

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

LUIZA DEITOS MENTI

MODELO DE ESFEROIDE TUMORAL: UMA ABORDAGEM TRIDIMENSIONAL
PARA TRIAGEM DE DROGAS *IN VITRO*

Porto Alegre

2021

LUIZA DEITOS MENTI

MODELO DE ESFEROIDE TUMORAL: UMA ABORDAGEM TRIDIMENSIONAL
PARA TRIAGEM DE DROGAS *IN VITRO*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Odontologia da Universidade Federal
do Rio Grande do Sul, como requisito parcial
para obtenção do título de Cirurgiã-Dentista.

Orientador: Marcelo Lazzaron Lamers

Porto Alegre

2021

Dados de catalogação-na-publicação:

Menti, Luiza Deitos
Modelo de esferoide tumoral: uma abordagem
tridimensional para triagem de drogas in vitro / Luiza
Deitos Menti. -- 2021.
36 f.
Orientador: Marcelo Lazzaron Lamers.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade
de Odontologia, Curso de Odontologia, Porto Alegre,
BR-RS, 2021.

1. neoplasias bucais. 2. técnica de cultura de
células. 3. esferoides celulares. 4. tratamento
farmacológico. 5. cisplatino. I. Lamers, Marcelo
Lazzaron, orient. II. Título.

LUIZA DEITOS MENTI

MODELO DE ESFEROIDE TUMORAL: UMA ABORDAGEM TRIDIMENSIONAL
PARA TRIAGEM DE DROGAS *IN VITRO*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Odontologia da Universidade Federal
do Rio Grande do Sul, como requisito parcial
para obtenção do título de Cirurgiã-Dentista.

Porto Alegre, 23 de novembro de 2021.

Profª Drª Manoela Domingues Martins
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Drª Paloma Santos de Campos
Cirurgiã-dentista Drª em Patologia Bucal - UFRGS

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo incentivo à minha educação desde pequena. Por me incentivarem a estudar na escola, a ser curiosa, a arriscar participar de coisas novas e por sempre propiciar um ambiente de muito amor em casa. E igualmente ao meu irmão, que é meu melhor companheiro.

À minha família toda por ser refúgio e apoio. Obrigada pelos abraços apertados de saudade todas as vezes que nos reencontramos, seja em Caxias do Sul, Porto Alegre ou Torres.

Aos colegas que dividiram essa trajetória difícil, mas cheia de alegrias que foi a graduação. Ver a evolução pessoal e profissional de todos é muito gratificante.

Ao Ohana por ser família e ser lar.

À Roberta por ser a pessoa que esteve mais perto de mim nessa etapa, dividindo comigo muito estudo, anseios e alegrias em quase as 24 horas do dia. Obrigada por ser dupla desde o primeiro semestre, colega de apartamento, luz e inspiração todos os dias.

À Gabrielle por todos nossos momentos de reflexão e por transmitir tanta paz.

Ao meu laboratório que abriu as portas para que eu gostasse tanto da pesquisa e a todas as pessoas incríveis que fazem e fizeram parte dele. Às ICs pela companhia nos momentos de muito trabalho, mas que tornaram eles mais leves. À Luise por ser minha eterna dupla de esferoides. À Paloma por todos os ensinamentos e orientação desde o início dessa jornada. Ao professor Marcelo pelo brilhantismo e por me preparar da melhor forma possível.

A todos professores incríveis que tive o prazer e o privilégio de encontrar no caminho.

Aos pacientes pelo carinho e colaboração.

À UFRGS por ser minha casa por 5 anos maravilhosos.

A todas as pessoas que cruzaram o meu caminho e deixaram um pouquinho de si junto comigo.

“Durante nossa breve estadia no planeta Terra, devemos a nós mesmos e a nossos descendentes a oportunidade de explorar – em parte porque é algo divertido de fazer.”

Neil DeGrasse Tyson

RESUMO

O diagnóstico tardio do câncer oral está relacionado a altas taxas de mortalidade e, para aumentar as chances de cura com o tratamento quimioterápico, há uma grande área de pesquisa focada no desenvolvimento de drogas antitumorais. Porém, a maioria dos experimentos *in vitro* são realizados em cultura celular bidimensional, o que geralmente é seguido de ineficácia quando testados na etapa *in vivo*. A cultura celular tridimensional de ensaio de esferoides está sendo amplamente utilizada para testar potenciais substâncias antitumorais, pois essa metodologia mimetiza melhor o microambiente tumoral *in vivo* e, portanto, produz resultados mais confiáveis que a tradicional cultura celular bidimensional. No nosso estudo, o objetivo foi avaliar a capacidade de diferentes linhagens celulares em formar esferoides – fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais e linhagens tumorais de carcinoma espinocelular oral – através da metodologia de esferoides e analisar os efeitos desencadeados pelo tratamento com cisplatina, o quimioterápico padrão-ouro para tratamento desse câncer. Foi observado que todas as linhagens celulares testadas foram capazes de formar esferoides tridimensionais - apesar de apresentarem diferentes comportamentos - e quando tratados com cisplatina, esses esferoides demonstraram efeitos relacionados à coesão celular vistos como um espalhamento das células.

Palavras-chave: neoplasias bucais; tratamento farmacológico; técnicas de cultura de células; esferoides celulares; cisplatino.

ABSTRACT

The late diagnosis of oral cancer is related to high mortality rates and, to increase the chances of cure with chemotherapy, there is a large research area focused on antitumoral drugs development. However, most assays are performed in bidimensional conditions often followed by failure on treatment effectiveness when performed *in vivo*. Tridimensional cell culture has been widely used to test potential antitumoral substances for cancer treatment because it mimics better the *in vivo* microenvironment and, therefore, it is more reliable than traditional single layer culture. In this study we evaluated the capacity of different cells to form tridimensional spheroids – fibroblasts, keratinocytes, endothelial cells and oral squamous cell carcinoma (OSCC) cell lines – through spheroid assay and analyzed cisplatin treatment effects on spheroids. It was observed that all cell lines tested were capable of form tridimensional spheroids – although they showed different behaviors – and when treated with cisplatin, the spheroids demonstrated effects related to cell-cell cohesion, seen as a spheroid spreading.

Keywords: mouth neoplasms; drug therapy; cell culture techniques; spheroids; cisplatin.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
1.1	Dados do câncer	8
1.2	Progressão tumoral	8
1.3	Microambiente tumoral	10
1.4	Modalidades de tratamento	11
1.5	Quimioterapia	13
1.6	Ensaio tridimensional de esferoides	13
2	DESENVOLVIMENTO	16
3	CONCLUSÃO	28
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
	REFERÊNCIAS	30

1 INTRODUÇÃO

1.1 DADOS DO CÂNCER

O câncer pode ser considerado um problema de saúde pública, visto que resulta em impactos na vida do indivíduo, como dor e desconforto, altos custos de tratamento e impacto familiar, bem como o impacto na sociedade, com altas taxas de mortalidade e morbidade (COSTA; VICTORA, 2006). Atualmente no Brasil, a incidência anual do câncer é de 626.030 novos casos, sendo essa doença responsável por 232.030 mortes anualmente. Mais especificamente sobre o câncer oral, ele é o quinto câncer mais prevalente em homens no Brasil, sendo responsável por 4,2% das mortes por neoplasias nessa população. Além disso, as regiões Sul e Sudeste apresentam maiores taxas de incidência e de mortalidade (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2021). Apesar da cavidade oral ser uma área de acesso facilitado para diagnóstico do câncer oral se comparado a outros tipos de câncer, como por exemplo de próstata e de colo do útero, ainda há altas taxas de mortalidade. Isso pode ocorrer devido à baixa demanda de pacientes aos serviços odontológicos pela presença de lesão em boca – o que é agravado pelo fato de geralmente as lesões de câncer serem assintomáticas – e pelo desconhecimento e despreparo de cirurgiões-dentistas em realizar o exame estomatológico completo. Esses aspectos levam ao diagnóstico tardio, quando o câncer já está em estágios avançados ou até mesmo metastizado (ILHAN *et al.*, 2020; SANTOS; BATISTA; CANGUSSU, 2010).

