latin (Roman) alphabet, which comprises most of the European languages, will be included. Study selection will be performed by two authors in a two-phase process; if any disagreement arises, a third author will be consulted to make a final decision. Data extraction will be performed by two authors using a standardized extraction tool. The results will be described in details accordantly with the aims of this scoping review.

Keywords Biomarkers; disease progression; mouth neoplasms; prognosis; review

JBI Evid Synth 2020; 18(6):1349–1357.

Introduction

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is one of the most common malignancies of the head and neck, and, despite the advances in research and therapy development, it is still associated with high rates of mortality and low quality of life after

surgical treatment.^{1–3} Routinely, OSCC is preceded by oral potentially malignant disorders (OPMD) that represent tissue alterations with a higher risk of malignant transformation compared to the normal mucosa.⁴

A recent systematic review published by our research group reported that the prevalence of OPMD worldwide was 4.47% (95% confidence interval, 2.43 to 7.08).⁵ Leukoplakia, erythroleukoplakia, and erythroplakia are the subtypes of OPMD most commonly reported in Western countries and

Correspondence: Fernanda Weber Mello, fernanda.wmello@gmail.com

The authors declare no conflict of interest.

DOI: 10.11124/JBISIR-D-19-00259



Contents lists available at ScienceDirect

Critical Reviews in Oncology / Hematology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/critrevonc

Oral potentially malignant disorders: A scoping review of prognostic biomarkers



Fernanda Weber Mello^{a,*}, Gilberto Melo^a, Eliete Neves Silva Guerra^b, Saman Warnakulasuriya^c, Cathie Garnis^d, Elena Riet Correa Rivero^e

^a Postgraduate program in Dentistry, Federal University of Santa Catarina - Florianópolis, Brazil

^b Laboratory of Oral Histopathology, School of Health Sciences, University of Brasília - Brasília, Brazil

^c Faculty of Dentistry, Oral & Craniofacial Sciences, King's College London and WHO Collaborating Centre for Oral Cancer, UK

^d Department of Surgery, University of British Columbia - Vancouver, Canada

^e Department of Pathology, Federal University of Santa Catarina - Florianópolis, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

oral potentially malignant disorders
biomarkers
disease progression
leukoplakia
erythroplakia
prognosis
review

ABSTRACT

This scoping review aimed to map evidence regarding biomarkers for malignant transformation of oral potentially malignant disorders (OPMD). Seventy-three longitudinal studies investigating prognostic biomarkers for OPMD malignant transformation were included, encompassing 5612 disorders and 108 biomarkers, of which 72 were investigated by immunohistochemistry. Most biomarkers were assessed in one or two studies, while five (p53, Ki-67, podoplanin, p16, and DNA ploidy) were analyzed in five or more studies. All studies investigating podoplanin (n = 8) reported a significant association between positive/high immunoreexpression and malignant transformation. Similarly, all studies assessing DNA ploidy (n = 5) found that aneuploidy or gross genomic aberrations were significantly associated with malignant transformation. Included studies often presented mixed data from different OPMD subtypes, inadequate description of population characteristics, and lack of adjusted analysis for confounding factors. One hundred and eight biomarkers were identified and, from these, podoplanin immunoreexpression and DNA ploidy were considered promising candidates for future long-term clinical research.

1. INTRODUCTION

Oral potentially malignant disorders (OPMD) are conditions characterized by tissue alteration with increased oncogenic potential compared to normal oral mucosa [1]. Malignant transformation rates vary between OPMD subtypes - oral leukoplakia (OL), oral erythroplakia (OE), proliferative verrucous leukoplakia (PVL), oral submucous fibrosis (OSMF), oral lichen planus (OLP), or actinic cheilitis (AC) - and depend on specific prognostic factors, such as clinical presentation, presence of epithelial dysplasia, advanced age, and lesion size [2,3,4].

Leukoplakia is defined as a white plaque with an increased risk of malignant transformation, having excluded other known disorders without increased risk for cancer development [1]. OE is defined as a red plaque that cannot be characterized as any other lesion and often presents with more severe degrees of oral epithelial dysplasia (OED) and a higher risk of malignant transformation compared to OL [5,6,7]. These OPMD subtypes are mostly associated with smoking, alcohol

consumption, and betel quid use [6]. PVL is an aggressive and rare form of OL, with higher morbidity and malignant transformation ratio (49.5%; 99% confidence interval [CI] = 26.7%-72.4%) compared to more common forms of OL (9.5%; 99%CI = 5.9%-14.00%) [7,8]. OSMF, on the other hand, is associated with areca nut consumption and its prevalence is considerably higher in several Asian countries [9,10]. OLP is considered an autoimmune disease, its malignant transformation potential is contradictory in the literature [11]. A recent systematic review (SR) found a malignant transformation ratio of 1.14% (95%CI = 0.84%-1.49%) for OLP [12], which is lower than most ratios reported for OL [7]. Moreover, AC is an OPMD subtype usually associated with chronic ultraviolet radiation exposure [13]. Despite limited evidence, the estimated malignant transformation ratio of AC is approximately 3% [14].

Usually, treatment choice for OPMD depends on the estimated risk for malignant transformation and often differs across healthcare services; for example, low-risk lesions can be treated by habit cessation

* Corresponding author at: Department of Pathology, Health Sciences Center, Federal University of Santa Catarina, University Campus - Trindade, Florianópolis, Santa Catarina, Zip code: 88040900, Brazil.

E-mail addresses: fernanda.wmello@gmail.com (F.W. Mello), melo.gilberto@hotmail.com (G. Melo), elieteneves.unb@gmail.com (E.N.S. Guerra), saman.warne@kcl.ac.uk (S. Warnakulasuriya), cgarnis@bccrc.ca (C. Garnis), riet.elena@gmail.com (E.R.C. Rivero).

<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2020.102986>

Received 11 January 2020; Received in revised form 7 May 2020; Accepted 12 May 2020

1040-8428/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

Cell-block as ancillary tool for the diagnosis of cystic and cyst-like jaw lesions

Gilberto Melo MSc¹ | Fernanda Weber Mello DDS¹ |
 Ricardo Alves Mesquita PhD² | Liliane Janete Grando PhD³ |
 Elena Riet Correa Rivero PhD³

¹Postgraduate Program in Dentistry, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil

²Department of Oral Surgery and Pathology, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil

³Department of Pathology, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil

Correspondence

Elena Riet Correa Rivero, Department of Pathology, Health Sciences Center, Federal University of Santa Catarina (UFSC), University Campus, Trindade, Florianópolis, Santa Catarina 88040-370, Brazil.
 Email: riet.elena@gmail.com

Funding information

Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina. Grant/Award Numbers: 88887.200723/2018-00, 88887.200724/2018-00

Abstract

Background: The cell-block technique is a cytological diagnostic method that decreases cellular dispersion; however, its usefulness regarding intraosseous lesions is underexplored. Therefore, this study aimed to assess the diagnostic usefulness of cell-block for cystic and cyst-like jaw lesions.

