



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

MATEUS JOSÉ DUTRA

**INDUÇÃO DA MORTE CELULAR IMUNOGÊNICA EM
LINHAGENS CELULARES DE LEUCOPLASIA E CARCINOMA
DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL SOB TRATAMENTO DE
ARTEMISININA E CISPLATINA**

2024

MATEUS JOSÉ DUTRA

**INDUÇÃO DA MORTE CELULAR IMUNOGÊNICA EM LINHAGENS CELULARES
DE LEUCOPLASIA E CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL SOB
TRATAMENTO DE ARTEMISININA E CISPLATINA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE BUCAL.

Área: Patologia e Diagnóstico Bucal. Linha de pesquisa: Inflamação, reparação tecidual e patologia do sistema estomatognático.

Orientadora: Profa. Assoc. Estela Kaminagakura Tango

São José dos Campos

2024

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2024]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Dutra, Mateus José

Indução da morte celular imunogênica em linhagens celulares de leucoplasia e carcinoma de células escamosas oral sob tratamento de artemisinina e cisplatina / Mateus José Dutra. - São José dos Campos : [s.n.], 2024.
95 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2024.

Orientadora: Estela Kaminagakura Tango.

1. Morte celular imunogênica. 2. Células apresentadoras de antígenos. 3. Leucoplasia oral. 4. Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. 5. Imunomodulação. I. Tango, Estela Kaminagakura, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

O impacto desta pesquisa está relacionado a uma nova forma de tratamento da Leucoplasia Oral, que é uma lesão potencialmente maligna, que acomete a boca de indivíduos e pode se transformar em um Carcinoma de Células Escamosas Oral que possui um pior prognóstico. A Leucoplasia Oral não possui protocolos de tratamentos estabelecidos, assim, a presente pesquisa objetivou verificar se dois compostos seriam úteis ao tratamento da desta lesão e do Carcinoma de Células Escamosas Oral, que são duas doenças bucais de importância em saúde pública a nível mundial.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

The impact of this research is related to a new form of treatment for Oral Leukoplakia, which is a potentially malignant lesion that affects the mouth of individuals and can transform into Oral Squamous Cell Carcinoma, which has a worse prognosis. Oral Leukoplakia does not have established treatment protocols, therefore, the present research aimed to verify whether two compounds would be useful in the treatment of this lesion and Oral Squamous Cell Carcinoma, which are two oral diseases of importance in public health worldwide.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Assoc. Estela Kaminagakura Tango (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. José Jara Sandoval

Universidade de Chile

Faculdade de Odontologia

Santiago

Prof. Assoc. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 02 de fevereiro de 2024.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, que nos dá oportunidades diárias de recomeçar, forças para seguir e perseverança para não desistir.

Ao meu pai, Clóvis, e à minha mãe, Dulcimar, que me deram todo o suporte necessário nesta trajetória, sempre me estimularam e me encorajaram para que eu seguisse trilhando meu caminho e alcançando os meus sonhos, sem vocês isso não seria possível, amo vocês.

À minha irmã, Aline, e meus dois sobrinhos, Lorenzo e Luiza, pelo apoio e compreensão de sempre, também dedico esta conquista a vocês.

AGRADECIMENTOS

O mestrado foi um grande desafio na minha formação profissional, e com o apoio e incentivo de inúmeras pessoas, essa trajetória fluiu mais tranquila. Assim, dedico algumas páginas do meu trabalho para agradecer a todos que contribuíram direta ou indiretamente na minha formação.

Agradeço ao ICT Unesp e ao diretor Prof. Assoc. Cesar Rogério Pucci, também ao Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal (CASB) e ao coordenador Prof. Assoc. Alexandre Luiz Souto Borges.

Agradeço a Deus pela vida, saúde e coragem que me concede diariamente. Embora desafios tenham surgido, Ele sempre mostrou o caminho a ser seguido. Também, agradeço a Ele pela família que me presenteou, que sempre esteve ao meu lado e me incentivando.

Assim, agradeço ao meu pai, Clóvis, e à minha mãe, Dulcimar, que nunca mediram esforços para que eu alcançasse meus sonhos, tiveram paciência em me ouvir por ligações, entenderam minhas longas ausências e sempre me deram suporte e energia para seguir em frente.

À minha irmã Aline, que sempre foi uma grande companheira, incentivadora e minha fiel amiga, que me escuta, me entende e compreende.

Aos meus sobrinhos, Lorenzo e Luiza, que compreenderam a minha distância e ausência, o “ti” ama vocês.

A todos da minha família, minha vó, tios e primos que sempre me desejaram sucesso e me enviaram boas energias. Também aos meus avós que já partiram mas que sempre me incentivaram quando criança.

À minha orientadora e amiga, professora Estela, obrigado pelo apoio, ensinamentos e orientações ao longo deste tempo. Diariamente me mostra caminhos que me tornam melhor como profissional e como pessoa. É uma referência pra mim. Agradeço o acolhimento, companheirismo e amizade que cultivamos neste período e por todo o ensinamento que me proporcionou em Estomatologia e Patologia, especialidades que me sinto realizado em atuar como cirurgião dentista. Onde eu florescer lá você estará!!

A todos os professores que contribuíram e contribuem com a minha formação, em especial as professoras da Estomatologia e Patologia Oral. Registro meu agradecimento em especial à professora Ana Lia, que me ensinou tanto de Patologia e à professora Janete com quem dividimos os desafios na clínica semanalmente. Também agradeço à professora Luana, que sempre me deu apoio e orientações para que esse trabalho fosse executado.

Agradeço também à professora Daniela Adorno, da Universidade do Chile, que se disponibilizou em me receber para o intercâmbio, e me recebeu tão bem, tornou minha experiência incrível e contribuiu muito na minha formação profissional e pessoal, além disso, se tornou uma grande amiga, à quem eu tenho muita admiração.

Agradeço à Universidade do Chile, lugar que me acolheu por um período do meu mestrado, e a todos professores da UChile, que tornaram minha experiência a melhor possível. Agradeço aos professores Gina, Gabriel, Íris, Ana, Juan Pablo, José J., José S. e Vicente Torres, obrigado pelos ensinamentos e amizade, e aos amigos que fiz neste período, Maca, Camila, Consuelo, Javiera, Karla e Tânia, obrigado pela troca de experiências nas clínicas e laboratórios.

Agradeço aos professores José Jara e Vicente Torres, que gentilmente cederam as células que foram essenciais para que esse estudo fosse executado.

A todos os funcionários do ICT Unesp, especialmente à Michelle, pelos milhares cafezinhos, confraternizações e conversas diárias. Também ao Sérgio, que sempre esteve pronto para ajudar quando fosse preciso.

Aos meus professores e a Universidade de Passo Fundo, que me formaram como cirurgião-dentista, especialmente à professora Gisele que me apresentou ao mundo da Patologia e Estomatologia, e que sempre me incentivou a trilhar esse caminho. Também a professora e amiga Daniela Corralo, com quem trabalhei muito e fiz minha primeira iniciação científica.

Aos alunos do ICT Unesp que contribuí na formação neste período e a todos os pacientes que por mim passaram, na clínica e no laboratório de patologia, sem vocês nada faria sentido, muito obrigado.

Aos meus colegas de pós graduação Maria Leticia, Charles, Kamilla, Luiza, Natalia, Bruna, Genesis, Gabi, Thais, Fernanda, Leticia, Lucas, Fábria e Jaque... são muitos nomes para recordar, mas obrigado pelos momentos de descontração e risadas diárias.

A todos os alunos de IC da professora Estela, que sempre estiveram dispostos à ajudar, Brunna, Isa, Nathan, Gustavo, Daniela...

A todos os colegas e alunos do LEIC, laboratório em que executei este estudo, obrigado pela ajuda, apoio e trocas neste período.

Aos meus amigos que sempre compreenderam a minha distância e ausência, Karol, Lucas, Weigleson, Iara, Bia, Karen, Jayne, Daniela, Ana, Luís, Ale, Pati, Nati, Pati B., Laís, Lucas e Milena, dos quais muitos são colegas dentistas, amigos que fiz durante a minha formação e que sempre levarei comigo.

À CAPES pela concessão da minha bolsa de mestrado.

Ao Programa Escala da Associação de Universidades do Grupo Montevideu pela concessão da minha bolsa de internacionalização.

Ao Laboratório de Estudos Interdisciplinar em Células (LEIC) onde esta pesquisa foi desenvolvida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento da pesquisa (processo 20/07375-3).

“A sabedoria suprema é ter sonhos bastante grandes para não se perderem de vista enquanto os perseguimos.” William Faulkner

RESUMO

Dutra MJ. Indução da morte celular imunogênica em linhagens celulares de leucoplasia e carcinoma de células escamosas oral sob tratamento de artemisinina e cisplatina [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2024.

Novos fármacos, como a artemisinina (ART), podem ser promissores no tratamento de lesões potencialmente malignas (LPM) e podem ser úteis quando usados em associação com outros quimioterápicos, especialmente na redução dos seus efeitos colaterais. A leucoplasia oral (LO) é a LPM mais comum da cavidade bucal e, pode evoluir para um carcinoma de células escamosas oral (CCEO). Não há terapia para evitar a sua transformação maligna, a quimioprevenção pode iniciar a morte celular imunogênica (MCI) que ativa o sistema imunológico para que reconheça e elimine as células malignas ou pré-malignas, sendo um potencial tratamento para as LPM. O presente estudo objetivou avaliar se a ART e a cisplatina (CSP) associadas ou não seriam capazes de induzir a MCI em linhagens celulares de LO (DOK) e CCEO (SCC-180). Material e métodos: As linhagens celulares HaCat (controle), DOK e SCC-180 foram tratadas por ART e CSP de forma combinada ou isolada, a fim de analisar a citotoxicidade e a genotoxicidade destes fármacos, além da capacidade destes em reduzir a migração celular e, se os compostos seriam capazes de induzir a expressão da proteína box de alta mobilidade (HGMB-1), caspase 3, 8, 9, e Calreticulina (CALR). Resultados: Em todas as linhagens celulares a CSP e CSP+ART causaram uma resposta dose dependente, apresentando maior citotoxicidade com doses mais altas, o que não foi observado com a ART. A formação de micronúcleos não foi observada no teste de genotoxicidade. A taxa de migração foi reduzida com as concentrações de IC₅₀ de CSP e ART+CSP para as células de CCEO. Não foram encontradas expressões significativas de proteínas relacionadas à MCI ou apoptose nas linhagens de LO e CCEO, tratadas com ART, CSP ou ART+CSP, indicando que outro tipo de morte celular possa ter ocorrido. Conclusão: A MCI e a apoptose não foram evidenciadas como forma de morte celular após as linhagens de LO e CCEO receberem tratamentos com ART, CSP e a associação de ambas. Efeitos genotóxicos não foram observados nas doses testadas. O tratamento de CSP e ART+CSP foi

capaz de reduzir a migração de células de CCEO. Também concluimos que novos estudos são necessários para elucidar se a ART e CSP podem ocasionar a MCI ou apoptose em linhagens celulares de LO e CCEO.

Palavras-chave: Morte celular imunogênica; Células apresentadoras de antígenos; Leucoplasia oral; Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço; Imunomodulação.

ABSTRACT

Dutra MJ. Induction of immunogenic cell death in leukoplakia and oral squamous cell carcinoma cell lines under artemisinin and cisplatin treatment [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2024.

New drugs, such as artemisinin (ART), may be promising in the treatment of potentially malignant lesions (PML) and may be useful when used in combination with other chemotherapy drugs, especially in reducing their side effects. Oral leukoplakia (OL) is the most common LPM of the oral cavity and can progress to oral squamous cell carcinoma (OSCC). There is no therapy to prevent its malignant transformation, chemoprevention can initiate immunogenic cell death (ICM) that activates the immune system to recognize and eliminate malignant or pre-malignant cells, being a potential treatment for LPM. The present study aimed to evaluate whether or not ART and cisplatin (CSP) combined would be capable of inducing MCI in LO (DOK) and CCEO (SCC-180) cell lines. Material and methods: HaCat (control), DOK and SCC-180 cell lines were treated by ART and CSP in combination or alone, in order to analyze the cytotoxicity and genotoxicity of these drugs, in addition to their ability to reduce cell migration and, whether the compounds would be able to induce the expression of high mobility box protein (HGMB-1), caspase 3, 8, 9, and Calreticulin (CALR). Results: In all cell lines, CSP and CSP+ART caused a dose-dependent response, showing greater cytotoxicity at higher doses, which was not observed with ART. The formation of micronuclei was not observed in the genotoxicity test. The migration rate was reduced with the IC50 concentrations of CSP and ART+CSP for OSCC cells. No significant expressions of proteins related to MCI or apoptosis were found in the LO and CCEO lines, treated with ART, CSP or ART+CSP, indicating that another type of cell death may have occurred. Conclusion: MCI and apoptosis were not evidenced as a form of cell death after the LO and CCEO lines received treatments with ART, CSP and the combination of both. Genotoxic effects were not observed at the doses tested. CSP and ART+CSP treatment was able to reduce OSCC cell migration. We also conclude that new studies are necessary to elucidate whether ART and CSP can cause MCI or apoptosis in LO and CCEO cell lines.

Keywords: Immunogenic cell death; Antigen presenting cells; Oral leukoplakia; Squamous cell carcinoma of the head and neck; Immunomodulation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ART	<i>Artemisinina</i>
ATP	Adenosina trifosfato
CALR	Calreticulina
CCEO	Carcinoma de células escamosas oral
CSP	Cisplatina
DAMPs	<i>Damage associated molecular patterns</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ERO	Espécies reativas de oxigênio
HMGB1	<i>High mobility group box protein 1</i>
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-18	Interleucina 18
LO	Leucoplasia oral
LPM	Lesões potencialmente malignas
MCI	Morte celular imunogênica
NM	Neoplasia maligna
RE	Retículo endoplasmático

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Leucoplasia Oral.....	19
2.2 Carcinoma de Células Escamosas Oral	21
2.3 Morte Celular Imunogênica.....	23
2.4 Artemisinina	25
2.5 Cisplatina	26
2.6 Associação de Compostos	28
3 PROPOSIÇÃO	30
3.1 Objetivo geral:.....	30
3.2 Objetivos específicos:.....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 Seleção das linhagens celulares e divisão dos grupos experimentais .	32
4.2 Cultura celular.....	32
4.3 Diluição dos compostos	33
4.4 Teste de viabilidade celular	34
4.5 Teste de genotoxicidade.....	35
4.6 Teste de migração celular.....	35
4.7 Ensaio de ELISA	36
4.8 Forma de análise dos resultados	38
5 RESULTADO	39
5.1 Viabilidade celular	39
5.1.1 Linhagem HaCat	39
5.1.2 Linhagem DOK.....	42
5.1.3 Linhagem SCC-180	46
5.2 Teste de genotoxicidade.....	48
5.3 Teste de migração celular.....	50
5.3.1 Linhagem HaCat	50
5.3.2 Linhagem DOK.....	53
5.3.3 Linhagem SCC-180.....	56

5.4 Expressão de proteínas	59
5.4.1 Linhagem HaCat	59
5.4.2 Linhagem DOK.....	65
5.4.3 Linhagem SCC-180	71
6 DISCUSSÃO	78
7 CONCLUSÃO	83
REFERÊNCIAS	84

1 INTRODUÇÃO

Novos meios e fármacos para o tratamento de NM ou das LPM devem ser estudados para a melhora no prognóstico e na qualidade de vida dos pacientes (Hsiao, Liu, 2010). Fármacos de origem natural apresentam vantagens no tratamento de NM, como a redução de efeitos colaterais no decorrer da terapia. A ART é extraída de uma planta medicinal que age contra diversas doenças, principalmente contra a malária e, também apresenta uma ação antineoplásica (Efferth et al., 2001; Efferth et al., 2003; Reungpatthanaphong, Mankhetkorn, 2002; Woerdenbag et al., 1993). Por possuir origem natural, a ART é um composto muito estudado para ser empregado no tratamento do câncer, pois possui grande importância na redução dos efeitos colaterais quando comparado aos quimioterápicos empregados atualmente (Santos et al., 2020).

A ART foi relacionada com eventos importantes no tratamento de NM. Ela permeia a membrana celular e reage com o ferro das células produzindo ERO, que induz o estresse oxidativo celular e a apoptose, conferindo citotoxicidade e gerando um efeito citostático sobre células malignas, ocasionando uma desorganização do DNA, afetando o ciclo, a divisão e o crescimento das células, promovendo perda da integridade e a morte celular (Jia et al., 2016; Lang et al., 2019; Letis et al., 2017; Tin et al., 2012; Wong et al., 2017), sendo propriedades importantes para o tratamento de NM. Ainda, o estresse oxidativo pode ocasionar a MCI, que é um meio promissor no tratamento do câncer e das LPM (Efferth et al., 2011; Slezakova, Ruda-Kucerovala, 2017).

Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que o composto teve ação antineoplásica contra vários tipos de câncer (Jia et al., 2016; Letis et al., 2017; Wong et al., 2017) e foi capaz de inibir a formação de metástases (Feng et al., 2016; Li et al., 2017) além de, ter ocasionado a morte de células de NM de boca em um estudo *in vitro* (Yamachika et al., 2004) demonstrando um potencial para ser empregado como quimioterápico juntamente com os disponíveis atualmente, à exemplo da CSP.

A CSP é um quimioterápico à base de metais muito utilizada contra uma ampla gama de NM, como as de testículo, ovário, câncer de bexiga, pulmão, colo do útero, câncer gástrico e cabeça e pescoço (Ho et al., 2016; Shen et al., 2012). Atua no DNA

da célula, onde se liga ao DNA genômico ou mitocondrial, criando alterações que interrompem a replicação, ativando vias de transdução que levam à necrose ou apoptose da célula (Achkar et al., 2018). Porém, mudanças genéticas e epigenéticas podem acarretar a resistência da neoplasia ao fármaco, especialmente pelo aumento da capacidade de reparo a danos ao DNA, pela inibição da via de apoptose e pela própria inativação da CSP (Shen et al., 2012). Outra limitação importante do tratamento com CSP são os efeitos colaterais como nefrotoxicidade, ototoxicidade, hepatotoxicidade e neurotoxicidade (Oun et al., 2018).

Especialmente para reduzir a resistência da CSP pelas NM e para diminuir os efeitos colaterais do tratamento, tem-se estudado a terapia combinada com outros fármacos que também apresentam propriedades antineoplásicas, principalmente em associação com compostos de origem natural. Essas estratégias terapêuticas têm sido investigadas para o tratamento de diversas NM (Santos et al., 2020).

As terapias combinadas de fármacos podem reduzir as doses e a toxicidade, modificar a biodisponibilidade e alterar as propriedades físico-químicas, gerando efeitos sinérgicos e potencializando o tratamento (Eling et al., 2015). O artemeter, derivado da ART, quando combinado com paclitaxel, aumentou o valor terapêutico deste quimioterápico e diminuiu a sua toxicidade (Li et al., 2014), a ART e seus derivados podem ser úteis quando associados a quimioterápicos atualmente disponíveis (Li et al., 2021).

A CSP associada com diidroartemisinina, um outro derivado da ART, aumentou significativamente a quantidade de células apoptóticas em linhagens celulares de hepatocarcinoma mesmo com a redução da dosagem dos quimioterápicos. A diidroartemisinina atuou como uma sensibilizadora antitumoral da CSP (Rao et al., 2022).

Os tratamentos para as NM com os quimioterápicos empregados atualmente, como o caso da CSP, geram a morte celular por apoptose, que ocorre de forma silenciosa, vista como fisiológica para o sistema imune, onde as células sofrem alterações citoplasmáticas, nucleares e alterações na permeabilidade da membrana plasmática, e então formam-se corpos apoptóticos que são rapidamente eliminados por fagocitose, não provocando a geração da imunidade antitumoral que é formada pela MCI (Ahmed, Tait, 2020; Kroemer et al., 2022; Messmer et al., 2019).

Especificamente, a MCI é uma forma de morte celular e quando ocorre em células malignas liberam antígenos que ativam o sistema imunológico adaptativo (Kepp et al., 2014; Vanmeerbeeg et al., 2020), gerando resposta imune específica ao tumor para que posteriormente as células de defesa possam atuar no reconhecimento e eliminação das células (Diederich, 2019; Galluzzi et al., 2016; Kroemer et al., 2013; Obeid et al., 2007; Troitskaya et al., 2022; Vanmeerbeeg et al., 2020). A MCI é reconhecida como imunogênica pelo sistema imune pois induz uma imunidade antitumoral além de melhorar a eficácia da terapia empregada no tratamento de NM. Esse método de morte celular ganhou um enfoque de estudos no ramo da imunoncologia devido às suas contribuições no tratamento do câncer (Garg et al., 2013; Kroemer et al., 2022).

Assim, fármacos que induzam a MCI são promissores na terapia de NM e das LPM. As células moribundas, que entram neste tipo de morte celular, expõem superficialmente algumas moléculas como CALR, proteínas de choque térmico (HSP70 e HSP90), ATP e o HMGB1, sendo importantes para evidenciar se os fármacos empregados podem ocasionar a MCI (Ahmed, Tait, 2020; Kroemer et al., 2022).

A ART já foi relacionada com eventos ligados à MCI (Slezakova, Ruda-Kucerova, 2017), bem como a CSP e seus derivados (Hato et al., 2014; Martins et al., 2011), sinalizando que podem ser fármacos alternativos no tratamento imunogênico contra LPM e o CCEO (Petroni et al., 2021).

As LPM da boca, apresentam-se, na maioria das vezes, como placas brancas (leucoplasia) ou vermelhas (eritroplasia) (WHO, 2022). O termo LO é designado para uma mancha ou placa branca, não caracterizada clínica ou patologicamente como outra doença, não sendo um diagnóstico histopatológico (Shafer, Waldron, 1961). As LO são consideradas LPM, pois mesmo que as lesões sejam pequenas, estas já podem apresentar elevados graus de displasia epitelial ou até mesmo carcinomas, favorecendo a sua evolução maligna, culminando posteriormente em um CCEO (Warnakulasuriya, Ariyawardana, 2016; Woo et al., 2014).