1.2 PROGRESSÃO TUMORAL

O diagnóstico tardio está relacionado geralmente a tratamentos mais invasivos e mutiladores e a um pior prognóstico devido ao tempo decorrido para a progressão do tumor (KOWALSKI; CARVALHO, 2001). Para entender essa relação, primeiramente, é necessário compreender o câncer e os mecanismos da carcinogênese.

O câncer é caracterizado como um conjunto de mais de 100 doenças, onde mutações no DNA celular levam as células do corpo a proliferarem descontroladamente (NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH, 2007). Dentre as neoplasias malignas orais, a sua maioria (90%) se caracteriza como carcinoma espinocelular oral (CEC), também conhecido como carcinoma epidermoide (MONTERO; PATEL, 2015). No CEC, são as células do epitélio de revestimento que sofreram mutações – por influência de diversos fatores, como tabagismo, exposição à luz

UV, etilismo -, adquirindo seis características comuns a todos os tipos de câncer invasivo. Essas capacidades adquiridas pelas células tumorais durante o processo de carcinogênese incluem proliferação celular sustentada, evasão dos mecanismos de supressão de crescimento (checkpoints), resistência à morte celular, capacidade de replicação continuada (imortalidade), indução da angiogênese e ativação da invasão e metástase (BRENER *et al.*, 2006; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

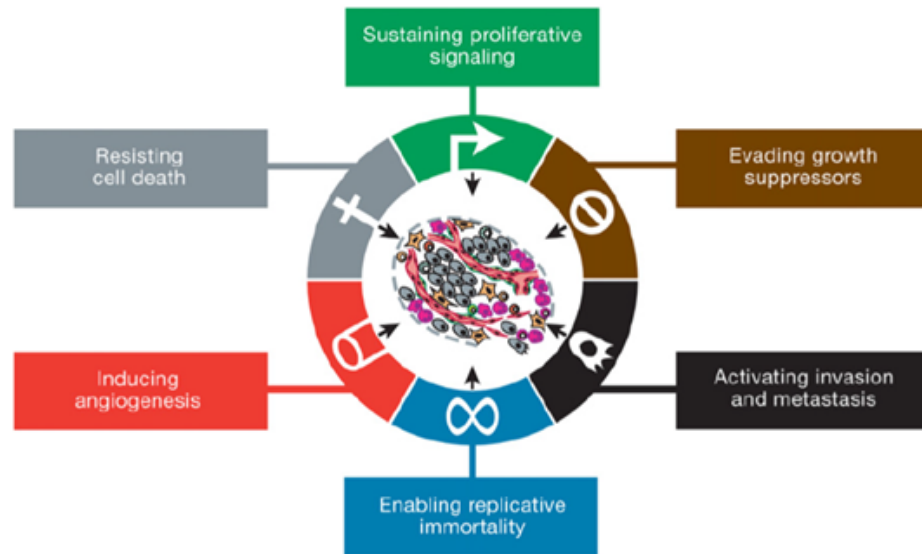


Figura 1: as seis características fundamentais comuns a todos os tipos de câncer invasivos citadas por Hanahan e Weinberg (2011): resistência à morte celular, sinalização proliferativa sustentada, evasão dos supressores de crescimento celular, ativação da invasão e metástase, aquisição de imortalidade replicativa e indução da angiogênese.

Todas essas capacidades, associadas à instabilidade genômica e ao microambiente tumoral complexo, influenciam as células tumorais a perderem as características de seu tecido de origem. Por exemplo, as células do CEC passam a expressar menos proteínas epiteliais de adesão celular como a E-caderina, e começam a expressar mais marcadores mesenquimais, como a N-caderina e a vimentina - o que facilita a invasão no tecido conjuntivo e intravasão para os vasos sanguíneos para a metástase. Esse é o início do processo denominado transição epitélio-mesênquima (EMT) (MITTAL, 2018).

Após romper a membrana basal, as células neoplásicas invadem o estroma como um cluster de células ou individualmente, dependendo de diversos fatores como por exemplo seus marcadores de superfície (DONGRE; WEINBERG, 2019). As linhagens celulares de carcinoma espinocelular oral mais invasivas, como SCC-9 e SCC-25, possuem alta expressão

de marcadores mesenquimais, tendendo a uma migração individual. Enquanto CAL 27, linhagem menos invasiva e mais diferenciada, tende a migrar coletivamente devido à presença de marcadores epiteliais como E-caderina (MATTE *et al.*, 2019; RAMOS *et al.*, 2016).

1.3 MICROAMBIENTE TUMORAL

No tecido conjuntivo adjacente, as células tumorais encontram um microambiente muito mais complexo, rico em vasos sanguíneos e em diversos outros tipos celulares, trocando inúmeras sinalizações com esse meio, influenciando-o e sofrendo influência.

O microambiente tumoral é composto por fatores físicos, químicos e biológicos. Os fatores físicos envolvem a hipóxia decorrente da proliferação e do metabolismo celular aumentado e uma maior rigidez da matriz extracelular pela intensa deposição de colágeno e infiltração de células tumorais. Já os fatores químicos envolvem uma maior secreção de metaloproteinases (MMPs) – que são enzimas responsáveis por degradar a matriz extracelular facilitando a invasão e progressão tumoral - e uma maior acidez no microambiente. Essa queda do pH acontece devido ao ácido lático como subproduto da glicólise anaeróbica realizada pelas células tumorais como consequência da hipóxia. Entre os fatores biológicos, podem ser ressaltados a presença de células do sistema imune, como macrófagos, fibroblastos e células endoteliais (CORBET; FERON, 2017; GIALELI; THEOCHARIS; KARAMANOS, 2010).

Os fibroblastos presentes no estroma sofrem alterações pela influência das células tumorais, expressando propriedades contráteis de miofibroblastos e aumento da capacidade migratória, sendo chamados então, de fibroblastos associados ao câncer (CAFs, do inglês cancer-associated fibroblasts) (NURMIK *et al.*, 2020). Os CAFs irão contribuir para a progressão do tumor pela deposição e alinhamento de fibras colágenas, aumentando a rigidez da matriz extracelular e criando caminhos para a migração celular, ou até mesmo puxando fisicamente as células com sua habilidade contrátil (HAMIDI; IVASKA, 2018; PANKOVA *et al.*, 2016).

Além disso, como as células tumorais apresentam proliferação descontrolada, há um aumento na demanda de nutrientes para nutrir esse tumor. As células endoteliais desse tecido são atraídas pelas células tumorais e outras células envolvidas no microambiente tumoral através da secreção de fatores de crescimento pró-angiogênicos, para a formação de novos

vasos sanguíneos e, conseqüentemente, aumentando a nutrição e a progressão tumoral (DE PALMA; BIZIATO; PETROVA, 2017).

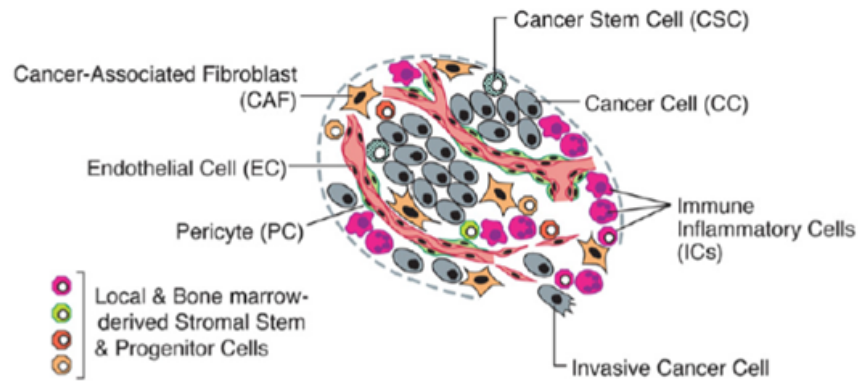


Figura 2: as células tumorais e o microambiente tumoral composto por células inflamatórias, células endoteliais e fibroblastos associados os câncer (CAFs), próximos a vasos sanguíneos (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Todas essas características tornam o câncer e o microambiente tumoral um alvo muito complexo para o tratamento, sendo necessário o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas para o tratamento com o máximo de eficácia e o mínimo de efeitos colaterais possíveis.