Methods: Individuals with cystic or cyst-like jaw lesions who underwent aspiration biopsy were considered eligible. Aspiration of luminal content was prepared and processed by the cell-block technique. Cytological evaluations were blindly performed by two trained PhD students (in a single evaluation) and one oral and maxillofacial pathologist (OMP). Cohen's kappa statistic was used to measure inter-rater agreement.

Results: The sample was composed of 52 lesions, represented by 25 radicular cysts (RC), 17 odontogenic keratocysts (OKC), 5 idiopathic bone cavities (IBC), and 5 unicystic ameloblastomas (UA). The kappa coefficient of cell-block compared to histopathological diagnosis was 0.390 (95% confidence interval [95%CI], 0.195-0.585) for PhD students and 0.612 (95%CI, 0.433-0.791) for the OMP. The highest concordance rates between cell-block and histopathological diagnosis were observed for RC (PhD = 76.0%; OMP = 80.0%) and OKC (PhD = 58.8%; OMP = 76.5%). Conflicting results were found regarding IBC (PhD = 40.0%; OMP = 80.0%) and UA, that presented the overall lowest concordance rates (PhD = 20.0%; OMP = 40.0%).

Conclusion: The cell-block technique presented a high diagnostic usefulness for detecting RC and OKC and, if associated with clinical and radiographic characteristics, might be sufficient for final diagnosis of these diseases. Regarding IBC and UA, an analysis with a higher number of cases is recommended to determine the true usefulness of the cell-block as ancillary tool for the diagnosis of these lesions.

KEYWORDS

biopsy, fine-needle aspiration, cytodiagnosis, cytological techniques, jaw cysts

1 | INTRODUCTION

Cystic lesions of the jaws comprise a group of pathologies of both odontogenic and nonodontogenic origin, often presenting similar

clinical and radiographic characteristics.¹ True cysts are histologically characterized by an epithelium-coated cavity filled with fluid or semi-fluid material. On the other hand, cyst-like lesions of the jaws might be defined as either: (a) pseudocysts, characterized by empty bone

Association between immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases and metastasis in oral squamous cell carcinoma: Systematic review and meta-analysis

Andressa F. P. Miguel Msc¹  | Fernanda W. Mello DDS¹  |
 Gilberto Melo Msc¹  | Elena R. C. Rivero PhD² 

¹Postgraduate Program in Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

²Department of Pathology, Health Sciences Center, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

Correspondence

Elena R. C. Rivero, Department of Pathology, Health Sciences Center, Federal University of Santa Catarina, University Campus - Trindade, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. Zip code: 88040-370.
 Email: riet.elena@gmail.com

Funding information

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Grant/Award Numbers: 131412/2017-5, 406744/20165; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Grant/Award Number: 001; Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina, Grant/Award Numbers: 88887.200723/2018-00, 88887.200724/2018-00

Abstract

Background: The aim of this systematic review (SR) was to summarize and critically appraise available evidence on the association of the immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases (MMPs) with the occurrence of lymph node/distant metastasis of oral squamous cell carcinoma (OSCC).

Methods: Searches were conducted in five main electronic and three gray literature databases.

Results: From 2128 records identified, 50 were included for qualitative analysis. A total of 12 MMPs were identified (-1, -2, -3, -7, -8, -9, -10, -11, -13, -25, -26, and MT1-MMP). Most included studies reported a positive association of MMP-1, -2, -3, -7, -9, and MT1-MMP with lymph node metastasis. MMP-8, -25, and -26 were not associated with lymph node metastasis.

Conclusions: According to this SR, MMP-1, -2, -3, -7, -9, and MT1-MMP seem to play an important role in lymph node metastasis of OSCC.

KEYWORDS

immunohistochemistry, lymphatic metastasis, matrix metalloproteinases, mouth neoplasms, neoplasm metastasis, systematic review

1 | INTRODUCTION

Cancer of the lip and oral cavity accounted for 2% of all cancers worldwide in the year of 2018.¹ Despite advances in treatment modalities, survival rates continue to be a concern for these patients, mostly because of late diagnosis.² Five-year survival rates are estimated to be approximately 50%, and metastasis has been associated with a poorer prognosis.³

The rates of cervical metastasis for oral maxillary squamous cell carcinoma are of approximately 32%, and

clinicopathological factors, such as tumor size and histologic differentiation, were shown to increase these rates.⁴ Although the incidence of distant metastasis (DM) is considered low when compared to other cancers, its presence is determinant for prognosis and survival.⁵ As predicting possible outcomes in oral squamous cell carcinoma (OSCC) can be challenging, the use of biomarkers may be useful in determining the behavior of these lesions, including their metastatic potential.⁶

It is well known that matrix metalloproteinases (MMPs) play an important role in cancer metastasis.⁷

Diagnostic capability of fine-needle aspiration cytology in assessment of intraosseous lesions of the jaws: A systematic review

Sarah F. M. Pilati¹ | Natália dos Santos² | Gilberto Melo¹ |
 Fernanda W. Mello¹ | Elena R. C. Rivero³

¹Postgraduate Program in Dentistry, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

²Dental School, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

³Department of Pathology, Health Sciences Center, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

Correspondence

Sarah F. M. Pilati, Postgraduate Program in Dentistry, Federal University of Santa Catarina (UFSC), University Campus, Mailbox 476, Trindade, Florianópolis, Santa Catarina 88040-370, Brazil.
 Email: sarahfreygang@gmail.com

Funding information

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)—Finance Code 001; Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC). Grant/Award Numbers: 88887.200724/2018-00, 88887.200723/2018-00

Abstract

Purpose: To systematically review (SR) and critically appraise studies that investigated the diagnostic capability of fine-needle aspiration cytology (FNAC) in the assessment of intraosseous lesions of the jaws.

Methods: Six main electronic databases and three gray literature databases were searched aiming diagnostic studies, which were selected in a two-phase process. Risk of bias (RoB) of included studies was assessed using the Revised Tool for the Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies.

