



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



TAÍS BACELAR SACRAMENTO DE ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-TUMORAL DE UM
INIBIDOR DE GLI1 EM CARCINOMA ESCAMOCELULAR
ORAL**

**EVALUATION OF THE ANTITUMORAL POTENTIAL OF A
GLI1 INHIBITOR IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA**

SALVADOR, BA

2019

TAÍS BACELAR SACRAMENTO DE ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-TUMORAL DE UM
INIBIDOR DE GLI1 EM CARCINOMA ESCAMOCELULAR
ORAL**

**EVALUATION OF THE ANTITUMORAL POTENTIAL OF A
GLI1 INHIBITOR IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Colegiado do
Curso de Pós-graduação em Odontologia, como pré-
requisito obrigatório para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Clarissa Araújo Gurgel Rocha

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Rosane Borges Dias

SALVADOR, BA

2019

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Araújo, Taís Bacelar Sacramento de
Avaliação do potencial anti-tumoral de um inibidor
de GLI1 em carcinoma escamocelular oral / Taís Bacelar
Sacramento de Araújo. -- Salvador, 2019.
54 f. : il

Orientadora: Clarissa Araújo Gurgel Rocha.
Coorientadora: Rosane Borges Dias.
Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
Odontologia e Saúde) -- Universidade Federal da
Bahia, Faculdade de Odontologia da UFBA, 2019.

1. Neoplasias bucais. 2. Proteínas Hedgehog. 3.
Quimioterapia. I. Rocha, Clarissa Araújo Gurgel. II.
Dias, Rosane Borges. III. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ODONTOLOGIA E SAÚDE

TERMO DE APROVAÇÃO

C.D. TAÍS BACELAR SACRAMENTO DE ARAÚJO

**“AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-TUMORAL DE UM INIBIDOR
DE GLI-1 EM CARCINOMA ESCAMOCELULAR ORAL ”**

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Clarissa Araújo Gurgel Rocha (Orientadora)
Professora da Universidade Federal da Bahia – Faculdade de Odontologia

Prof. Dr. Jean Nunes dos Santos (Examinador Interno)
Professor da Universidade Federal da Bahia – Faculdade de Odontologia

Prof. Dr. Bruno Solano de Freitas (Examinador Externo)
Pesquisador Adjunto - FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

À Deus,

Pela vida, saúde, proteção e por sempre guiar os meus caminhos.

Aos meus pais,

Por serem meus maiores incentivadores. Por sempre estarem presentes, por todo apoio, educação, amor, carinho, atenção e conselhos. Amo muito vocês e serei eternamente grata por tudo.

À Juliana,

Minha irmã querida, por sempre me apoiar e vibrar com todas as minhas conquistas como se fossem suas. Por sempre dividir angústias e celebrar momentos felizes.

Aos meus avós,

Por serem meus grandes exemplos. Agradeço por todas as orações e pelo amor incondicional. Obrigada por terem formado a nossa família maravilhosa.

À toda a minha família,

Pela união e por sempre torcerem por mim.

À Renan,

Pelo amor, carinho, apoio e incentivo. Por ser paciente e compreensivo. Por estar presente em todos os momentos e tornar tudo mais fácil.

À minha orientadora Profa. Dra. Clarissa Gurgel,

Por ser aquela pessoa que soma, motiva e que faz a diferença na vida daqueles que orienta. Muito obrigada por ser meu grande exemplo acadêmico e por ter me mostrado o mundo especial da ciência. Agradeço pelos ensinamentos, oportunidades, incentivo, carinho e amizade. Sou sua fã.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Rosane Borges,

Por ser especial em todos os aspectos e por me ensinar tanto todos os dias. Muito obrigada por estar comigo em todas as etapas deste trabalho, pela paciência, parceria, bondade e por acima de tudo, ser minha amiga querida. Conte sempre comigo.

À Leonardo Siquara e Andresa Karen,

Pela dedicação, comprometimento, e por terem me ajudado e incentivado em tantas etapas deste processo, muito obrigada!

À Manuela Andion,

Por ter sido essencial nas etapas de expressão gênica e por ser a alegria de qualquer ambiente em qualquer circunstância.

À Paulo Coelho,

Por ter sido essencial nos ensaios de avaliação proteica e pela disponibilidade em ajudar sempre que precisei.

À Jéssica Mariane,

Pela paciência, dicas e ótimas aulas.

A todo o grupo de Biopatologia,

Que são muito importantes e especiais. Muito obrigada por tornarem a jornada mais leve e por constituirmos um grupo de pesquisa unido.

Ao Prof. Dr. Ricardo Della Coletta,

Pela contribuição científica e doação das células para a realização deste estudo.

A todos os meus colegas de Mestrado,

Em especial, Tayane Coelho, Gabriela Prado e Larissa Abbehusen, por dividirem comigo esta jornada.

Ao Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM),

Pelo convívio e imensa contribuição na minha formação acadêmica.

Ao Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI), especialmente Dr. Daniel Bezerra e Dr. Cássio Santana

Pela oportunidade de trabalhar com pessoas diferenciadas, pelas contribuições neste trabalho e pelo aprendizado adquirido ao longo deste processo.

À Plataforma de Citometria de Fluxo, especialmente Liliane e Rafaela,

Por contribuir na realização dos experimentos de citometria de fluxo.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Odontologia da UFBA,

Que contribuíram imensamente na minha formação pessoal e profissional.

À Faculdade de Odontologia da UFBA,

Por ser a minha segunda casa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia e Saúde -UFBA,

Por este curso que me trouxe novas perspectivas, muito crescimento e amadurecimento.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia e Saúde, em especial a Prof^a. Dr^a Águida Leitão e Sueli,

Pela organização e eficiência em auxiliar e resolver as nossas questões.

Ao CNPq,

Pelo apoio financeiro durante a realização do Mestrado.

À FAPESB,

Pelo financiamento deste projeto

Ao IGM e toda equipe de funcionários,

Por representar um centro de pesquisa sério e de qualidade, com pessoas muito competentes,
que tenho orgulho de fazer parte.

RESUMO

Introdução. O carcinoma escamocelular oral (CEO) é uma doença que apresenta um pobre prognóstico e poucos avanços terapêuticos, sendo necessário desvendar os mecanismos envolvidos em sua patogênese, incluindo a participação de vias de sinalização embrionárias, como a via Hedgehog (HH). Esta cascata é importante para a iniciação e comportamento biológico tumoral, bem como para a manutenção da população de células-tronco tumorais, com reflexos diretos na resistência à fármacos. **Objetivo.** Estudar os efeitos antitumorais do composto X sobre a expressão gênica de componentes da via HH, proliferação e morte em células de CEO. **Metodologia.** As células de CEO (HSC3, CAL27, SCC4, SCC9, SCC15 e SCC25) foram cultivadas em meio DMEM. Inicialmente, a citotoxicidade foi avaliada contra diferentes células tumorais e não tumorais através do ensaio do alamar blue. A expressão de componentes da via HH foi avaliada através de reações de qPCR, utilizando TaqMan Gene Expression Assays™, após 12 horas de tratamento com os compostos-teste. Os ensaios de viabilidade, ciclo celular e padrão de morte em células HSC3 foram realizados em diferentes tempos de incubação do composto X (18 e 36 μM), através da citometria de fluxo. As alterações morfológicas foram avaliadas através dos parâmetros FSC (tamanho/volume) e SSC (granulosidade), obtidos por citometria. **Resultados.** A análise da citotoxicidade do composto-teste por Alamar Blue demonstrou uma maior sensibilidade ao tratamento para célula HSC3 (CI_{50} : 36 μM) em relação aos outros tipos celulares testados, sendo escolhida para realização dos ensaios de análise dos efeitos do composto X em células de CEO. O composto X foi capaz de reduzir os níveis de mRNA do fator de transcrição GLI1 na concentração de 36 μM , após 12h de tratamento. O inibidor de GLI reduziu significativamente a viabilidade celular das células HSC3 a partir de 24h de tratamento. Os ensaios de análise do ciclo celular e padrão de morte demonstraram um aumento significativo da fragmentação nuclear na fase sub-G1 e morte celular por apoptose. **Conclusão.** O inibidor de GLI reduziu significativamente a expressão do gene GLI1, indicando redução da atividade *downstream* da via HH em 12 horas de tratamento. Além disso, o composto-teste reduziu significativamente a viabilidade e promoveu um aumento significativo da fragmentação nuclear e morte celular por apoptose em células de CEO.