1.4 MODALIDADES DE TRATAMENTO

A compreensão do câncer e seu tratamento foram evoluindo com o passar dos mais de 4 mil anos de história dessa doença. Ao longo dos anos, ela foi envolta por crenças, mitologia, estudos clínicos com milhares de substâncias e combinações letais de substâncias, tratamentos extremamente mutiladores - como as cirurgias radicais de mastectomia que envolviam, além da remoção da mama, linfonodos do pescoço e da axila, músculos do peito, clavícula e inclusive costelas -, até chegar no entendimento clínico e microscópico que se tem hoje, com as mais diversas modalidades terapêuticas (MUKHERJEE, 2010).

Atualmente as modalidades de tratamento do câncer de boca englobam principalmente a cirurgia, quimioterapia e radioterapia (NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER

NETWORK, 2021). Mas há também outras modalidades de tratamento dependendo do tipo e do estadiamento do tumor, como imunoterapia, terapia hormonal, terapia fotodinâmica e transplante de células pluripotentes (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2021).

O tratamento realizado através da cirurgia consiste na remoção total do tumor com amplas margens de segurança, realizado na maioria dos casos de tumores operáveis, ou seja, tumores que não estejam atingindo estruturas vitais com grande risco de levar o paciente a óbito durante o procedimento. A quimioterapia consiste na administração em ciclos de fármacos que atuam a nível celular sem especificidade, ou seja, acabam atuando, por exemplo, em células com alto potencial de proliferação, o que engloba além de células tumorais, células epiteliais e hematológicas. Em cânceres de cabeça e pescoço, o quimioterápico mais utilizado é a cisplatina, que tem a capacidade de ligar-se às bases purinas do DNA, interferindo assim nos processos de reparo e levando ao dano a esse DNA, induzindo a apoptose (DASARI; TCHOUNWOU, 2014). Já a radioterapia consiste em dano celular direto através da incidência de raios-X, que pode levar as células tumorais à morte, ou então diminuir sua capacidade proliferativa através do dano ao seu DNA e levar a uma diminuição de volume do tumor (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2021).

O tratamento do câncer de boca é iniciado após a determinação do estadiamento, que separa a doença em graus de 1 a 4, de acordo com as características do tumor, dos linfonodos regionais e se há presença de metástases à distância, que é o sistema TNM (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020). Geralmente em casos iniciais, o tratamento é realizado com a excisão cirúrgica do tumor primário, associado ou não à radioterapia, e em casos mais avançados, é realizado também o tratamento quimioterápico (NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK, 2021).

Atualmente, com os tratamentos disponíveis, a taxa de sobrevivência em 5 anos para o câncer de boca é variável de acordo com a localização do tumor primário e o estadiamento, sendo de 92% em lábio, 67% em língua e 51% em assoalho bucal, com taxas bem menores para casos onde já ocorreu metástases, tanto para linfonodos quanto para sítios mais distantes (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2021).

1.5 QUIMIOTERAPIA

Tendo em vista as baixas taxas de sobrevida de pacientes acometidos por câncer de boca, há uma intensa área de pesquisa em relação ao desenvolvimento de novos compostos capazes de induzir as células tumorais à morte com o mínimo de efeitos colaterais possíveis. Porém, esse processo é demorado e possui um custo financeiro elevado. Foi relatado na literatura que o desenvolvimento de um quimioterápico demora cerca de 10 anos para passar por todas essas etapas e custa em torno de 1 a 2 bilhões de dólares (SIDDIQUI; RAJKUMAR, 2012), além dos fatores éticos que envolvem pesquisas em animais.

O desenvolvimento de um novo fármaco inicia com estudos em células em laboratório (*in vitro*) e as substâncias que demonstrarem efeitos promissores, avançam para a segunda etapa *in vivo*, para serem testadas em animais. Após isso, há as etapas clínicas testadas em seres humanos, passando pelas fases 1 a 4, até serem vendidas comercialmente e amplamente utilizadas (CANCER TODAY MAGAZINE, 2021). Porém, apenas uma pequena parte dos compostos triados na etapa inicial acabam evoluindo para a próxima etapa *in vivo* que, por se tratar de um ambiente muito mais complexo, acabam demonstrando pouca eficácia, formando um gap entre ambas etapas.

1.6 ENSAIO TRIDIMENSIONAL DE ESFEROIDES

Com o intuito de reduzir o gap presente entre as etapas iniciais dos estudos para triagem de substâncias antitumorais *in vitro*, há uma intensa busca no desenvolvimento de plataformas mais fidedignas que mimetizem melhor o microambiente tumoral, reduzindo assim custos de tempo, financeiros e éticos que envolvem as pesquisas em animais.

A cultura celular bidimensional (2D) é um importante e amplamente utilizado recurso para ensaios de citotoxicidade, porém, pelo fato de as células estarem aderidas em uma superfície plástica extremamente rígida e pela presença de adesões célula-célula apenas no plano horizontal, muitos dos processos e sinalizações celulares que são importantes para o funcionamento celular normal são perdidos e/ou alterados. Além disso, em um ambiente 2D, as células apresentam proliferação desenfreada e o tratamento ocorre em contato direto com todas as células, sem a presença de gradientes de penetração de drogas, sendo uma abordagem menos rigorosa para testes (ZANONI *et al.*, 2019; BAKER; CHEN, 2012).

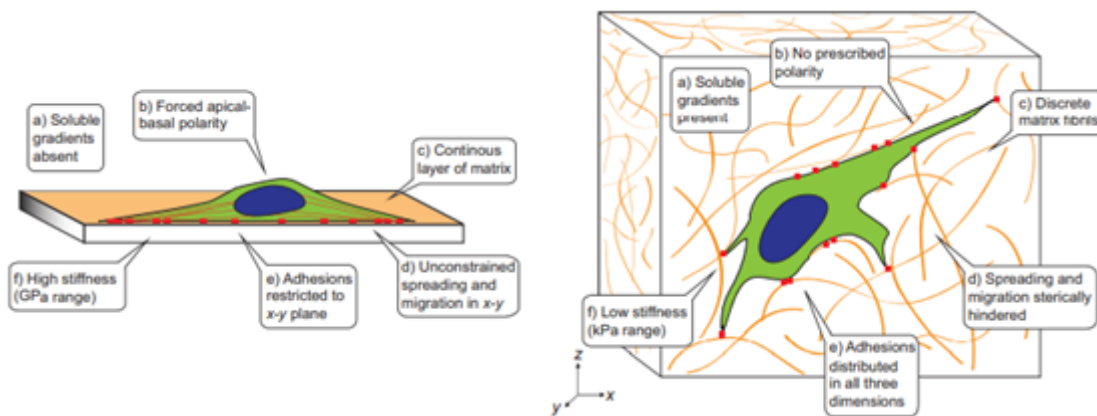


Figura 3: comparação culturas celulares 2D e 3D. A imagem à esquerda representa a tradicional cultura celular monocamada cultivada em superfície plástica com alta rigidez, onde as células apresentam adesões restritas apenas aos eixos x e y . Além disso, as células sofrem modificações na sua morfologia e no seu comportamento, adquirindo maior capacidade de proliferação e migração nesse substrato. A imagem à direita representa um exemplo de cultura celular tridimensional, onde as células encontram gradientes de oxigênio e metabólitos e possuem adesões celulares em todos os eixos (BAKER; CHEN, 2012).

Um ambiente tridimensional permite recapitular as dinâmicas de sinalização e comportamento celulares que ocorrem no microambiente tumoral *in vivo*, bem como sua arquitetura. Com isso, diversas metodologias tridimensionais foram desenvolvidas, sendo agrupadas geralmente em metodologias *liquid-based* e *scaffold-based*. Nas metodologias *scaffold-based* são confeccionados uma espécie de arcabouço tanto de materiais naturais quanto sintéticos para sustentar as células, como por exemplo os hidrogéis e scaffolds bioimpressos. Já as metodologias *liquid-based* não necessitam de arcabouço e como exemplo podemos citar o ensaio de esferoides (ZANONI *et al.*, 2016).

O ensaio de esferoides é uma metodologia tridimensional que consiste em um agregado de células aderidas entre si, que se assemelham a tumores principalmente em relação ao seu gradiente metabólico e de proliferação. Pela conformação das células nesse ensaio, é possível mimetizar gradientes de concentração de oxigênio e gás carbônico – com presença de hipóxia no centro do esferoide semelhante ao centro avascular do tumor *in vivo* –, gradiente de penetração de drogas e heterogeneidade da população celular, com células das camadas externas mais proliferativas e as do interior quiescentes ou então, formando um núcleo necrótico pela falta de nutrientes. Além disso, pelo fato de ser um ensaio

tridimensional, as células mantêm sua morfologia e adesões com as outras células mais semelhantes possíveis como no ambiente *in vivo*, resultando em menor alteração na expressão proteica e no comportamento celular (FRIEDRICH *et al.*, 2009).