Results: A total of eight articles were included, of which six evaluated the FNAC smear technique exclusively, one assessed both smear and cell-block techniques, while one investigated only the cell-block technique. With regard to the FNAC smear technique, from 134 benign lesions investigated, concordance with the histopathological diagnosis was achieved in 64.17% of cases. In addition, considering the 32 malignant lesions assessed through this technique, concordance with histopathology was achieved in all cases. Regarding the cell-block technique, only benign lesions (n = 40) were evaluated in the included studies, in which the concordance rate with histopathology was of 77.5%. The overall RoB judgment was “at risk of bias” for seven included studies mostly due to lack of information or reportedly absence of blinding of evaluator.

Conclusions: Within the limitations of this SR, FNAC presented modest to satisfactory diagnostic capability for the assessment of intraosseous jaw lesions, showing concordance rates higher than 64% for the smear and 77% for the cell-block technique. Also, considerably high concordance rates were found for the assessment of malignant lesions regarding FNAC smear technique.

KEYWORDS

biopsy, fine needle, evidence-based dentistry, intraosseous lesions, jaws, systematic review

1 | INTRODUCTION

Fine-needle aspiration cytology (FNAC) is a technique in which a fine needle is used to aspirate contents from solid or cystic lesions,

resulting in cellular material that is used for cytological diagnosis.^{1,2} FNAC has been used for the diagnosis of salivary gland masses, presenting significant improvements with regard to its diagnostic accuracy in the past years.^{3,4} This technique is a simple and minimally



REVIEW

Prevalence of mucoepidermoid carcinoma among intraoral minor salivary gland tumors: A systematic review and meta-analysis

André Goulart Poletto¹ | Fernanda Weber Mello¹ | Gilberto Melo¹ |
Elena Riet Correa Rivero² ¹Postgraduate Program in Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil²Department of Pathology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil**Correspondence**Elena Riet Correa Rivero, Department of Pathology, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Catarina, University Campus, Trindade, Florianópolis, 88.040-370 Santa Catarina, Brazil.
Email: riet.elena@gmail.com**Funding information**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)

Abstract

This study aimed to synthesize and critically appraise available evidence regarding mucoepidermoid carcinoma (MEC) prevalence among intraoral minor salivary gland tumors (MiSGT). Five main electronic databases and three grey literature databases were searched. The risk of bias (RoB) was assessed using the Joanna Briggs Institute Critical Appraisal Checklist for Studies Reporting Prevalence Data. Proportion meta-analyses were performed. From 1321 studies identified, 82 were included in qualitative synthesis and 80 in meta-analyses. Sixteen were classified as high, 33 as moderate, and 33 as low RoB. A total of 12 774 MiSGT were found, of which overall MEC prevalence was 16.5% (95% Confidence Interval [95% CI] = 14.8%-18.4%). Most MiSGT were found in the palate (n = 7115), although MEC pooled prevalence in this anatomic location was only 13.6% (95% CI = 11.7%-15.6%). The retromolar area presented the highest pooled prevalence (58.9%; 95% CI = 47.0%-70.3%), followed by gingiva (28.8%; 95% CI = 22.7%-35.4%) and tongue (27.2%; 95% CI = 21.2%-33.6%). Regarding geographic location, Middle East presented the highest pooled prevalence (20.8%; 95% CI = 14.8%-27.6%), followed by America (20.0%, 95% CI = 17.2%-23%) and Europe (15.6%; 95% CI = 9.2%-23.5%). Among MiSGT, the MEC overall prevalence was approximately 16.5%. Although most MiSGT were found in the palate, the retromolar area was proportionally more affected by MEC.

KEYWORDS

meta-analysis, mucoepidermoid carcinoma, prevalence, salivary gland neoplasms, systematic review

1 | INTRODUCTION

Salivary gland tumors are uncommon neoplasms that represent from 3% to 6% of head and neck tumors,¹ and the global prevalence rate of salivary gland tumors is 1.6 cases per 100.000 individuals in 5 years.² Overall, compared to major salivary gland tumors, a higher

frequency of malignant neoplasms is reported within minor salivary gland tumors (MiSGT).³ Palate, oral mucosa, and lips are usually the most affected sites.^{3,4}

Mucoepidermoid carcinoma (MEC) is one of the most frequent malignancies of the salivary glands. Studies have shown that MEC may represent up to 45% of all MiSGT.^{5,6} Histologically, MEC usually

Anesthetic Efficacy of an Alternative Inferior Alveolar Nerve Block Technique Using an Extra-Short Needle: A Double-Blind Randomized Non-Inferiority Trial



Rúbia Teodoro Stuepp, MSc,^{*} Leonisa Gabriela Cabral Fenandes,[†] Gilberto Melo, MSc,[‡] Filipe Modolo, DSc,[§] and Henrique José Ferrari, MSc^{||}

Purpose: Inferior alveolar nerve block (IANB) is a frequently used anesthetic technique for restorative and surgical procedures in the mandible and its success rate usually ranges from 80 to 85%. Thus, this study aimed to compare the anesthetic efficacy of an alternative technique named superficial nerve block (SNB)—which consists of a modified approach using an extra-short needle inserted 10 mm deep and on a higher injection site to the conventional technique (CT) for IANB in healthy individuals.

Methods: About 20 participants received both SNB and CT with 1.8 mL of 2% lidocaine and 1:100,000 epinephrine. Thermal tests were performed 6 times, every 2 min, on the inferior canine and first molar to determine the success rate and anesthesia onset. Assessments were repeated at 20, 40, and 60 min to determine anesthesia duration. Sensitivity of lips and tongue was tested by clamp pressure. Pain perception during injection was assessed by a 100 mm visual analog scale (VAS).

Results: The success rate in accordance with anatomical location was molars (SNB = 90%; CT = 85%), canines (SNB = 25%; CT = 70%), lips (SNB = 45%; CT = 95%), and tongue (SNB = 85%; CT = 95%). Significant differences were found for canines ($P = .012$) and lips ($P < .002$). Moreover, median anesthesia onset was: molars (SNB = 6 min; CT = 4 min), canines (SNB = 6 min; CT = 6 min), lips (SNB = 10 min; CT = 6 min), and tongue (SNB = 8 min; CT = 4 min), whereas median duration was molars (SNB = 60 min; CT = 60 min), canines (SNB = 20 min; CT = 60 min), lips (SNB = 60 min; CT = 60 min), and tongue (SNB = 60 min; CT = 60 min). A significant difference was found for anesthesia onset on molars ($P = .024$) and lips ($P = .009$). Pain scores on VAS were SNB (median = 8.5 mm) and CT (median = 10.0 mm) ($P = .398$).

Conclusions: In healthy individuals, the anesthetic effects of SNB were noninferior to CT in molars and tongue, although efficacy was considerably inferior in anterior teeth and lips.