Palavras-chave: Neoplasias bucais; Proteínas Hedgehog; Quimioterapia.

ABSTRACT

Introduction. Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is a disease that presents a poor prognosis and few therapeutic advances. It's necessary to uncover the mechanisms involved in its pathogenesis, including the participation of embryonic signaling pathways, such as the Hedgehog (HH) pathway. This cascade is important for tumor initiation and biological behavior, as well as maintenance of the tumor stem cell population, with direct reflexes in drug resistance. **Aim.** To study the antitumor effects of the X compound on gene expression of HH pathway components, proliferation and death in OSCC cells. **Methodology.** The OSCC cells (HSC3, CAL27, SCC4, SCC9, SCC15 e SCC25) were cultured in DMEM medium. Initially, cytotoxicity was assessed against different tumor and non-tumor cells by the Alamar Blue assay. Expression of HH pathway components was assessed by qPCR reactions using TaqMan Gene Expression Assays™ after 12 hours of treatment with the test compounds. Viability, cell cycle and death standard assays in HSC3 cells were performed at different incubation times with the X compound (18 and 36 μM) by flow cytometry. The morphological alterations were evaluated through FSC (size / volume) and SSC (granulosity) parameters, obtained by cytometry. **Results.** Cytotoxicity analysis of the test compound by Alamar Blue demonstrated greater sensitivity to treatment in HSC3 cell (IC_{50} : 36 μM) in relation to the other cell types tested, and it was chosen to the analysis of the effects of the X compound in OSCC cells. The X compound was able to reduce mRNA levels of the GLI1 transcription factor at the concentration of 36 μM after 12 hours of treatment. The GLI inhibitor significantly reduced the cell viability of HSC3 cells after 24 hours of treatment. Cell cycle and death standard assays demonstrated a significant increase in nuclear fragmentation in the sub-G1 phase and cell death by apoptosis. **Conclusion.** The GLI inhibitor significantly reduced GLI1 gene expression, indicating reduction of HH pathway downstream activity within 12 hours of treatment. In addition, the test compound significantly reduced viability and promoted a significant increase in nuclear fragmentation and cell death by apoptosis in OSCC cells.

Keywords: Oral cancer; Hedgehog Proteins; Chemotherapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Perfil de expressão gênica dos componentes da via Hedgehog em células de CEO.	17
Figura 2.	Esquema ilustrativo da via de sinalização Hedgehog (HH).	20
Figura 3.	Avaliação das proteínas Hedgehog em células HSC3 por imunofluorescência (A) e Western Blot (B).	35
Figura 4.	Expressão gênica dos componentes da via HH, PTCH1, GLI1,2 e 3 após 12 horas de tratamento com o composto X (18 e 36 μ M).	38
Figura 5.	Efeito do composto X sobre a viabilidade de células HSC3, determinado pelo ensaio de exclusão de azul de tripan após 24h, 48h e 72h de tratamento.	40
Figura 6.	Dotplots representativos das características de dispersão da luz em células HSC3 tratadas com o Composto X.	41
Figura 7.	Efeito do composto X sobre a externalização da fosfatidilserina em células HSC3 determinado por citometria de fluxo usando Anexina V-FITC.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Células tumorais e não-tumorais humanas utilizadas no ensaio de citotoxicidade	25
Tabela 2.	Atividade citotóxica do inibidor de GLI.	37
Tabela 3.	Efeito do composto X sobre o ciclo celular e fragmentação do DNA internucleosomal em células HSC3	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	Refere-se ao fármaco 5-Fluorouracil
μl	Microlitro
μM	Micromolar
μg	Micrograma
°C	Graus Celsius
BCL2	Gene <i>Human B-cell lymphoma 2</i>
CCND1	Ciclina D1
CEO	Carcinoma escamocelular oral
CI₅₀	Concentração inibitória de 50%
Composto X	Bloqueador dos fatores de transcrição GLI
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
Cq	Quantification cycle
DCT	Docetaxel, Cisplatina e 5-Fluorouracil
DHH	Gene ou proteína <i>Desert Hedgehog</i>
DMEM	Do inglês, <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
EP	Erro padrão
FDA	Do inglês, <i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Do inglês, <i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FSC	Do inglês, <i>Forward Scatter</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FOP - UNICAMP	Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade de Campinas
FU	Gene ou proteína <i>serine/threonine kinase fused</i>
GLI	Gene <i>Glioma associated oncogene homolog</i>
GLI1	Gene ou proteína <i>Glioma associated oncogene homolog1</i>
GLI2	Gene ou proteína <i>Glioma associated oncogene homolog2</i>
GLI3	Gene ou proteína <i>Glioma associated oncogene homolog3</i>
Hh	Família de ligantes <i>Hedgehog</i>
HHIP	Gene ou proteína <i>hedgehog interacting protein</i>

HPV	<i>Human Papiloma vírus</i>
IHH	Gene ou proteína <i>Indian Hedgehog</i>
IP	<i>Iodeto de Propídio</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer
MAPK	MAP Quinase (Mitogen Activated Protein Kinases)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBMC	do inglês <i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PCR	Do inglês, <i>Polimerase Chain Reacton</i>
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PTCH1	Gene ou proteína <i>Patched 1</i>
RQ	Quantificação relativa de RNAm
RT-PCR	Do inglês, <i>Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction</i>
SFB	Soro Bovino Fetal
SSC	Do inglês, <i>Side Scatter</i>
SHH	Gene ou proteína <i>Sonic Hedgehog</i>
SMO	Gene ou proteína <i>Smoothened</i>
SUFU	Gene ou proteína <i>Supressor of fused</i>
TGF-β	Do inglês, <i>transforming growth factor beta</i>
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UPS	Sistema ubiquitina-proteossoma
VEGF	Proteína <i>Vascular endothelial growth factor</i>
WHO	World Health Organization
ZF	Do inglês, <i>zinc finger</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	CARCINOMA ESCAMOCELULAR ORAL	15
2.2	VIA DE SINALIZAÇÃO HEDGEHOG	17
2.3	GLI COMO ALVO DE INIBIÇÃO	20
3	HIPÓTESE	23
4	OBJETIVOS	23
4.1	Objetivo Geral	23
4.2	Objetivos Específicos	23
5	METODOLOGIA	24
5.1	Caracterização do estudo	24
5.2	Obtenção e manutenção das células em cultura	24
5.3	Obtenção de células PBMC	26
5.4	Obtenção de fibroblastos associados ao câncer, meio condicionado por FACs e fibroblastos normais	26
5.5	Ensaio do Alamar blue para avaliação da citotoxicidade do inibidor de GLI	27
5.6	Avaliação da expressão das proteínas relacionadas à via HH por imunofluorescência	28
5.7	Expressão dos componentes da via HH por Western Blot	29
5.8	Expressão dos componentes da via HH após tratamento com os inibidores	30
5.8.1	Isolamento de RNA total e transcrição reversa (RT-PCR)	30
5.8.2	Determinação da atividade da via HH	30
5.9	Avaliação dos efeitos do composto X sobre a viabilidade, ciclo celular e padrão de morte em células HSC3	31
5.9.1	Determinação do ciclo celular e fragmentação do DNA internucleossomal	31
5.9.2	Determinação da externalização de fosfatidilserina	32
5.9.3	Análise morfológica por citometria de fluxo	32
5.10	Análise Estatística	32
6	RESULTADOS	34
6.1	Expressão dos componentes da via HH em células de CEO	34
6.2	Atividade citotóxica do inibidor de GLI1	36

6.3	Efeitos do inibidor de GLI sobre a expressão gênica de componentes da via HH em células HSC3	36
6.4	Efeitos do inibidor de GLI sobre a viabilidade de células HSC3	38
6.5	Efeito do composto X sobre a morfologia das células HSC3	39
6.6	Efeitos do inibidor de GLI sobre o ciclo celular e fragmentação do DNA internucleossomal em células HSC3	41
6.7	Efeito do composto X sobre a externalização da fosfatidilserina em células de HSC3.	44
7	DISCUSSÃO	46
8	CONCLUSÕES	51
	REFERÊNCIAS	

1 INTRODUÇÃO

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo e, em 2018, foi responsável por 9,6 milhões de óbitos, sendo uma em cada seis mortes relacionadas à doença (OMS, 2017). No Brasil, para os anos 2018 e 2019, são estimados 600 mil casos novos de câncer (excetuando-se o câncer de pele não melanoma), para cada ano. Nesse contexto, o câncer de boca no Brasil, ocupa o 5º e o 12º lugares em frequência, para homens e mulheres, respectivamente. Na região Nordeste, a Bahia é o estado responsável pelo maior número de casos (BRASIL, INCA, 2018). subtipo histológico mais comum, estando presente em mais de 90% dos casos diagnosticados (RODRIGUES et al., 2014; BRANDS et al., 2018; LIU; CHUA; BATSTONE, 2018).