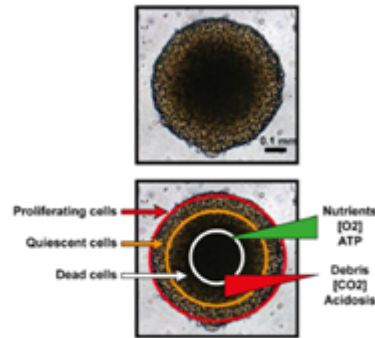


Figura 4: representação das áreas de um esferoide. Na camada mais externa, há a presença de maior quantidade de nutrientes, oxigênio e ATP e, portanto, células mais proliferativas. Enquanto no centro do esferoide, pela escassez desses recursos e aumento de debris, gás carbônico e ácidos, há a presença de um núcleo necrótico (ZANONI *et al.*, 2016).

Esse ensaio tridimensional representa uma metodologia mais complexa que a tradicional cultura de monocamada, porém é de fácil confecção e de baixo custo, apresentando resultados em um curto período de tempo. Os esferoides podem ser confeccionados através de diversas técnicas, como *hanging drop*, sistemas de cultura celular rotatórios, uso de placas de cultura antiaderentes ou então de nanopartículas magnéticas (ZANONI *et al.*, 2019).

Com isso, o objetivo do nosso trabalho foi avaliar a capacidade de diferentes linhagens celulares em formar esferoides tridimensionais, utilizando não apenas células de carcinoma espinocelular oral, mas também células presentes no microambiente tumoral, como fibroblastos e células endoteliais, validando essa metodologia como uma plataforma tridimensional para triagem de drogas *in vitro*.

2 DESENVOLVIMENTO

O desenvolvimento do trabalho está apresentado na forma de artigo científico de periódico em inglês, o qual será submetido para publicação no periódico Archives of Oral Biology.

Tumor spheroid model: a tridimensional approach for drug screening in vitro

Luiza Deitos Menti¹, Paloma Santos de Campos¹, Luise Pazutti¹,

Lisiane Bernardi², Marcelo Lazzaron Lamers^{1 2 *}

1. Basic Research Center, Dentistry School, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

2. Department of Morphological Sciences, Institute of Basic Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

* Corresponding author:

E-mail: marcelo.lamers@ufrgs.br;

Address: Department of Morphological Sciences, Institute of Basic Health Science, Federal University of Rio Grande do Sul

Rua Sarmento Leite, 500, subsolo, Porto Alegre, RS, Brazil, CEP 90.050-170

Phone: +55 51 33085011

ABSTRACT

The late diagnosis of oral cancer is related to high mortality rates, thereby, there is a large research area focused on antitumoral drugs development. However, most assays are performed in bidimensional conditions often followed by failure on treatment effectiveness in vivo studies. Tridimensional cell culture has been widely used to test potential antitumoral substances for cancer treatment because it mimics better the in vivo microenvironment and, therefore, it is more reliable than traditional single layer culture. In this study we evaluated the capacity of different cells to form a tridimensional assay –the spheroid method- and be used as an approach for drug screening in vitro. Our results indicate that different cell lines – not only oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells, but also those that become involved in

tumor's microenvironment- can be used in the spheroid assay, being a very versatile method. And when treated with Cisplatin, all cell lines demonstrated effects, suggesting the drug penetration capacity and loss of cell-cell cohesion - seen as an increase of spheroid area. This effect was also pronounced in keratinocytes, indicating drug's low selectivity and cytotoxicity.

Keywords: oral squamous cell carcinoma, treatment, 3D culture, spheroids, cisplatin.

INTRODUCTION

Lip and oral cavity cancer is the fifteenth most common cancer worldwide in male with over 354.000 new cases being found each year and the number of death cases is worrying, around 177.000 cases per year (BRAY *et al.*, 2018). Although oral cancer lesions are easier to access and diagnose compared to certain types of cancer, e.g. prostate and uterus cancer, there is a high death rate. According to Santos, Batista and Cangussu (2010), this scenario may be due to low demand of patients to dental care – fact aggravated by cancer lesions being asymptomatic – and the low or none frequency of routine stomatologic exams. These aspects lead to late diagnosis, when cancer is in an advanced stage or even metastasized.

Cancer progression depends on neoplastic cell characteristics that allow cell invasion and proliferation in adjacent tissue. Hanahan and Weinberg (2011) suggested the hallmarks of cancer - six biological capabilities acquired during cancer progression and tumor growth. According to them, the tumoral cells are capable of – among other characteristics - sustain proliferative signaling, resisting cell death and activating invasion and metastasis. All this linked to genomic instability and a complex tumor microenvironment. By breaking down the basement membrane, neoplastic cells enter and invade the stroma either as clusters of cells or individually, depending on their surface markers (BERI *et al.*, 2018). More invasive oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells, such as SCC-9 and SCC-25, have high mesenchymal markers expression, tending to an individual migration. Whilst CAL 27 – less invasive and more differentiated cell line – tend to migrate collectively by the presence of epithelial markers such as E-cadherin (RAMOS *et al.*, 2016; MATTE *et al.*, 2019). By invading underlying connective tissue, the tumoral cells exchange innumerable signaling with the microenvironment full of blood vessels and fibroblasts, e.g., influencing and undergoing influence. The fibroblasts in the stroma are influenced by the cancer cells, becoming cancer-associated fibroblasts (CAFs) that will contribute on cancer progression by collagen

deposition and alignment, increasing matrix stiffness (MATTE *et al.*, 2019), and creating tracks for cell migration, or even pushing physically the cells with its contractile ability (HAMIDI; IVASKA, 2018). Also, endothelial cells are attracted by neoplastic cells through pro-angiogenic growth factors, for the formation of new blood vessels and, thus, leading to increased nutrition and tumor progression (de PALMA; BIZIATO; PETROVA, 2017). All these characteristics make cancer a very complex disease with great necessity for new therapies to emerge and enhance overall survival and life quality of the patients. Thereupon, there is a major search regarding the OSCC treatments, which challenges researchers to find substances with an antitumoral effect with minimal effect on normal cells of the body, i.e., minimal side effects.

The traditional bidimensional cell culture is a well-known culture method and it is widely used to test antitumoral drugs, but it does not reproduce so reliably the tumor microenvironment because cells adhere to a flat and plastic surface, changing their morphology and behavior (ZANONI *et al.*, 2016). Accordantly to Zanoni *et al.* (2019), half of drugs fail on the Phase II and Phase III of clinical trials due to lack of efficacy – in monolayer cultures they can demonstrate promising results, but when tested *in vivo*, there is poor efficacy. So, one alternative to this is the spheroid assay, a well consolidated tridimensional method that exhibits greater representativeness and accuracy compared to monolayer cell culture as it is able to mimic the cytoarchitecture and morphology with cell-cell adhesion and cell-matrix interactions, besides conditions of drug penetration gradient and hypoxia, that occur in solid tumors *in vivo* (FRIEDRICH *et al.*, 2009). Thus, the spheroid assay is a more refined drug screening method that can be used as a carrier prior to animal experiments (WEN *et al.*, 2013).

The aim of this study was to evaluate different cell lines' ability to form three dimensional spheroids and validate this model as a drug-screening approach for oral squamous cell carcinoma. We observed that different cell lines, such as OSCC and microenvironmental cells - fibroblasts, keratinocytes and endothelial cells - are capable to form spheroids and are viable to be tested with antitumoral substances, demonstrating effects when treated with Cisplatin - the golden standard for head and neck cancer treatment. Also, a pronounced effect of Cisplatin was observed in keratinocytes, suggesting toxicity in normal cells of the body and the non-selectivity of this drug.