A porcentagem de LO que se transformam em malignas é muito ampla, variando de 1,1 até 40,8% (Aguirre-Urizar et al., 2021), podendo evoluir para um CCEO ou não, entretanto quanto maior for o grau de displasia epitelial, maiores são as chances de malignização (Chaturvedi et al., 2020). Alguns autores indicam que

lesões com displasia epitelial moderada ou severa devem ser totalmente removidas, sendo uma limitação para LO de grande extensão (Neville, Day, 2002). Portanto, não há um protocolo estabelecido de tratamentos eficazes para a LO, nem para a prevenção da sua transformação maligna, tendo o manejo e o acompanhamento clínico da LO variando de acordo com profissionais e pela própria literatura (Mehanna et al., 2009).

O CCEO corresponde à cerca de 90% das NM de cabeça e pescoço (Kong, Hong, 2015), sendo a NM mais comum da boca (Ferlay et al., 2020). No ano de 2020, esperava-se que 377.713 novos casos tenham surgido em todo o planeta (Ferlay et al., 2020). Geralmente, apresenta-se como uma úlcera que não cicatriza, mas placas eritematosas também podem ser uma forma de apresentação do CCEO (Aguirre-Urizar et al., 2021; Chi et al., 2015; Neville, Day, 2002).

O CCEO possui um curso clínico desafiador, implicando na piora da qualidade de vida e a redução de sobrevida de seus portadores, além disso, o tratamento é complexo, requerendo uma equipe multidisciplinar, e pode gerar sequelas mutilantes, afetando a função e a estética (Valdez, Brennan, 2018).

O consumo de bebidas alcoólicas e tabaco estão fortemente relacionados aos casos de LO e CCEO, principalmente se estas dependências estiverem associadas (Warnakulasuriya et al., 2007). Evitar a exposição a esses produtos é a principal forma de prevenção do CCEO, também, a detecção precoce do CCEO e das LPM tem um papel fundamental em relação a um melhor prognóstico e previsibilidade de tratamento destes pacientes, especialmente devido a taxa de mortalidade gerada pelo CCEO, que atinge 45 a 55% dentro dos primeiros cinco anos (Ferlay et al., 2020), justamente por as lesões se apresentarem em estágios avançados pelo diagnóstico tardio, reduzindo as chances de sucesso do tratamento que é feito por meio de cirurgias, radioterapia, quimioterapia ou associação das técnicas (Chow et al., 2016).

2 REVISÃO DE LITERATURA

Produtos naturais e seus derivados têm sido estudados por muitos anos para serem empregados nos tratamentos de diversas doenças, especialmente por suas vantagens como baixa toxicidade, efeitos colaterais reduzidos e a ampla atividade biológica que possuem. Por 20 anos consecutivos, institutos norte-americanos contribuíram na análise de extratos de mais de 15.000 espécies de plantas, buscando identificar atividade antineoplásica em compostos naturais (Weaver, 2014).

Em triagens como estas, extratos naturais foram identificados com propriedades antineoplásicas e estudados a fundo, alguns estão sendo empregados atualmente no tratamento de NM (Efferth et al., 2001; Efferth et al., 2003; Reungpatthanaphong, Mankhetkorn, 2002; Woerdenbag et al., 1993). Estas descobertas têm grande impacto no tratamento quimioterápico, pois estes compostos podem agir causando a MCI, ativando o sistema imunológico adaptativo, gerando resposta imune contra o tumor (Kepp et al., 2014; Vanmeerbeeg et al., 2020), diferentemente dos quimioterápicos atuais empregados. Outro grande impacto dos quimioterápicos de origem natural é que geram menos efeitos colaterais como a nefrotoxicidade, ototoxicidade, hepatotoxicidade e neurotoxicidade e, resistência ao fármaco, que é comum com CSP, um composto a base de metais (Ho et al., 2016; Oun et al., 2018; Shen et al., 2012).

Embora o tratamento principal do CCEO seja por meio de cirurgia, quando a quimioterapia é empregada, a CSP é o fármaco de escolha (Kong, Hong, 2015; de Castro et al., 2018; Li et al., 2020). Sabendo das limitações deste quimioterápico, fármacos de origem natural podem ser úteis no tratamento do CCEO, sendo uma possível forma de tratamento inclusive das LPM, que apresenta um potencial de transformação maligna, e não possui tratamento estabelecido (Aguirre-Urizar et al., 2021).

2.1 Leucoplasia Oral

As LPM ou “distúrbios potencialmente malignos orais” quando ocorrem podem revelar histologicamente uma displasia epitelial ou um CCEO, por isso as LPM são denominadas qualquer anormalidade da mucosa oral associada a um risco aumentado de desenvolver câncer oral (Warnakulasuriya et al., 2020). As LPM são observadas em até 4,47% da população mundial, sendo a LO a mais comum, com prevalência de 4,11% (Carrard, Van der Waal, 2018; Mello et al., 2018). A presença da displasia epitelial nas LPM é utilizada como um fator indicativo que pode ocorrer a transformação maligna destas lesões (Warnakulasuriya et al., 2007). Como exemplo, se a displasia epitelial for observada na LO, a sua probabilidade de transformação maligna é de 15,3% (Stojanov, Bin 2022).

A LO é definida como uma placa predominantemente branca de risco questionável que excluiu outras doenças ou distúrbios conhecidos que não apresentam risco aumentado de câncer (Warnakulasuriya et al., 2007).

Clinicamente, a LO pode se apresentar como manchas ou placas brancas, de superfície lisa, plana, verrucosa ou fissurada (Carrard, Van der Waal, 2018). Quando houver a presença de áreas vermelhas é denominada eritroleucoplasia e apresentam um alto risco de transformação maligna (Carrard, Van der Waal, 2018).

Fatores de risco para o surgimento de uma LO são as diversas formas de tabaco e o consumo crônico de álcool, porém pode ser observada em pacientes que não possuem essas dependências (Warnakulasuriya, Ariyawardana, 2016). Alterações cromossômicas, como deleções e mutações em genes supressores de tumor ou proto-oncogenes favorecem que a LO e outras LPM sofram transformação maligna (Banerjee et al., 2005).

Embora a malignização possa ser reduzida com a excisão completa da LO, esse risco não é excluído totalmente, pois além de recidivas, outros sítios clinicamente saudáveis podem desenvolver um CCEO (Iocca et al., 2020; Warnakulasuriya, Ariyawardana, 2016). Atualmente, o tratamento padrão da LO é a excisão cirúrgica e acompanhamento clínico do paciente, mesmo que possa recorrer e sofrer transformação maligna (van der Waal, 2009).

Outras formas de tratamento como criocirurgia, cirurgia à laser, retinoides tópicos ou sistêmicos foram testados, porém, não revelaram evidências concretas para evitar ou reduzir as chances de transformação maligna (Chiesa et al., 2005; Kvaal, Warloe, 2007; Lodi, Porter, 2008; Tradati et al., 1997; van der Waal, 2009).

A quimioprevenção também tem sido testada no tratamento da LO, podendo ser de origem natural ou sintética, podendo ser utilizado por via tópica ou sistêmica (Liao et al., 2023). Todavia, essa forma de tratamento possui sucesso limitado (Kuriakose, Sharan, 2006; Xie, Liu, 2017), não tendo uma estratégia farmacológica estabelecida (Monteiro de Oliveira Novaes, William, 2016).

A quimioprevenção pode atuar em diferentes estágios da carcinogênese, como no bloqueio de danos ao DNA evitando a transformação maligna, ou suprimindo a proliferação de células pré-malignas que são observadas em LPM com displasia epitelial (Mohan Shankar et al., 2021).

Agentes quimiopreventivos revelaram-se promissores no tratamento da LPM. A vitamina A foi capaz de causar regressão completa de 57,1% de LO, sem causar efeitos colaterais (Stich et al., 1988). Já o ZengShengPing, que é uma mistura das ervas *Sophra tonkinensis*, *Polygonum bistorta*, *Prunella vulgaris*, *Sonchus brachyotus*, *Dictamnus dasycarpus* e *Dioscorea bulbifera*, diminuiu em mais da metade o tamanho de LO, em 67,8% dos pacientes incluídos no estudo, após três meses de tratamento (Sun et al., 2010).

2.2 Carcinoma de Células Escamosas Oral

O CCEO é a NM mais comum em boca, representando 90% de todos os tipos de câncer neste sítio (WHO, 2022), sendo um problema global de suma importância. Vários fatores estão associados ao desenvolvimento de um CCEO, como fatores genéticos e principalmente os habituais como o tabagismo e etilismo (Warnakulasuriya, Ariyawardana, 2016). Geralmente acomete pessoas acima dos 40 anos, do sexo masculino, embora tenha-se descrito recentemente um aumento de casos em pacientes abaixo desta faixa etária (Kaminagakura et al., 2022).

Sugere-se que para que se estabeleça um CCEO invasivo ocorra uma série de eventos ambientais, histológicos e moleculares antes, onde, por exemplo o álcool, pode servir como solvente para carcinógenos presentes no tabaco e outras fontes, ou a presença de uma LPM que pode conter displasia epitelial possam progressivamente transformar-se em um CCEO (Johnson et al., 2020; Warnakulasuriya et al., 2020).

Desta forma, antes de um CCEO invasor, o epitélio pode apresentar hiperplasia, distintos graus de displasia ou um carcinoma *in situ* (Johnson et al., 2020).

O estudo de biomarcadores moleculares é um campo muito pesquisado para o CCEO, visando fins prognósticos de um CCEO já estabelecido ou e prever a transformação maligna nos casos das LPM. Como exemplo, o CD44, um receptor de superfície da célula para ácido hialurônico e metaloproteinases de matriz, está relacionado com a migração celular, assim, sua expressão em CCEO indica piores prognósticos (Faber et al., 2011). Altos níveis de expressão das proteínas CD133 e ALDH1, assim como o CD34, também são indicadores de invasão e metástases das células cancerígenas, sendo marcadores com significado prognóstico nos casos de CCEO (Yu, Cirillo, 2020; Zhang et al., 2010).

Embora haja um aumento de evidências e estudos envolvendo fatores prognósticos para os casos de CCEO, novos meios e modalidades de tratamento para essa NM permanecem sem grandes avanços, sendo a cirurgia a principal forma de tratamento para o CCEO, que ocasiona sequelas estéticas e funcionais, além de não eliminar a doença em estádios avançados, portanto, têm limitações importantes e muitas vezes, não contribuiu para a sobrevida do paciente (Chow et al., 2016; Valdez, Brennan, 2018). A cirurgia pode ser complementada com radioterapia e/ou quimioterapia, geralmente quando as margens cirúrgicas estão comprometidas, quando há invasão perineural, embolização vascular e/ou linfática (Ettinger et al., 2019).

Os quimioterápicos empregados, de forma geral, atuam danificando o DNA ou formando ERO, causando uma série de eventos que geram a morte celular por apoptose (Schomberg, 2019). A CSP, carboplatina, bleomicina, docetaxel, hidroxiuréia, metotrexato, entre outros, são quimioterápicos usados para tratamento do CCEO quando essa modalidade é empregada (Schomberg, 2019). Porém, várias são as limitações e efeitos colaterais destes quimioterápicos, como ser tóxico ao sistema nervoso, rins, fígado e por causar morte não imunogênica e resistência da neoplasia a estes quimioterápicos. Desta forma, novos compostos que causem a morte da célula neoplásica ativando outras vias e que tenham menores efeitos colaterais e baixa resistência, devem ser investigados.

2.3 Morte Celular Imunogênica

Os quimioterápicos atuais, na grande maioria, induzem a morte das células neoplásicas por meio da apoptose, que é um tipo de morte celular programada. As células que entram em apoptose passam por uma série de etapas como encolhimento do citoplasma, fragmentação do núcleo, condensação da cromatina e bolhas na membrana plasmática, gerando os corpos apoptóticos, ou pequenos fragmentos da célula apoptótica, que posteriormente são reconhecidos e eliminados por fagocitose (Arandjelovic, Ravichandran, 2015).

A apoptose é iniciada por fatores extrínsecos e/ou intrínsecos, tais fatores ativam as caspases apoptóticas iniciadoras, como a caspase 2, 8, 9 e 10, que ativam as caspases efetoras, como a 3, 6 e 7, fragmentando a célula e gerando os corpos apoptóticos (Kesavardhana et al., 2020).

Caspases ativadas inativam a liberação de DAMPs que são imprescindíveis para que ocorra a MCI (Giampazolias et al., 2017), quando a morte da célula não ocorre por ativação da cascata de caspases há geração de DAMPs e consequentemente uma MCI, portanto a ativação de caspases apoptóticas impede com que ocorra a MCI (Rongvaux et al., 2014).

Já a morte celular com a ativação de caspases inflamatórias, como a caspase 1, 4, 5, 11 e 12, induz a morte celular inflamatória chamada de piroptose, onde ocorre liberação de DAMPs, porém esse tipo de morte não é observado com todos os quimioterápicos em uso atualmente (Kesavardhana et al., 2020).

A MCI é uma forma de morte celular que é regulada e capaz de induzir a ativação do sistema imunológico adaptativo em ambiente imunocompetente (Galluzzi et al., 2018). Pode ser iniciada por algumas drogas quimioterápicas, vírus oncolíticos, terapia fotodinâmica, entre outros (Galluzzi et al., 2018). As células que passam por esse tipo de morte podem regular a atividade imune, já que são capazes de liberar ou expor moléculas em sua superfície, servindo como sinais de estímulo ao sistema imune (Ahmed, Tait, 2020), portanto a MCI é um tipo de morte celular importante para o tratamento de NM e na imunoterapia.

A imunoterapia no tratamento do câncer estimula o sistema imunológico a criar uma resposta antitumoral, que pode ser alcançada por meio da MCI, que é iniciada por DAMPs, não observada com os quimioterápicos atuais (Ahmed, Tait, 2020).

A MCI inicia-se com algum tipo de estresse celular, como o estresse do retículo endoplasmático (RE), produção de espécies reativas a oxigênio (ERO), a autofagia ou a cadeia de apoptose, então a célula libera DAMPs, como a calreticulina (CALR), adenosina trifosfato (ATP) e o *high mobility group box protein 1* (HMGB1) que são expostos na superfície da célula moribunda, ativando células dendríticas que englobam e apresentam os antígenos da célula morta para o sistema imunológico, especialmente para os linfócitos T (CD8+) (Garg et al., 2012; Kepp et al., 2014; Kroemer et al., 2022; Troitskaya et al., 2022; Vanmeerbeeg et al., 2020; Yamazaki et al., 2020). A MCI pode ser responsável por gerar a resposta imune específica ao tumor, para que posteriormente as células de defesa possam atuar no reconhecimento e eliminação das células malignas (Diederich, 2019; Galluzzi et al., 2016; Kroemer et al., 2013; Obeid et al., 2007; Troitskaya et al., 2022; Vanmeerbeeg et al., 2020), também, provocando a eficácia a longo prazo de medicamentos antineoplásicas, já que ocasionam a morte direta das células neoplásicas e conferem a imunidade antitumoral e memória imunológica (Galluzzi et al., 2018).

A CALR, um dos DAMPs, quando exposta na superfície da membrana celular atua de uma forma sinalizadora ao interagir com receptores CD91 nos fagócitos para que se ativem e façam a fagocitose (Galluzzi et al., 2016; Li, 2018). Outro tipo de DAMP, o ATP, quando liberado para fora da célula, sinaliza para que células de defesa reconheçam as células moribundas, ainda, age na pró-inflamação, já que atua em receptores de células apresentadoras de antígenos fazendo sua quimioatração (Yatim et al., 2017). O ATP, quando se liga em receptores das células apresentadoras de antígenos pode liberar interleucinas que ativam células T, contribuindo na eliminação destas células moribundas, assim, todos esses fatores agem diretamente no sistema imunológico, promovendo a memória celular (Galluzzi et al., 2016; Kepp et al., 2014; Martins et al., 2014; Vanmeerbeeg et al., 2020).

Já o HMGB1, uma proteína nuclear, quando liberado para o meio extracelular pode ligar-se a TLR4 de células dendríticas estimulando a apresentação de antígenos tumorais de células moribundas ao sistema imune (Apetoh et al., 2007; Ghiringhelli et

al., 2009). O HMGB1, é inativado indiretamente pela ativação de caspases (Kazama et al., 2008).

Estudos *in vivo* em camundongos vacinados contra tumores mostraram em células neoplásicas, que a depleção ou neutralização de HMGB1 comprometeram a capacidade dos animais em resistir à tumorigênese, evidenciando a importância do HMGB1 na ativação do sistema imune para combater tumores (Apetoh et al., 2007).

Embora muito dos quimioterápicos atuais não causem a MCI, tratamentos complementares que causem estresse nas células, poderiam restaurar a imunogenicidade de quimioterápicos como a CSP por exemplo (Martins et al., 2011). As terapias combinadas de fármacos podem ser extremamente benéficas, já que a ação sinérgica pode possibilitar a redução das doses e efeitos colaterais, melhorando o tratamento (Eling et al., 2015) como é o caso da ART e seus derivados, que podem ser úteis quando associados a quimioterápicos atualmente disponíveis (Li et al., 2021). A diidroartemisinina, um derivado da ART foi capaz de atuar como um sensibilizador antitumoral da CSP (Rao et al., 2022), evidenciando que novos compostos podem melhorar os tratamentos quimioterápicos atuais por meio da sensibilização imune e da MCI.

2.4 Artemisinina

A ART, derivada da erva *Artemisia annua*, uma planta chinesa, é um composto de origem natural muito investigado devido as suas propriedades antineoplásicas (Konstat-Korzenny, 2018). Diversos derivados sintéticos da ART foram desenvolvidos, como a diidroartemisinina, artesunato, arteméter e o arteter, e estudos mostraram que estes possuem ações imunoterapêuticas em linhagens de células malignas, inclusive as que são resistentes aos quimioterápicos atuais (Efferth 2017; Konstat-Korzenny, 2018).

A ART e seus derivados possuem pontes de endoperóxido que reagem com ferro dentro de eritrócitos gerando as espécies reativas de oxigênio (ERO), a formação de ERO contribui para a morte de parasitas, no caso da malária (Zhang et al., 1992). Além disso, as ERO podem dar início ao processo da MCI, sendo um composto

promissor para o tratamento imunogênico de NM, ou ainda, pode dar início a outros tipos de morte celular, incluindo apoptose e ferroptose (Li et al., 2008; Wang et al., 2012).

Evidências *in vitro* e *in vivo* foram reportadas sobre o uso da ART e seus derivados em relação as suas propriedades antineoplásicas. Uma investigação em linhagens de CCEO mostrou que a ART foi citotóxica e ocasionou a morte destas células por apoptose, que é o tipo de morte celular que ocorre em quimioterápicos empregados atualmente, assim, o estudo sugeriu que a ART possui uma possível aplicação clínica para o tratamento quimioterápico do CCEO (Yamachika et al., 2004).

Cao et al., (2019) avaliaram *in vitro* e *in vivo* os efeitos da ART no câncer de mama murino. Os resultados mostraram que a ART aumentou a apoptose das células malignas *in vitro* e impediu o crescimento de tumores *in vivo* aumentando a sobrevivência dos camundongos, além de ter atuado promovendo a ativação de células T, indicando que pode ser útil tanto para a apoptose das células neoplásicas quanto para a MCI.

Roh et al., (2017) investigaram os efeitos do artesunato em linhagens de células derivadas de câncer de cabeça e pescoço, incluindo linhagens resistentes à CSP. O artesunato matou as células neoplásicas seletivamente e foi capaz de induzir a ferroptose destas células.

O artesunato, derivado semi-sintético da ART, reduziu em 30% o tamanho de um carcinoma de células escamosas em laringe de um paciente que recebeu tratamento de 60 mg via intramuscular, aplicado duas vezes na semana; sugerindo que o composto possui potencial para ser empregado no tratamento quimioterápico de NM em região de cabeça e pescoço (Singh, Verma, 2002).

Embora existam evidências da utilidade e eficácia da ART e seus derivados no tratamento das mais diversas neoplasias, não há resultados na literatura evidenciando qual seria a sua ação em células displásicas. Sabe-se que a ART atuou de forma seletiva reduzindo as células malignas (Roh et al., 2017).

2.5 Cisplatina

NM de diversos sítios anatômicos, como colo de útero, ovário, testículo, bexiga, pulmão e em região de cabeça e pescoço, incluindo o CCEO, são tratados com a CSP (Ho et al., 2016; Shen et al., 2012).

Embora a CSP seja muito empregada e tenha ação comprovada, mudanças genéticas e epigenéticas, aumento de reparo a danos do DNA, inibição da via de apoptose e a inativação do composto podem ocorrer, ocasionando ineficácia e resistência da neoplasia ao quimioterápico (Shen et al., 2012). Outra limitação do tratamento com CSP é a capacidade tóxica que possui, afetando diversos sistemas do corpo, como rins, fígado e sistema nervoso (Oun et al., 2018).

Os compostos à base de platina, em conjunto com a água, sofrem hidratação e dissociação resultando em um hidrato de platina carregado positivamente, que é atraído pelo DNA com carga negativa no núcleo da célula, assim, o composto de platina-água sofre reação de troca de ligante com átomos de nitrogênio em moléculas de DNA, gerando adutos de DNA-platina. Tais adutos inibem a replicação celular e ativam vias que levam a morte da célula, por necrose ou apoptose (Achkar et al., 2018; Ober, Lippard, 2007).

Embora seja descrito a forma como a CSP e seus derivados atuam causando a morte da célula, Hato et al., (2014) reportaram que esse quimioterápico estimula as células Ts, podendo induzir a MCI.

A morte celular causada pela oxaliplatina, um derivado da CSP, seria por via de estresse ribossômico, e não por danos ao DNA, assim, alguns autores sugerem que a oxaliplatina pode causar a MCI, sendo um importante mecanismo antineoplásico (Bruno et al., 2017), desta forma, se a CSP, e/ou seus derivados, forem capazes de causar a morte celular e causar estresse ribossômico ou do RE estariam atuando de forma dupla, na morte direta da célula e restaurando a imunogenicidade de fármacos que possivelmente não causam a MCI, como a CSP (Martins et al., 2011).

Compostos de platina indicaram capacidade de promover a MCI diretamente, como exposição de CALR na superfície celular, liberação de ATP e HMGB1, fatores diretamente relacionados com a MCI (Wong et al., 2015). Tham et al., (2020) evidenciaram a relação de compostos de platina com a MCI, pois células de câncer colorretal tratadas com compostos de platina foram capazes de liberar DAMPs imunogênicos e a gerar ERO (Tham et al., 2020).

Portanto, investigações adicionais do uso da CSP e sua relação com a MCI no CCEO e na LO possuem importância para o manejo destas lesões, sendo um campo de importantes estudos.