Dentro desse contexto, os indivíduos acometidos pelo carcinoma escamocelular de cabeça e pescoço, especialmente o CEO, sofrem um grande impacto na qualidade de vida, principalmente em casos mais graves da doença, quando o tratamento quimio-radioterápico está associado (LIU; CHUA; BATSTONE, 2018). Essa abordagem de tratamento, considerada padrão para os casos mais avançados, traz reflexos importantes que norteiam a alteração fonética, deformidade facial, dificuldade de deglutição e sintomatologia dolorosa, especialmente decorrente de alterações clínicas intrínsecas a este câncer, bem como promovidas pela radioterapia nesta região, a exemplo da mucosite, xerostomia, cárie por radiação, infecções fúngicas como a candidíase e ulcerações aftosas (ADKINS; et al., 2019). Essas características associadas à terapêutica desse tumor, conferem um agravante a esta condição, com fortes impactos sociais, emocionais e também econômicos, por contribuir para uma baixa produtividade dos indivíduos acometidos, além de dificuldade de reinserção no mercado de trabalho.

Diante do exposto, faz-se necessário um esforço e urgência mundial na abordagem de estratégias que possam refletir em melhor desfecho clínico e sobrevida para os pacientes com CEO. Deste modo, alinhado ao conhecimento de que a re-ativação de vias de sinalização embrionárias é muito importante para a iniciação, biologia tumoral, bem como para a manutenção da população de células-tronco tumorais, com reflexos diretos na resistência a fármacos, a nossa equipe dedica-se ao estudo da via Hedgehog (HH) em CEO, desde 2010.

Iniciamos os estudos do potencial terapêutico da via HH em 2016 avaliando, *in vitro*, a ação citotóxica e citostática de inibidores de SMO (Vismodegib e Itraconazol) em células de CEO. Observamos que a inibição farmacológica de SMO, *in vitro*, reduziu a expressão dos genes PTCH1, SMO e GLI1, indicando redução da atividade desta cascata sinalizadora, em 24h de tratamento. O vismodegib e o itraconazol foram capazes de reduzir a viabilidade e alterar a

morfologia das células de CEO, de maneira tempo e concentração-dependente, além de terem induzido a apoptose e aumentado a fragmentação do DNA (FREITAS, 2018).

Ainda que os resultados iniciais da equipe demonstrem o potencial terapêutico da via HH em CEO, há lacunas importantes para a geração de conhecimentos e avanço deste estudo. Sendo assim, o objetivo deste trabalho é avaliar a ação antitumoral de um inibidor de fator de transcrição da via Hedgehog (Composto X- não identificado neste projeto, pela viabilidade patentária para nova aplicação terapêutica), sobre a expressão gênica de componentes da via HH (PTCH1, GLI1, GLI2 e GLI3), proliferação e morte em células de CEO.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARCINOMA ESCAMOCELULAR ORAL

De acordo com a classificação de tumores da cavidade oral e orofaringe da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2017), o CEO é uma neoplasia derivada do epitélio escamoso estratificado da mucosa oral, de caráter invasivo e agressivo, com potencial de promover metástase precoce e com amplo envolvimento de linfonodos. Esta doença apresenta taxa de sobrevida global em 5 anos, menor que 50% (FRONIE et al., 2013; SAGGI et al., 2018), e acomete principalmente indivíduos adultos na faixa etária da 5ª a 6ª década de vida. A sua etiologia é multifatorial, sendo bem estabelecido que os principais fatores de risco são o tabaco e o álcool (FRONIE et al., 2013; ADRIEN et al., 2014; RIVERA, 2015; YESENSKY et al., 2018).

Clinicamente, o CEO apresenta-se como uma lesão nodular ulcerada de tamanhos variados, normalmente acometendo principalmente os sítios dos dois terços anteriores da língua, assoalho bucal e palato duro (BAGAN; SARRION; JIMENEZ, 2010; OMS, 2017). Inicialmente, as lesões apresentam-se assintomáticas ou com discretos sintomas, como incômodo e ardência. Entretanto, com a progressão da doença, os pacientes frequentemente apresentam intensa sintomatologia dolorosa, dificuldade ao falar, deglutir, mastigar, dentre outros sintomas (CHI; DAY; NEVILLE, 2015; MARKOPOULOS, 2012; OMS, 2017). É importante ressaltar que o diagnóstico precoce interfere diretamente no prognóstico da doença, desta forma o cirurgião-dentista deve sempre realizar um exame clínico criterioso, visto que o CEO pode evoluir a partir de distúrbios potencialmente malignos como a leucoplasia, eritroplasia e eritroleucoplasia, que consistem em alterações na mucosa oral de coloração branca, avermelhada ou com ambas as colorações, respectivamente (CHI; DAY; NEVILLE, 2015; MARKOPOULOS, 2012; VAN DER WAAL, 2009).

Embora os desfechos clínicos para pacientes CEO localmente avançado tenham melhorado significativamente ao longo dos anos, com abordagens de tratamento multimodal, o mesmo não pode ser considerado para pacientes que apresentam recidiva e / ou metástase à distância (CHUNG, et al., 2011). A alta morbidade e mortalidade da doença ocorre principalmente devido ao diagnóstico tardio, que contribui para um alto índice de casos metastáticos, ao conhecimento limitado sobre a biologia deste tumor e, conseqüentemente, desconhecimento de prováveis moléculas-alvo que possam direcionar estratégias terapêuticas mais eficazes para esta condição (DIAZ et al., 2003; FERLAY et al., 2015). Desta forma, compreender os processos biológicos de resistência ao tratamento e metástase é fundamental para uma intervenção bem-sucedida.

A principal forma de tratamento do CEO é a excisão cirúrgica, especialmente nos estágios iniciais desta condição. No entanto, a radioterapia e a quimioterapia são indicadas para casos avançados da doença, quando a cirurgia não é possível ou quando o tratamento cirúrgico traria sequelas funcionais importantes e complicadas para a reabilitação funcional e a qualidade de vida do paciente (HARTNER, 2018, INCA, 2019). Atualmente, há somente um esquema de quimioterapia combinada para os pacientes com carcinoma de células escamosas que acometem a região da cabeça e pescoço, aprovado pelo *Food and Drug Administration- USA*: DCT- Docetaxel, Cisplatina e 5-Fluouracil, com modesto impacto na sobrevida dos pacientes (<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/TPF>), associado a uma elevada toxicidade sistêmica e morte ao longo do tratamento (COHEN, 2014). Em trabalhos publicados pelo grupo francês que monitora estudos clínicos direcionados a quimioterapia para tumores de cabeça e pescoço, a indução da quimioradioterapia (prévia a cirurgia) só é adotada, atualmente, em caso de CEO inoperável, utilizando altas doses de cisplatina e, quando esta estratégia é comparada à radioterapia isolada, nota-se um aumento na sobrevida apenas deste grupo de pacientes (BLANCHARD et al., 2016). Por outro lado, o regime de quimioterapia adjuvante (com cisplatina e 5-FU) aumenta a sobrevida em torno de 6,5% (PIGNON et al., 2004).