METODOLOGY

Reagents and cell culture

HaCaT (human aneuploid immortal keratinocyte – BCRJ® CRL – 0341™), CAL 27 (OSCC – ATCC® CRL-2095™), SCC-9 (OSCC – ATCC® CRL-1628™), SCC-25 (OSCC – ATCC® CRL-1628™), HUVEC (umbilical vein/vascular endothelium - ATCC® CRL-1730™) and NIH/3T3 (fibroblasts) were cultivated on Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM – Gibco, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA) high glucose (HaCaT, CAL 27 and SCC-9) or DMEM/DMEM F12 media (SCC-25) and (DMEM – Gibco, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA) low glucose (NIH/3T3 and HUVEC) . All media were supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% penicillin, and streptomycin (Gibco, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA). For SCC-25 medium, hydrocortisone (400 ng/mL) was added. The cells were treated with 20µg/ml of Cisplatin (C-platin, Blau Farmacêutica S.A., Cotia – SP).

Spheroid assay

Cells (HaCaT, CAL 27, SCC-9, SCC-25, HUVEC and NIH/3T3) were plated in a non-adherent agarose-coated 96-well plate (1x10⁴ cells/well) to form the spheroids (FRIEDRICH; SEIDEL; EBNER; KUNZ-SCHUGHART, 2009). After 24h of spheroid formation, the spheres were treated with 20µg/ml of Cisplatin or medium. Then, after 24, 48 and 72 hours, pictures from the spheroids were taken with a charge coupled device camera (AxioCam vision, Zeiss, Göttingen, Germany) attached to an inverted microscope (Axio Observer Z1, Zeiss, Göttingen, Germany) using AxioVision Software (Zeiss, Göttingen, Germany).

Statistical analysis

The spheroid images were measured in ImageJ Software (National Institute of Health, Bethesda, MA, USA), according to external and internal (denser) area at the treatment day (24h), 48, 72 and 96 hours after the beginning of the experiment. Statistical analysis was performed with the Microsoft Office Excel (Microsoft Co, Redmond, Washington, USA) and GraphPad version 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Data were presented as number, percentage, mean, and standard deviation. To compare means between groups, we

applied analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-test. The level of statistical significance was 5% ($p < 0.05$).

RESULTS

Different cell lines are able to form spheroids and are viable to be performed as an antitumoral drug screening assay

In order to evaluate the capacity of different cells from the tumor microenvironment to form 3D structures, epithelial cells (HaCaT), endothelial cells (HUVEC), NIH/3T3 and more (CAL 27) or less (SCC-9 and SCC-25) differentiated OSCC cells were plated in a non-adherent surface, imaged after 24h, 48h, 72h and 96h and submitted to area analysis. It was observed that keratinocytes formed spheroids in 24h while endothelial cells took longer to form a solid spheroid (72h). Fibroblasts formed a cohesive sphere already in 24h but decreased almost 50% its total area overtime and became a more compact sphere. The OSCC cell lines also showed different behaviors: while more differentiated cancer cell line (CAL 27) formed a cohesive spherical 3D structure in 24h, more undifferentiated OSCC cells (SCC-9 and SCC-25) formed a spread low-cohesive spheroid. Despite fibroblast, all cell lines have remained with constant area overtime, indicating that they are viable for being tested with antitumoral substances.

Cisplatin triggers loss of cell-cell cohesion in all cell lines tested

In order to evaluate spheroids' behavior exposed to the golden standard drug for OSCC treatment, 24 hours after the cells were seeded, they were treated with 20 μ g/ml of Cisplatin. In HaCaT cells, it was observed an increase of spreading area when compared to the control group. This increase of the spreading area associated with poorly defined edges, was also observed in cancer cell lines when compared to the non-treated group, indicating loss of cell-cell cohesion. In CAL 27 it was not observed significantly effects but in SCC-9 treated cells, it was shown an increase in the spreading area compared to control group. These results indicate that Cisplatin leads to cytotoxic effects in cancer cells but also normal cells.

DISCUSSION

The growing cancer incidence and mortality rates alarms researchers to study further the mechanisms behind this disease and develop novel therapies. A great number of substances with promising antitumoral effect that are tested in the traditional bidimensional cell culture, when tested *in vivo* shows little or no effect. This happens due to the complexity of a living organism and its cancer's microenvironment that monolayer culture cannot reproduce (PAMPALONI; REYNAUD; STELZER, 2007).

The spheroid model is a tridimensional cell culture method largely used for cytotoxic tests to assess treatment efficiency of well-established chemotherapeutic drugs or in the screening for novel substances and therapies (RIAZ *et al.*, 2019; PATRA *et al.*, 2019). This methodology reproduces hypoxia and drug penetration gradients (ZANONI *et al.*, 2016), maintain cell morphology, cell-cell and cell-matrix interactions and, moreover, it is cheaper and faster when compared to others organotypic models (ROLVER; ELINGAARD-LARSEN; PEDERSEN, 2019). For these reasons, it can fill the gap between monolayer cell culture and *in vivo* trials, reducing biological and financial expenses (ZANONI *et al.*, 2019; PAMPALONI; REYNAUD; STELZER, 2007; LEE, 2018). The spheroid model is described in a considerable number of studies using different tumoral cells, such as brain, lung, ovarian and colorectal cancers (PLUMMER *et al.*, 2019; FRIEDRICH *et al.*, 2009).

It is acknowledged that tumors are formed not only by tumoral cells, but also by macrophages, fibroblasts associated to tumors (CAFs) and endothelial cells, that are attracted by cancerous cells to contribute to tumor nutrition and progression (DE PALMA, BIZIATO, PETROVA, 2017; ROMA-RODRIGUES *et al.*, 2019).

In our study, we used different cell lines such as keratinocytes (HaCaT), OSCC cells (SCC-9, SCC-25 and CAL 27), endothelial cells (HUVEC) and NIH/3T3 to assess if these cells are capable to form spheroids and posteriorly analyze the effects of the golden standard for OSCC chemotherapy – Cisplatin - on them. We showed that all the cells previously cited can be used in the spheroid model, not only OSCC cells, but also those involved in tumor microenvironment (SIEVERS *et al.*, 2017). We also showed that the cells presented different behaviors, e.g., fibroblast spheroids decrease their total area overtime and become a more solid and compact sphere, probably because of their contract ability (MULLIGAN; FENG; ADIE, 2019). Meanwhile endothelial cells take more time to form a solid spheroid (72h), keratinocytes form spheroids already in 24h, most likely because of the presence of its

epithelial marker E-cadherin which increase cell-cell adhesion (DESROCHERS *et al.*, 2012). OSCC cell lines also shows different behaviors: while CAL 27 is a more differentiated cancer cell line and forms a spherical spheroid, SCC-9 and SCC-25 - more undifferentiated cancer cell lines – forms a spread spheroid, more pronounced in SCC-25, due the presence of its mesenchymal marker N-cadherin (PAN *et al.*, 2015).

Once we observed that all these cells formed spheroids, we analyzed the cytotoxic effect of 20µg/ml Cisplatin in OSCC cell lines and also its effects on normal tissue cells. The results showed an increase in the spreading area of HaCaT and SCC-9 spheroids, suggesting drug penetration and loss of cell-cell cohesion, indicating toxicity for both cell lines and, thus, the low selectivity of this drug.

One recent alternative to improve treatment efficacy is the personalized medicine, which tumoral cells are individually collected from each patient to be tested with different chemotherapeutic drugs in vitro, including in short-term spheroids (JEPPESEN *et al.*, 2017; PLUMMER *et al.*, 2019) and then, used as a chemotherapeutic individual agent.

REFERENCES

- Beri, P., Matte, B. F., Fattet, L., Kim, D., Yang, J., & Engler, A. J. (2018). Biomaterials to model and measure epithelial cancers. *Nature Reviews Materials*, (3), 418-430. doi:10.1038/s41578-018-0051-6.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. doi:10.3322/caac.21492.
- De Palma, M., Biziato, D., Petrova, T. V. (2017). Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*, 17(8), 457-474. doi: 10.1038/nrc.2017.51.
- DesRochers, T. M., Shamis, Y., Alt-Holland, A., Kudo, Y., Takata, T., Wang, G., Jackson-Grusby, L., Garlick, J. A. (2012). The 3D tissue microenvironment modulates DNA methylation and E-cadherin expression in squamous cell carcinoma. *Epigenetics*. 7(1), 34-46. doi: 10.4161/epi.7.1.18546.