2.6 Associação de Compostos

As práticas terapêuticas utilizando dois ou mais fármacos ou com múltiplas drogas são utilizadas há anos no tratamento de diversas doenças, em especial no tratamento do câncer. Pois, a combinação de compostos pode potencializar os efeitos na célula-alvo ou no mecanismo de ação, fazendo com que as concentrações terapêuticas possam ser diminuídas e, conseqüentemente reduzir os efeitos indesejáveis da quimioterapia (Baxevanis et al., 2009; Gao et al., 2020).

Quando dois ou mais fármacos são empregados, os diferentes mecanismos de ação de cada um podem direcionar o efeito no mesmo alvo, tratando a doença de forma mais eficaz. Podem atuar de forma sinérgica, criando resultados favoráveis como o aumento da eficácia do efeito terapêutico, redução da dosagem mantendo ou aumentando a mesma eficácia, evitando a toxicidade e podendo retardar ou diminuir as chances de resistência ao composto, assim, diferentes combinações de fármacos têm sido utilizadas no tratamento de inúmeras doenças, especialmente contra as NM (Chou et al., 2006).

Li et al., (2014), avaliaram, em linhagens de células malignas, se a ART em combinação com o resveratrol, que é um polifenol encontrado em sementes de uva, seria capaz de gerar um melhor efeito antitumoral se comparado ao uso isolado de cada um. Os resultados mostraram que os compostos tiveram uma ação sinérgica, reduzindo a IC_{50} , que é a dose que resulta em redução de 50% da viabilidade celular, aumentando o número de células apoptóticas e diminuindo a migração das células malignas quando comparado ao uso isolado de cada composto, com isso os autores concluíram que a combinação é promissora para o tratamento de tumores sólidos. Porém, o mecanismo de como atuam em conjunto não foi estudado.

Qin et al., (2017) ao analisarem a associação da diidroartemisinina, que é derivada da ART, com CSP e oxaliplatina em células neoplásicas hepáticas,

concluíram que a diidroartemisinina pode aumentar a quimiossensibilidade destas células neoplásicas à CSP e oxaplatina, ainda, esteve relacionada com a expressão de biomarcadores como o de transição epitélio-mesênquima, sendo uma importante observação para o tratamento quimioterápico de pacientes com câncer hepático.

Zhang et al., (2018) também encontraram resultados semelhantes, onde a diidroartemisinina combinada com a carboplatina, derivada da CSP, apresentou um maior efeito inibitório em células neoplásicas malignas pulmonares.

Rao et al., (2022) revelaram que a combinação de CSP e diidroartemisinina reduziu a proliferação e a migração celular e aumentou a apoptose de células de hepatoblastoma humano, sugerindo que a diidroartemisinina atua como um sensibilizante para a CSP.

Li et al., (2021) revisaram a literatura pretendendo resumir como a diidroartemisinina poderia atuar sensibilizando as células malignas, além de elucidar os mecanismos moleculares e efeitos farmacológicos deste composto. Os autores revelaram que a diidroartemisinina reduziu a resistência da CSP em neoplasias com esta característica, aumentando a concentração nas células neoplásicas, contribuindo no aumento da quimiossensibilidade resultando, então, na parada do ciclo celular e na apoptose. Embora a resistência aos quimioterápicos possa ocorrer, a diidroartemisinina parece ser uma boa alternativa para reduzir esses efeitos, quando usada em associação com quimioterápicos que possuam essa característica.

A associação da CSP com outros compostos de origem natural também parece ter um efeito benéfico. Um estudo de Liu et al., (2019) revelou que a berberina, extraída de uma erva medicinal, resultou em efeitos sinérgicos com a CSP na indução de necroptose e apoptose de células malignas de ovário, desta forma, a ideia de que compostos de origem natural atuem sensibilizando o tratamento com a CSP parece ser possível, mesmo que este mecanismo não esteja totalmente elucidado (Rao et al., 2022).

3 PROPOSIÇÃO

Há uma divergência no tratamento da LO, onde alguns tratam de maneira agressiva e outros apenas no monitoramento do curso clínico da lesão, que pode evoluir para um CCEO, necessitando de tratamentos radicais.

Não há nenhuma terapia ou fármaco que impossibilite a transformação maligna da LO. Assim, o presente estudo pretende obter resultados positivos, de acordo com a literatura consultada, de que a ART, CSP e a associação de ambas sejam uteis para um possível tratamento para a LO e para o CCEO, por meio da MCI ou apoptose.

Desta forma, as seguintes hipóteses foram aventadas:

H0- A ART, CSP e associação de ambas não são capazes de induzir a MCI e/ou apoptose em linhagens celulares testadas.

H1- A ART é capaz de induzir a MCI e/ou apoptose nas linhagens celulares testadas.

H2- A CSP é capaz de induzir a MCI e/ou apoptose nas linhagens celulares testadas.

H3- A associação de ART e CSP é capaz de induzir a MCI e/ou apoptose nas linhagens celulares testadas.

3.1 Objetivo geral:

Avaliar *in vitro*, se a ART e a CSP, associadas ou não, são capazes de induzir a MCI ou apoptose das linhagens de LO (DOK) e CCEO (SCC-180).

3.2 Objetivos específicos:

A) Verificar a citotoxicidade e o potencial genotóxico dos compostos isolados ou associados frente as linhagens celulares estudadas;

B) Avaliar a expressão das proteínas caspases 3, 8, 9, relacionadas a apoptose, após tratamento das linhagens celulares testadas com os compostos isolados ou associados;

C) Avaliar a expressão das proteínas CALR e HMGB-1, relacionadas a MCI, após tratamento das linhagens celulares testadas com os compostos isolados ou associados;

D) Avaliar a taxa de migração das linhagens celulares após tratamento com os compostos isolados ou associados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção das linhagens celulares e divisão dos grupos experimentais

A linhagem celular de células displásicas DOK 94122104 (Sigma- Aldrich, St Louis, MO, USA) foi gentilmente cedida pelo professor Dr. Vicente Torres (Universidad de Chile), a linhagem de carcinoma de células escamosas oral SCC-180 (American Type Culture Collection, Manassa, VA, USA) foi gentilmente cedida pelo professor Dr. José Jara (Universidad de Chile), e a linhagem de queratinócitos HaCat (American Type Culture Collection, Manassa, VA, USA) foi gentilmente cedida pela professora Dra. Luciane Dias de Oliveira (Unesp). As linhagens foram testadas, *in vitro*, e tratadas com ART (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), CSP (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) e ART+CSP. Os grupos controles foram compostos pelas mesmas linhagens celulares, que, entretanto, não receberam tratamento (Figura 1).

Figura 1 - Esquema de divisão e tratamento das linhagens celulares testadas

Queratinócitos normais	Queratinócitos displásicos	Queratinócitos malignos
HaCat	DOK	SCC-180
→ ART	→ ART	→ ART
→ CSP	→ CSP	→ CSP
→ ART+CSP	→ ART+CSP	→ ART+CSP

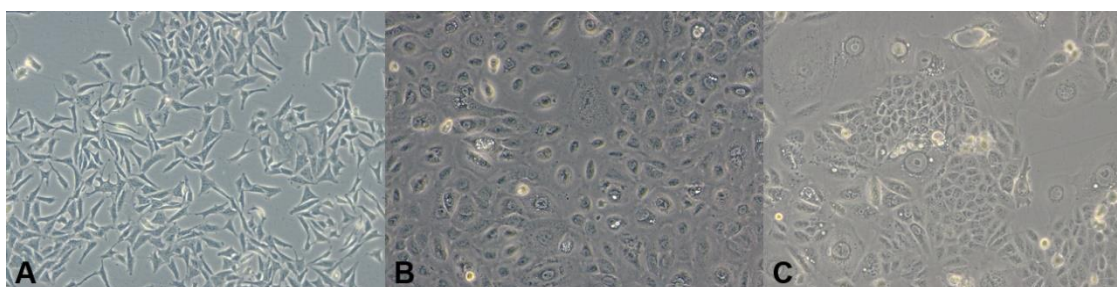
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Cultura celular

Todas as linhagens celulares foram cultivadas de acordo com as

recomendações dos fornecedores. As linhagens HaCat e SCC-180 foram cultivadas com meio de cultura DMEM com alta concentração de glicose (Nova biotecnologia, Cotia, SP, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Nova biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) e 1% de antibiótico (Penicilina-Estreptomicina Anfotericina, Nova biotecnologia, Cotia, SP, Brasil). A linhagem DOK foi cultivada com meio de cultura DMEM com alta concentração de glicose (Nova biotecnologia, Cotia, SP, Brasil), suplementado com 20% de soro fetal bovino (Nova biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) e 1% de antibiótico (Penicilina-Estreptomicina Anfotericina, Nova biotecnologia, Cotia, SP, Brasil). O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias, e as células cultivadas à 37°C e 5% CO₂ até atingirem a confluência de 90% (Figura 2).

Figura 2 – Linhagens celulares testadas.



Legendas: A. Queratinócitos normais, linhagem HaCat, aumento de 100x. B. Queratinócitos displásicos, linhagem DOK, aumento de 100x. C. Queratinócitos malignos, linhagem SCC-180, aumento de 100x

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Diluição dos compostos

ART e CSP foram diluídas em solução salina tamponada com fosfato (Nova biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) como soluções de estoque. Posteriormente, a solução de estoque foi diluída em meio de cultura adequado para cada linhagem celular até as concentrações de 0.1, 1, 10, 100 e 200 µM.

4.4 Teste de viabilidade celular

A viabilidade celular foi medida pelo ensaio de brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT, Sigma- Aldrich, St Louis, MO, USA). Após atingirem confluência de 90%, foram semeadas 4×10^4 células em cada poço, de placas de 24 poços, que foram mantidas por 24 horas para sua aderência. Passadas as 24 horas, as linhagens celulares foram expostas a ART (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), CSP (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) e ART+CSP, nas concentrações de 0.1, 1, 10, 100 e 200 μ M diluída em meio de cultura adequado para cada linhagem celular. Passadas 48 horas de exposição, os tratamentos foram retirados dos poços e adicionado o sal de MTT diluído em salina tamponada com fosfato, a uma concentração de 0,5mg por mL. Depois da incubação com o MTT, este foi removido dos poços e adicionado 1mL DMSO, onde após homogeneização, alíquotas de 100 μ L foram passadas para poços de uma placa de 96 poços. As absorbâncias foram mensuradas em espectrofotômetro (BioRad, Hercules, CA, E.U.A) ajustado para 570 nm.

A viabilidade celular foi expressa em porcentagem em relação ao controle negativo. As análises dose-efeito foram realizadas a partir do cálculo da fração de efeito (Fe) de cada droga nas diferentes concentrações, por meio da equação:

$$\% \text{ Viabilidade celular} = \frac{\text{Absorbância das células tratadas} - \text{branco}}{\text{Absorbância das células não tratadas} - \text{branco}} \times 100$$

$$\text{Absorbância das células não tratadas} - \text{branco} \times 100$$

A partir disso, a concentração inibitória de 50% (IC_{50}) foram definidas como as concentrações de fármaco necessárias para reduzir a proliferação celular para 50%. As doses foram definidas para os experimentos de ELISA e migração.

4.5 Teste de genotoxicidade

O teste de genotoxicidade foi feito por meio da análise de micronúcleos, onde as linhagens celulares foram semeadas num total de 4×10^4 células por cada poço de placas de 24 poços contendo o meio de cultura indicado pelo fornecedor para cada linhagem celular. Depois de semeadas, as linhagens celulares foram incubadas e aguardado 24 horas para a aderência celular, depois desse período, as células foram tratadas com ART (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), CSP (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) e ART+CSP nas concentrações de 0.1, 1, 10, 100 e 200 μ M diluídas em meio de cultura adequado para cada linhagem celular. Após 48 horas do tratamento, este foi removido e adicionado citocalasina B (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) na concentração final de 6,0 μ g/ml de meio de cultura. Após 28 horas da adição da citocalasina, esta foi removida e as amostras lavadas com solução salina tamponada com fosfato (Nova biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) e fixadas com metanol durante 15 minutos. Posteriormente, as amostras foram lavadas novamente com solução salina tamponada com fosfato (Nova biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) e o corante DAPI (Sigma-Aldrich, USA) foram adicionadas aos poços e incubadas por 5 minutos. O grupo controle positivo recebeu tratamento com EMS (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Os poços foram examinados no microscópio de fluorescência (Microscópio Carl Zeiss Microlimaging GmbH – Axiovert 40C, Germany), sob epifluorescência. Foram obtidas 10 fotos por poço por meio do software Axio Vision 7.0. As imagens foram analisadas, a partir das quais um descritivo foi realizado para obter-se a quantidade de micronúcleos em 100 células binucleadas por tratamento.

4.6 Teste de migração celular

As linhagens celulares testadas foram semeadas em poços de placas de 6 poços numa quantidade de 7×10^4 e mantidas à 37°C e 5% CO₂ até atingirem a

confluência de 100%. Após atingirem 100% de confluência, feridas por arranhão foram geradas nos poços das placas contendo as células, usando uma ponta de pipeta estéril de 10 µl (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), e então foi feita a adição dos tratamentos nos poços. As linhagens celulares foram expostas a doses determinadas com base no ensaio de citotoxicidade, que causassem redução da viabilidade de 10 e 50%. Para isso, as células plaqueadas foram tratadas com as doses de IC₁₀ de ART (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), IC₁₀ e IC₅₀ de CSP (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) e IC₁₀ e IC₅₀ de ART+CSP, o grupo controle negativo também foi incluído. Depois de criar as feridas e os poços receberem os tratamentos, os poços foram analisados em microscopia de luz convencional (Microscópio Carl Zeiss Microimaging GmbH – Axiovert 40C, Germany), fotos foram feitas em 5 pontos distintos e aleatórios com software Axio Vision 7.0 no momento da criação da ferida, 24 e 48 horas depois do tratamento. As distâncias foram obtidas por meio da contagem do espaço com escala Barr, por meio do software Axio Vision 7.0 nos momentos 0, 24 e 48 horas. A taxa de migração foi contada de acordo com a seguinte fórmula:

Distância da migração = distância inicial entre as bordas do arranhão livre de células – distância em 24 ou 48 h entre as bordas do arranhão livre de células.

4.7 Ensaio de ELISA

O ensaio de ELISA foi feito com amostra de sobrenadante para a proteína HMGB-1, pois extracelular ativa a sinalização inflamatória em células e tecidos (Zhang et al., 2020) e com amostras de lisado celular para verificar níveis aumentados das proteínas CALR e caspases 3, 8 e 9, que são encontradas em sítios como o retículo endoplasmático, membrana celular, citoplasma e núcleo (Zamanian et al., 2013; Boice, Bouchier-Hayes L, 2020). Para a coleta do sobrenadante, as linhagens celulares testadas foram semeadas em poços de placas de 6 poços numa quantidade de 8×10^5 e mantidas à 37°C e 5% CO₂ até atingirem a confluência de aproximadamente 80%. Após, as células foram expostas a doses determinadas com

base no ensaio de citotoxicidade, que causassem redução da viabilidade de 10 e 50%. Para isso, as células plaqueadas foram tratadas com as doses de com a dose de IC₁₀ de ART (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), IC₁₀ e IC₅₀ de CSP (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) e IC₁₀ e IC₅₀ de ART+CSP, o grupo controle negativo também foi incluído. 48 horas após o início do tratamento, o sobrenadante foi coletado, centrifugado por 20 minutos e armazenado em alíquotas em freezer -80°C para posteriormente ser submetido à reação de ELISA.

Para o lisado celular, as linhagens celulares testadas foram semeadas em poços de placas de 6 poços numa quantidade de 8×10^5 e mantidas à 37°C e 5% CO₂ até atingirem a confluência de aproximadamente 80%. Depois, as linhagens celulares foram expostas a doses determinadas com base no ensaio de citotoxicidade, que causassem redução da viabilidade de 10 e 50%. Para isso, as células plaqueadas foram tratadas com as doses de IC₁₀ de ART (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), IC₁₀ e IC₅₀ de CSP (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) e IC₁₀ e IC₅₀ de ART+CSP, o grupo controle negativo também foi incluído. 48 horas após o início do tratamento, o sobrenadante foi desprezado e os poços lavados com solução salina tamponada com fosfato (Nova biotecnologia, Cotia, SP, Brasil), depois, foi adicionado tripsina (Nova biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) em cada poço, então a tripsina foi inativada com a adição do dobro de meio de cultura e toda a suspensão foi centrifugada por 5 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e o pellet foi dissolvido em tampão para lise celular (T-PER, Rockford, IL, USA) e novamente centrifugado por 20 minutos sob temperatura de 2°C, depois o sobrenadante foi aliquoteado, identificado e armazenado em freezer -80°C para posteriormente ser submetidos à reação de ELISA.

O ensaio de ELISA foi feito com kits comerciais para as proteínas CAS3 (Cloud-Clone Corp. TX, USA), CAS8 (Cloud-Clone Corp. TX, USA), CAS9 (Cloud-Clone Corp. TX, USA), CALR (Novus Biologicals, CO, USA) e HMGB-1 (Novus Biologicals, CO, USA). Todos os reagentes foram diluídos conforme as recomendações do fabricante de cada kit. Foram adicionados 100µL do padrão, das amostras de sobrenadante ou lisado celular e dos controles negativos, nos poços de uma placa de 96 poços disponível em cada kit ELISA, e então foi incubado por 1 hora a 37°C. Após isso, o conteúdo foi aspirado e então foi adicionado 100 µL do anticorpo de detecção A e novamente incubado por 1 hora a 37°C. Após o período, os poços foram aspirados e

lavados para então receber 100 μ L do reagente de estreptavidina, que foi incubado por 30 minutos a 37°C. Passado o tempo, os poços foram lavados e aspirados cinco vezes, para então receber 90 μ L da solução de cromógeno e incubado por 20 minutos a 37°C. Por fim, foi adicionado 50 μ L a solução ácida em cada poço e feita a leitura em espectrofotômetro (BioRad, Hercules, CA, E.U.A) ajustado para 450 nm.

4.8 Forma de análise dos resultados

Foi feita uma análise descritiva inicial dos dados contendo a avaliação de possíveis Outliers. Foi realizada análise exploratória de dados através do cálculo de medidas resumo (média, desvio padrão, mínimo, mediana e máximo). Para avaliar citotoxicidade foram usados modelos log-logísticos de dose-resposta. Para comparar os fármacos em relação à migração celular e expressão de proteína foram usados modelo de ANOVA seguidos do teste de comparação múltipla de Tukey. O nível e significância adotado foi de 5%.

5 RESULTADO

5.1 Viabilidade celular

5.1.1 Linhagem HaCat

A Tabela 1 apresenta as medidas descritivas da citotoxicidade por fármaco e concentração para a linhagem HaCat. A partir dessa tabela e da Figura 3, nota-se que praticamente não houve morte celular quando a ART foi avaliada isolada, mesmo com o aumento da concentração, por isso esse medicamento não foi considerado no modelo ajustado e que está apresentado na Tabela 2. A IC_{10} da ART foi alcançada e calculada por porcentagem em relação ao grupo controle, portanto a IC_{10} de CSP e ART+CSP também foi determinada.

Tabela 1 – Medidas descritivas viabilidade celular por fármaco e concentração (Linhagem HaCat).

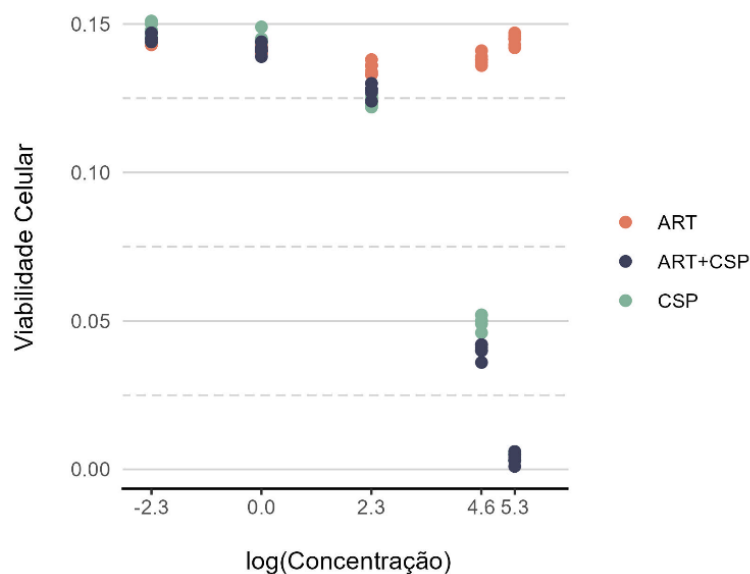
<i>(continua)</i>						
Fármaco	Concentração	Média de absorbância	Desvio Padrão	Mínimo	Media na	Máximo
Controle negativo		0.150	0.0024	0.147	0.150	0.153
ART	0.1	0.144	0.0008	0.143	0.144	0.145
ART	1	0.141	0.0012	0.140	0.142	0.143
ART	10	0.135	0.0020	0.133	0.135	0.138
ART	100	0.138	0.0017	0.136	0.138	0.141

Tabela 1 – Medidas descritivas viabilidade celular por fármaco e concentração (Linhagem HaCat).

<i>(conclusão)</i>						
Fármaco	Concentração	Média de absorbância	Desvio Padrão	Mínimo	Média	Máximo
ART	200	0.145	0.0019	0.142	0.145	0.147
CSP	0.1	0.147	0.0028	0.144	0.147	0.151
CSP	1	0.145	0.0019	0.144	0.144	0.149
CSP	10	0.124	0.0015	0.122	0.124	0.126
CSP	100	0.050	0.0022	0.046	0.050	0.052
CSP	200	0.005	0.0012	0.003	0.005	0.006
ART+CSP	0.1	0.145	0.0010	0.144	0.145	0.147
ART+CSP	1	0.141	0.0016	0.139	0.141	0.144
ART+CSP	10	0.128	0.0020	0.124	0.128	0.130
ART+CSP	100	0.040	0.0022	0.036	0.041	0.042
ART+CSP	200	0.004	0.0018	0.001	0.004	0.006

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 3 – Distribuição da viabilidade celular por fármaco e concentração (Linhagem HaCat)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Observou-se comportamento bastante semelhante entre CSP e ART+CSP, por isso no modelo dose-resposta a inclinação e os limites inferior e superior estão fixos entre os fármacos. A partir da Tabela 2 nota-se a IC_{50} e IC_{10} da combinação ART+CSP e da CSP. A IC_{10} de ART calculada por porcentagem foi de 10 μ M.