Dentro deste contexto, como forma de tratamento mais direcionada e menos invasiva do CEO, na intenção de reduzir o impacto social, emocional e econômico frente à alta morbidade dos tratamentos cirúrgicos, novas abordagens terapêuticas têm sido estudadas, principalmente acerca da inibição de vias de sinalização que atuam no estágios iniciais, envolvendo a biologia tumoral de diversos tipos de câncer, com destaque para a via de sinalização embrionária Hedgehog, que está reativada em CEO e participa de forma efetiva na progressão deste tumor.

2.2. VIA DE SINALIZAÇÃO HEDGEHOG

Atualmente, já está bem estabelecido que a reativação de vias de sinalização embrionárias assume papel importante para a iniciação, biologia tumoral, bem como para a manutenção da população de células-tronco tumorais, com reflexos diretos na resistência a fármacos (GONNISSEN et al., 2015; KUREBAYASHI et al., 2017). Dentre estas vias de sinalização, destaca-se a via Hedgehog (HH), a qual está reativada em CEO (CAVICCHIOLI BUIM; GURGEL et al., 2011; CHUNG et al., 2011; FAN, et al., 2014; AGYEMAN et al., 2014; GONNISSEN, et al., 2015), assim como ocorre em carcinomas basocelulares (GOODRICH et al., 1997; HAHN et al., 1996), câncer de próstata (RUIZ I ALTABA, 2005), pulmão (WATKINS et al., 2003), mama, pâncreas, em câncer cervical e ovariano, além de também participar em casos de meduloblastoma e melanoma (GONNISSEN et al., 2015).

Recentemente, demonstramos que a via HH está ativada em células de CEO, utilizando qPCR. A expressão gênica dos componentes da via HH (SHH, PTCH1, SMO, SUFU, GLI1, GLI2 e GLI3) foi realizada nas linhagens de CEO, previamente, durante o trabalho de Mestrado da estudante Raíza Dias de Freitas (Figura 2). Os níveis de mRNA dos fatores de transcrição da família GLI (GLI1, GLI2 e GLI3) foram mais expressos nas linhagens HSC3 e SCC4.

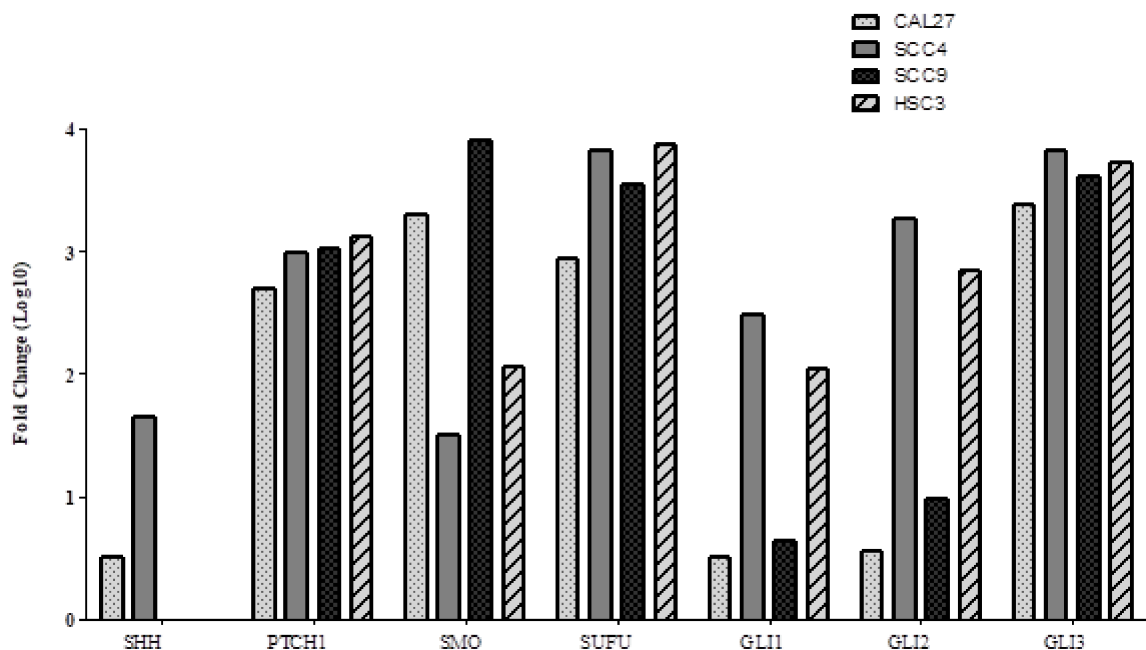


Figura 1. Perfil de expressão gênica dos componentes da via Hedgehog em células de CEO

A via HH compreende uma rede de sinalização complexa, altamente conservada evolutivamente, a qual orchestra passos-chave de múltiplos aspectos do desenvolvimento, incluindo padronização embrionária, morfogênese de órgãos e controle do crescimento pela regulação da proliferação, diferenciação e migração celular. As funções desta via dependem de alguns fatores importantes, a exemplo do tipo de célula, nicho e das condições extracelulares (NIEWIADOMSKI et al., 2019)

Sabe-se ainda, que a via HH já está ativada em estágios iniciais da carcinogênese oral (DIAS et al., 2015), contribuindo para eventos de angiogênese e proliferação celular (SALES et al., 2016, VALVERDE et al., 2016), inclusive através de ativação parácrina mediada por macrófagos CD163+ (fenótipo M2) (VALVERDE et al., 2016) e fibroblastos associados ao câncer (GUIMARÃES, 2018). Esta via atua tanto através da sinalização clássica ou canônica, quanto não-canônica. A ativação da sinalização canônica envolve três principais ligantes: Sonic Hedgehog (SHH), Desert Hedgehog (DHH) e Indian Hedgehog (IHH), além de dois receptores: Patched1 (PTCH1) e Smoothened (SMO) (HARDCASTLE et al., 1998). Estes ligantes são proteínas duplamente modificadas por lipídios, e podem ser secretadas localmente ou difundidas por longas distâncias. Em células de mamíferos, a maioria dos componentes da via HH está situada na proximidade do cílio primário - uma minúscula organela baseada em microtúbulos que funciona como uma antena celular específica e é indispensável para a sinalização de HH (NIEWIADOMSKI et al., 2019).

Desta forma, a ativação clássica da via HH ocorre quando existe a interação entre um dos ligantes HH e o receptor PTCH1, causando um acúmulo da proteína SMO na membrana ciliar aliada a exclusão de PTCH1 neste sítio, de modo a desencadear cascatas intracelulares que irão culminar na ativação de fatores de transcrição da família *Glioma-associated oncogene* (GLI), representada por três proteínas: GLI1, GLI2 e GLI3. A proteína GLI1 atua principalmente como ativador transcricional, participando na ativação de genes que favorecem a proliferação aberrante (ciclina D1 e D2, N-myc), sobrevivência (Bcl2) e manutenção da população de células tronco tumorais, enquanto GLI2 e GLI3 exibem funções ativadoras e repressoras. A localização ciliar de GLI2 no ápice é necessária para a sua ativação e sua translocação para o núcleo como um ativador da transcrição (NIEWIADOMSKI et al., 2019). Estas proteínas são membros da família de fatores do tipo Kruppel com domínios de ligação de DNA de dedo de zinco altamente conservados. (PO et al., 2010; STECCA; RUIZ I ALTABA, 2010; BENVENUTO et al., 2016; NIEWIADOMSKI et al., 2019).

Em condição normal de inativação da via, a atividade de SMO é bloqueada por PTCH1, enquanto GLI1 e GLI2 atuam como repressores de genes alvo HH. Aliado a isto, a inativação dos fatores de transcrição GLI é controlada pelo Supressor de Fusão (SUFU), um regulador negativo desta via, que restringe o GLI no citoplasma e promove sua associação com co-repressores transcricionais (NIEWIADOMSKI et al., 2019). Em contrapartida, a ativação "não-canônica" de HH ocorre de forma independente de ligante, podendo ser desencadeada a partir de inativação de PTCH (Tipo I) e/ou SMO (Tipo II), ou através de estimulação direta dos fatores transcricionais GLI através de "bypass" por outras vias de sinalização e independente dos sinais mediados pelo complexo PTCH/SMO (GONNISSEN et al., 2015). Além das mutações em componentes da via HH já identificados como principais desencadeadores tumorais, através da perda de função dos supressores de tumor PTCH e SUFU, ou ganho de mutações de função das proteínas SMO ou GLI, a ativação ou inibição anômala desta via em embriões constitui a principal causa de diversas desordens do desenvolvimento, como holoprosencefalia, síndrome de Greig, síndrome de Ellis van Creveld, síndrome de Pallister-Hall, neuropatia periférica, osteoartrite, neoplasia cartilaginosa e doenças neurodegenerativas (NIEWIADOMSKI et al., 2019).