- Friedrich, J., Seidel, C., Ebner, R., Kunz-Schughart, L. A. (2009). Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nature Protocols*, (4), 309–324. doi: 10.1038/nprot.2008.226
- Hamidi, H., Ivaska, J. (2018). Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*, 18(9), 533-548. doi: 10.1038/s41568-018-0038-z.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A.. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Jeppesen, M., Hagel, G., Glenthøj, A., Vainer, B., Ibsen, P., Harling, H., Thastrup, O., Jørgensen, L., N., Thastrup, J. (2017). Short-term spheroid culture of primary colorectal cancer cells as an in vitro model for personalizing cancer medicine. *PLoS ONE* 12(9), e0183074. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183074>.
- Lee, I-Chi. (2018). Cancer-on-a-chip for Drug Screening. *Current Pharmaceutical Design*, (24), 5407. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190206235233>.
- Matte, B.F., Kumar, A., Placone, J. K., Zanella, V. G., Martins, M. D., Engler, A. J., Lamers, M. L. (2019). Matrix stiffness mechanically conditions EMT and migratory behavior of oral squamous cell carcinoma. *J Cell Sci.*, 132(1), pii: jcs224360. doi: 10.1242/jcs.224360.
- Mulligan, J. A., Feng, X., Adie, S. G. (2019). Quantitative reconstruction of time-varying 3D cell forces with traction force optical coherence microscopy. *Sci Rep.*, 9(1), 4086. doi: 10.1038/s41598-019-40608-4.
- Pampaloni, F., Reynaud, E. G., & Stelzer, E. H. K. (2007). The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(10), 839–845. doi:10.1038/nrm2236.
- Pan, S. T., Qin, Y., Zhou, Z. W., He, Z. X., Zhang, X., Yang, T., Yang, Y. X., Wang, D., Zhou, S. F., Qiu, J. X. (2015). Plumbagin suppresses epithelial to mesenchymal transition and stemness via inhibiting Nrf2-mediated signaling pathway in human tongue squamous cell carcinoma cells. *Drug Des Devel Ther.*, (9), 5511-5551. doi: 10.2147/DDDT.S89621.

Patra, B., Lafontaine, J., Bavoux, M., Zerouali, K., Glory, A., Ahanj, M., Carrier, J., Gervais, T. and Wong, P. (2019). On-chip combined radiotherapy and chemotherapy testing on soft tissue sarcoma spheroids to study cell death using flow cytometry and clonogenic assay. *Scientific reports*, (9), 2214. doi: 10.1038/s41598-019-38666-9.

Plummer, S., Wallace, S., Ball, G., Lloyd, R., Schiapparelli, P., Quiñones-Hinojosa, A., Hartung, T., Pamies, D. (2019). A Human iPSC-derived 3D platform using primary brain cancer cells to study drug development and personalized medicine. *Scientific Reports*, (9), 1407. doi:10.1038/s41598-018-38130-0.

Ramos, G. d. O., Bernardi, L., Lauxen, I., Sant'ana Filho, M., Horwitz, A. R., Lamers, M. L. (2016). Fibronectin Modulates Cell Adhesion and Signaling to Promote Single Cell Migration of Highly Invasive Oral Squamous Cell Carcinoma. *PLoS ONE*, 11(3), e0151338. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151338>.

Riaz, M. K., Zhang, X., Wong, K. H., Chen, H., Liu, Q., Chen, X., Zhang, G., Lu, A., Yang, Z. (2019). Pulmonary delivery of transferrin receptors targeting peptide surface-functionalized liposomes augments the chemotherapeutic effect of quercetin in lung cancer therapy. *Int J Nanomedicine*. (14), 2879–2902. doi: 10.2147/IJN.S192219.

Rolver, M. G., Elingaard-Larsen, L. O., & Pedersen, S. F. (2019). Assessing Cell Viability and Death in 3D Spheroid Cultures of Cancer Cells. *Journal of Visualized Experiments*, (148). doi:10.3791/59714.

Roma-Rodrigues, C., Mendes, R., Baptista, P. V., Fernandes, A. R. (2019). Targeting Tumor Microenvironment for Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.*, (20), 840. doi: 10.3390/ijms20040840.

Santos, L. C., Batista, O. M., Cangussu, M. C. (2010). Characterization of oral cancer diagnostic delay in the state of Alagoas. *Braz J Otorhinolaryngol.*, 76(4), 416-422.

Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2020). *Cancer statistics, 2020*. CA: A Cancer Journal for Clinicians. doi:10.3322/caac.21590.

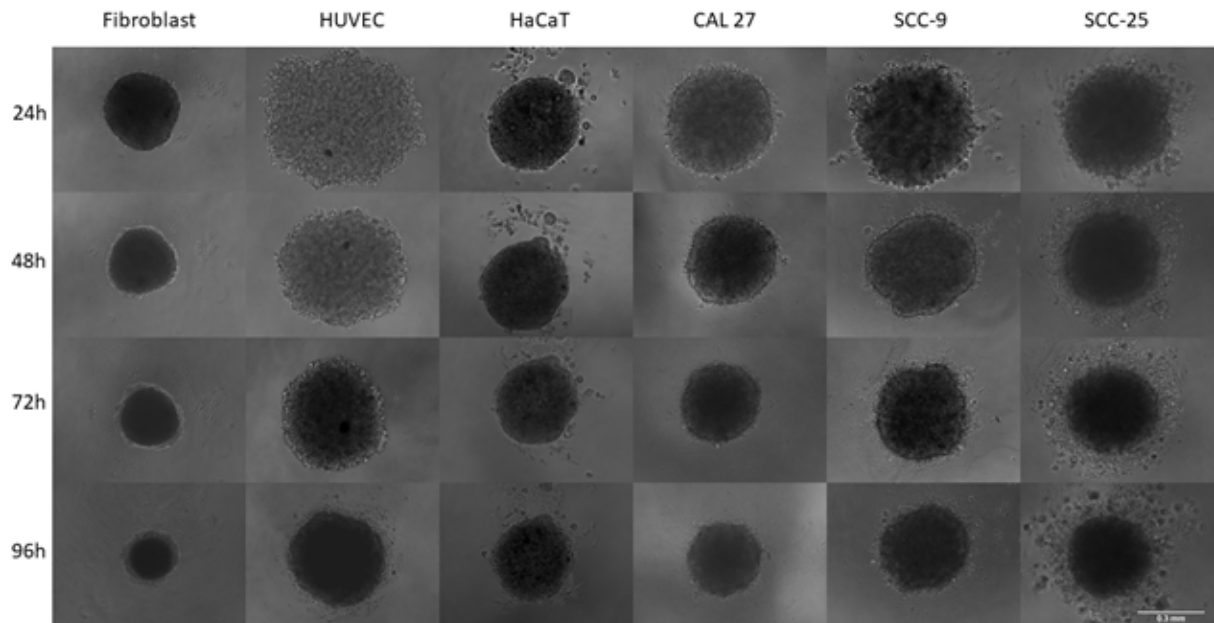
Sievers, D., Bunzendahl, J., Frosch, A., Perske, C., Hemmerlein, B., Schliephake, H., & Brockmeyer, P. (2018). Generation of highly differentiated BHY oral squamous cell carcinoma multicellular spheroids. *Molecular and Clinical Oncology*, (8), 323-325. <https://doi.org/10.3892/mco.2017.1514>.

Wen, Z., Liao, Q., Hu, Y., You, L., Zhou, L., & Zhao, Y. (2013). A spheroid-based 3-D culture model for pancreatic cancer drug testing, using the acid phosphatase assay. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 46(7), 634-642. <https://dx.doi.org/10.1590/1414-431X20132647>.

Zanoni, M., Piccinini, F., Arienti, C., Zamagni, A., Santi, S., Polico, R., Bevilacqua, A., Tesei, A. (2016). 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. *Scientific reports*, (6), 19103. doi: 10.1038/srep1910.

Zanoni, M., Pignatta, S., Arienti, C., Bonafè, M., Tesei, A. (2019). Anticancer drug discovery using multicellular tumor spheroid models. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 14 (3), 289-301. doi: 10.1080/17460441.2019.1570129.