Tabela 2 – Ajuste do modelo dose-resposta (Linhagem HaCat)

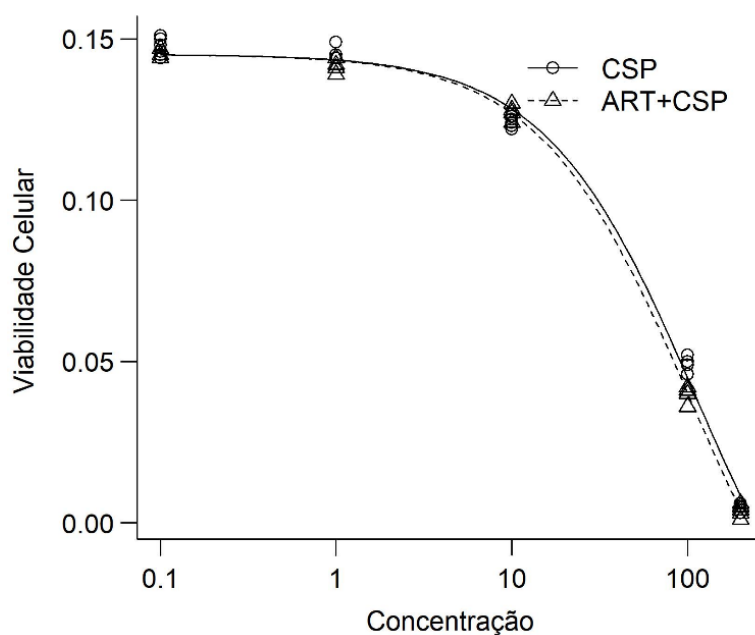
Parâmetro	Estimativa	Erro Padrão	(continua)
			p-valor
Inclinação	1.01	0.04	<0.001
Limite Inferior	-0.07	0.01	<0.001
Limite Superior	0.15	0.00	<0.001

Tabela 2 – Ajuste do modelo dose-resposta (Linhagem HaCat)

Parâmetro	Estimativa	Erro Padrão	(conclusão)
			p-valor
IC ₅₀ : ART+CSP	103.54	9.36	<0.001
IC ₅₀ : CSP	113.17	9.89	<0.001
IC ₁₀ : ART+CSP	11.82	0.79	<0.001
IC ₁₀ : CSP	12.92	0.85	<0.001

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4 – Curva log-logística ajustada para CSP e ART+CSP (Linhagem HaCat)



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.1.2 Linhagem DOK

A Tabela 3 apresenta as medidas descritivas da citotoxicidade por fármaco e concentração, para a linhagem DOK. A partir dessa tabela e da Figura 5, nota-se que praticamente não houve morte celular quando a ART foi avaliada isolada, mesmo com o aumento da contração, por isso esse medicamento não foi considerado no modelo ajustado e que está apresentado na Tabela 4. A IC₁₀ da ART foi alcançada e calculada por porcentagem em relação ao grupo controle, portanto a IC₁₀ de CSP e ART+CSP também foi determinada.

Tabela 3 – Medidas descritivas da viabilidade celular por fármaco e concentração (Linhagem DOK)

(continua)

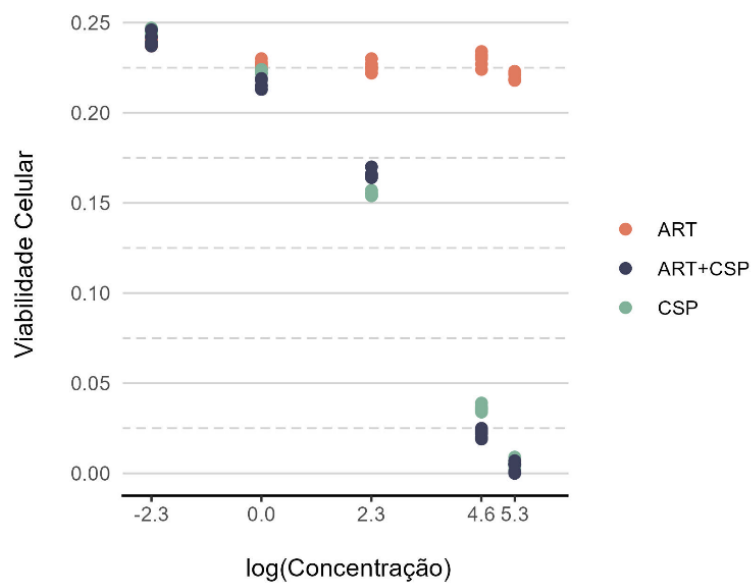
Fármaco	Concentração	Média de absorbância	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Controle negativo		0.251	0.0025	0.249	0.250	0.256
ART	0.1	0.240	0.0014	0.237	0.240	0.241
ART	1	0.227	0.0022	0.224	0.227	0.230
ART	10	0.226	0.0027	0.222	0.225	0.230
ART	100	0.230	0.0036	0.224	0.231	0.234
ART	200	0.220	0.0021	0.218	0.220	0.223
CSP	0.1	0.245	0.0015	0.243	0.244	0.247
CSP	1	0.222	0.0018	0.219	0.222	0.224
CSP	10	0.155	0.0011	0.154	0.155	0.157
CSP	100	0.036	0.0017	0.034	0.036	0.039

Tabela 3 – Medidas descritivas da viabilidade celular por fármaco e concentração (Linhagem DOK)

<i>(conclusão)</i>						
Fármaco	Concentração	Média de absorbância	Desvio Padrão	Mínimo	Media na	Máximo
CSP	200	0.006	0.0024	0.002	0.006	0.009
ART+C SP	0.1	0.240	0.0034	0.237	0.238	0.246
ART+C SP	1	0.216	0.0025	0.213	0.215	0.219
ART+C SP	10	0.166	0.0021	0.164	0.165	0.170
ART+C SP	100	0.022	0.0023	0.019	0.023	0.025
ART+C SP	200	0.004	0.0027	0.000	0.005	0.007

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 5 – Distribuição da viabilidade celular por fármaco e concentração (Linhagem DOK)



Fonte: Elaborado pelo autor.

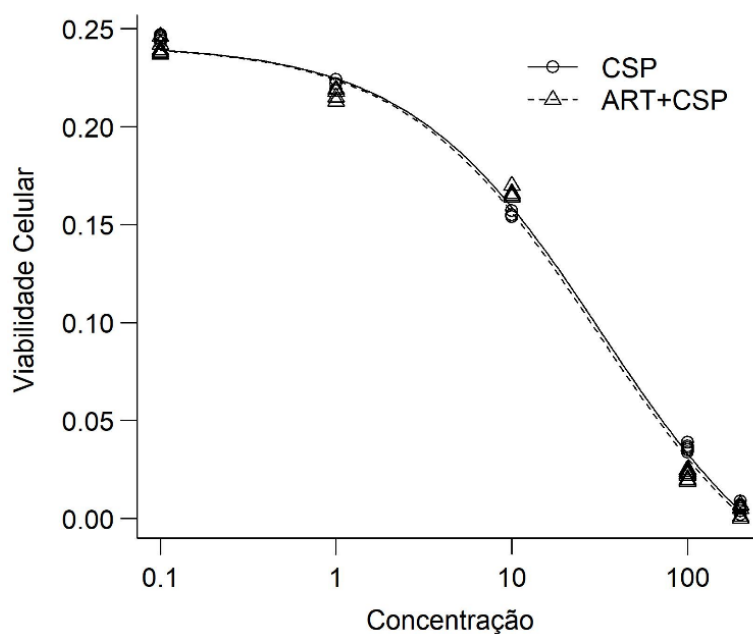
Tabela 4 – Ajuste do modelo dose-resposta (Linhagem DOK)

Parâmetro	Estimativa	Erro Padrão	p-valor
Inclinação	0.79	0.05	<0.001
Limite Inferior	-0.05	0.01	<0.001
Limite Superior	0.24	0.00	<0.001
IC ₅₀ : ART+CSP	30.72	3.67	<0.001
IC ₅₀ : CSP	32.34	4.09	<0.001
IC ₁₀ : ART+CSP	1.93	0.19	<0.001
IC ₁₀ : CSP	2.03	0.20	<0.001

Fonte: Elaborado pelo autor.

Observou-se comportamento bastante semelhante entre CSP e ART+CSP, por isso no modelo dose-resposta a inclinação e os limites inferior e superior estão fixos entre os fármacos. A partir da Tabela 4 nota-se a IC_{50} e IC_{10} da combinação ART+CSP e da CSP. A IC_{10} de ART calculada por porcentagem foi de 10 μ M.

Figura 6 – Curva log-logística ajustada para CSP e ART+CSP (Linhagem DOK)



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.1.3 Linhagem SCC-180

A Tabela 5 apresenta as medidas descritivas da viabilidade celular por fármaco e concentração, para a linhagem SCC-180. Nenhum modelo estudado apresentou bom ajuste para esse conjunto de dados, por isso a IC_{50} e IC_{10} não foi calculada pelo

programa, sendo feita a porcentagem em relação ao controle negativo. A dose de IC₅₀ para CSP+ART foi de 122 µM e de 120 µM para CSP isolada. A dose de IC₁₀ foi de 0.04 µM para ART, 0.08 µM para CSP e 24 µM para ART+CSP.

Tabela 5 – Medidas descritivas da viabilidade celular por fármaco e concentração (Linhagem SCC-180)

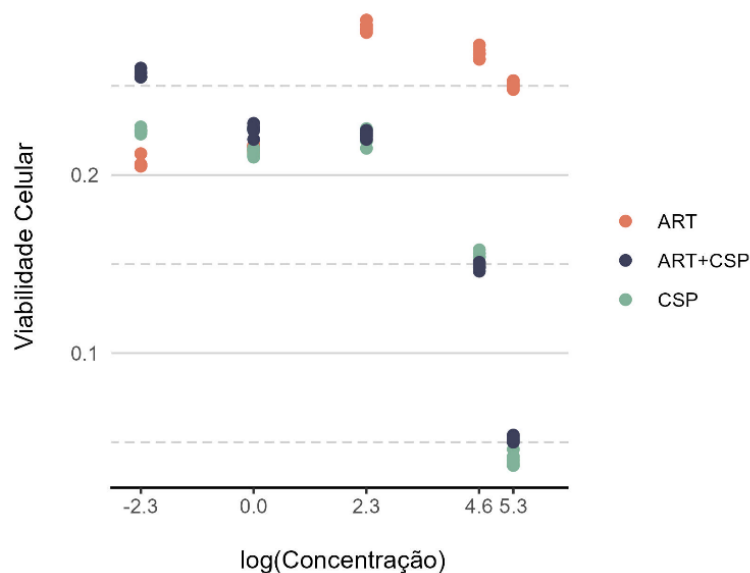
<i>(continua)</i>						
Fármaco	Concentração	Média de absorbância	Desvio Padrão	Mínimo	Media na	Máximo
Controle negativo		0.268	0.0028	0.265	0.268	0.271
ART	0.1	0.207	0.0027	0.205	0.206	0.212
ART	1	0.215	0.0015	0.213	0.216	0.217
ART	10	0.283	0.0024	0.280	0.283	0.287
ART	100	0.268	0.0031	0.265	0.268	0.273
ART	200	0.250	0.0016	0.248	0.250	0.253
CSP	0.1	0.225	0.0013	0.223	0.225	0.227
CSP	1	0.213	0.0020	0.210	0.213	0.215
CSP	10	0.221	0.0041	0.215	0.222	0.226
CSP	100	0.155	0.0024	0.151	0.155	0.158
CSP	200	0.040	0.0035	0.037	0.039	0.046
ART+CSP	0.1	0.257	0.0021	0.255	0.256	0.260
ART+CSP	1	0.226	0.0030	0.220	0.226	0.229
ART+CSP	10	0.223	0.0019	0.220	0.224	0.225
ART+CSP	100	0.149	0.0018	0.146	0.149	0.151

Tabela 5 – Medidas descritivas da viabilidade celular por fármaco e concentração (Linhagem SCC-180)

Fármaco	Concentração	Média de absorvância	Desvio Padrão	Mínimo	(conclusão)	
					Media	Máximo
ART+CSP	200	0.052	0.0015	0.050	0.052	0.054

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 7 – Distribuição da viabilidade celular por fármaco e concentração (Linhagem SCC-180)

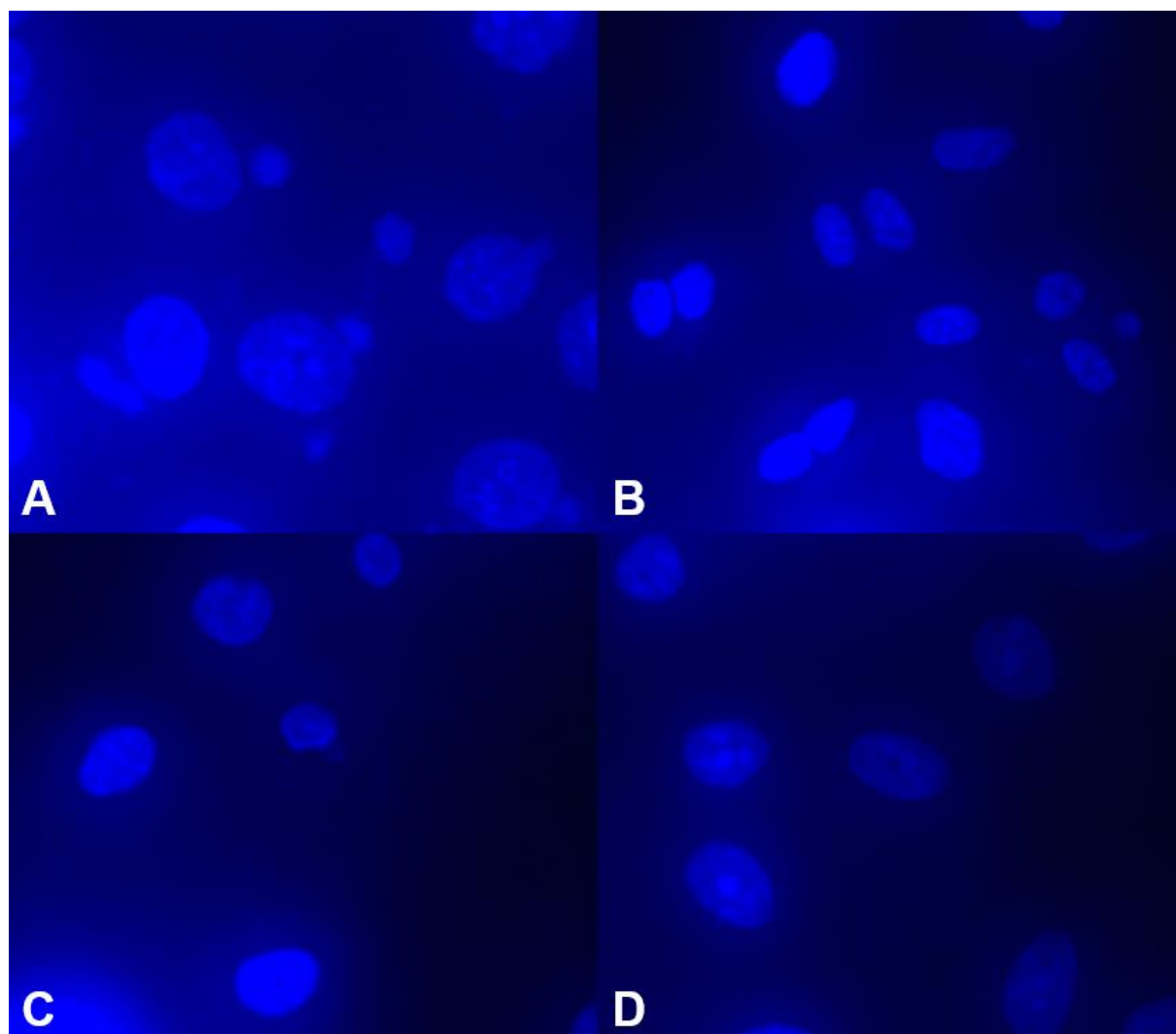


Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Teste de genotoxicidade

Em todos os grupos os núcleos foram semelhantes ao normal (Figura 8), algumas células binucleadas foram observadas, mas sem a formação de micronúcleos. Doses mais altas com o tratamento de CSP e CSP+ART causaram alta redução no número das células, mas micronúcleos não foram observados.

Figura 8 - Teste de genotoxicidade, linhagem DOK



Legenda: A. Controle positivo com formação de micronúcleos. B. Após tratamento com ART na concentração de 10µM por 48 horas. C. Após tratamento com CSP na concentração de 10µM por 48 horas. D. Após tratamento com ART+CSP na concentração de 10µM por 48 horas

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 Teste de migração celular

5.3.1 Linhagem HaCat

A Tabela 6 apresenta as medidas descritivas da distância entre as bordas da ferida por fármaco e tempo, além da comparação entre os tempos para cada fármaco, para a linhagem HaCat. Como mostra a Figura 9, o comportamento de cada fármaco/concentração é diferente, ao longo do tempo, dos demais, ou seja, há interação entre fármaco/concentração e tempo, por isso a comparação foi realizada entre os tempos para cada fármaco/concentração.

Os fármacos ART IC₁₀, ART+CSP IC₁₀ e CSP IC₁₀ apresentaram maior distância média no tempo 0h que nos tempos 24h e 48h, indicando que estes tratamentos não inibiram a migração destas células. Os fármacos ART+CSP IC₅₀ e CSP IC₅₀ apresentaram maior distância média no tempo 0h que nos tempos 24h e 48h, apresentando diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.001$), ou seja, foram capazes de reduzir a migração celular.

O controle negativo não apresentou variação no tempo 48h (distância igual a zero em todas as medições), por isso não foi realizada comparação estatística entre os tempos.

Tabela 6 – Medidas descritivas da distância entre as bordas da ferida por fármaco e tempo (Linhagem HaCat)

(continua)

Fármaco	Tempo	Média da distância	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor
ART IC ₁₀	0h	414	8	403	416	421	<0.001

Tabela 6 – Medidas descritivas da distância entre as bordas da ferida por fármaco e tempo (Linhagem HaCat)

<i>(continuação)</i>							
Fármaco	Tempo	Média da distância	Desvio Padrão	Mínimo	Média	Máximo	p-valor
ART IC ₁₀	24h	275	3	270	274	281	0h>24h>48h
ART IC ₁₀	48h	129	5	123	128	135	
ART+CSP IC ₁₀	0h	395	3	392	395	400	<0.001
ART+CSP IC ₁₀	24h	180	2	177	180	182	0h>24h>48h
ART+CSP IC ₁₀	48h	83	3	79	84	88	
ART+CSP IC ₅₀	0h	413	3	408	412	417	<0.001
ART+CSP IC ₅₀	24h	329	4	324	329	335	0h>24h,48h
ART+CSP IC ₅₀	48h	325	3	321	325	327	
CSP IC ₁₀	0h	422	6	413	421	430	<0.001
CSP IC ₁₀	24h	226	3	223	226	230	0h>24h>48h
CSP IC ₁₀	48h	137	6	131	135	147	
CSP IC ₅₀	0h	394	2	391	394	396	<0.001
CSP IC ₅₀	24h	348	3	344	348	351	0h>24h,48h
CSP IC ₅₀	48h	348	3	344	348	351	

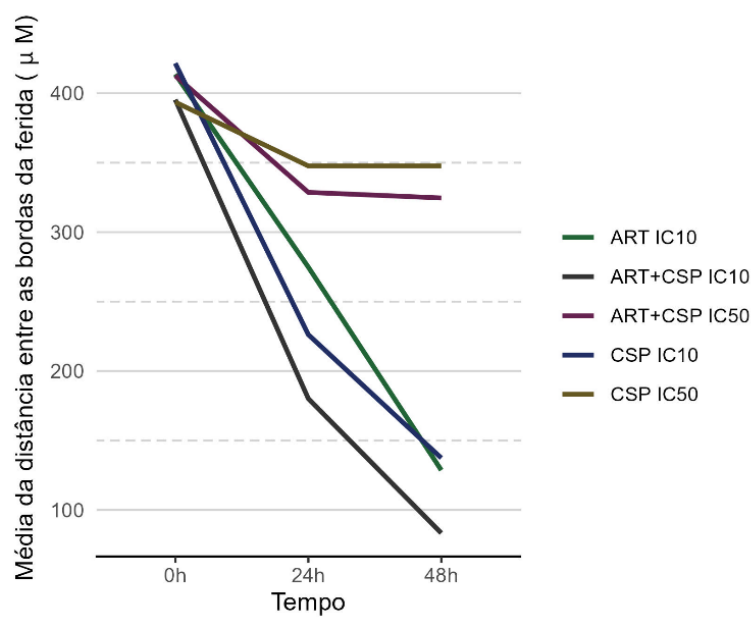
Tabela 6 – Medidas descritivas da distância entre as bordas da ferida por fármaco e tempo (Linhagem HaCat)

<i>(conclusão)</i>							P- val or
Fármaco	Temp o	Média da distância	Desvio Padrão	Míni mo	Media na	Máxi mo	
Controle negativo	0h	368	19	338	373	384	NC
Controle negativo	24h	88	6	82	89	96	
Controle negativo	48h	0	0	0	0	0	

Legendas: NC = não calculado.