Atualmente, o direcionamento da inibição da via de sinalização HH tem sido investigado *upstream*, principalmente com inibidores de SMO, em especial, ciclopamina, itraconazol e vismodegib (AMAKYE, JAGANI, DORSCH, 2013; KITAMOTO, et al., 2014; GONNISSEN, et al., 2015). No entanto, as características farmacocinéticas, como a citotoxicidade, baixa solubilidade e pouca estabilidade química destes fármacos frente às células de CEO e outros tumores, continuam sendo um desafio à utilização terapêutica destes. Aliado a isso, a resistência terapêutica contra inibidores de SMO já foi observada em pacientes com carcinoma basocelular (CBC) (NG, CURRAN, 2011; KUREBAYASHI, et al., 2017). Deste modo, o uso de inibidores HH visando a regulação da via *downstream*, em especial os fatores de transcrição da família GLI pode representar uma estratégia promissora e complementar aos inibidores SMO, já aprovados pela FDA (DESCH, et al., 2010). Somado a isto, a inibição *downstream* da via HH pode interferir em outras cascatas de sinalização envolvidas no câncer, como por exemplo, MAPK, PI3K, TGF β (GONNISSEN et al., 2015; KUREBAYASHI et al., 2017).

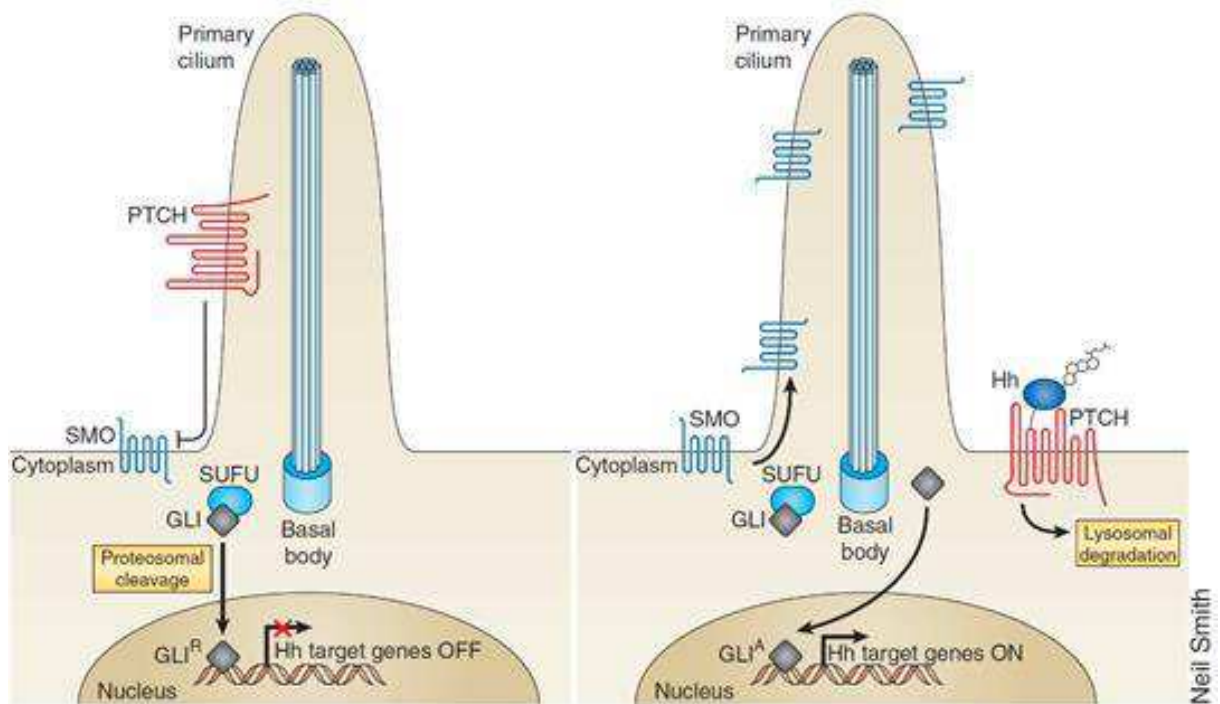


Figura 2. Esquema ilustrativo da via de sinalização Hedgehog (HH). Regulação da via Hedgehog (HH) no cílio primário de células com hiperativação da cascata sinalizadora. Na presença do ligante HH, os níveis da proteína GLI aumentam no cílio, GLI é transformada na sua forma ativa e translocada para o núcleo, onde ativará genes alvos da via Hh. A atividade da via HH pode ser inibida através de vários mecanismos, incluindo a ligação direta a SMO, modulação da translocação de SMO no cílio primário, inibição da interação ligante-receptor ou inibição de fatores de transcrição GLI. Fonte: AMAKYE et al., 2013.

2.3 GLI COMO ALVO DE INIBIÇÃO

A superexpressão de GLI1 foi primeiramente observada no glioma maligno, sendo então nomeado a partir deste tumor (CHUNG et al., 2011). Atualmente, diversos outros tumores apresentam a superexpressão deste gene, a exemplo do meduloblastoma, rhabdomyosarcoma, dos cânceres biliar, de próstata, mama, pulmão, cólon, bexiga e em carcinoma escamocelular de cabeça e pescoço (CHUNG et al., 2011; AGYEMAN et al., 2014). Além disso, a maior expressão de GLI1 está associada a tumores mais avançados, e principalmente a casos metastáticos. (GONNISEN et al., 2015; AGYEMAN et al., 2015).

Sabe-se que GLI1, 2 e 3 são domínios de proteínas de dedo de zinco (ZF), um dos motivos de ligação ao DNA mais comuns em fatores de transcrição eucarióticos. (LAUTH et al., 2007). Enquanto a sequência do domínio ZF é altamente conservada entre as três proteínas GLI, a composição diferente dos domínios N-terminal e C-terminal determinam os papéis especializados de cada proteína. Desta forma, GLI1 não possui o domínio repressor e, portanto,

atua exclusivamente como um ativador transcricional, GLI2 tem um domínio repressor e dois domínios ativadores e pode, em princípio, funcionar como um repressor e um ativador, mas na prática ele atua ativando principalmente a transcrição de genes alvo, enquanto GLI3 é um repressor de transcrição, e sua deleção resulta, na maioria dos casos, em fenótipos de ganho de função da sinalização HH (NIEWIADOMSKI et al., 2019). É importante ressaltar que GLI1 tipicamente não é expresso em células em repouso e é produzido somente após estimulação da via HH via GLI2 e GLI3. Portanto, na via canônica HH, o nível de transcrição dos genes alvo de Hh é largamente determinado pelo balanço entre o ativador GLI2 e o repressor GLI3 (GONNISSEN et al., 2015; NIEWIADOMSKI et al., 2019).

Atualmente, apenas alguns inibidores de GLI foram descritos e estão sendo estudados, tanto de origem sintética, como derivados de produtos naturais (MAS; ATALBA; 2010). A abordagem terapêutica frente aos níveis de GLI1/2 pode ser direcionada através de quatro mecanismos: inibição do processamento de GLI e seu tráfego (modificações pós-traducionais), da inibição da ligação de GLI-DNA, da inibição de produção transcricional, e através da inibição indireta. (GONNISSEN et al., 2015; BENVENUTO et al., 2016). A inibição da atividade transcricional de GLI pode ocorrer por diversos mecanismos, por exemplo, através do aumento do processamento proteossomal em suas formas repressoras, da diminuição do processamento em ativadores transcricionais e da redução do tráfego das proteínas GLI. Diferentemente de GLI2 e GLI3, o GLI1 não é clivado a uma forma repressora, mas será degradado pelo sistema ubiquitina-proteassoma (UPS). Desta forma, direcionar a estratégia terapêutica para a inibição do acúmulo das proteínas GLI também pode representar uma abordagem antitumoral promissora (GONNISSEN et al., 2015).