A



B

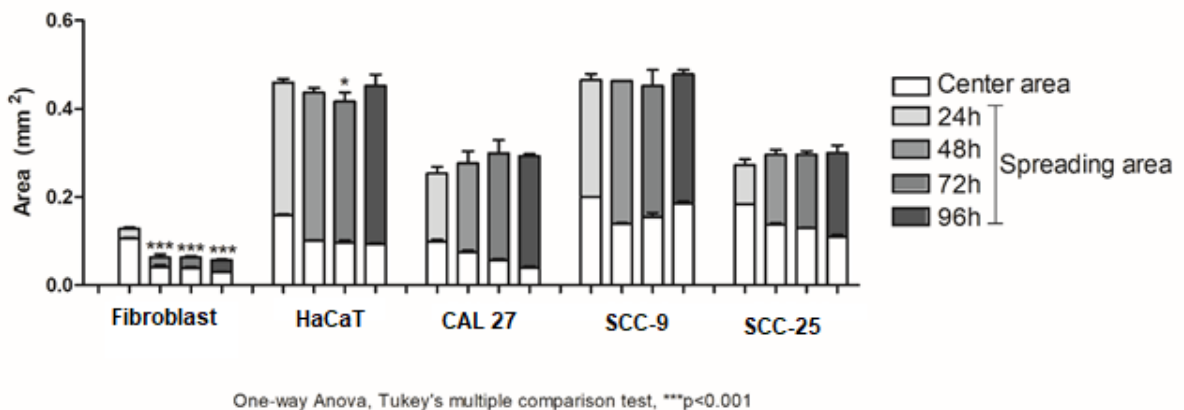
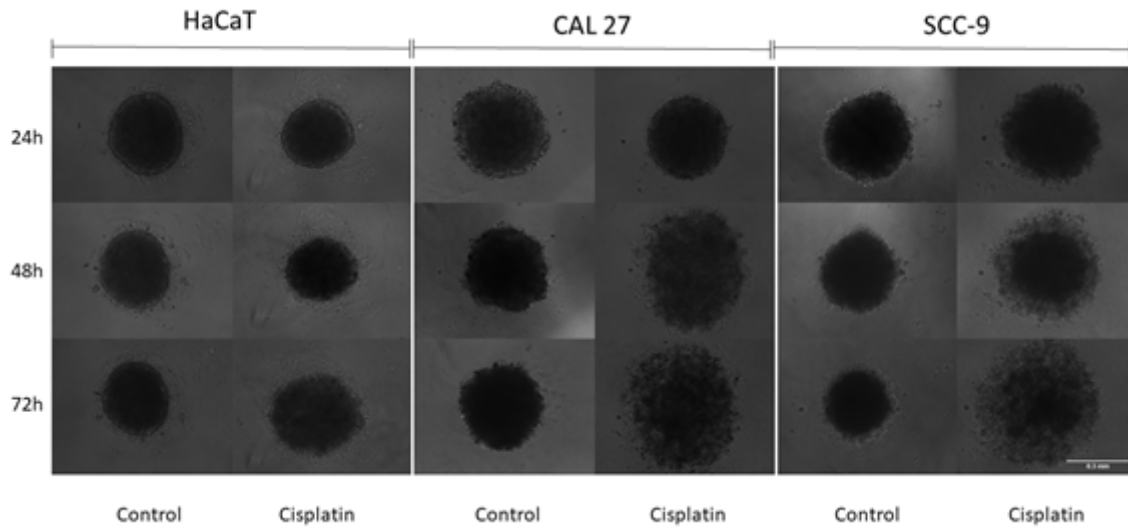


Figure 1: All cell lines tested are capable to form spheroids and are viable to be performed as an antitumoral drug screening assay. (A) It was performed the spheroid assay with agarose to form a non-adherent surface, the cells were plated and the spheroid formation was observed in 24h, 48h, 72h and 96h. Fibroblasts, HaCaT and SCC-9 form a more spherical and solid spheroid compared to SCC-25, which forms a spread sphere. Scale bar of 0.3 mm. (B) To evaluate quantitatively the area of spheroids, the spheroids were measured by ImageJ Software. The obtained data were grouped and the graphs confectioned by GraphPad Software. The statistical analysis of variance (ANOVA) and Tukey's multiple comparison test, $p < 0.05$.

A



B

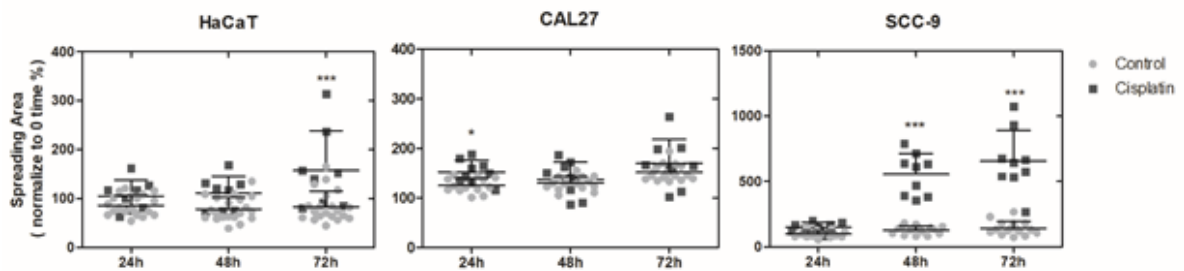


Figure 2: HaCaT, CAL 27 and SCC-9 cell lines were treated with cisplatin. (A) After 24h the cells were plated, cell lines were treated with 20 μ g/ml of Cisplatin. In keratinocytes, it was observed an increased external area compared to the control group. The increase of spreading area in the treated group was also observed in cancer cell line SCC-9 associated with not defined edges, indicating loss of cell-cell adhesion. Scale bar of 0.3 mm. (B) After 72h cells were treated, it was observed an increase in the spreading area for both HaCaT and SCC-9 cells when compared to the control group. Although Cisplatin demonstrates antitumoral effect, it also has effects on normal keratinocytes, indicating low selectivity. The statistical analysis of variance (One-way ANOVA) and Tukey's multiple comparison test, $p < 0.05$.

3 CONCLUSÃO

Com esse trabalho foi demonstrado que diferentes linhagens celulares, tanto células de carcinoma espinocelular oral mais invasivas quanto menos invasivas, além de células envolvidas no microambiente tumoral, são capazes de formar esferoides tridimensionais de forma estável, validando esse modelo como uma plataforma de triagem de drogas *in vitro*.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As tentativas de mimetizar *in vitro* o microambiente tumoral para melhor compreender seu funcionamento e obter maior fidedignidade na triagem de compostos antitumorais vêm tendo cada vez mais espaço nas pesquisas. O ensaio de esferoides é uma metodologia capaz de demonstrar em laboratório a heterogeneidade celular e gradientes de concentração de oxigênio, gás carbônico e outros metabólitos, além de outras características observadas em tumores sólidos *in vivo*, como manutenção da morfologia celular e de adesões célula-célula. Esse ensaio pode ser realizado de diversas maneiras, mas, para torná-lo um método ainda mais acessível, neste trabalho foram confeccionadas as placas de cultura antiaderentes utilizando agarose, representando um método que, apesar de ser mais complexo que a cultura bidimensional, é barato e de fácil realização.

Foi demonstrado em outros estudos que o ensaio de esferoides é passível de ser realizado cultivando células de diferentes tipos de tumor. Neste trabalho, foi demonstrado o uso da metodologia de esferoides utilizando células de câncer de boca, tanto células mais invasivas quanto menos invasivas, bem como aquelas envolvidas no microambiente tumoral, como fibroblastos e células endoteliais.

No tratamento com cisplatina - o padrão-ouro para tratamento de câncer de cabeça e pescoço - foi demonstrado além de efeitos nas células tumorais, efeitos em queratinócitos, demonstrando citotoxicidade em células normais. Isso pode ser correlacionado com os efeitos colaterais observados em pacientes submetidos a esse tratamento quimioterápico, que apresentam muitas vezes mucosite, alopecia, entre outros. Por isso, o ensaio de esferoides pode ser utilizado para refinar o processo de desenvolvimento de novos agentes antitumorais com o máximo de efeito nas células tumorais e o mínimo de efeitos colaterais possíveis.

Os resultados obtidos com esse trabalho permitem a observação da arquitetura dos esferoides e da coesão celular tanto na presença ou ausência de tratamento. Com essa metodologia é possível realizar também análises mais específicas com coloração com hematoxilina e eosina para visualização da morfologia celular, imunohistoquímica para marcadores de proliferação e morte celular, entre outros testes dependendo do objetivo do estudo e, assim, enriquecendo ainda mais os resultados.