© 2020 American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons
J Oral Maxillofac Surg 79:1025.e1-1025.e8, 2021

^{*}Post-graduation Student, Department of Pathology, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

[†]Graduate, Dental School, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil.

[‡]Post-graduation Student, Department of Pathology, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

[§]Professor, Department of Pathology, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

^{||}Professor, Department of Dentistry, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

Source of funding: Rúbia T. Stuepp [number 201705960] and Gilberto Melo [number 88887.200723/2018-00] are supported with scholarships by CAPES/FAPESC (Coordination for the Improvement

of Higher Education Personnel/Foundation for the Support of Research and Innovation in the State of Santa Catarina), Ministry of Education, Brazil.

Conflict of Interest Disclosures: The authors declare that they have no conflict of interest.

Address correspondence and reprint requests to Dr Stuepp: Federal University of Santa Catarina, University Campus, Mailbox 476 - Trindade, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil 88040-900; e-mail: rubia_ts@hotmail.com

Received July 24 2020

Accepted December 22 2020

© 2020 American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons

0278-2391/20/31536-6

<https://doi.org/10.1016/j.joms.2020.12.038>

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 59 (2021) E17–E42

BRITISH
Journal of
Oral and
Maxillofacial
Surgerywww.bjoms.com

Review

Effectiveness of marsupialisation and decompression on the reduction of cystic jaw lesions: a systematic review

L.M. Berretta^a, G. Melo^b, F.W. Mello^b, G. Lizio^c, E.R.C. Rivero^{d,*}^a Dental School, Federal University of Santa Catarina - Florianópolis, Santa Catarina, Brazil^b Postgraduate Programme in Dentistry, Federal University of Santa Catarina - Florianópolis, Santa Catarina, Brazil^c Department of Biomedical and Neuromotor Sciences (DIBINEM), University of Bologna - Bologna, Italy^d Department of Pathology, Health Sciences Centre, Federal University of Santa Catarina - Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

Accepted 12 March 2021

Available online 23 March 2021

Abstract

In this study, we aimed to systematically review and critically appraise the available literature concerning the effectiveness of marsupialisation and decompression on the reduction of cystic jaw lesions. The 'Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis' guidelines were followed and the study protocol was registered at the 'International Prospective Register of Systematic Reviews' (CRD42019116099). Six main databases were searched: Embase, LILACS, PubMed, Scopus, The Cochrane Library, and Web of Science. Searches were complemented with three grey literature sources: Google Scholar, ProQuest, and Open Grey. Any reduction measures, compared with preoperative status or other procedures, were considered. Risk of bias was assessed using the Joanna Briggs Institute Critical Appraisal Tool. Thirty-one studies were included, of which five were judged with low, 24 with moderate, and two with high risk of bias. Considering surgical approach, 20 studies assessed the decompression and 11 the marsupialisation technique. Most studies considered these techniques as preliminary treatments, followed by enucleation. From 1088 lesions found, most were odontogenic keratocysts (33.8%), followed by unicystic ameloblastomas (21.0%), dentigerous cysts (20.6%), and radicular cysts (8.4%). Large lesions and younger individuals frequently presented more favourable responses to treatment and anatomical location was not associated with lesion reduction overall. The intervention duration generally ranged between one to two years. In conclusion, marsupialisation and decompression were mostly considered as preliminary treatments, followed by enucleation. Lesion reduction was generally considered insufficient for these techniques to be used as definitive therapies, although benefits concerning the diminished invasiveness of the secondary surgery were often proposed.

© 2021 The British Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Jaw Cysts; Jaw Neoplasms; Oral Surgical Procedures; Decompression, Surgical; Conservative Treatment; Systematic Review

Introduction

Cystic lesions are the most prevalent intraosseous jaw diseases. The most common presentation of these lesions

is painless swelling; however, involvement of important anatomical structures such as maxillary sinuses and the inferior alveolar nerve can be present, as well as dental tooth displacement and root resorption.¹ Several cystic lesions (including cysts and cyst-like lesions) such as odontogenic keratocysts (OKC), dentigerous cysts (DC), radicular cysts (RC), and unicystic ameloblastomas (UA) can present large dimensions, which could represent a challenge for the conservative treatment of these lesions.^{2,3}

Although invasive surgical procedures (such as enucleation and resection) are commonly considered treatments of

* Corresponding author at: Department of Pathology, Health Sciences Centre, Federal University of Santa Catarina, University Campus, Trindade, Florianópolis, 88.040-370, Santa Catarina, Brazil. Tel.: +554837213481.

E-mail addresses: le.berretta@hotmail.com (L.M. Berretta), melo.gilberto@hotmail.com (G. Melo), fernanda.wmello@gmail.com (F.W. Mello), giuseppelizio@libero.it (G. Lizio), riet.elena@gmail.com (E.R.C. Rivero).

<https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2021.03.004>

0266-4356/© 2021 The British Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.



Contents lists available at ScienceDirect

Gait & Posture

journal homepage: www.elsevier.com/locate/gaitpost

Effects of total knee arthroplasty for primary knee osteoarthritis on postural balance: A systematic review

Fernando de Lima^{a,*}, Gilberto Melo^b, Daniel Araujo Fernandes^c, Gilmar Moraes Santos^d, Francisco Rosa Neto^d

^a Postgraduate Program in Human Movement Sciences, State University of Santa Catarina (UDESC), Florianópolis, Santa Catarina (UDESC), Brazil

^b Postgraduate Program in Dentistry (PPGO), Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

^c Department of Surgery and Postgraduate Program in Medical Sciences (PPGCM), Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

^d Centre of Health and Sports Sciences (CEFID), State University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina (UDESC), Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Evidence-based medicine
Total knee arthroplasty
Osteoarthritis
Postural balance
Systematic review

ABSTRACT

Background: Knee osteoarthritis is often related to physical function impairment. Although total knee arthroplasty is considered effective for advanced cases of knee osteoarthritis, its effects on postural balance is a topic of debate.

Research question: What are the effects of total knee arthroplasty for primary knee osteoarthritis on postural balance compared to preoperative status and/or to healthy controls?

Methods: Longitudinal studies (with more than 1-month follow-up) assessing postural balance measures (either clinical-based such as balance scales or laboratory-based such as postural sway) were considered eligible and selected in a 2-phase process. Six main electronic databases were searched, complemented by 3 grey literature sources. The risk of bias was evaluated using the Joanna Briggs Institute Critical Appraisal Tools.

Results: A total of 19 studies were included for qualitative synthesis, of which 14 had low and 5 had a moderate risk of bias. The follow-up period ranged from 1–24 months. Most studies (n = 11) presented comparisons to preoperative status only. From these, 7 studies reported relevant improvements in postural balance, 2 reported partial improvements, and 2 no improvements. The remaining studies (n = 8) presented comparisons to healthy controls and, although improvements following total knee arthroplasty were consistently observed, only one study reported postural balance measures comparable to that of controls.