Dentro desse contexto, o inibidor de GLI, composto sintético, derivado de hexahidropirimidina, denominado neste projeto como “composto X”, se destaca por apresentar idêntico acoplamento à proteína GLI, bem como ao complexo GLI-DNA (GONNISSEN et al., 2015). Deste modo, foi visto por meio de modelagem computacional, que a atuação do composto X se dá a nível nuclear e o seu modo de ligação aos fatores de transcrição GLI ocorre através da ligação ao GLI1, em estreita proximidade, mas independente da região de ligação ao DNA. Mutações nos sítios de ligação do composto X resultam em uma inibição significativa da ligação entre o inibidor e GLI1, confirmando a interação entre as duas moléculas. (AGYEMAN et al., 2014; GONNISSEN, et al., 2015).

O composto X atua inibindo muitas das “marcas clássicas do câncer”, como viabilidade celular, proliferação, apoptose, reparo do dano ao DNA, transição epitélio-mesenquimal

(TEM), autofagia, células-tronco cancerígenas e resposta imune (GONNISSEN et al., 2015). Alguns autores já demonstraram que o composto X é capaz de diminuir de forma significativa a expressão gênica e proteica dos genes alvo GLI1 e PTCH1, bem como a produção transcricional através de ensaios inventoriados de GLI em múltiplos tipos de células cancerosas (LAUTH et al., 2007; DESCH et al., 2010; MECHLIN et al., 2010; WICKSTROM et al., 2014; YOU et al., 2014; KUREBAYASHI, et al., 2017).

Não é de nosso conhecimento, atualmente, grupos de pesquisas dedicados ao estudo do potencial terapêutico do inibidor de GLI em CEO, e embora os resultados iniciais da equipe têm demonstrado o potencial terapêutico da via HH em CEO, há lacunas importantes para a geração de conhecimentos e avanços deste campo de pesquisa. Desta forma, diante da hipótese de que a atividade da cascata HH ocorre preferencialmente em células-tronco tumorais e que o bloqueio de GLI-1, apresenta uma ação antitumoral mais efetiva, o objetivo deste trabalho consiste em avaliar a ação antitumoral do composto X sobre a expressão de genes da via HH, proliferação e morte em células de CEO.

3 HIPÓTESE

O inibidor farmacológico (composto X) interfere na expressão gênica dos componentes da via HH (PTCH1, GLI1, GLI2 e GLI3), exerce efeitos inibitórios na viabilidade celular e promove morte celular em células de CEO.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Estudar os efeitos do “composto X” sobre a expressão gênica de componentes da via HH, proliferação e morte em células de CEO.

4.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos do “composto X” sobre a viabilidade celular em células tumorais e não-tumorais;
- Analisar a expressão dos componentes da via HH (PTCH1, GLI1, GLI2 e GLI3) após o tratamento com diferentes concentrações do “composto X” em células HSC3;
- Estudar os efeitos do “composto X” sobre a viabilidade, ciclo celular e padrão de morte em células HSC3.

5 METODOLOGIA

5.1 Caracterização do estudo

Trata-se de um estudo *in vitro*, experimental e analítico.

5.2 Obtenção e manutenção das células em cultura

Para a realização deste estudo, a linhagem HSC3 de CEO (ATCC, Manassas, VA, EUA) foi utilizada. As células HSC3 foram cultivadas em garrafas para cultura de células (75 cm³, volume de 250 mL), em meio DMEM (Gibco[®], Life Technologies), suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco[®], Life Technologies) e 50 µg/mL de gentamicina (Novafarma, Anápolis, GO, BRA), e foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. A dissociação das células com tripsinização foi realizada sempre que o crescimento celular atingiu a confluência necessária, ou seja, preencheu 70 a 80% do volume total da garrafa de cultura. Além da linhagem tumoral HSC3, células tumorais de outros tipos histológicos e células não-tumorais também foram utilizadas para avaliar o potencial citotóxico do inibidor de GLI1 através do ensaio do Alamar Blue (Tabela 1).

Tabela 1. Células tumorais e não-tumorais humanas utilizadas no ensaio de citotoxicidade

Célula	Tipo histológico	Fonte
CAL 27	Carcinoma escamocelular oral	Centro Antoine Lacassagne Laboratório de Bio-Oncologia Nice – França
HSC3	Carcinoma escamocelular oral	Banco de Recursos para Pesquisa em Ciências da Saúde do Japão
SCC4, SCC9, SCC15 e SCC25	Carcinoma escamocelular oral	Instituto de Câncer Sidney Farber, Divisão de Crescimento e Regulação Celular e Departamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina de Harvard
HepG2	Carcinoma hepatocelular	Instituto de Anatomia e Biologia Wistar, Filadélfia, Pensilvânia
HL-60	Leucemia promielocítica aguda	Hospital Pediátrico de Mercy – EUA
K562	Leucemia mielogênica crônica	Laboratórios de Citogenética e Fisiopatologia Esplênica, Centro de Pesquisa e Hospital da Universidade de Tennessee
AGP01	Adenocarcinoma gástrico peritoneal	Universidade Federal do Pará – Brasil
ACP02	Adenocarcinoma gástrico	Universidade Federal do Pará – Brasil
ACP03	Adenocarcinoma gástrico	Universidade Federal do Pará – Brasil
HT-29	Adenocarcinoma de cólon	Instituto Sloan Kettering – EUA
HCT-116	Carcinoma de cólon	Departamento de Bioquímica da Universidade do Alabama – EUA
CAF1	Fibroblasto associado ao câncer de boca (célula primária)	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Campinas - UNICAMP/Piracicaba
CAF2	Fibroblasto associado ao câncer de boca (célula primária)	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Campinas - UNICAMP/Piracicaba
NOF	Fibroblasto normal de boca (célula primária)	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Campinas - UNICAMP/Piracicaba
HaCaT	Queratinócitos normais imortalizados não transformados	Divisão de Diferenciação e Carcinogênese <i>in vitro</i> , Instituto de Bioquímica, Centro de Pesquisa em Câncer, Alemanha

5.3 Obtenção de PBMC

As células mononucleares (linfócitos e monócitos) humanas de sangue periférico – PBMC (do inglês *peripheral blood mononuclear cell*) foram obtidas a partir de sangue periférico de voluntários saudáveis, não fumantes, com idade variando entre 25 – 35 anos, que não haviam utilizado qualquer tipo de droga ou medicamento durante, pelo menos, 15 dias antes da coleta. O comitê de ética em pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz (Salvador, Bahia, Brasil) aprovou o protocolo experimental (nº 031019/2013). Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido para participação do estudo. A coleta do sangue foi realizada em frasco heparinizado por profissionais capacitados no Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (IGM, Fiocruz, Bahia), utilizando seringas esterilizadas e descartáveis com volume de 5 mL.

O PBMC foi isolado por protocolo padrão, utilizando um gradiente de densidade com uso de Ficoll (Ficoll-Paque Plus, GE Helthcare Bio-Sciences AB, Suécia). Após a separação, as células foram lavadas duas vezes com solução salina, ressuspensas ($0,3 \times 10^6$ células/mL) em meio RPMI 1640 (Gibco®) suplementado com 20% de SFB, 2 mM de glutamina e 50 µg/mL de gentamicina. Para induzir a divisão celular de linfócitos T, 10 µg/mL de concanavalina A (ConA, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA) foi utilizada como agente mitógeno.

5.4 Obtenção de fibroblastos associados ao câncer, meio condicionado por FACs e fibroblastos normais

Duas populações de fibroblastos associados ao câncer (CAF1 e CAF2) foram obtidas a partir de fragmentos de carcinoma escamocelular de língua que foram removidos de pacientes e divididos em duas partes: uma secção foi fixada em formol e embebida em parafina para posterior coloração com hematoxilina-eosina e imuno-histoquímica para o anticorpo α -SMA; outro fragmento foi lavado com PBS e incubado em meio DMEM suplementado com 10% de soro de SFB e antibiótico, a 4°C.