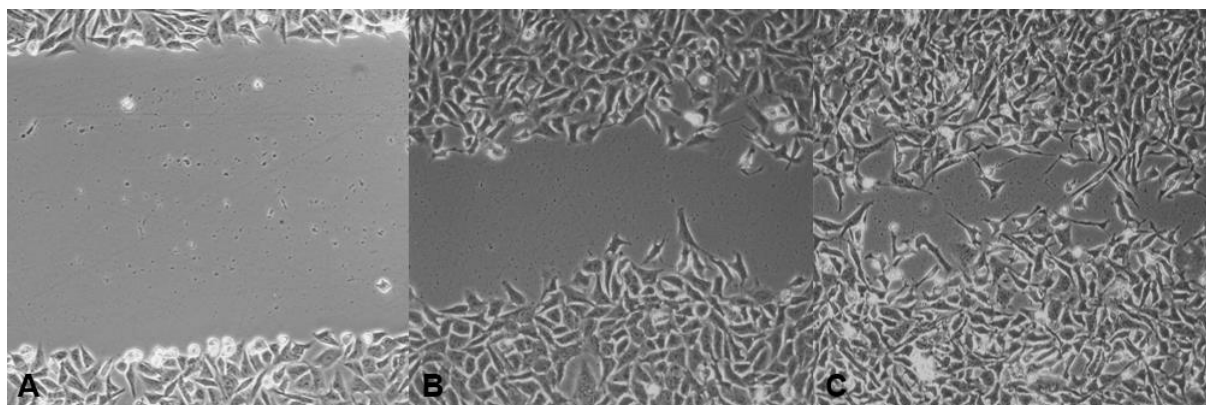
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 9 – Média da distância entre as bordas da ferida por fármaco e tempo (Linhagem HaCat)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 10 - Migração celular da linhagem HaCat, tratada com ART+CISP IC₁₀



Legenda: A. Hora 0. B. Após 24 horas. C. Após 48 horas. Aumento de 100x.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.2 Linhagem DOK

A Tabela 7 apresenta as medidas descritivas da distância entre as bordas da ferida por fármaco e tempo, considerando linhagem DOK. Note que nos tempos 24h e 48h a distância entre as bordas foi 0 para praticamente todas as medidas, ou seja, nenhum tratamento inibiu a migração destas células. Por essa falta de variação, não foi possível realizar teste estatístico comparando os tempos em cada fármaco/concentração.

Tabela 7 – Medidas descritivas da distância entre as bordas da ferida por fármaco e tempo (Linhagem DOK)

(continua)

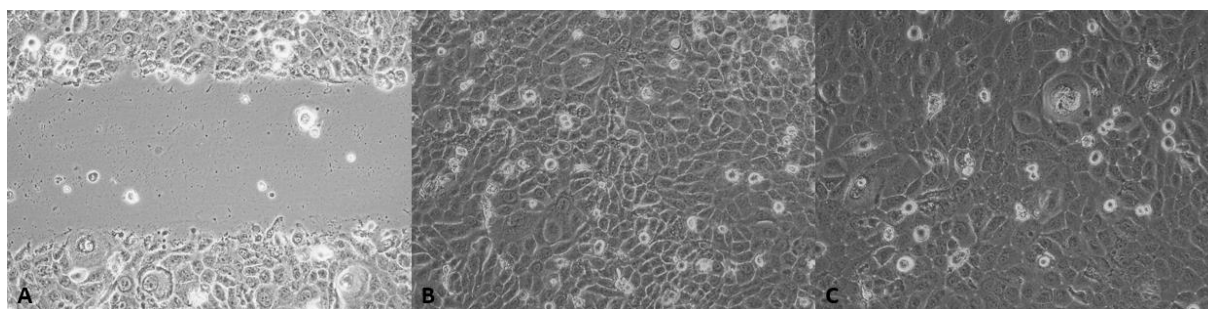
Fármaco	Tempo	Média da distância	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
ART IC ₁₀	0h	271	4	265	270	276
ART IC ₁₀	24h	0	0	0	0	0
ART IC ₁₀	48h	0	0	0	0	0
ART+CSP IC ₁₀	0h	342	3	337	342	345
ART+CSP IC ₁₀	24h	0	0	0	0	0
ART+CSP IC ₁₀	48h	0	0	0	0	0
ART+CSP IC ₅₀	0h	318	2	315	318	320
ART+CSP IC ₅₀	24h	268	2	265	267	272
ART+CSP IC ₅₀	48h	0	0	0	0	0
CSP IC ₁₀	0h	292	6	287	291	302

Tabela 7 – Medidas descritivas da distância entre as bordas da ferida por fármaco e tempo (Linhagem DOK)

Fármaco	Tempo	Média da distância	Desvio Padrão	(conclusão)		
				Mínimo	Mediana	Máximo
CSP IC ₁₀	24h	0	0	0	0	0
CSP IC ₁₀	48h	0	0	0	0	0
CSP IC ₅₀	0h	310	4	303	311	314
CSP IC ₅₀	24h	0	0	0	0	0
CSP IC ₅₀	48h	0	0	0	0	0
Controle negativo	0h	284	2	282	283	287
Controle negativo	24h	0	0	0	0	0
Controle negativo	48h	0	0	0	0	0

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 11 - Migração celular da linhagem DOK, tratada com ART IC₁₀



Legenda: A. Hora 0. B. Após 24 horas. C. Após 48 horas. Aumento de 100x

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.3 Linhagem SCC-180

A Tabela 8 apresenta as medidas descritivas da distância entre as bordas da ferida por fármaco e tempo, além da comparação entre os tempos para cada fármaco, considerando a linhagem SCC-180.

A ART IC₁₀, ART+CSP IC₁₀, CSP IC₁₀ e o controle negativo não apresentaram variação entre as medições em pelo menos um dos tempos avaliados, por isso não foi possível realizar comparação estatística entre os tempos nesses casos.

A ART+CSP IC₅₀ apresentou maior distância média no tempo 0h que nos tempos 24h e 48h, e também apresentou maior distância média no tempo 24h que no tempo 48h, mostrando que esta associação pode retardar a migração de células malignas. Já a CSP IC₅₀ apresentou maior distância média no tempo 0h que nos tempos 24h e 48h, e não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os tempos 24h e 48h ($p < 0.001$). Desta forma, a ART+CSP IC₅₀ e CSP IC₅₀ tiveram resultados significativos na redução da migração das células SCC-180.

Tabela 8 – Medidas descritivas da distância entre as bordas da ferida por fármaco e tempo (Linhagem SCC-180)

(continua)

Fármaco	Tempo	Média da distância	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor
---------	-------	--------------------	---------------	--------	---------	--------	---------

Tabela 8 – Medidas descritivas da distância entre as bordas da ferida por fármaco e tempo (Linhagem SCC-180)

(continuação)

Fármaco	Tempo	Média da distância	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor
ART IC ₁₀	0h	267	4	260	269	271	NC
ART IC ₁₀	24h	0	0	0	0	0	
ART IC ₁₀	48h	0	0	0	0	0	
ART+CSP IC ₁₀	0h	300	9	289	300	311	NC
ART+CSP IC ₁₀	24h	148	10	134	148	161	
ART+CSP IC ₁₀	48h	0	0	0	0	0	
ART+CSP IC ₅₀	0h	284	14	264	285	300	<0.001 0h>24h>48h
ART+CSP IC ₅₀	24h	260	8	248	260	270	
ART+CSP IC ₅₀	48h	241	14	217	243	255	
CSP IC ₁₀	0h	271	4	266	271	278	NC
CSP IC ₁₀	24h	150	5	144	152	154	
CSP IC ₁₀	48h	0	0	0	0	0	
CSP IC ₅₀	0h	291	14	270	293	307	<0.001 0h>24h,48h
CSP IC ₅₀	24h	201	10	185	203	210	
CSP IC ₅₀	48h	199	10	183	200	210	
Controle negativo	0h	377	4	373	376	384	NC

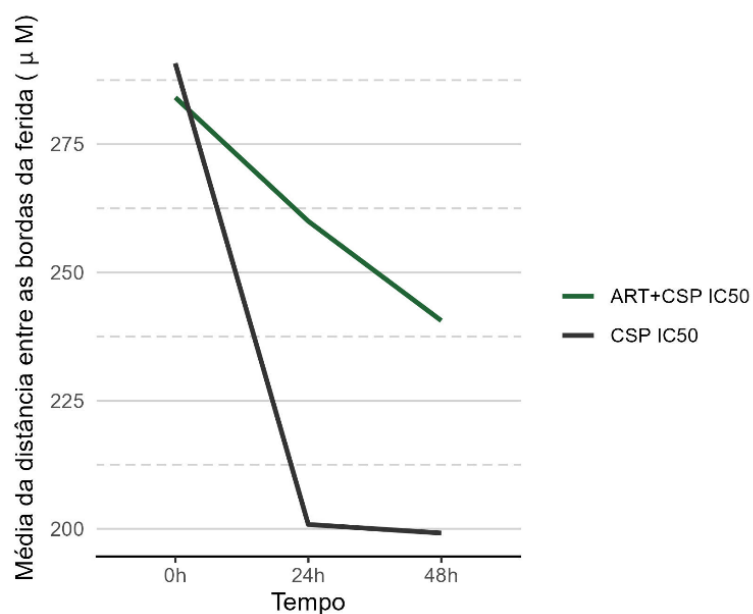
Tabela 8 – Medidas descritivas da distância entre as bordas da ferida por fármaco e tempo (Linhagem SCC-180)

(conclusão)							
Fármaco	Tempo	Média da distância	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	P-valor
Controle negativo	24h	0	0	0	0	0	
Controle negativo	48h	0	0	0	0	0	

Legendas: NC = não calculado.

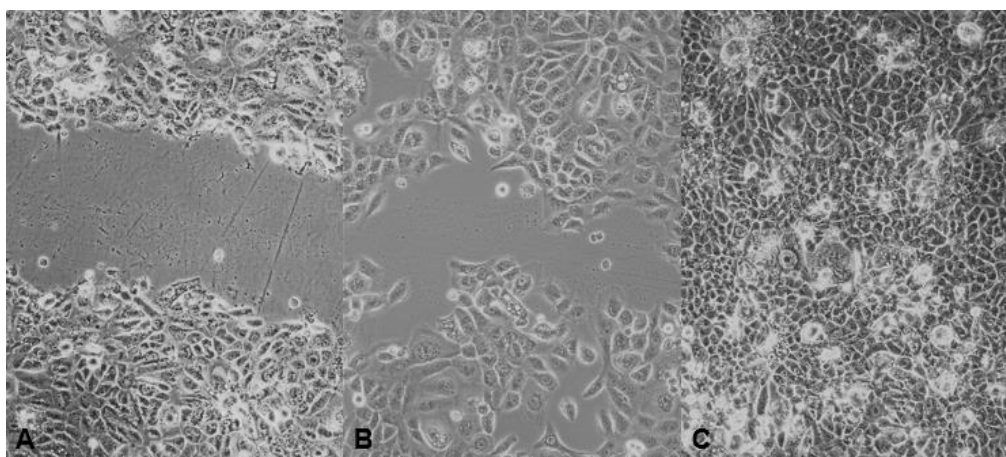
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 12 – Média da distância entre as bordas da ferida por fármaco e tempo (Linhagem SCC-180)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 13 - Migração celular da linhagem SCC-180, tratada com ART+CISP IC₁₀



Legenda: A. Hora 0. B. Após 24 horas. C. Após 48 horas. Aumento de 100x

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4 Expressão de proteínas

5.4.1 Linhagem HaCat

Para a linhagem HaCat, na proteína CALR o controle negativo apresentou maior média de expressão apresentando diferença estatística quando comparado aos demais grupos ($p=0.041$). Para as proteínas CAS8 e 9, o controle negativo apresentou maior média de expressão do que os grupos experimentais, sem diferenças estatísticas, ($p=0.133$ e $p=0.059$, respectivamente). Na CAS3, todos os tratamentos apresentaram maior média quando comparados ao controle negativo, porém sem diferença estatística ($p=0.259$). A expressão de HMGB-1 foi nula em todas as amostras, por isso os valores na tabela 9 são iguais a zero.

Tabela 9 – Medidas descritivas da quantidade de nanogramas e picogramas das proteínas por ml, por fármaco e proteína (Linhagem HaCat)

(continua)

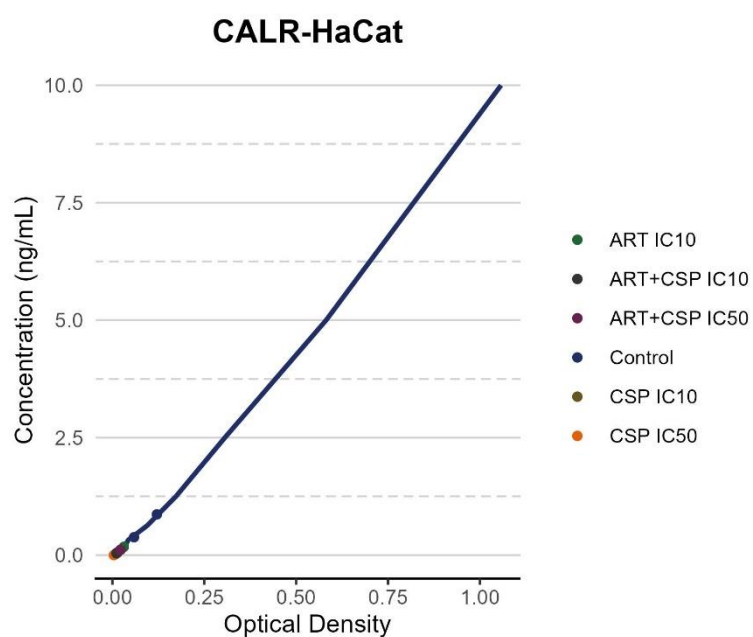
Proteína	Fármaco	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor
CALR (ng/mL)	ART IC ₁₀	0.100	0.106	0.025	0.100	0.175	0.041
	ART+CSP IC ₁₀	0.044	0.009	0.038	0.044	0.051	
	ART+CSP IC ₅₀	0.085	0.038	0.058	0.085	0.112	
	CSP IC ₁₀	0.078	0.057	0.038	0.078	0.119	
	CSP IC ₅₀	0.007	0.009	0.000	0.007	0.013	
	Controle negativo	0.624	0.343	0.381	0.624	0.867	
CAS3 (ng/mL)	ART IC ₁₀	0.383	0.247	0.208	0.383	0.558	0.259
	ART+CSP IC ₁₀	0.298	0.127	0.208	0.298	0.387	
	ART+CSP IC ₅₀	0.578	0.148	0.473	0.578	0.683	
	CSP IC ₁₀	0.600	0.059	0.558	0.600	0.642	
	CSP IC ₅₀	0.194	0.274	0.000	0.194	0.387	
	Controle negativo	0.172	0.243	0.000	0.172	0.344	
CAS8 (ng/mL)	ART IC ₁₀	2.140	1.120	1.340	2.140	2.930	0.133
	ART+CSP IC ₁₀	0.297	0.420	0.000	0.297	0.594	
	ART+CSP IC ₅₀	2.530	0.976	1.840	2.530	3.220	
	CSP IC ₁₀	2.600	0.000	2.600	2.600	2.600	
	CSP IC ₅₀	2.430	0.251	2.250	2.430	2.600	

Tabela 9 – Medidas descritivas da quantidade de nanogramas e picogramas das proteínas por ml, por fármaco e proteína (Linhagem HaCat)

<i>(conclusão)</i>							
Proteína	Fármaco	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor
CAS8 (ng/mL)	Controle negativo	2.910	0.437	2.600	2.910	3.220	0.133
	ART IC ₁₀	0.109	0.058	0.069	0.109	0.150	0.059
	ART+CSP IC ₁₀	0.033	0.018	0.020	0.033	0.046	
CAS9 (ng/mL)	ART+CSP IC ₅₀	0.130	0.056	0.090	0.130	0.169	
	CSP IC ₁₀	0.131	0.000	0.131	0.131	0.131	
	CSP IC ₅₀	0.121	0.014	0.111	0.121	0.131	
	Controle negativo	0.150	0.027	0.131	0.150	0.169	
HMGB-1 (pg/mL)	ART IC ₁₀	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	NC
	ART+CSP IC ₁₀	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
	ART+CSP IC ₅₀	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
	CSP IC ₁₀	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
	CSP IC ₅₀	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
	Controle negativo	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	

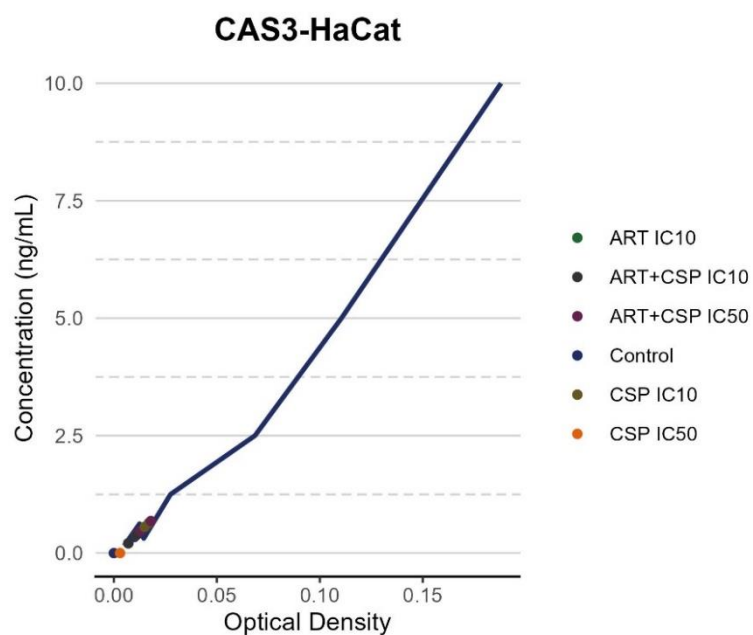
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 14 – Distribuição da quantidade de proteína CALR expressa após os tratamentos (Linhagem HaCat)



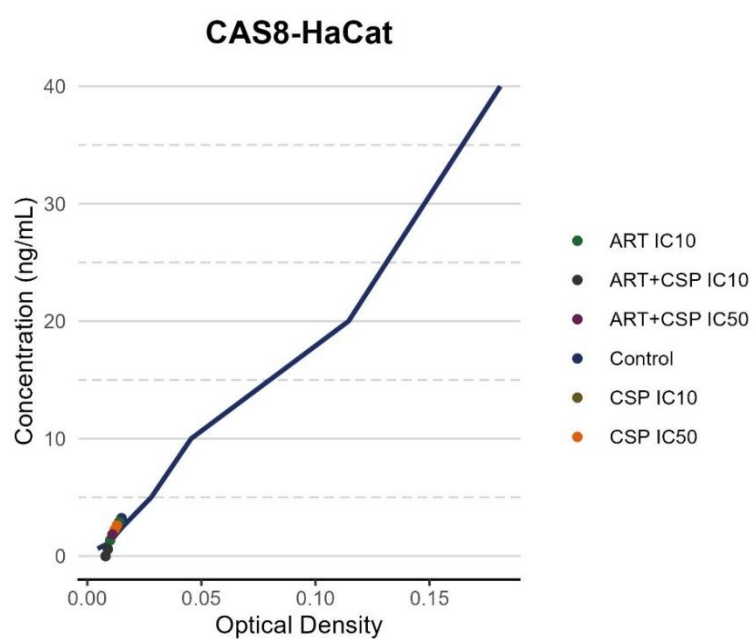
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15 – Distribuição da quantidade de proteína CAS3 expressa após os tratamentos (Linhagem HaCat)



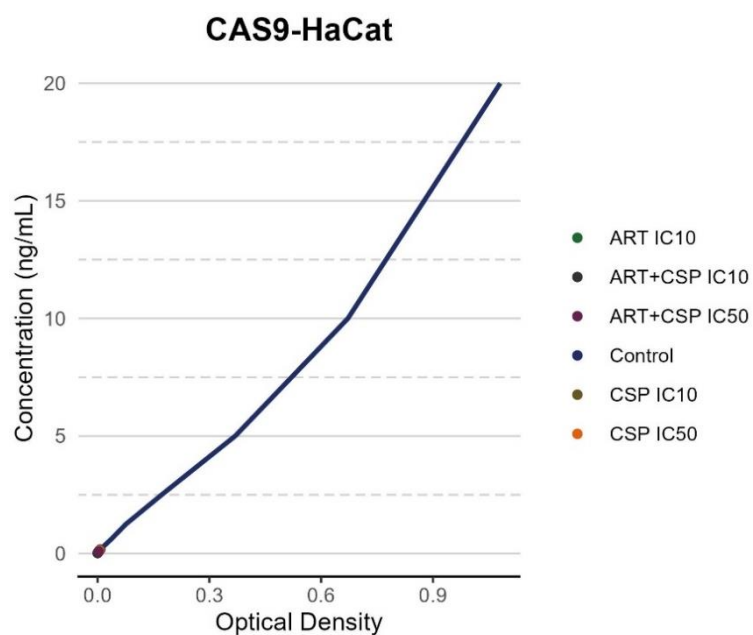
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 16 – Distribuição da quantidade de proteína CAS8 expressa após os tratamentos (Linhagem HaCat)



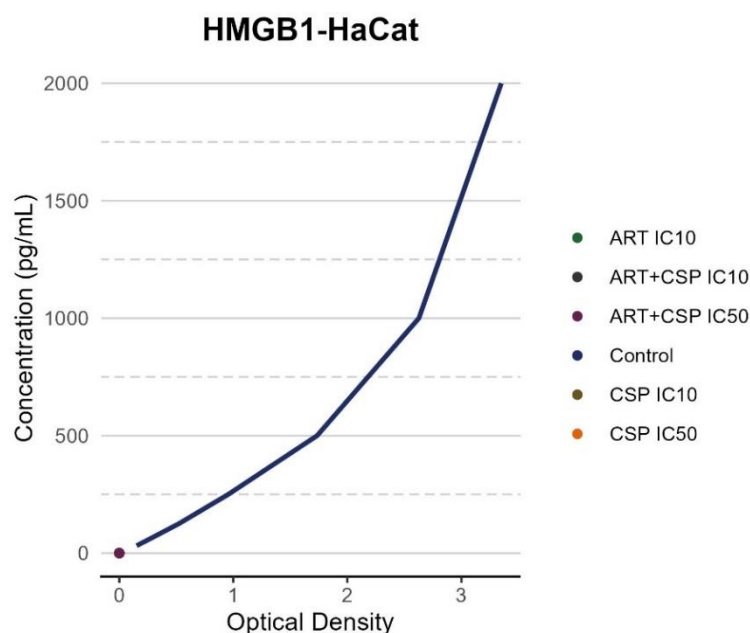
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 17 – Distribuição da quantidade de proteína CAS9 expressa após os tratamentos (Linhagem HaCat)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 18 – Distribuição da quantidade de proteína HMGB1 expressa após os tratamentos (Linhagem HaCat)



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4.2 Linhagem DOK

Para a linhagem DOK, nas proteínas CAS8 e 9, a ART IC₁₀ apresentou maior média de expressão e juntamente com o controle negativo diferiram estatisticamente dos demais tratamentos ($p=0.003$ e $p=0.001$, respectivamente).