Conclusions: The majority of studies reported relevant improvements (especially in clinical-based measures) compared to preoperative evaluations, although inconsistencies were found possibly due to variability in studies' populations, assessment tools, and follow-up times. Despite this, persistent deficits in postural balance were commonly observed when compared to healthy controls.

Significance: This evidence synthesis could better inform clinicians and researchers about the therapeutic effects and limitations of total knee arthroplasty concerning postural balance. Standardization of assessment tools is recommended to strengthen the certainty of cumulative evidence.

1. Introduction

Knee osteoarthritis (OA) is a chronic and multifactorial disease characterized by cartilaginous tissue degeneration, stiffness, and painful symptoms, which in advanced stages can potentially result in physical impairment [1]. It is well established in the literature that OA affects mostly women and that its prevalence steeply increases with aging [2].

According to data from the Global Burden of Disease study [3], which evaluated epidemiological data regarding 291 diseases across 187 countries, hip and knee OA was ranked as the 11th highest contributor to global disability (as measured by years of life lived with disability).

Although articular cartilage degeneration is considered a key feature regarding knee OA etiology and progression, alterations in surrounding structures including the subchondral bone, synovium capsule,

* Corresponding author at: Centre of Health and Sports Sciences (CEFID), State University of Santa Catarina (UDESC) Rua Pascoal Simone, 358, Coqueiros, Florianópolis, Santa Catarina, 88080-350, Brazil.

E-mail addresses: lima_fe@hotmail.com (F. de Lima), melo.gilberto@hotmail.com (G. Melo), danielortopediafernandes@gmail.com (D.A. Fernandes), gilmar.santos@udesc.br (G.M. Santos), francisco.neto@udesc.br (F. Rosa Neto).

<https://doi.org/10.1016/j.gaitpost.2021.04.042>

Received 16 January 2021; Received in revised form 13 April 2021; Accepted 26 April 2021

Available online 30 April 2021

0966-6362/© 2021 Published by Elsevier B.V.

Diagnostic performance of periapical and panoramic radiography and cone beam computed tomography for detection of circumferential gaps simulating osseointegration failure around dental implants: A systematic review



José Della Pasqua Neto, MSc,^a Gilberto Melo, MSc,^a Charles Marin, PhD,^b Elena Riet Correa Rivero, PhD,^c Ariadne Cristiane Cabral Cruz, PhD,^{b,d} Carlos Flores-Mir, PhD,^c and Márcio Corrêa, PhD^b

Objective. The objective of this study was to appraise the diagnostic performance of periapical (PR) and panoramic (PANO) radiographs and cone beam computed tomography (CBCT) in detecting artificial circumferential gaps simulating osseointegration failure around dental implants in *ex vivo* studies.

Study Design. Seven electronic databases and three gray literature sources were searched. Studies reporting diagnostic performance measures or data allowing calculation of those measures compared with the reference standard of *in situ* direct measurements were considered eligible. Either the area under the receiver operating characteristic curve or accuracy was chosen to summarize findings, with diagnostic performance interpreted as poor, acceptable, excellent, or outstanding. Risk of bias (RoB) was also assessed.

Results. The ten included studies mostly suggested overall excellent to outstanding diagnostic capability with PR and CBCT. Various enhancement filters, CBCT voxel sizes, and/or fields of view were associated with acceptable to outstanding efficacy. PANO had the poorest results, with most research demonstrating acceptable to excellent discrimination. The RoB was high for seven studies, moderate for two, and low for -one.

Conclusions. PR and CBCT images were generally superior to PANO for the detection of artificial bone gaps. Results should be interpreted with caution because most studies had a high RoB. (Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol 2021;132:e208–e222)

Implant osseointegration is imperative to implant-supported prosthetic rehabilitation and long-term success. In association with the clinical examination, the 2D techniques of periapical radiography (PR) and panoramic radiography (PANO), along with 3D cone beam computed tomography (CBCT), are imaging examinations frequently used to assist in the assessment of dental implant osseointegration and in monitoring the success of prosthetic rehabilitation. PR and PANO images are the most commonly used radiographs in clinical practice.¹ They are used to indicate the status of implant osseointegration² and peri-implant bone height.²

However, several studies have reported that bone defects restricted to cancellous bone are not identified on 2D radiographs if the surrounding cortical

bone is unaffected.^{3,4} Moreover, the superimposition of 3D structures on 2D images severely affects the assessment of particular details,⁵ such as defects located on the vestibular or palatal/lingual surfaces of dental implants.⁶ Additionally, the volume of the fibrous capsule present in areas of osseointegration failure represents only a small fraction of the total implant surface,¹ and the Mach band optical effect at the margins of structures of different densities may also limit the evaluation of the peri-implant interface.^{1,6}

CBCT provides volumetric data sets without image superimposition.² In this context, CBCT can provide important additional information compared with 2D dental radiography, especially regarding the bucco-lingual dimension.⁷ The CBCT device, field of view (FOV), voxel size, and image reconstruction parameters influence diagnostic image quality of CBCT

^aPostgraduate Program in Dentistry, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

^bDepartment of Dentistry, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

^cDepartment of Pathology, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

^dLaboratory of Applied Virology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

^eFaculty of Medicine and Dentistry, Department of Dentistry, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada.

Received for publication May 14, 2021; returned for revision Aug 12, 2021; accepted for publication Aug 17, 2021.

© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

2212-4403/\$-see front matter

<https://doi.org/10.1016/j.oooo.2021.08.012>

Statement of Clinical Relevance

Periapical and panoramic radiographs and cone beam computed tomography are frequently used to assist in assessment of implant osseointegration failure. Periapical and cone beam computed tomography generally outperformed panoramic radiography but the risk of bias was significant.