REFERÊNCIAS

AMERICAN CANCER SOCIETY (Estados Unidos da América). **Cancer staging**. Atlanta, 2020. Disponível em: <https://www.cancer.org/treatment/understanding-your-diagnosis/staging.html>. Acesso em: 12 out. 2021.

AMERICAN CANCER SOCIETY (Estados Unidos da América). **Survival Rates for Oral Cavity and Oropharyngeal Cancer**. Atlanta, 2021. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/oral-cavity-and-oropharyngeal-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html>. Acesso em: 12 out. 2021.

BAKER, B.; CHEN, C. S. Deconstructing the third dimension - how 3D culture microenvironments alter cellular cues. **Journal of Cell Science**, Londres, v. 125, n. 13, p. 3015–3024, Jul 2012. DOI: 10.1242/jcs.079509. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22797912/>. Acesso em: 07 out. 2021.

BRENER, S. *et al.* Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 53, n. 1, p. 63-69, Mar 2007. DOI: 10.32635/2176-9745.RBC.2007v53n1.1831. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/rbc/n_53/v01/pdf/revisao4.pdf. Acesso em: 14 set 2021.

CANCER TODAY MAGAZINE. **The five phases of clinical research**. Philadelphia, 2021. Disponível em: <https://www.cancertodaymag.org/Pages/Spring2021/The-Five-Phases-of-Clinical-Research.aspx>. Acesso em: 01 nov. 2021.

CORBET, C.; FERON, O. Tumour acidosis: from the passenger to the driver's seat. **Nat Rev Cancer**, Londres, v. 10, p. 577-593, Oct 2017. DOI: 10.1038/nrc.2017.77. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28912578/>. Acesso em: 08 out. 2021.

COSTA, J. S. D.; VICTORA, C. G. O que é "um problema de saúde pública"?. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 9, n. 1, p. 144-146, May 2006. DOI:

10.1590/S1415-790X2006000100018. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbepid/a/f3MrHMwdX3FC84t68qph98v/?lang=pt#>. Acesso em: 28 ago. 2021.

DASARI, S.; TCHOUNWOU, P. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. **Eur J Pharmacol.**, Amsterdã, v. 740, p. 364-378, Oct 2014. DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25058905/>. Acesso em: 02 nov. 2021.

DE PALMA, M.; BIZIATO, D.; PETROVA, T. V. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. **Nat Rev Cancer**, Londres, v. 17, n. 8, p. 457-474, Aug 2017. DOI: 10.1038/nrc.2017.51. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28706266/>. Acesso em: 18 abr. 2021.

DONGRE, A.; WEINBERG, R. A. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. **Nat Rev Mol Cell Biol**, Londres, v. 20, n. 2, p. 69-84, Feb 2019. DOI: 10.1038/s41580-018-0080-4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30459476/>. Acesso em: 18 abr. 2021.

FRIEDRICH, J. *et al.* Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. **Nature Protocols**, Londres, v. 4, p. 309–324, Feb 2009. DOI: 10.1038/nprot.2008.226. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nprot.2008.226>. Acesso em: 09 nov. 2021.

GIALELI, C.; THEOCHARIS, A. D.; KARAMANOS, N. K. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. **FEBS J.**, Oxford, v. 278, n. 1, p. 16-27, Jan 2011. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07919.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21087457/>. Acesso em: 08 out. 2021.

HAMIDI, H.; IVASKA, J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. **Nat Rev Cancer**, Londres, v. 18, n. 9, p. 533-548, Sep 2018. DOI: 10.1038/s41568-018-0038-z. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30002479/>. Acesso em: 18 abr. 2021.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, Cambridge, v. 144, n. 5, p. 646-674, Mar 2011. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21376230/>. Acesso em: 18 abr. 2021.

ILHAN, B. *et al.* Improving Oral Cancer Outcomes with Imaging and Artificial Intelligence. **J Dent Res**, Newbury Park, v. 99, n. 3, p. 241-248, Mar 2020. DOI: 10.1177/0022034520902128. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32077795/>. Acesso em: 28 ago. 2021.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (Brasil). **Números de câncer**. Rio de Janeiro, 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acesso em: 28 ago. 2021.

KOWALSKI, L. P; CARVALHO, A. L. Influence of time delay and clinical upstaging in the prognosis of head and neck cancer. **Oral Oncol.**, v. 31, n. 1, p. 94–98, Jan 2001. DOI: 10.1016/s1368-8375(00)00066-x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11120489/>. Acesso em: 14 set. 2021.

MATTE, B. F. *et al.* Matrix stiffness mechanically conditions EMT and migratory behavior of oral squamous cell carcinoma. **J Cell Sci**, Cambridge, v. 132, n. 1, Jan 2019. DOI: 10.1242/jcs.224360. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30559248/>. Acesso em: 19 abr. 2021.

MITTAL, V. Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Metastasis. **Annual Review of Pathology**, Palo Alto, v. 13, n. 1, p. 395-412, Jan 2018. DOI: 10.1146/annurev-pathol-020117-043854. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-pathol-020117-043854>. Acesso em: 14 set. 2021.

MONTERO, P. H.; PATEL, S. G. Cancer of the oral cavity. **Surg Oncol Clin N Am**, Philadelphia, v. 24, n. 8, p. 491-508, Jul 2015. DOI: 10.1016/j.soc.2015.03.006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5018209/>. Acesso em: 18 abr. 2021.

MUKHERJEE, S. O imperador de todos os males: uma biografia do câncer. 1. ed. São Paulo: Companhia das Letras, 2012.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (Estados Unidos da América). **Types of Cancer Treatment**, 2021. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>. Acesso em: 12 out. 2021.

NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK (Estados Unidos da América). **NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology**. Plymouth Meeting, 2021. Disponível em: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/head-and-neck.pdf. Acesso em: 12 out. 2021.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (Estados Unidos da América). **Understanding Cancer**. Bethesda, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20362/>. Acesso em: 11 set. 2021.

NURMIK, M. *et al.* In search of definitions: Cancer-associated fibroblasts and their markers. **Int J Cancer**, Nova Iorque, v. 146, n. 4, p. 895-905, Feb 2020. DOI: 10.1002/ijc.32193. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30734283/>. Acesso em: 08 out. 2021.

PANKOVA, D. *et al.* Cancer-Associated Fibroblasts Induce a Collagen Cross-link Switch in Tumor Stroma. **Mol Cancer Res**, Philadelphia, v. 14, n. 3, p. 287-295, Mar 2016. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-15-0307. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26631572/>. Acesso em: 19 abr. 2021.

RAMOS, G. O. *et al.* Fibronectin Modulates Cell Adhesion and Signaling to Promote Single Cell Migration of Highly Invasive Oral Squamous Cell Carcinoma. **PLoS One**, São Francisco, v. 11, n. 3, p. e0151338, Mar 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0151338. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26978651/>. Acesso em: 19 abr. 2021.

SANTOS, L. C. O. D.; BATISTA, O. D. M.; CANGUSSU, M. C. T. Caracterização do diagnóstico tardio do câncer de boca no estado de Alagoas. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, São Paulo, v. 76, n. 4, p. 416-422, Ago 2010. DOI: 10.1590/S1808-86942010000400002. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/bjorl/a/CdBpdKTbRWWgYrTjb7dyCNH/?lang=pt>. Acesso em: 28 ago. 2021.

SIDDIQUI, M.; RAJKUMAR, S. V. The high cost of cancer drugs and what we can do about it. **Mayo Clin Proc.**, Oxford, v. 87, n. 10, p. 935-943, Oct 2012. DOI: 10.1016/j.mayocp.2012.07.007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23036669/>. Acesso em: 02 nov. 2021 .

ZANONI, M. *et al.* 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. **Scientific reports**, [s. l.], v. 6, n. 19103, Jan 2016. DOI: 10.1038/srep1910. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep19103>. Acesso em: 01 nov. 2021.

ZANONI, M. *et al.* Anticancer drug discovery using multicellular tumor spheroid models. **Expert Opinion on Drug Discovery**, Londres, v. 14, n. 3, p. 289-301, Mar 2019. DOI: 10.1080/17460441.2019.1570129. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30689452/>. Acesso em: 30 out. 2021.