Na proteína CALR os tratamentos ART+CSP IC₅₀, ART+CSP IC₁₀ e ART IC₁₀ apresentaram maior média quando comparado ao controle negativo, porém sem diferenças significantes ($p=0.490$). Para a CAS3 todos os tratamentos, com exceção da CSP IC₁₀ apresentaram maior média de expressão do que o controle negativo, embora diferenças estatísticas não tenham sido encontradas ($p=0.457$), assim como para a proteína HMGB1, onde ART+CSP IC₅₀ e CSP IC₅₀ apresentaram maior média comparada ao controle negativo, porém sem diferenças estatísticas ($p=0.462$).

Tabela 10 – Medidas descritivas da quantidade de nanogramas e picogramas das proteínas por ml por fármaco e proteína (Linhagem DOK)

(continua)

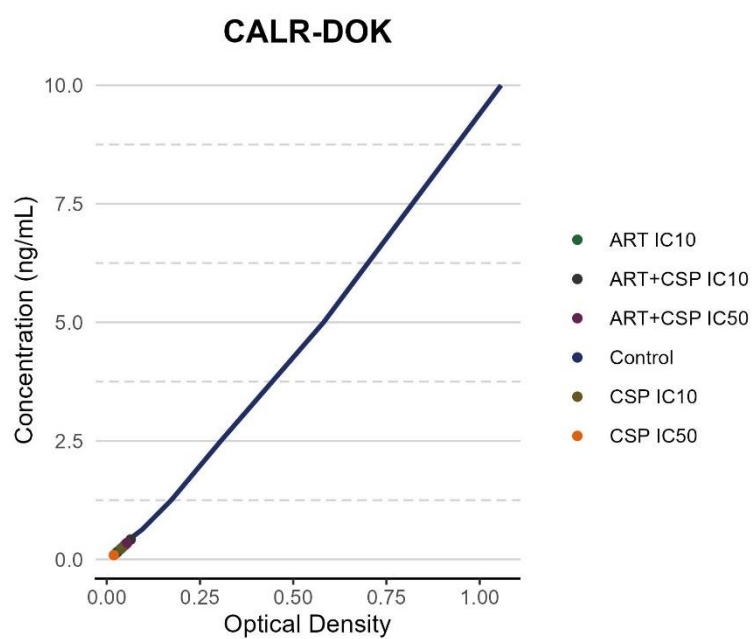
Proteína	Fármaco	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor
CALR (ng/mL)	ART IC ₁₀	0.277	0.083	0.218	0.277	0.336	0.490
	ART+CSP IC ₁₀	0.290	0.183	0.161	0.290	0.419	
	ART+CSP IC ₅₀	0.321	0.042	0.291	0.321	0.351	
	CSP IC ₁₀	0.190	0.081	0.132	0.190	0.247	
	CSP IC ₅₀	0.115	0.034	0.091	0.115	0.139	
	Controle negativo	0.223	0.138	0.125	0.223	0.321	
CAS3 (ng/mL)	ART IC ₁₀	0.909	0.087	0.848	0.909	0.970	0.457
	ART+CSP IC ₁₀	0.546	0.773	0.000	0.546	1.090	
	ART+CSP IC ₅₀	0.621	0.030	0.600	0.621	0.642	
	CSP IC ₁₀	0.137	0.035	0.112	0.137	0.161	
	CSP IC ₅₀	0.637	0.414	0.344	0.637	0.930	
	Controle negativo	0.266	0.293	0.060	0.266	0.473	
CAS8 (ng/mL)	ART IC ₁₀	2.910	0.437	2.600	2.910	3.220	0.003
	ART+CSP IC ₁₀	2.250	0.000	2.250	2.250	2.250	
	ART+CSP IC ₅₀	2.050	0.288	1.840	2.050	2.250	
	CSP IC ₁₀	0.594	0.000	0.594	0.594	0.594	
	CSP IC ₅₀	1.590	0.352	1.340	1.590	1.840	

Tabela 10 – Medidas descritivas da quantidade de nanogramas e picogramas das proteínas por ml por fármaco e proteína (Linhagem DOK)

(conclusão)							
Proteína	Fármaco	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor
CAS8 (ng/mL)	Controle negativo	2.770	0.227	2.600	2.770	2.930	0.003
	ART IC ₁₀	0.150	0.027	0.131	0.150	0.169	0.001
	ART+CSP IC ₁₀	0.111	0.000	0.111	0.111	0.111	
CAS9 (ng/mL)	ART+CSP IC ₅₀	0.101	0.015	0.090	0.101	0.111	
	CSP IC ₁₀	0.046	0.000	0.046	0.046	0.046	
	CSP IC ₅₀	0.080	0.015	0.069	0.080	0.090	
	Controle negativo	0.141	0.014	0.131	0.141	0.150	
HMGB-1 (pg/mL)	ART IC ₁₀	1579	95.6	1511	1579	1647	0.462
	ART+CSP IC ₁₀	1520	61.4	1477	1520	1563	
	ART+CSP IC ₅₀	1639	64.6	1594	1639	1685	
	CSP IC ₁₀	1587	4.54	1584	1587	1590	
	CSP IC ₅₀	1613	33.8	1589	1613	1636	
	Controle negativo	1601	5.76	1597	1601	1605	

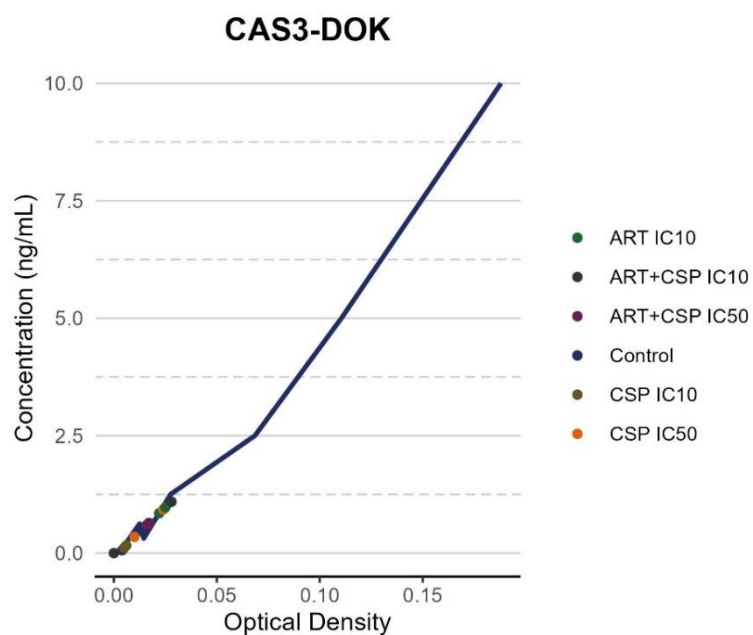
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 19 – Distribuição da quantidade de proteína CALR expressa após os tratamentos (Linhagem DOK)



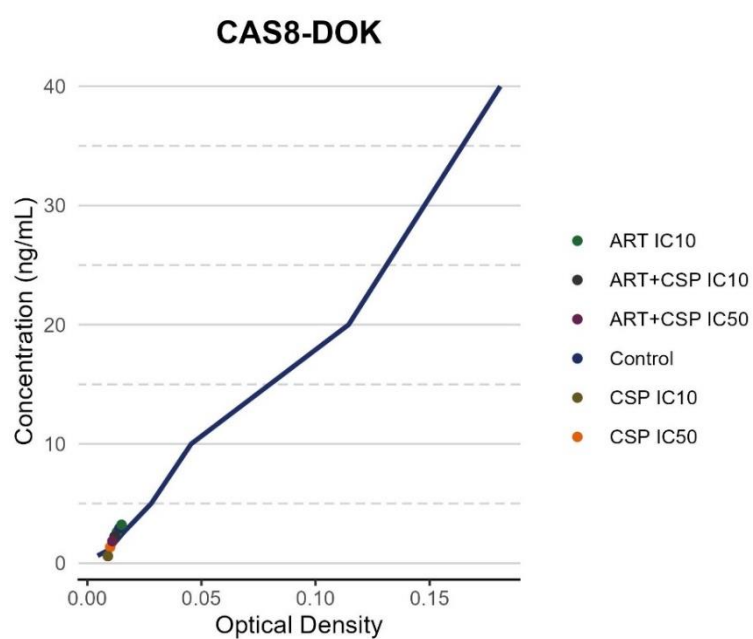
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 20 – Distribuição da quantidade de proteína CAS3 expressa após os tratamentos (Linhagem DOK)



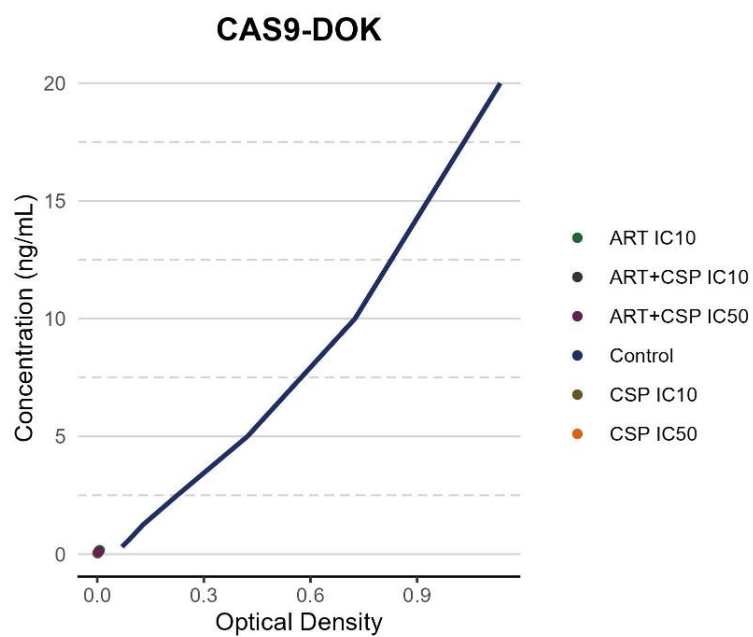
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 21 – Distribuição da quantidade de proteína CAS8 expressa após os tratamentos (Linhagem DOK)



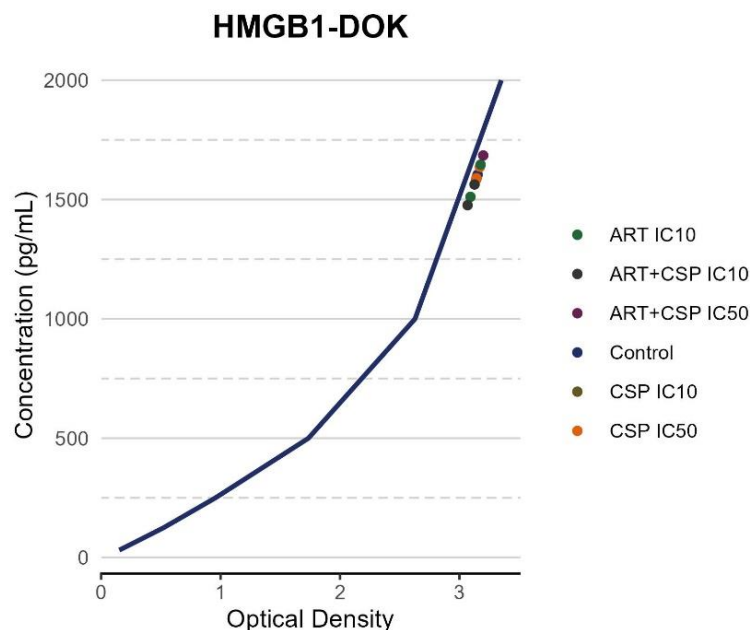
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 22 – Distribuição da quantidade de proteína CAS9 expressa após os tratamentos (Linhagem DOK)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 23 – Distribuição da quantidade de proteína HMGB1 expressa após os tratamentos (Linhagem DOK)



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4.3 Linhagem SCC-180

Para a linhagem SCC-180, na proteína CALR todas as concentrações de CSP IC₅₀ foram iguais a zero e, por isso, esse tratamento não entrou na comparação. Na proteína CAS3 todas as concentrações de CSP IC₁₀ e CSP IC₅₀ são iguais a zero e, por isso, esses tratamentos também não entraram na comparação.

Para a proteína HMGB-1 o controle negativo, a ART IC₁₀, CSP IC₁₀ e ART+CSP IC₁₀ apresentaram maiores médias que os demais tratamentos, diferindo estatisticamente ($p < 0.001$).

Nas proteína CALR os tratamentos com ART IC₁₀, ART+CSP IC₁₀ e CSP IC₁₀ apresentaram maior média que o controle negativo, porém sem diferenças estatísticas ($p = 0.058$). Na proteína CAS3 o controle negativo expressou maior concentração desta proteína, sem diferenças significantes ($p = 0.081$). Para a CAS8 e CAS9 os tratamentos com ART+CSP IC₅₀ e ART IC₁₀ expressaram maiores médias que o controle negativo, porém sem diferenças significantes, ($p = 0.056$ e $p = 0.118$, respectivamente).

Tabela 11 – Medidas descritivas da quantidade de nanogramas e picogramas das proteína por ml por fármaco e proteína (Linhagem SCC-180)

<i>(continua)</i>							
Proteína	Fármaco	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor
CALR (ng/mL)	ART IC ₁₀	0.464	0.265	0.277	0.464	0.651	0.058
	ART+CSP IC ₁₀	0.446	0.005	0.442	0.446	0.449	
	ART+CSP IC ₅₀	0.051	0.028	0.032	0.051	0.071	
	CSP IC ₁₀	0.430	0.005	0.427	0.430	0.434	
	CSP IC ₅₀	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
	Controle negativo	0.158	0.075	0.105	0.158	0.211	
CAS3 (ng/mL)	ART IC ₁₀	0.279	0.395	0.000	0.279	0.558	0.081
	ART+CSP IC ₁₀	0.279	0.395	0.000	0.279	0.558	
	ART+CSP IC ₅₀	0.237	0.335	0.000	0.237	0.473	
	CSP IC ₁₀	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
	CSP IC ₅₀	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
	Controle negativo	1.280	0.029	1.260	1.280	1.300	
CAS8 (ng/mL)	ART IC ₁₀	2.250	0.000	2.250	2.250	2.250	0.056
	ART+CSP IC ₁₀	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	

Tabela 11 – Medidas descritivas da quantidade de nanogramas e picogramas das proteína por ml por fármaco e proteína (Linhagem SCC-180)

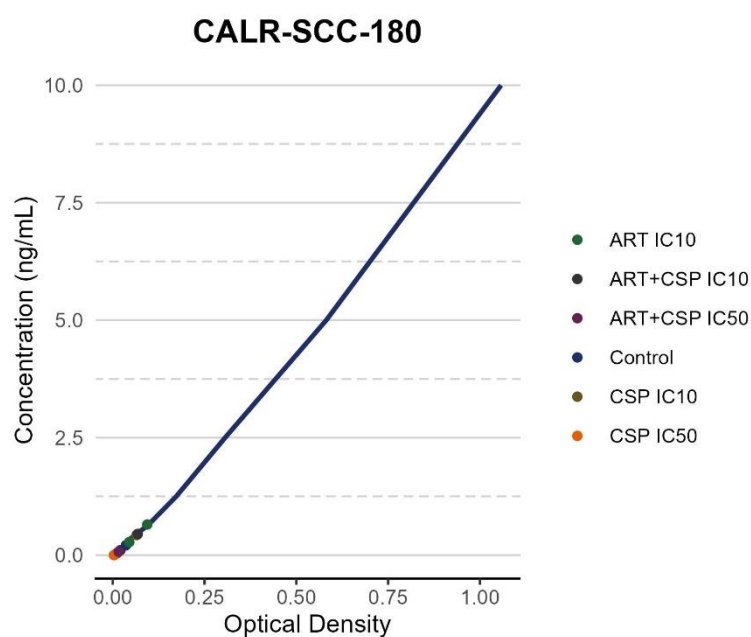
<i>(continuação)</i>							
Proteína	Fármaco	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor
CAS8 (ng/mL)	ART+CSP IC ₅₀	2.930	1.540	1.840	2.930	4.010	0.056
	CSP IC ₁₀	1.590	0.352	1.340	1.590	1.840	
	CSP IC ₅₀	1.590	0.352	1.340	1.590	1.840	
	Controle negativo	1.590	0.352	1.340	1.590	1.840	
CAS9 (ng/mL)	ART IC ₁₀	0.111	0.000	0.111	0.111	0.111	0.118
	ART+CSP IC ₁₀	0.010	0.014	0.000	0.010	0.020	
	ART+CSP IC ₅₀	0.157	0.094	0.090	0.157	0.224	
	CSP IC ₁₀	0.080	0.015	0.069	0.080	0.090	
	CSP IC ₅₀	0.080	0.015	0.069	0.080	0.090	
	Controle negativo	0.080	0.015	0.069	0.080	0.090	
HMGB-1 (pg/mL)	ART IC ₁₀	1456	18.8	1443	1456	1469	<0.001
	ART+CSP IC ₁₀	1356	82.2	1298	1356	1414	
	ART+CSP IC ₅₀	264	46.6	231	264	297	
	CSP IC ₁₀	1401	17.7	1388	1401	1413	

Tabela 11 – Medidas descritivas da quantidade de nanogramas e picogramas das proteína por ml por fármaco e proteína (Linhagem SCC-180)

Proteína	Fármaco	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	(conclusão)
							p-valor
HMGB-1 (pg/mL)	CSP IC ₁₀	1401	17.7	1388	1401	1413	<0.001
	CSP IC ₅₀	848	38.8	821	848	876	
	Controle negativo	1522	84.8	1462	1522	1582	

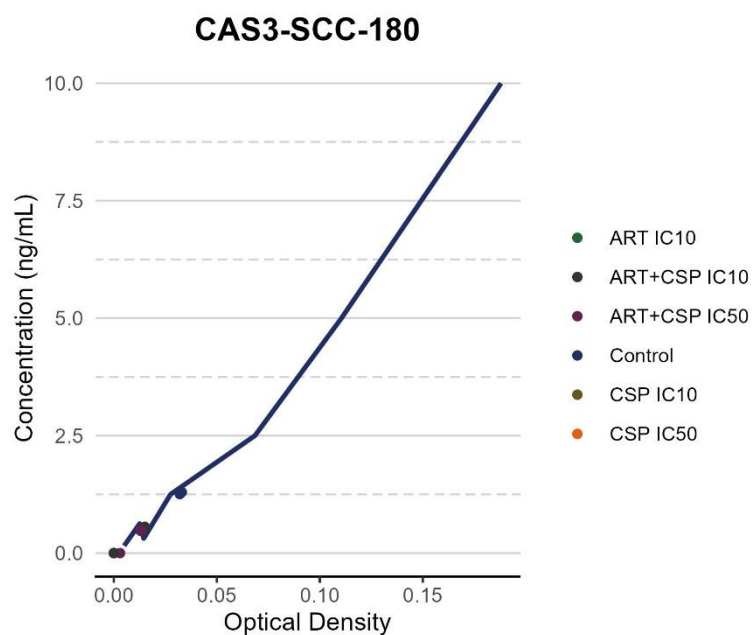
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 24 – Distribuição da quantidade de proteína CALR expressa após os tratamentos (Linhagem SCC-180)



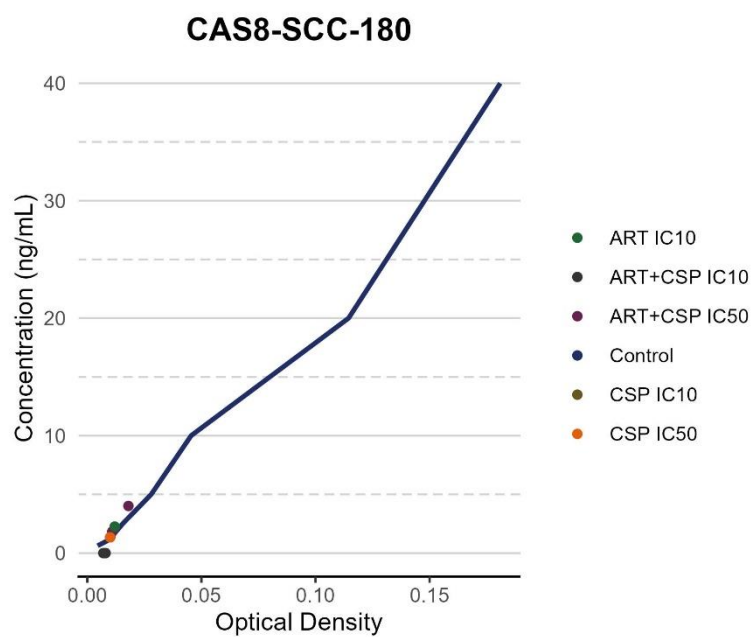
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 25 – Distribuição da quantidade de proteína CAS3 expressa após os tratamentos (Linhagem SCC-180)



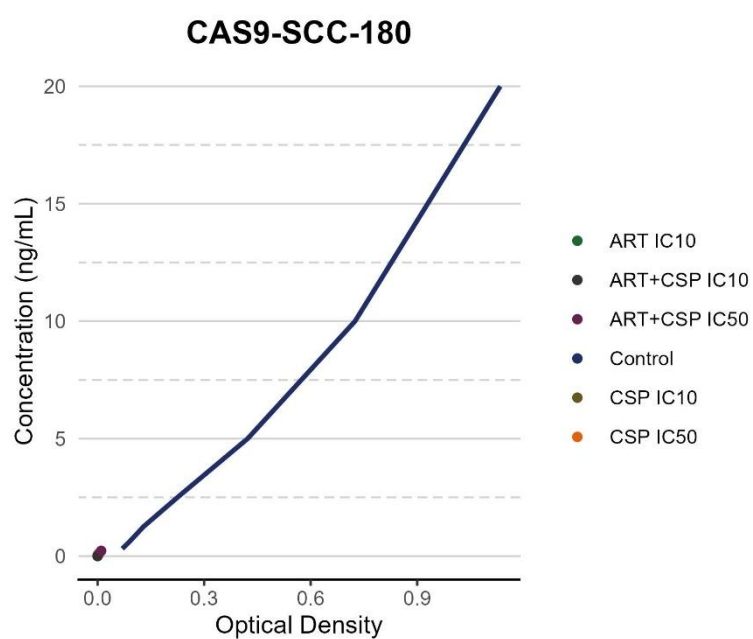
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 26 – Distribuição da quantidade de proteína CAS8 expressa após os tratamentos (Linhagem SCC-180)



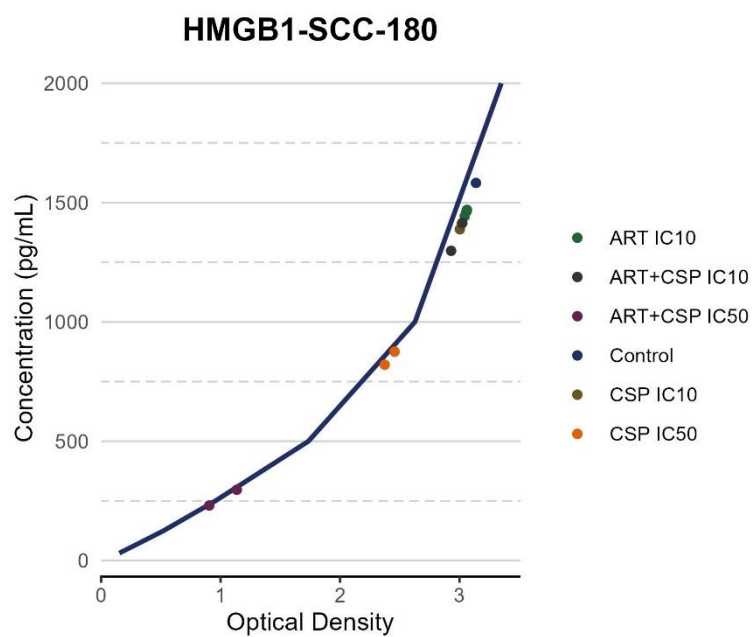
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 27 – Distribuição da quantidade de proteína CAS9 expressa após os tratamentos (Linhagem SCC-180)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 28 – Distribuição da quantidade de proteína HMGB1 expressa após os tratamentos (Linhagem SCC-180)



Fonte: Elaborado pelo autor.