Diagnostic Accuracy of Clinical Tests and Imaging Exams for Femoroacetabular Impingement: An Umbrella Review of Systematic Reviews

Daniel A. Fernandes, MD, MSc,* Gilberto Melo, DDS, MSc,† Marcos E. K. Contreras, MD, MSc,‡ Renato Locks, MD,§ Jorge Chahla,¶ and Fabricio S. Neves, MD, PhD||

Abstract

Objective: To synthesize available evidence about diagnostic accuracy of clinical tests and imaging examinations for femoroacetabular impingement (FAI) syndrome. **Design:** Umbrella review. **Setting:** N/A. **Participants:** N/A. **Interventions:** N/A. **Main Outcome Measures:** Systematic reviews (SR) indexed in Embase, LIVIVO, PubMed, SCOPUS, the Cochrane Library, and Web of Science were searched in a 2-phase process. SR assessing diagnostic accuracy were considered eligible. **Results:** From 1520 studies, 6 SR were included, which evaluated 24 primary studies related to FAI syndrome. Of these, 5 SR assessed clinical tests, and a substantial heterogeneity was found concerning reference standards adopted across primary studies, which included arthroscopy, clinical examination (associated or not with imaging exams), intra-articular injections, and open surgery. Most clinical tests presented higher values of sensitivity compared with specificity, although evidence was considered limited because the same primary studies were often included across SR. Nonetheless, evidence around the flexion adduction internal rotation (FADIR) test was considered stronger and its use as a screening tool was consistently supported. Only one SR assessed the accuracy of imaging examinations, which adopted open surgery as the sole reference standard. Most imaging exams presented considerably high values of sensitivity, although specificity values were notably lower. **Conclusions:** No robust recommendations can be provided for most clinical tests, although the FADIR test, in particular, was consistently supported as a screening tool. Moreover, although imaging examinations showed considerably high sensitivity values, evidence was considered sparse and further research is strongly recommended to validate its use as reference standards for diagnostic accuracy data.

Key Words: evidence-based medicine, femoroacetabular impingement, diagnosis, sensitivity, specificity, accuracy, systematic review, umbrella review

(*Clin J Sport Med* 2021;00:1–13)

INTRODUCTION

Femoroacetabular impingement (FAI) syndrome is a pathological entity that may arise from abnormal morphological features involving the femur and/or the acetabulum or from an

excessive and supraphysiological articular range of motion in otherwise healthy individuals.¹ It is proposed that it may lead to serious consequences such as chondrolabral lesions and, if left untreated, may result in hip osteoarthritis (OA).² Imaging examinations such as plain radiography,³ computed tomography (CT),⁴ magnetic resonance imaging (MRI), and magnetic resonance arthrography (MRA)^{5,6} can be used for FAI syndrome screening. Nonetheless, correlation with data from clinical examinations (such as, for example, the flexion adduction internal rotation (FADIR) test,⁷ flexion abduction, and external rotation (FABER) test,⁸ or Scour test⁹) is mandatory for a definite diagnosis of FAI syndrome.

The diagnostic accuracy of tools for FAI syndrome assessment, however, is a topic of debate because a variety of signs and symptoms are not exclusive and can be present in several other pathologic conditions.¹⁰ Hip pain, for example, may be originated from intra- or extra-articular structures, which can be related to very distinct lesions.¹¹ In this context, ancillary tools such as anesthetic injections may provide some information because a positive pain blockage could be a predictor of intra-articular hip pathologies.⁹ Concerning imaging examinations, MRI, in particular, has shown satisfactory diagnostic accuracy for evaluation of hip deformities,¹² although the literature is sparse considering the applicability of MRI and other imaging examinations for FAI syndrome assessment.¹³

Submitted for publication April 8, 2021; accepted August 13, 2021.

From the *Department of Surgery, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Postgraduate Program in Medical Sciences (PPGCM-UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil; †Postgraduate Program in Dentistry, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil; ‡Department of Orthopedics and Traumatology, Celso Ramos Hospital, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil; §Department of Orthopaedics, Regional Hospital of São José Dr Homero de Miranda Gomes, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil; ¶Division of Sports Medicine, Department of Orthopedics, Midwest Orthopedics at Rush, Rush University, Chicago, Illinois; and ||Internal Medicine Department, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

G. Melo [grant number: 88887.200723/2018-00] is supported with scholarship by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)—Brasil—Finance Code 001. The remaining authors report no conflicts of interest.

The authors report no conflicts of interest.

Corresponding Author: Daniel A. Fernandes, Department of Surgery, Federal University of Santa Catarina, University Campus, Mailbox 476—Trindade, Florianópolis, Santa Catarina 88040900, Brazil (danielortopediafernandes@gmail.com).

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Web site (www.cjsportmed.com).

Copyright © 2021 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

http://dx.doi.org/10.1097/JSM.0000000000000978



Contents lists available at ScienceDirect

Archives of Oral Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/archoralbio

Is there an association of genetic polymorphisms of the catechol-O-methyltransferase gene (rs165656 and rs174675) and the 5-hydroxytryptamine receptor 2A gene (rs4941573 and rs6313) with sleep bruxism in individuals with obstructive sleep apnea?

Joyce Duarte^{a,b,*}, Patrícia Pauletto^{a,b}, Helena Polmann^{a,b}, Jéssica Conti Réus^{a,b}, Juliana Feltrin de Souza^c, Daniella Cristina Gaio^d, João Armando Brancher^d, André Vieira^e, Cleber Machado-Souza^e, Gilberto de Souza Melo^{a,b}, Israel Silva Maia^f, Graziela De Luca Canto^{a,b}

^a Brazilian Center for Evidence-Based Research (COBE), Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

^b Department of Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

^c Department of Stomatology, School of Dentistry, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

^d School of Health Sciences, Positivo University, Curitiba, Paraná, Brazil

^e Graduate Program in Biotechnology Applied to Child and Adolescent Health - Pequeno Príncipe College, Pelé Research Institute, Curitiba, Paraná, Brazil

^f Baía Sul Research Institute, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Sleep bruxism
Obstructive sleep apnea
Genetic polymorphisms

ABSTRACT

Objective: To evaluate the association of single-nucleotide polymorphisms within the catechol-O-methyltransferase and 5-hydroxytryptamine receptor 2A genes with sleep bruxism in individuals diagnosed with obstructive sleep apnea.

Design: Sixty-nine individuals with suspected sleep-related problems were evaluated by polysomnography, following the recommendations of the American Academy of Sleep Medicine. Deoxyribonucleic acid (DNA) samples were collected only from 48 of the study participants because of missing polysomnographic data. DNA samples were collected and two single-nucleotide polymorphisms in the 5-hydroxytryptamine receptor 2A encoding *HTR2A* gene (rs4941573 and rs6313) and two in the catechol-O-methyltransferase gene (rs165656 and rs174675) were selected to be genotyped using real-time polymerase chain reaction. The association between sleep bruxism and genetic polymorphisms was investigated by recessive and dominant models. Association analyses were performed using a 95% confidence interval and the level of statistical significance was $p < 0.05$.

Results: From the 69 study participants, 48 were included in the polymorphism analysis and sleep bruxism was present in 35.4%. No significant differences were observed in the dominant and recessive models ($p > 0.05$).

Haplotype and diplotype analyses revealed the predicted four haplotypes and two diplotypes were not associated with sleep bruxism.