Posteriormente, o espécime seguiu para lavagem com PBS, fragmentação e incubação em frascos de cultura de células de 25cm² contendo 1ml de meio DMEM suplementado com 10% de soro de SFB e antibiótico, mantidos em estufa a 37°C e 5% de CO₂. O crescimento celular foi monitorado diariamente e o meio substituído a cada 2-3 dias. Quando as células atingiram determinada confluência, foram tripsinizadas, propagadas e caracterizadas como fibroblastos ou miofibroblastos por imunocitoquímica, citometria de fluxo e análise de Western

Blot. Ainda, como marcador de atividade de miofibroblasto, a produção de colágeno de tipo I foi avaliada por ELISA. No presente estudo, foram utilizadas essas duas populações primárias de FACs (CAF1 e CAF2) por, no máximo, 12 passagens. A manutenção do fenótipo de FAC foi avaliada a cada 2 passagens, através da marcação imunocitoquímica para o anticorpo α -SMA. Para o preparo do meio condicionado (MC) por FAC, os fibroblastos foram mantidos em cultura até atingir uma confluência de 70-80%; em seguida, a garrafa de cultura foi lavada com salina, no intuito de remover resíduos de SFB e então foi colocado meio DMEM sem soro, por 72 horas. Após esse período, o meio foi coletado, centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm para remoção de debris celulares e armazenado em alíquotas de 1 mL, em temperatura de -80°C .

Para uma análise comparativa, foi utilizada cultura primária de fibroblastos normais de boca (NOF), isolados a partir de fragmentos de gengiva de paciente saudável, utilizando a mesma técnica descrita anteriormente para os FACs, na Faculdade de Odontologia da UNICAMP, e cedida pelo Prof. Ricardo Della Coletta. Essas foram mantidas em cultura, por até 15 passagens.

5.5 Ensaio do Alamar blue para avaliação da citotoxicidade do inibidor de GLI

Para avaliar a citotoxicidade composto-X em células tumorais e não tumorais (NOF, HaCaT, PBMC), o ensaio do alamar blue foi realizado após 72 horas de exposição aos compostos. O alamar blue é um ensaio colorimétrico e fluorimétrico que avalia a viabilidade celular através da capacidade de redução da resazurina em resofurina por células metabolicamente viáveis. Neste ensaio, todas as células listadas na tabela 1 foram utilizadas. As células tumorais foram distribuídas em placas de 96 cavidades numa densidade de 7×10^4 células/mL, para células aderidas, e 3×10^5 células/mL, para células em suspensão, em um volume de 100 μL . O composto-teste (0,19 a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), dissolvido em DMSO, foi adicionado em cada poço e incubado por 72 horas. A doxorubicina (Laboratory IMA S.A.I.C., Buenos Aires, Argentina) e 5-Fluorouracil (5-FU, Sigma-Aldrich, USA) foram utilizados como controles positivos, com concentrações variando de 0,03 a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As células tratadas com o veículo (DMSO 0,5%) usado para diluir as substâncias testes foram utilizadas como controle negativo. Antes do final do período de incubação (4 h para linhagens celulares e 24 h para PBMC), 20 μL da solução estoque (0,312 mg/mL) de alamar blue (resazurina, Sigma-Aldrich) foram adicionados a cada poço. As absorbâncias foram mensuradas nos comprimentos de onda de 570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado) utilizando leitora de placas Spectra Max 190, HexiS.

A viabilidade celular foi calculada utilizando a seguinte fórmula: $\text{viabilidade} = \text{ALW} - (\text{AHW} \times \text{R0})$. Onde, ALW e AHW são as absorbâncias no menor e maior comprimento de onda, respectivamente. O R0 foi calculado utilizando a seguinte fórmula: $\text{R0} = \text{AOLW} / \text{AOHW}$. Onde, AOLW e AOHW são as absorbâncias do meio adicionado ao alamar blue subtraído das absorbâncias do meio isolado nos comprimentos de onda menor e maior, respectivamente. A substância foi testada em diluição seriada, em duplicata ou triplicata. A porcentagem de inibição foi calculada por comparação com o controle e registrada a porcentagem de inibição x log da concentração e determinado suas CI_{50} (concentração inibitória de 50%) realizado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

5.6 Avaliação da expressão das proteínas relacionadas à via HH por imunofluorescência

As células da linhagem HSC3 foram submetidas à reação de imunofluorescência para os anticorpos contra as proteínas relacionadas à via HH (SHH, PTCH1, SMO e GLI1). Para esta técnica, as células foram cultivadas sobre lamínula específica para células (CellVIEW™), sem a presença de soro fetal bovino e sem permitir a confluência celular, de modo a facilitar a análise das proteínas. As lâminas foram lavadas em PBS 1x estéril pH 7.2 e fixadas por 10 minutos em acetona/metanol gelado. Após as lavagens, as lâminas seguiram para a fase de bloqueio de sítio inespecífico, onde foram incubadas em solução de PBS 1x + BSA a 1% por 30 minutos e, em seguida, 4 lavagens com PBS. Foram utilizados os seguintes anticorpos primários: policlonal de camundongo contra Sonic Hedgehog (1:500, Novus Biologicals), policlonal de coelho contra Gli1 (1:500, Novus), policlonal de coelho contra Patched (1:500, Novus) e policlonal de coelho contra Smoothed (1:1000, Abcam) diluído em PBS/BSA 1%. Os anticorpos primários foram diluídos em PBS/BSA a 1% nas concentrações e tempo segundo orientações dos fabricantes. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas novamente com PBS. Decorrido o tempo de incubação do anticorpo primário, as células foram lavadas 3 vezes com PBS, e incubadas com o anticorpo secundário, uma IgG de camundongo contra coelho ou contra camundongo conjugado à fluoresceína (FITC) diluído em PBS na proporção de 1:1000, sob agitação lenta, por 1 h à temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, os núcleos das células foram corados com o agente intercalante de DNA fluorescente 4',6-diamidino-2-phenilindol diidroclorido (DAPI, Molecular Probes, Eugene, OR) (5µg/mL) durante 10 minutos à temperatura ambiente. As células foram então lavadas com PBS, e com o auxílio de microscópio de inversão (Leica DMI8, Wetzlar, Germany), as alterações morfológicas foram

avaliadas e fotografadas utilizando o software Leica Application Suite X (XLAS X, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Para todas as reações, os controles negativos foram realizados seguindo os mesmos procedimentos, com exceção da incubação com o anticorpo primário.

5.7 Expressão dos componentes da via HH por Western Blot

As células foram lavadas com PBS e o tampão de células de lise celular foi realizada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4 contendo Triton X-100 a 1%, NaCl 150 mM, EGTA 0,5 mM, EDTA 0,5 mM e cocktail anti-protease (Complete Pro- inibidor Cocktail Tablets, Roche, França). Os extratos protéicos (50 µg) foram separados por SDS-PAGE e transferidos para membranas de nitrocelulose Hybond-C Extra (GE Healthcare, EUA). Os seguintes anticorpos foram utilizados para westernblot: policlonal de camundongo contra Sonic Hedgehog (1:500, Novus), policlonal de coelho contra Gli1 (1:500, Novus), policlonal de coelho contra Patched (1:500, Novus) e policlonal de coelho contra Smoothened (1:1000, Abcam). Os anticorpos secundários foram IgG anti-rato (Santa Cruz Biotecnologia, 1: 10.000), IgG anti-coelho (GE Health- 1: 10.000). A detecção do sinal foi realizada com o Sistema de detecção de quimioluminescência ECL + (PerkinElmer, França).

5.8 Expressão dos componentes da via HH após tratamento com os inibidores

5.8.1 Isolamento de RNA total e transcrição reversa (RT-PCR)

Para isolamento do RNA total, as células HSC3 foram plaqueadas em placas de 6 poços em uma densidade de $0,7 \times 10^5$ células/ml, em um volume de 5 mL por poço e incubadas *overnight*. Em seguida, as células foram tratadas por 12 horas com o inibidor de GLI nas duas concentrações (18 e 36 μ L).