6 DISCUSSÃO

A ART e seus derivados apresentam propriedades anticancerígenas contra diversas neoplasias *in vitro* e *in vivo*, como de mama (Cao et al., 2019; Wen et al., 2018), de cabeça e pescoço (Roh et al., 2017), laringe (Singh, Verma, 2002), ovário, fígado (Zhou et al., 2021) e de câncer de boca (Nam et al., 2007), além de atividade antimalárica (Dembitsky et al., 2021). O isolamento e identificação de novos compostos são importantes para que substituam os quimioterápicos que possuem diversos efeitos adversos como náuseas, vômitos, efeitos tóxicos em diferentes órgãos e resistência de alguns tumores, como é o caso da CSP (Lee et al., 2007; Oun et al., 2018; Shen et al., 2012).

No presente estudo observamos que a ART não causou uma redução significativa da viabilidade celular das linhagens de LO e CCEO, embora a ART tenha sido descrita capaz de atuar seletivamente em células cancerígenas (Efferth, 2017). Em um estudo de Tin et al. (2012) a ART atuou de maneira distinta entre células tumorais e não tumorais de mama, indicando que propriedades intrínsecas de cada tipo celular podem causar diferentes respostas ao composto, assim, em células de LO e CCEO ocorrem mudanças a níveis moleculares que podem afetar a maneira de resposta ao composto. Ainda, Posadino et al. (2023) sugeriram que os efeitos da ART dependem da linhagem celular e do desenho experimental, como meio de diluição e doses testadas, o que pode explicar os nossos resultados encontrados com este composto.

No presente estudo, a diluição da CSP e ART foi feita em PBS que é um meio aquoso, pois Massart et al., (1993) relataram que o DMSO (dimetilsulfóxido) reduziu a citotoxicidade da CSP, que pode mascarar os resultados. Bhakuni et al. (2001) relataram que a melhor biodisponibilidade da ART é em suas folhas secas, ainda, Titulaer et al. (1991) relataram que a inclusão da ART em óleo mostrou uma absorção mais rápida com concentrações de pico relativamente altas quando comparado com a suspensão aquosa, que revelou uma ação baixa.

O DMSO é conhecido como um solvente universal e é muito empregado na solubilização de soluções de estoque de medicamentos de base orgânica (Pereira, Williams, 2007). Ainda, o DMSO pode interagir com compostos de platina, mudando

seus complexos, tornando-os instáveis neste meio de diluição (Hall et al., 2014; Kerrison, Sadler, 1985), comprometendo a citotoxicidade do fármaco, favorecendo a proliferação celular (Hall et al., 2014). Com isso, autores sugerem outros meios de diluição de drogas, como o soro fisiológico e o PBS, que foi diluente empregado por nós (Hall et al., 2014).

A CSP possui atividade anticancerígena bem estabelecida apesar de seus efeitos adversos, o que foi possível observar em nossos resultados, onde a viabilidade de todas as linhagens celulares testadas diminuiu conforme a concentração aumentou, evidenciando que a CSP não atua seletivamente em células neoplásicas pois causou redução na viabilidade de queratinócitos normais, o que não foi observado com a ART, que apresentou baixa citotoxicidade em todas as linhagens testadas.

A ART não demonstrou efeitos genotóxicos nas doses testadas, assim como a CSP em baixas concentrações, porém, a CSP causou uma redução no número de células nas maiores doses, não sendo observado a formação de micronúcleos, apenas fragmentos celulares. A genotoxicidade de compostos pode ser avaliada por meio do ensaio de micronúcleos, que é um teste empregado para avaliar mutações pontuais e danos cromossômicos de compostos como a ART e a CSP (Hayashi, 2016; Kang et al., 2013).

O crescimento celular desregulado e de mobilidade acentuada revela um comportamento que contribui nos processos de metástase (DeVries et al., 1999; Hood, Cheresch, 2002). Os testes de cicatrização ou fechamento de feridas, também chamados de *scraft*, em culturas celulares confluentes são muito empregados e descritos como uma boa forma para estudar a migração de células após receberem um tratamento específico (Nobes, Hall, 1999; Valster et al., 2005). Nossos resultados mostram que a CSP e ART+CSP nas concentrações de IC₅₀ foram os únicos tratamentos capazes de impossibilitar o fechamento completo do *scraft* para as linhagens HaCat e SCC-180, indicando que a ART empregada junto com a CSP pode reduzir as chances de metástases, ainda este resultado ressalta também que a CSP atua em células normais e não especificamente nas células neoplásicas, podendo explicar a sua toxicidade elevada para os pacientes em tratamento com este quimioterápico (Lee et al., 2007; Oun et al., 2018; Shen et al., 2012).

Rao et al., (2022) verificaram que a combinação de CSP com

diidroartemisinina foi capaz de reduzir a migração de células de hepatoblastoma humano, e embora tenhamos testado CSP associada à ART, e não com diidroartemisinina, encontramos resultados semelhantes na redução da migração de células de CCEO. Também, observamos a redução na migração de células de CCEO tratadas com CSP, de acordo com os achados de Semlali et al. (2023) que verificaram uma redução na migração de células cancerígenas orais tratadas com CSP e CSP associada ao anetol, que é um composto derivado da planta anis.

A ART foi descrita como sendo capaz de ocasionar a MCI, apoptose e ferroptose de NM (Cao et al., 2019; Li et al., 2008; Slezakova, Ruda-Kucerova, 2017; Wang et al., 2012). Yamachika et al. (2004) ao avaliarem o tratamento de diidroartemisinina *in vitro* em células de CCEO, verificaram que em doses mais altas, de 400 μ M, houve uma redução na viabilidade celular, e que a morte celular ocorreu por apoptose. Em nosso estudo, não testamos diidroartemisinina, mas sim a ART, e diferente de Yamachika et al. (2004), testamos até a dose de 200 μ M, que não causou a redução expressiva da viabilidade das células de LO e CCEO, e tampouco foi capaz de induzir a apoptose das linhagens celulares testadas, diferindo dos achados de Yamachika et al. (2004) que não esclareceram qual foi o meio de diluição do composto derivado da ART que testaram, assim, diferenças nas metodologias empregadas podem elucidar a diferença entre os resultados.

Os compostos a base de platina foram descritos capazes de ativar vias que ocasionam a morte da célula por necrose ou apoptose (Achkar et al., 2018; Ober, Lippard, 2007). No presente estudo, notamos que o tratamento das linhagens celulares testadas com CSP causou uma relação dose dependente, conforme a dose aumentou, a viabilidade celular reduziu, porém verificamos que a apoptose não foi o tipo de morte que ocorreu no presente estudo. Ainda, derivados da CSP, como a oxaliplatina, foram descritos como capazes ocasionar a MCI (Bruno et al., 2017; Hato et al., 2014; Martins et al., 2011), porém, alguns autores descreveram que apenas alguns destes compostos geram a MCI (Obeid et al., 2007; Wang et al., 2005), no presente estudo não observamos a indução da MCI nas linhagens celulares de LO e CCEO tratadas com CSP.

Buscamos verificar a expressão das proteínas relacionadas a MCI, como HMGB-1 e CALR, após as linhagens celulares testadas receberem os tratamentos com ART, CSP e a associação de ambas. Verificamos que a proteína CALR foi

expressa pela linhagem de LO após receber tratamento com ART em maior quantidade em comparação ao controle negativo, assim como HMGB-1, onde tratamentos com ART+CSP e CSP resultaram em uma maior expressão, embora diferenças estatísticas não tenham sido encontradas. Para a linhagem de CCEO, os tratamentos com ART, ART+CSP e CSP revelaram uma maior expressão de CALR que o grupo controle negativo, e embora não tenhamos encontrado diferenças significantes, esses resultados sugerem que os tratamentos com ART possam induzir a imunogenicidade, necessitando de mais estudos para elucidar essa possibilidade, uma vez que não há na literatura estudos que avaliaram a expressão destas proteínas, relacionadas a MCI, em linhagens celulares de LO e CCEO tratadas com estes compostos.

A expressão de proteínas relacionadas a apoptose, como a CAS3, 8 e 9, foi observada na linhagem de LO após tratamento com ART, ART+CSP e CSP em maior quantidade que o controle negativo, embora não tenhamos encontrado diferenças estatísticas, contrapondo com os achados de Cao et al., (2019) que revelaram que a ART aumentou a apoptose das células malignas *in vitro*.

Já para a linhagem de CCEO, os tratamentos de ART e ART+CSP causaram uma maior expressão de CAS8 e CAS9, comparado ao controle negativo, porém sem diferença estatística, indicando que tais tratamentos também possam atuar na apoptose destas células, necessitando novos estudos com estes compostos.

Além das formas de morte celular discutidas acima, é possível que a ART e a CSP causem outras formas de morte, como a necrose e ferroptose (Roh et al., 2017). Huang et al. (2022) verificaram que o artesunato exibiu pouco efeito na apoptose de células de câncer colorretal, indicando que este composto possa induzir outro tipo de morte celular, de acordo com os nossos achados.

A CSP pode ocasionar a necrose das células (Achkar et al., 2018; Ober, Lippard, 2007), que é caracterizada pelo edema celular, ruptura de sua membrana e disfunção de organelas e ocorre independente da ativação de caspases (Dhuriya, Sharma, 2018; Weinlich et al., 2017; Wyllie et al. 1980). Embora a necrose não tenha sido estudada no presente estudo, não se pode descartar que o tratamento com CSP também possa ter ocasionado essa forma de morte celular, já que a expressão de caspases ocorreu de forma discreta, especialmente nas linhagens celulares que tiveram redução da viabilidade celular, foram tratadas com CSP e não tiveram alta

expressão das proteínas relacionadas a apoptose (Cho, 2018; Leeper, 2016; Seifert, Miller 2017).

Dursun et al., (2006) verificaram que a CSP pode ocasionar apoptose inicialmente e necrose secundária após 18 horas de tratamento, o que levaria a redução da expressão de caspases (Lau, 1999), isso pode ser relacionado com os nossos achados onde o tratamento com CSP, que ocasionou uma maior redução da viabilidade celular, não revelou uma expressão significativa de caspases 3, 8 e 9 nas linhagens testadas que receberam esse tratamento, isso pode ser explicado pelo período de tratamento que empregamos de 48 horas, que foi maior que 18 horas, podendo ter ocasionado uma apoptose inicial, seguido de necrose destas células.

7 CONCLUSÃO

- A MCI e a apoptose não foram evidenciadas como forma de morte celular após as linhagens HaCat, DOK e SCC-180 receberem tratamentos com ART, CSP e a associação de ambas, indicando que outro tipo de morte celular possa ter ocorrido.
- Efeitos genotóxicos não foram observados nas doses testadas.
- O tratamento de CSP e ART+CSP foram capaz de reduzir a migração da linhagem SCC-180.
- Novos estudos são necessários para elucidar se a ART e CSP podem ocasionar a MCI ou apoptose nas linhagens celulares HaCat, DOK e SCC-180, para estabelecer se estes compostos possuem atividade imunogênica.

REFERÊNCIAS

- Achkar IW, Abdulrahman N, Al-Sulaiti H, Joseph JM, Uddin S, Mraiche F. Cisplatin based therapy: the role of the mitogen activated protein kinase signaling pathway. *J Transl Med.* 2018;16(1):96. doi: 10.1186/s12967-018-1471-1.
- Aguirre-Urizar JM, Lafuente-Ibáñez de Mendoza I, Warnakulasuriya S. Malignant transformation of oral leukoplakia: Systematic review and meta-analysis of the last 5 years. *Oral Dis.* 2021;27(8):1881-1895. doi: 10.1111/odi.13810.
- Ahmed A, Tait SWG. Targeting immunogenic cell death in cancer. *Mol Oncol.* 2020;14(12):2994-3006. doi: 10.1002/1878-0261.12851.
- Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med.* 2007;13(9):1050-9. doi: 10.1038/nm1622.
- Arandjelovic S, Ravichandran KS. Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis. *Nat Immunol.* 2015;16(9):907-17. doi: 10.1038/ni.3253.
- Banerjee AG, Bhattacharyya I, Vishwanatha JK. Identification of genes and molecular pathways involved in the progression of premalignant oral epithelia. *Mol Cancer Ther.* 2005 Jun;4(6):865-75. doi: 10.1158/1535-7163.
- Baxevanis CN, Perez SA, Papamichail M. Combinatorial treatments including vaccines, chemotherapy and monoclonal antibodies for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2009;58(3):317-24. doi: 10.1007/s00262-008-0576-4.
- Bhakuni RS, Jain DC, Sharma RP, Kumar S. Secondary metabolites of *Artemisia annua* and their biological activity. *Curr. Sci.* 2001;80:35-48.
- Boice A, Bouchier-Hayes L. Targeting apoptotic caspases in cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2020;1867(6):118688. doi: 10.1016/j.bbamcr.2020.118688.
- Bruno PM, Liu Y, Park GY, Murai J, Koch CE, Eisen TJ, et al. A subset of platinum-containing chemotherapeutic agents kills cells by inducing ribosome biogenesis stress. *Nat. Med.* 2017;23:461-471. doi: 10.1038/nm.4291.
- Cao Y, Feng YH, Gao LW, Li XY, Jin QX, Wang YY, et al. Artemisinin enhances the anti-tumor immune response in 4T1 breast cancer cells in vitro and in vivo. *Int Immunopharmacol.* 2019;70:110-116. doi: 10.1016/j.intimp.2019.01.041.
- Carrard VC, van der Waal I. A clinical diagnosis of oral leukoplakia; A guide for dentists. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2018;23(1):e59-e64. doi: 10.4317/medoral.22292.

de Castro G Jr, Alves GV, Castro AF, Chaves ALF, De Marchi P, de Oliveira TB, et al. Criteria for eligibility to cisplatin in the curative treatment of head and neck cancer: Consensus opinion from a panel of experts. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2018;131:30-34. doi: 10.1016/j.critrevonc.2018.08.009.

Chaturvedi AK, Udaltsova N, Engels EA, Katznel JA, Yanik EL, Katki HA, et al. Oral Leukoplakia and Risk of Progression to Oral Cancer: A Population-Based Cohort Study. *J Natl Cancer Inst*. 2020;112(10):1047-1054. doi: 10.1093/jnci/djz238.

Chi AC, Day TA, Neville BW. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma--an update. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(5):401-21. doi: 10.3322/caac.21293.

Chiesa F, Tradati N, Grigolato R, Boracchi P, Biganzoli E, Crose N, et al. Randomized trial of fenretinide (4-HPR) to prevent recurrences, new localizations and carcinomas in patients operated on for oral leukoplakia: long-term results. *Int J Cancer*. 2005;115(4):625-9. doi: 10.1002/ijc.20923.

Cho YS. The role of necroptosis in the treatment of diseases. *BMB Rep*. 2018;51(5):219-224.

Chou TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev*. 2006;58(3):621-81. Erratum in: *Pharmacol Rev*. 2007;59(1):124. doi: 10.1124/pr.58.3.10.

Chow LQM, Haddad R, Gupta S, Mahipal A, Mehra R, Tahara M, et al. Antitumor Activity of Pembrolizumab in Biomarker-Unselected Patients With Recurrent and/or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Results From the Phase Ib KEYNOTE-012 Expansion Cohort. *J Clin Oncol*. 2016;34(32):3838-3845. doi: 10.1200/JCO.2016.68.1478.

Dembitsky VM, Ermolenko E, Savidov N, Gloriovova TA, Poroikov VV. Antiprotozoal and Antitumor Activity of Natural Polycyclic Endoperoxides: Origin, Structures and Biological Activity. *Molecules*. 2021; 26(3):686.

DeVries ME, Ran L, Kelvin DJ. On the edge: the physiological and pathophysiological role of chemokines during inflammatory and immunological responses. *Semin Immunol*. 1999;11(2):95-104.

Dhuriya YK, Sharma D. Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death. *J Neuroinflammation*. 2018;15(1):199.

Diederich M. Natural compound inducers of immunogenic cell death. *Archives of Pharmacol Research*. 2019;42(7):629–645. doi: 10.1007/s12272-019-01150-z.

Dursun B, He Z, Somerset H, Oh DJ, Faubel S, Edelstein CL. Caspases and calpain are independent mediators of cisplatin-induced endothelial cell necrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006 Sep;291(3):F578-87. doi: 10.1152/ajprenal.00455.2005.

Efferth T, Dunstan H, Sauerbrey A, Miyachi O, Chitambar CR. The anti-malarial artesunate is also active against cancer. *Int J Oncol*. 2001;18:767–773. doi: 10.3892/ijo.18.4.767.

Efferth T, Herrmann F, Tahrani A, Wink M. Cytotoxic activity of secondary metabolites derived from *Artemisia annua* L. towards cancer cells in comparison to its designated active constituent artemisinin. *Phytomedicine*. 2011;18:959-969. doi: 10.1016/j.phymed.2011.06.008.

Efferth T, Sauerbrey A, Olbrich A, Gebhart E, Rauch P, Weber HO, et al. Molecular modes of action of artesunate in tumor cell lines. *Mol Pharmacol*. 2003;64(2):382-94. doi: 10.1124/mol.64.2.382.

Efferth T. From ancient herb to modern drug: *artemisia annua* and artemisinin for cancer therapy. *Semin Cancer Biol*. 2017;46:65-83. doi: 10.1016/j.semcancer.2017.02.009.

Eling N, Reuter L, Hazin J, Brady AH, Brady NR. Identification of artesunate as a specific activator of ferroptosis in pancreatic cancer cells. *Oncoscience*. 2015;2(5):517–532. doi: 10.18632/oncoscience.160.

Ettinger KS, Ganry L, Fernandes RP. Oral Cavity Cancer. *Oral Maxillofac Surg Clin NA*. 2019;31(1):13–29. doi: 10.1016/j.coms.2018.08.002.

Faber A, Barth C, Hörmann K, Kassner S, Schultz JD, Sommer U. CD44 as a stem cell marker in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2011;26(2):321-6. doi: 10.3892/or.2011.1322.

Feng MX, Hong JX, Wang Q, Fan YY, Yuan CT, Lei XH, et al. Dihydroartemisinin prevents breast cancer-induced osteolysis via inhibiting both breast cancer cells and osteoclasts. *Sci Rep*. 2016;6:19074. Erratum in: *Sci Rep*. 2018 Jan 08;8:46935. doi: 10.1038/srep19074.

Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer*. 2021; 5. doi: 10.1002/ijc.33588. [Epub ahead of print].

Galluzzi L, Buqué A, Kepp O, Zitvogel L, Kroemer G. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nature Reviews Immunology*. 2016;17(2):97-111. doi: 10.1038/nri.2016.107.

Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*. 2018;25(3):486-541. doi: 10.1038/s41418-017-0012-4.

Gao J, Ma F, Wang X, Li G. Combination of dihydroartemisinin and resveratrol effectively inhibits cancer cell migration *via* regulation of the DLC1/TCTP/Cdc42 pathway. *Food Funct*. 2020;11(11):9573-9584. doi: 10.1039/d0fo00996b.

Garg AD, Krysko DV, Verfaillie T, Kaczmarek A, Ferreira GB, Marysael T, et al. A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death. *EMBO J.* 2012;31(5):1062-79. doi: 10.1038/emboj.2011.497.

Garg AD, Martin S, Golab J, Agostinis P. Danger signalling during cancer cell death: origins, plasticity and regulation. *Cell Death & Differentiation.* 2013;21(1):26-38. doi: 10.1038/cdd.2013.48.

Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, Aymeric L, Ma Y, Ortiz C, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 β -dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med.* 2009;15(10):1170-8. doi: 10.1038/nm.2028.

Giampazolias E, Zunino B, Dhayade S, Bock F, Cloix C, Cao K, et al. Mitochondrial permeabilization engages NF- κ B-dependent anti-tumour activity under caspase deficiency. *Nat Cell Biol.* 2017 Sep;19(9):1116-1129. doi: 10.1038/ncb3596.

Hall MD, Telma KA, Chang KE, Lee TD, Madigan JP, Lloyd JR, et al. Say no to DMSO: dimethylsulfoxide inactivates cisplatin, carboplatin, and other platinum complexes. *Cancer Res.* 2014;74(14):3913-22.

Hato SV, Khong A, de Vries IJ, Lesterhuis WJ. Molecular pathways: the immunogenic effects of platinum-based chemotherapeutics. *Clin Cancer Res.* 2014;20(11):2831-7. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3141.

Hayashi M. The micronucleus test-most widely used *in vivo* genotoxicity test. *Genes Environ.* 2016;38:18.

Ho GY, Woodward N, Coward JI. Cisplatin versus carboplatin: comparative review of therapeutic management in solid malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016;102:37-46. doi: 10.1016/j.critrevonc.2016.03.014.