Conclusion: Polymorphisms rs174675 and rs165656 in the catechol-O-methyltransferase gene and rs4941573 and rs6313 in the 5-hydroxytryptamine receptor 2A gene were not significantly associated with sleep bruxism in individuals with obstructive sleep apnea.

List of abbreviations: A, adenine; COMT, catechol-O-methyltransferase enzyme; *COMT*, catechol-O-methyltransferase gene; C, cytosine; DNA, deoxyribonucleic acid; G, guanine; *HTR2A*, 5-hydroxytryptamine receptor 2A; *HTR2A*, 5-hydroxytryptamine receptor 2A gene; HWE, Hardy-Weinberg Equilibrium; OSA, obstructive sleep apnea; PSG, polysomnography; SB, sleep bruxism; SNP, single-nucleotide polymorphism; T, thymine.

* Correspondence to: Federal University of Santa Catarina, Department of Dentistry, Health Sciences Center, Delfino Conti, S/N, Trindade, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

E-mail address: joyceduarteortodtm@gmail.com (J. Duarte).

<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2021.105315>

Received 22 August 2021; Received in revised form 5 November 2021; Accepted 6 November 2021

Available online 17 November 2021

0003-9969/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.



ORIGINAL RESEARCH
Oral Pathology

Top 100 most-cited articles on intraoral squamous cell carcinoma and its risk factors: a bibliometric study

Gilberto MELO^(a) 

Carolina Simão FLAUSINO^(a) 

Isadora Koepp DARELLA^(b) 

Andressa Fernanda Paza

MIGUEL^(a) 

Paulo Antônio

MARTINS-JÚNIOR^(c) 

Elena Riet Correa RIVERO^(d) 

^(a)Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Postgraduate Program in Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

^(b)Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Dental School, Florianópolis, SC, Brazil.

^(c)Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Department of Paediatric Dentistry, Belo Horizonte, MG, Brazil.

^(d)Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Health Sciences Center, Department of Pathology, Florianópolis, SC, Brazil.

Declaration of Interests: The authors certify that they have no commercial or associative interest that represents a conflict of interest in connection with the manuscript.

Corresponding Author:

Elena Riet Correa Rivero
E-mail: riet.elena@gmail.com

<https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2022.vol36.0030>

Submitted: April 2, 2021
Accepted for publication: November 3, 2021
Last revision: November 24, 2021



Abstract: This study aimed to analyze the 100 most-cited articles on intraoral squamous cell carcinoma and its risk factors. A literature search was conducted on November 12, 2020 using the Web of Science database. Bibliometric data were collected after study selection. Bibliometric maps were generated using VOSviewer software. Articles were ranked based on the number of citations, ranging from 108 to 1513 per study. Eleven studies presented at least 400 citations. Articles were published between 1950 and 2017 and were mostly case-control studies (n = 39) and narrative reviews (n = 29). The author and institution in most articles were S. Franceschi (n = 10) and the International Agency for Research on Cancer (n = 10), respectively. The most prominent countries were the United States (n = 35), the United Kingdom (n = 16), and France (n = 9). Among the 100 most-cited articles, only one article was from Brazil, and the authors were affiliated with the Ludwig Institute for Cancer Research. Bibliometric maps showed strong associations between the terms alcohol, smoked/smokeless tobacco, and human papillomavirus. Emerging terms, such as areca nut and betel quid, were cited in recent articles. In conclusion, alcohol, tobacco, and human papillomavirus were the most prominent risk factors. Case-control design was the most common study design, and the majority of studies were conducted in the United States by the International Agency for Research on Cancer.

Keywords: Bibliometrics; Mouth Neoplasms; Alcohol Drinking; Areca; Epidemiologic Factors; Tobacco Products; Research Design.

Introduction

Approximately 90% of all intraoral malignancies are squamous cell carcinomas (SCCs), which are solid tumors originating from abnormal epithelial cells.¹ Tobacco smoking is considered a major etiological factor for intraoral SCC development, and although the harms associated with its carcinogenic potential are known, smoking is widely accepted as part of daily life.² Alcohol intake is also proposed as a risk factor for intraoral SCC, and although evidence does not support an association between isolated alcohol consumption and malignant transformation,³ its synergistic consumption with tobacco products (both smoked and smokeless) can significantly increase the odds for intraoral SCC development.⁴ Moreover,

Polymeric implants with drug-releasing capabilities: a mapping review of laboratory research

Gustavo Ferrari^{a,b}, Arthur Thives Mello^c, Gilberto Melo^d , Carlos Rodrigo de Mello Roesler^b, Gean Vitor Salmoria^{b,e}, Luiz Paulo de Souza Pinto^f and Izabelle de Mello Gindri^{a,g}

^aIaso Biodelivery Fabricação de Dispositivos com Liberação de Fármacos LTDA, Florianópolis, Brazil; ^bMechanical Engineering Department, Biomechanical Engineering Laboratory, University Hospital and Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil; ^cPostgraduate Program in Nutrition, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil; ^dPostgraduate Program in Dentistry, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil; ^eMechanical Engineering Department, NIMMA – Núcleo de Inovação em Moldagem e Manufatura Aditiva, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil; ^fCITH – Integrated Hormone Treatment Center, Curitiba, Brazil; ^gBio meds Pharmaceutica LTDA, Florianópolis, Brazil

ABSTRACT

Purpose: To provide a systematic map of the nature and extent of preclinical research concerning drug-releasing polymeric implants.

Significance: By summarizing available data, this mapping review can guide the development of new drug-delivery devices.

Methods: *In-vitro* studies assessing drug-delivery implants were reviewed. A study protocol was registered at Open Science Framework. The association of polymers with prominent drugs, manufacturing processes, geometries, treatments, and anatomical locations was assessed using the VOSviewer software. The release periods were also evaluated.

Results: A total of 423 articles, published between 1975 and 2020, were included and grouped into a framework with nine main categories. More than half of studies were published between 2010 and 2020. Among 201 individual polymers or combinations, the most investigated were PLGA, PCL, PLA, Silicone (SIL), EVA, and PU. Similarly, from 232 individual drugs or combinations, the most prominent were dexamethasone (DEX; anti-inflammatory), paclitaxel (PTX; anticancer), fluorouracil (anticancer), ciprofloxacin (CFX) hydrochloride (antibiotic), and gentamicin (GS; antibiotic). A total of 51 manufacturing processes were encountered, of which the most reported were solvent evaporation, compression molding (CM), extrusion (EX), electrospinning (ELS), and melt molding (MM). Among 38 implant geometries, cylinder (CIL) was the most prominent, followed by disk, square film, circular film (FCIR), and undefined film. Release times varied greatly, although the majority of articles ranged between 5 and 300 d.