Hood JD, Cheresch DA. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(2):91-100.

Hsiao WLW, Liu L. The role of traditional Chinese herbal medicines in cancer therapy from TCM theory to mechanistic insights. *Planta Med.* 2010;76(11):1118–1131. doi: 10.1055/s-0030-1250186.

Huang Z, Gan S, Zhuang X, Chen Y, Lu L, Wang Y, et al. Artesunate Inhibits the Cell Growth in Colorectal Cancer by Promoting ROS-Dependent Cell Senescence and Autophagy. *Cells.* 2022;11(16):2472.

Iocca O, Sollecito TP, Alawi F, Weinstein GS, Newman JG, De Virgilio A, et al. Potentially malignant disorders of the oral cavity and oral dysplasia: A systematic review and meta-analysis of malignant transformation rate by subtype. *Head Neck.* 2020 Mar;42(3):539-555. doi: 10.1002/hed.26006.

Jia J, Qin Y, Zhang L, Guo C, Wang Y, Yue X, et al. Artemisinin inhibits gallbladder cancer cell lines through triggering cell cycle arrest and apoptosis. *Mol Med Rep*. 2016;13(5):4461-8. doi: 10.3892/mmr.2016.5073

Johnson DE, Burtneess B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2020 Nov 26;6(1):92. Erratum in: *Nat Rev Dis Primers*. 2023; 19;9(1):4. doi: 10.1038/s41572-020-00224-3.

Kaminagakura E, Tango RN, Cruz-Perez D, Bonan R, Yamamoto de Almeida L, de Almeida Lança ML, et al. Oral squamous cell carcinoma outcome in adolescent/young adult: Systematic review and meta-analysis. *Head Neck*. 2022 Feb;44(2):548-561. doi: 10.1002/hed.26940.

Kang SH, Kwon JY, Lee JK, Seo YR. Recent advances in in vivo genotoxicity testing: prediction of carcinogenic potential using comet and micronucleus assay in animal models. *J Cancer Prev*. 2013;18(4):277-88.

Kazama H, Ricci JE, Herndon JM, Hoppe G, Green DR, Ferguson TA. Induction of immunological tolerance by apoptotic cells requires caspase-dependent oxidation of high-mobility group box-1 protein. *Immunity*. 2008 Jul 18;29(1):21-32. doi: 10.1016/j.immuni.2008.05.013.

Kepp O, Senovilla L, Vitale I, Vacchelli E, Adjemian S, Agostinis P, et al. Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *Oncoimmunology*. 2014; 13;3(9):e955691. doi: 10.4161/21624011.2014.955691.

Kerrison SJS, Sadler PJ. 195Pt NMR studies of platinum(II) dimethylsulphoxide complexes. *Inorganica Chimica Acta*. 1985;104:197–201.

Kesavardhana S, Malireddi RKS, Kanneganti TD. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Pyroptosis. *Annu Rev Immunol*. 2020; 26;38:567-595. doi: 10.1146/annurev-immunol-073119-095439.

Kong M, Hong SE. Tumor Regression Patterns Based on Follow-up Duration in Patients With Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Treated With Radiotherapy or Chemoradiotherapy. *Clin Exp Otorhinolaryngol*. 2015;8(4):416-21. doi: 10.3342/ceo.2015.8.4.416.

Konstat-Korzenny E, Ascencio-Aragon JA, Niezen-Lugo S, Vazquez-Lopez R. Artemisinin and its synthetic derivatives as a possible therapy for cancer. *Med Sci (Basel)*. 2018;6:19. doi: 10.3390/medsci6010019.

Kroemer G, Galassi C, Zitvogel L, Galluzzi L. Immunogenic cell stress and death. *Nat Immunol*. 2022;23(4):487-500. doi: 10.1038/s41590-022-01132-2.

Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, Zitvogel L. Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy. *Annual Review Of Immunology*. 2013;31(1):51-72. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-100008.

Kuriakose MA, Sharan R. Oral cancer prevention. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2006; 18(4):493-511. doi: 10.1016/j.coms.2006.06.003.

Kvaal SI, Warloe T. Photodynamic treatment of oral lesions. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2007;26(2):127-33. doi: 10.1615/jenvironpatholtoxicoloncol.v26.i2.70.

Lang SJ, Schmiech M, Hafner S, Paetz C, Steinborn C, Huber R, et al. Antitumor activity of an *Artemisia annua* herbal preparation and identification of active ingredients. *Phytomedicine.* 2019;62:152962. doi: 10.1016/j.phymed.2019.152962.

Lau AH. Apoptosis induced by cisplatin nephrotoxic injury. *Kidney Int.* 1999 Oct;56(4):1295-8. doi: 10.1046/j.1523-1755.1999.00687.x.

Lee DY, Kim SK, Kim YS, Son DH, Nam JH, Kim IS, Park RW, Kim SY, Byun Y. Suppression of angiogenesis and tumor growth by orally active deoxycholic acid-heparin conjugate. *J Control Release.* 2007;118(3):310-7.

Leeper NJ. The role of necroptosis in atherosclerotic disease. *JACC Basic Transl Sci.* 2016;1(6):548-550.

Letis AS, Seo EJ, Nikolaropoulos SS, Efferth T, Giannis A, Fousteris MA. Synthesis and cytotoxic activity of new artemisinin hybrid molecules against human leukemia cells. *Bioorg Med Chem.* 2017;25(13):3357-3367. doi: 10.1016/j.bmc.2017.04.021.

Liao YH, Chou WY, Chang CW, Lin MC, Wang CP, Lou PJ, et al. Chemoprevention of oral cancer: A review and future perspectives. *Head Neck.* 2023;45(4):1045-1059. doi: 10.1002/hed.27301.

Li P, Yang S, Dou M, Chen Y, Zhang J, Zhao X. Synergic effects of artemisinin and resveratrol in cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2014;140(12):2065–2075. doi: 10.1007/s00432-014-1771-7.

Li PC, Lam E, Roos WP, Zdzienicka MZ, Kaina B, Efferth T. Artesunate derived from traditional Chinese medicine induces DNA damage and repair. *Cancer Res.* 2008 Jun 1;68(11):4347-51. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2970.

Li Q, Liu X, Yan W, Chen Y. Antitumor effect of poly lactic acid nanoparticles loaded with cisplatin and chloroquine on the oral squamous cell carcinoma. *Aging.* 2020;13(2):2593-2603. doi: 10.18632/aging.202297.

Li Q, Ma Q, Cheng J, Zhou X, Pu W, Zhong X et al. Dihydroartemisinin as a Sensitizing Agent in Cancer Therapies. *Onco Targets Ther.* 2021;14:2563-2573. doi: 10.2147/OTT.S297785.

Li X, Ba Q, Liu Y, Yue Q, Chen P, Li J, et al. Dihydroartemisinin selectively inhibits PDGFR α -positive ovarian cancer growth and metastasis through inducing degradation of PDGFR α protein. *Cell Discov.* 2017;3:17042. doi: 10.1038/celldisc.2017.42.

Li X. The inducers of immunogenic cell death for tumor immunotherapy. *Tumori Journal*. 2018;104(1):1-8. doi: 10.5301/tj.5000675.

Liu L, Fan J, Ai G, Liu J, Luo N, Li C, et al. Berberina em combinação com cisplatina induz necroptose e apoptose em células de câncer de ovário. *Res. Biol*. 2019;52:37. doi: 10.1186/s40659-019-0243-6.

Lodi G, Porter S. Management of potentially malignant disorders: evidence and critique. *J Oral Pathol Med*. 2008; 37(2):63-9. doi: 10.1111/j.1600-0714.2007.00575.x.

Martins I, Kepp O, Schlemmer F, Adjemian S, Tailler M, Shen S, et al. Restoration of the immunogenicity of cisplatin-induced cancer cell death by endoplasmic reticulum stress. *Oncogene*. 2011;30(10):1147-58. doi: 10.1038/onc.2010.500.

Martins I, Wang Y, Michaud M, Ma Y, Sukkurwala AQ, Shen S, et al. Molecular mechanisms of ATP secretion during immunogenic cell death. *Cell Death Differ*. 2014;21(1):79-91. doi: 10.1038/cdd.2013.75.

Massart C, Le Tellier C, Gibassier J, Leclech G, Nicol M. Modulation by dimethyl sulphoxide of the toxicity induced by cis-diamminedichloroplatinum in cultured thyrocytes. *Toxicol In Vitro*. 1993;7(1):87-94.

Mehanna HM, Rattay T, Smith J, McConkey CC. Treatment and follow-up of oral dysplasia - a systematic review and meta-analysis. *Head Neck*. 2009; 31(12):1600-9. doi: 10.1002/hed.21131.

Mello FW, Miguel AFP, Dutra KL, Porporatti AL, Warnakulasuriya S, Guerra ENS, et al. Prevalence of oral potentially malignant disorders: A systematic review and meta-analysis. *J Oral Pathol Med*. 2018;47(7):633-640. doi: 10.1111/jop.12726.

Messmer MN, Snyder AG, Oberst A. Comparing the effects of different cell death programs in tumor progression and immunotherapy. *Cell Death Differ*. 2019;26(1):115-129. doi: 10.1038/s41418-018-0214-4.

Mohan Shankar G, Swetha M, Keerthana CK, Rayginia TP, Anto RJ. Cancer Chemoprevention: A Strategic Approach Using Phytochemicals. *Front Pharmacol*. 2022;12:809308. doi: 10.3389/fphar.2021.809308.

Monteiro de Oliveira Novaes JA, William WN Jr. Prognostic factors, predictive markers and cancer biology: the triad for successful oral cancer chemoprevention. *Future Oncol*. 2016;12(20):2379-86. doi: 10.2217/fon-2016-0168.

Nam W, Tak J, Ryu JK, Jung M, Yook JI, Kim HJ, et al. Effects of artemisinin and its derivatives on growth inhibition and apoptosis of oral cancer cells. *Head Neck*. 2007;29(4):335-40.

Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin*. 2002; 52(4):195-215. doi: 10.3322/canjclin.52.4.195.

Nobes CD, Hall A. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol.* 1999 ;144(6):1235-44.

Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med.* 2007;13(1):54-61. doi: 10.1038/nm1523.

Ober M, Lippard SJ. Cisplatin damage overrides the predefined rotational setting of positioned nucleosomes. *J Am Chem Soc.* 2007;129(19):6278-86. doi: 10.1021/ja0706145.

Oun R , Moussa YE , Wheate NJ. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. *Dalton Trans.* 2018; 47(19):6645-6653. doi: 10.1039/c8dt00838h. Erratum in: *Dalton Trans.* 2018 Jun 12;47(23):7848.

Pereira DA, Williams JA. Origin and evolution of high throughput screening. *Br J Pharmacol.* 2007;152(1):53-61.

Petroni G, Buqué A, Zitvogel L, Kroemer G, Galluzzi L. Immunomodulation by targeted anticancer agents. *Cancer Cell.* 2021;39(3):310-345. doi: 10.1016/j.ccell.2020.11.009.

Posadino AM, Giordo R, Pintus G, Mohammed SA, Orhan IE, Fokou PVT, et al. Medicinal and mechanistic overview of artemisinin in the treatment of human diseases. *Biomed Pharmacother.* 2023;163:114866.

Qin Y, Yang G, Li M, Liu HJ, Zhong WL, Yan XQ, et al. Dihydroartemisinin inhibits EMT induced by platinum-based drugs via Akt-Snail pathway. *Oncotarget.* 2017;8(61):103815-103827. doi: 10.18632/oncotarget.21793.

Rao Q, Li R, Yu H, Xiang L, He B, Wu F, et al. Effects of dihydroartemisinin combined with cisplatin on proliferation, apoptosis and migration of HepG2 cells. *Oncol Lett.* 2022;24(2):275. doi: 10.3892/ol.2022.13395.

Reungpatthanaphong P, Mankhetkorn S. Modulation of multidrug resistance by artemisinin, artesunate and dihydroartemisinin in K562/adr and GLC4/adr resistant cell lines. *Biol Pharm Bull.* 2002;25(12):1555–1561. doi: 10.1248/bpb.25.1555.

Roh JL, Kim EH, Jang H, Shin D. Nrf2 inhibition reverses the resistance of cisplatin-resistant head and neck cancer cells to artesunate-induced ferroptosis. *Redox Biol.* 2017;11:254-262. doi: 10.1016/j.redox.2016.12.010.

Rongvaux A, Jackson R, Harman CC, Li T, West AP, de Zoete MR, et al. Apoptotic caspases prevent the induction of type I interferons by mitochondrial DNA. *Cell.* 2014;159(7):1563-77. doi: 10.1016/j.cell.2014.11.037.

Santos NAGD, Ferreira RS, Santos ACD. Overview of cisplatin-induced neurotoxicity and ototoxicity, and the protective agents. *Food Chem Toxicol.* 2020;136:111079. doi: 10.1016/j.fct.2019.111079.

Schomberg J. Identification of Targetable Pathways in Oral Cancer Patients via Random Forest and Chemical Informatics. *Cancer Inform.* 2019;18:1–12. doi: 10.1177/1176935119889911.

Seifert L, Miller G. Molecular Pathways: The Necrosome-A Target for Cancer Therapy. *Clin Cancer Res.* 2017;23(5):1132-1136.

Semlali A, Ajala I, Beji S, Al-Zharani MM, Rouabhia M. Synergistic Effect of Anethole and Platinum Drug Cisplatin against Oral Cancer Cell Growth and Migration by Inhibiting MAPKase, Beta-Catenin, and NF- κ B Pathways. *Pharmaceuticals (Basel).* 2023;16(5):700. doi: 10.3390/ph16050700.

Shafer WG, Waldron CA. A clinical and histopathologic study of oral leukoplakia. *Surg Gynecol Obstet.* 1961 Apr;112:411-20.

Shen DW, Pouliot LM, Hall MD, Gottesman MM. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. *Pharmacol Rev.* 2012;64(3):706-21. doi: 10.1124/pr.111.005637.

Singh NP, Verma KB. Case report of a laryngeal squamous cell carcinoma treated with artesunate. *Arch Oncol.* 2002;10(4): 279- 280. doi.org/10.2298/AOO0204279S

Slezakova S, Ruda-Kucerova J. Anticancer activity of artemisinin and its derivatives. *Anticancer Res.* 2017;37:5995-6003. doi: 10.21873/anticancer.12046.

Stich HF, Hornby AP, Mathew B, Sankaranarayanan R, Nair MK. Response of oral leukoplakias to the administration of vitamin A. *Cancer Lett.* 1988; 40(1):93-101. doi: 10.1016/0304-3835(88)90266-2.

Stojanov IJ, Woo SB. Malignant Transformation Rate of Non-reactive Oral Hyperkeratoses Suggests an Early Dysplastic Phenotype. *Head Neck Pathol.* 2022; 16(2):366-374. doi: 10.1007/s12105-021-01363-z.

Sun Z, Guan X, Li N, Liu X, Chen X. Chemoprevention of oral cancer in animal models, and effect on leukoplakias in human patients with ZengShengPing, a mixture of medicinal herbs. *Oral Oncol.* 2010 Feb;46(2):105-10. doi: 10.1016/j.oraloncology.2009.06.004.

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249. doi: 10.3322/caac.21660.

Tin AS, Sundar SN, Tran KQ, Park AH, Poindexter KM, Firestone GL. Antiproliferative effects of artemisinin on human breast cancer cells requires the

downregulated expression of the E2F1 transcription factor and loss of E2F1-target cell cycle genes. *Anticancer Drugs*. 2012;23:370–379. doi: 10.1097/CAD.0b013e32834f6ea8.

Titulaer HAC, Zuidema J, Lugt CB. Formulation and pharmacokinetics of artemisinin and its derivatives. *Int. J. Pharm.*1991;69:83-92.

Tham MJR, Babak MV, Ang WH. PlatinER: A Highly Potent Anticancer Platinum(II) Complex that Induces Endoplasmic Reticulum Stress Driven Immunogenic Cell Death. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2020;59(43):19070-19078. doi: 10.1002/anie.202008604.

Tradati N, Grigolat R, Calabrese L, Costa L, Giugliano G, Morelli F, et al. Oral leukoplakias: to treat or not? *Oral Oncol*. 1997;33(5):317-21. doi: 10.1016/s1368-8375(97)00016-x.

Troitskaya OS, Novak DD, Richter VA, Koval OA. Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy. *Acta Naturae*. 2022;14(1):40-53. doi: 10.32607/actanaturae.11523.

Valdez JA, Brennan MT. Impact of Oral Cancer on Quality of Life. *Dent Clin N Am*. 2018;62:143–154. doi: 10.1016/j.cden.2017.09.001.

Valster A, Tran NL, Nakada M, Berens ME, Chan AY, Symons M. Cell migration and invasion assays. *Methods*. 2005;37(2):208-15.

van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol*. 2009 Apr-May;45(4-5):317-23. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.05.016.

Vanmeerbeek I, Sprooten J, De Ruyscher D, Tejpar S, Vandenberghe P, Fucikova J, et al. Trial watch: chemotherapy-induced immunogenic cell death in immuno-oncology. *Oncoimmunology*. 2020;9(1):1703449. doi: 10.1080/2162402X.2019.1703449.

Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(4):307-20.

Wang Z, Hu W, Zhang JL, Wu XH, Zhou HJ. A dihidroartemisinina induz a autofagia e inibe o crescimento de células K562 de leucemia mielóide humana carregadas de ferro via toxicidade de ROS. *FEBS Open Bio*. 2012;2:103–12. doi: 10.1016/j.fob.2012.05.002.

Warnakulasuriya S, Ariyawardana A. Malignant transformation of oral leukoplakia: A systematic review of observational studies. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2016;45:155–166. doi: 10.1111/jop.12339.

Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med*. 2007 Nov;36(10):575-80. doi: 10.1111/j.1600-0714.2007.00582.x.

- Warnakulasuriya S, Kujan O, Aguirre-Urizar JM, Bagan JV, González-Moles MÁ, Kerr AR, et al. Oral potentially malignant disorders: A consensus report from an international seminar on nomenclature and classification, convened by the WHO Collaborating Centre for Oral Cancer. *Oral Dis.* 2021;27(8):1862-1880. doi: 10.1111/odi.13704.
- Weaver BA. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol Biol Cell.* 2014 Sep 15;25(18):2677-81. doi: 10.1091/mbc.E14-04-0916.
- Weinlich R, Oberst A, Beere HM, Green DR. Necroptosis in development, inflammation and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017;18(2):127-136.
- Wen L, Liu L, Wen L, Yu T, Wei F. Artesunate promotes G2/M cell cycle arrest in MCF7 breast cancer cells through ATM activation. *Breast Cancer.* 2018;25(6):681-686.
- WHO Classification of Tumours Editorial Board. Head and neck tumours (WHO classification of tumours series, 5th ed. vol. 9). Lyon (France): International Agency for Research on Cancer 2022.
- Woerdenbag HJ, Moskal TA, Pras N, Malingré TM, el-Ferally FS, Kampinga HH, et al. Cytotoxicity of artemisinin-related endoperoxides to Ehrlich ascites tumor cells. *J Nat Prod.* 1993;56(6):849-56. doi: 10.1021/np50096a007.
- Wong DY, Ong WW, Ang WH. Induction of immunogenic cell death by chemotherapeutic platinum complexes. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2015;54(22):6483-7. doi: 10.1002/anie.201500934.
- Wong YK, Xu C, Kalesh KA, He Y, Lin Q, Wong WSF, et al. Artemisinin as an anticancer drug: Recent advances in target profiling and mechanisms of action. *Med Res Rev.* 2017;37(6):1492-1517. doi: 10.1002/med.21446.
- Woo SB, Grammer RL, Lerman MA. Keratosis of unknown significance and leukoplakia: A preliminary study. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology.* 2014;118:713–724. doi: 10.1016/j.oooo.2014.09.016.
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 1980;68:251-306.
- Xie A, Liu J. Chemoprevention of oral cancer in leukoplakia patients: A systematic review and meta-analysis. *J Pak Med Assoc.* 2017;67(9):1415-1419.
- Yamachika E, Habte T, Oda D. Artemisinin: an alternative treatment for oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2004;24(4):2153-60.
- Yamazaki T, Kirchmair A, Sato A, Buqué A, Rybstein M, Petroni G, et al. Mitochondrial DNA drives abscopal responses to radiation that are inhibited by autophagy. *Nat Immunol.* 2020;21(10):1160-1171. doi: 10.1038/s41590-020-0751-0.

- Yatim N, Cullen S, Albert ML. Dying cells actively regulate adaptive immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(4):262-275. doi: 10.1038/nri.2017.9.
- Yu SS, Cirillo N. The molecular markers of cancer stem cells in head and neck tumors. *J Cell Physiol*. 2020;235(1):65-73. doi: 10.1002/jcp.28963.
- Zamanian M, Veerakumarasivam A, Abdullah S, Rosli R. Calreticulin and cancer. *Pathol Oncol Res*. 2013;19(2):149-54. doi: 10.1007/s12253-012-9600-2.
- Zhang B, Zhang Z, Wang J, Yang B, Zhao Y, Rao Z, et al. Dihydroartemisinin sensitizes Lewis lung carcinoma cells to carboplatin therapy via p38 mitogen-activated protein kinase activation. *Oncol Lett*. 2018;15(5):7531-7536. doi: 10.3892/ol.2018.8276.
- Zhang C, Gu X, Zhao G, Wang W, Shao J, Zhu J, et al. Extracellular HMGB-1 activates inflammatory signaling in tendon cells and tissues. *Ther Adv Chronic Dis*. 2020;11;11:2040622320956429. doi: 10.1177/2040622320956429.
- Zhang F, Gosser DK Jr, Meshnick SR. Hemin-catalyzed decomposition of artemisinin (qinghaosu). *Biochem Pharmacol*. 1992;43(8):1805-9. doi: 10.1016/0006-2952(92)90713-s.
- Zhang Q, Shi S, Yen Y, Brown J, Ta JQ, Le AD. A subpopulation of CD133(+) cancer stem-like cells characterized in human oral squamous cell carcinoma confer resistance to chemotherapy. *Cancer Lett*. 2010;289(2):151-60. doi: 10.1016/j.canlet.2009.08.010.
- Zhou Y, Li X, Chen K, Ba Q, Zhang X, Li J, et al. Structural optimization and biological evaluation for novel artemisinin derivatives against liver and ovarian cancers. *Eur J Med Chem*. 2021;211:113000.