Conclusions: Drug-delivery implants were highly heterogeneous due to its applicability for multiple health conditions. Most implants were made of PLGA and most drugs assessed presented anti-inflammatory, antibiotic, or anticancer effects. Solvent evaporation and CIL were the most prominent manufacturing process and geometry, respectively.

ARTICLE HISTORY

Received 20 October 2021
Revised 13 January 2022
Accepted 7 February 2022

KEYWORDS

Polymers; polymeric; drug delivery; drug delivery system; drug release; *in-vitro*; *in-vitro* release

Introduction

Current therapies to treat chronic diseases are based on continual administration of drugs, mostly through oral route. Although this is a simple and convenient way to treat most diseases, problems associated with efficacy, side effects, and medication adherence may lead to treatment failure. Before reaching the target receptor, drugs administered through the oral route have to cross the gastrointestinal barrier and reach the systemic circulation. During this process, medication may suffer degradation due to acidic conditions of the stomach or alkaline conditions in the intestine as well as due to first-pass metabolism. The latter may result in active metabolites associated with severe side effects [1]. Transdermal drug delivery systems have been proposed to overcome some of the challenges of oral route, since they avoid chemical degradation in the gastrointestinal route and first-pass

metabolism. However, only a few drug molecules present the required properties to cross through the skin's outer barrier. Furthermore, this system has limitations related to low drug load and the need of patch replacement every 1 or 2 d [2].

The use of implantable drug delivery systems has the potential to overcome much of the difficulties faced in conventional forms of drug administration [2,3]. This strategy aims to deliver specific doses of the drug in a controlled and prolonged manner in the site of action or systemically [3]. In this way, it is possible to achieve better treatment compliance and efficacy, as well as the reduction of adverse effects [4]. Pioneer studies proposed subcutaneous hormone pellets as drug delivery systems, which were employed to treat symptoms of premature menopause in young women [5]. Since then, an increasing number of devices, prepared with a combination of polymers and drugs, have been used for

CONTACT Izabelle de Mello Gindri  izabelleindri@hotmail.com  Iaso Biodelivery Fabricação de Dispositivos com Liberação de Fármacos LTDA, Florianópolis, 88030-000 Santa Catarina, Brazil

 Supplemental data for this article can be accessed [here](#).

© 2022 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group



Contents lists available at ScienceDirect

Oral Oncology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/oraloncology

Anticancer effects of putative and validated BH3-mimetic drugs in head and neck squamous cell carcinomas: An overview of current knowledge

Gilberto Melo^{a,*,} Carolina Amália Barcellos Silva^{b,} Angela Hague^{c,} Eric Kenneth Parkinson^{d,} Elena Riet Correa Rivero^e

^a Postgraduate Program in Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

^b Department of Morphological Sciences, Biological Sciences Center, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

^c Senior Lecturer, Bristol Dental School, Bristol, United Kingdom

^d Centre for Oral Immunobiology and Regenerative Medicine, Institute of Dentistry, Barts and the London School of Medicine and Dentistry, Queen Mary University of London, London, United Kingdom

^e Department of Pathology, Health Sciences Center, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Head and Neck Neoplasms
Head and Neck Cancer
Drug Therapy
Apoptosis
BCL-2
BCL-XL
BCL-W
MCL-1
BH3
Targeted Therapy

ABSTRACT

The purpose of this review was to summarise available literature concerning the anticancer effects of both putative and validated BH3-mimetics in head and neck squamous cell carcinomas. A literature search was performed and studies assessing malignant cell lines, xenograft models, and/or humans were considered eligible. A total of 501 studies were identified, of which 40 were included. One phase-II clinical trial assessing gossypol (combined with docetaxel) was found. The remaining 39 preclinical studies investigated cell lines and/or xenograft models involving the use of six validated BH3-mimetics (A-1210477, A-1331852, ABT-737, navitoclax, S63845, venetoclax) and six putative BH3-mimetics (ApoG2, gossypol, obatoclax, sabutoclax, TW-37, and YC137). In preclinical settings, most validated BH3-mimetics were capable of inducing apoptosis (*in-vitro*) and tumour growth inhibition (*in-vivo*). The majority of putative BH3-mimetics were also capable of inducing cell death, although important off-target effects, such as autophagy induction, were also described. Combinations with conventional anticancer drugs, ionising radiation, or multiple BH3-mimetics generally resulted in enhanced anticancer effects, such as increased sensitivity to apoptotic stimuli, especially considering some cell lines that showed resistance to either treatment alone. In conclusion, although clinical data are still insufficient to evaluate the anticancer effects of BH3-mimetics in head and neck squamous cell carcinomas, promising results in preclinical settings were observed concerning induction of cell death and inhibition of tumour growth. Therefore, further clinical trials are highly encouraged.

Introduction

Head and neck cancers comprise a heterogeneous group of malignancies. Most cancers in the head and neck are histologically characterised as squamous cell carcinomas, which can arise from the epithelium of the oral and nasal cavities, pharynx, and larynx [1]. Although available treatments can improve survival rates, serious consequences including disruption of vital anatomy, aesthetic impairments, and associated psychosocial issues may arise [2].

Aiming to improve treatment effectiveness and diminish complications, novel anticancer strategies are being developed, such as gene therapy, immunotherapy, and targeted therapy [3]. Molecularly targeted therapies focus on specific cancer-associated molecules (which are highly expressed in certain types of tumours) to disrupt cancer survival mechanisms and selectively induce malignant cell death [4].

Apoptosis inhibition is considered an essential step in the transition of normal to malignant cells. Amongst key regulators of apoptosis, the B-cell lymphoma 2 (BCL-2) family proteins play an important role [5]. The

Abbreviations: BCL, B-cell lymphoma; HNSCC, Head and neck squamous cell carcinoma; ICLAC, International Cell Line Authentication Committee; IR, Ionising radiation; MOMP, Mitochondrial outer membrane permeabilisation.

* Corresponding author at: Federal University of Santa Catarina, University Campus, Mailbox 476 – Trindade, Zip code: 88040900, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

E-mail addresses: melo.gilberto@hotmail.com (G. Melo), carolina.barcellos@ufsc.br (C.A.B. Silva), a.hague@bristol.ac.uk (A. Hague), e.k.parkinson@qmul.ac.uk (E.K. Parkinson), elena.riet@ufsc.br (E.R.C. Rivero).

<https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2022.105979>

Received 21 February 2022; Received in revised form 20 May 2022; Accepted 17 June 2022

Available online 8 July 2022

1368-8375/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.