Todos os experimentos foram realizados em condições DNase/RNase free. Para o procedimento de extração de RNA, foram utilizadas microcolunas de sílica- Rneasy Plus Mini Kit (QIAGEN). O sobrenadante de células foi aspirado e, em seguida, 600 μ L do tampão de lise RLT foi transferido para o *pellet* e a amostra foi misturada durante 1 min, com auxílio do vórtex. Em seguida, o lisado foi transferido para a microcoluna contendo Dnase, a fim de eliminar o DNA genômico. Em seguida, foi adicionado 600 μ L de etanol 70% e o mesmo misturado gentilmente a amostra, com auxílio de pipeta. Após a passagem por nova microcoluna de sílica, lavagens com tampões do kit (RW1 e RPE), o RNA foi eluído com 20 μ L de água Rnase/DnaseFree pH 7.4 e armazenado em temperatura de -80°C . Esta etapa ocorreu antes e após o tratamento das culturas com o inibidor de GLI.

A quantidade e pureza do RNA extraído de cada amostra foi analisada em aparelho de espectrofotômetro NanoDrop® 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). A transcrição reversa foi realizada com a enzima transcriptase Superscript VILO™ (Invitrogen Corporation, USA) e as amostras de cDNA armazenadas em temperatura de -20°C .

5.8.2 Determinação da atividade da via HH

A expressão de componentes da via HH foi avaliada através de reações de qPCR, utilizando TaqMan Gene Expression Assays™ inventoriados para os genes PTCH1 (Hs00181117_m1), GLI1 (Hs01110766_m1), GLI2 (hs01119974_m1), GLI3 (hs00609233_m1), assim como para o gene referência B2M (Hs99999907_m1). As reações foram conduzidas no aparelho ABI ViiA7 Fast (Applied Biosystems™, Foster City, CA), utilizando placa de 96 poços e com um volume total de 20 μ L. Cada um dos poços possuía: 2,5ng/ μ L de cDNA da amostra (4 μ L), 1 μ L de Assay (Applied Biosystems™, Foster City, CA), 10 μ L de Taqman PCR Master Mix Kit (Applied Biosystems™, Foster City, CA) e 5 μ L de água livre de RNase.

Após as corridas de amplificação e dissociação, os valores de *Quantification Cycles* (Cqs) foram obtidos com o auxílio do Programa Operacional ViiA7™ *System* (Applied Biosystems, USA). Para quantificação relativa foi utilizado o método comparativo de Cq ($\Delta\Delta CQ$) (Livak, Schmittgen, 2001). O valor de Cq de cada amostra foi normalizado utilizando o gene referência B2M e calibrado segundo os valores de Cq obtidos para o grupo de células HSC3 sem tratamento (HSC3 ST). As reações de qPCR foram realizadas nas células tratadas e não tratadas com o composto X.

5.9 Avaliação dos efeitos do composto X sobre a viabilidade, ciclo celular e padrão de morte em células HSC3

Para estudar os efeitos do composto X sobre a viabilidade, ciclo celular e padrão de morte em células HSC3, 4 mL de uma solução de células ($0,7 \times 10^5$ células/mL) foram inseridos em placas de 6 poços e incubados *overnight* para permitir a adesão das células na placa. As células foram tratadas por 24, 48 e 72 horas com o composto X (18 e 36 μM). A avaliação dos efeitos do composto X sobre o ciclo celular em células HSC3 também foi realizada após 12 horas de tratamento. As concentrações utilizadas foram baseadas no valor de CI_{50} obtido para este composto nessa linhagem celular. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2%) usado para diluir as substâncias teste e o 5-fluorouracil (5-FU, 17 μM) foi utilizado como controle positivo. Os experimentos foram realizados em duplicatas e repetidos pelo menos três vezes. O monitoramento da viabilidade celular foi determinado pelo método de exclusão de azul de tripan, onde uma alíquota de 90 μL foi recolhida após o período de incubação, corada com 10 μL o azul de tripan e contadas utilizando a câmera de Neubauer, por meio de microscópio óptico (Olympus CX41).

5.9.1 Determinação do ciclo celular e fragmentação do DNA internucleossomal

A determinação do conteúdo de DNA nuclear da célula, que reflete as fases do ciclo celular, foi avaliado por citometria de fluxo, utilizando o IP (iodeto de propídio) como agente fluorógeno. Decorridos os períodos de tratamento com os compostos, o sobrenadante foi coletado, os poços foram lavados com solução salina, as células foram tripsinizadas e centrifugadas (295 xG/ 5 minutos) juntamente com o sobrenadante. As células foram diluídas com a solução de permeabilização (200 μL) contendo 0,1 % de triton X-100, 0,1% de citrato de sódio e 2 $\mu g/mL$ de IP e 100 $\mu g/mL$ de RNase em água destilada, na ausência de luz e a

temperatura ambiente. Após 30 minutos, as células foram adquiridas e analisadas em citômetro de fluxo BD LSRFortessa através do software BD FACSDiva versão 6.2 (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, EUA). As proporções de DNA internucleossomal fragmentado e as fases do ciclo celular foram obtidas utilizando o software Flowjo, versão 10 (Flowjo LCC, Ashland, OR, EUA). Os debris celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

5.9.2 Determinação da externalização de fosfatidilserina

Após o tratamento com o composto X, as células foram marcadas com anexina V-FITC e IP para determinar a viabilidade celular (viável, apoptose inicial, apoptose tardia e necrose), de acordo com o protocolo do fabricante (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, EUA). As células foram tripsinizadas, lavadas duas vezes com solução salina e em seguida, ressuspendidas numa solução de 100 μ L do tampão de ligação, 5 μ L de IP e 5 μ L de anexina V-FITC. Após 15 minutos de incubação em isopor com gelo, na ausência de luminosidade, 400 μ L de tampão de ligação foram adicionados a cada amostra. As células foram adquiridas e analisadas no citômetro de fluxo BD LSRFortessa através do software BD FACSDiva versão 6.2 (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, EUA). A proporção de células em apoptose foi determinada pela porcentagem de anexina quantificada utilizando o programa FlowJo, versão 10 (Flowjo LCC, Ashland, OR, EUA). Os debris celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

5.9.3 Análise morfológica por citometria de fluxo

Para a realização da análise morfológica, as células HSC3 foram avaliadas por citometria de fluxo através dos parâmetros FSC (tamanho/volume) e SSC (granulosidade). As células foram adquiridas e analisadas no citômetro de fluxo BD LSRFortessa através do software BD FACSDiva versão 6.2 (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, EUA). Os debris celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

5.10 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram compilados no programa GraphPad Prism versão 6.03 (*GraphPad Software, Inc., San Diego, USA*). Os dados foram analisados segundo a distribuição na curva normal de Gauss. Os valores de CI_{50} foram obtidos através de regressão não linear, a

partir de três experimentos independentes realizados em duplicata. A diferença entre os grupos dos ensaios *in vitro* foi avaliada pelo teste ANOVA (análise de variância) seguida do teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). A análise estatística deste estudo considerou como nível de significância o valor de “p” correspondente a alfa (α) menor ou igual a 5%.

Em relação à análise do qPCR, após as corridas de amplificação e dissociação, os valores de quantificação relativa (QR) serão obtidos com o auxílio do programa *Gene Expression Suite*TM (Applied Biosystems, USA) em comparação com o calibrador (células tratadas com o controle negativo DMSO 0,2%, QR = 1,0), de acordo com o método comparativo de Cq ($\Delta\Delta Cq$). (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001)

6 RESULTADOS

6.1 Avaliação das proteínas Hedgehog em células HSC3

As proteínas estudadas foram analisadas em relação à presença e a localização da marcação em DAPI, bem como a população positiva em relação a negativa, por campo microscópico. Os resultados demonstram a presença, em citoplasma, de todos os componentes básicos da via HH (SHH, PTCH, SMO e GLI1) em células HSC3, bem como marcação nuclear da proteína GLI1 (Figura 3A). Além disso, os resultados do Western Blot confirmaram a presença destas proteínas Hedgehog em células HSC3 (Figura 3B).

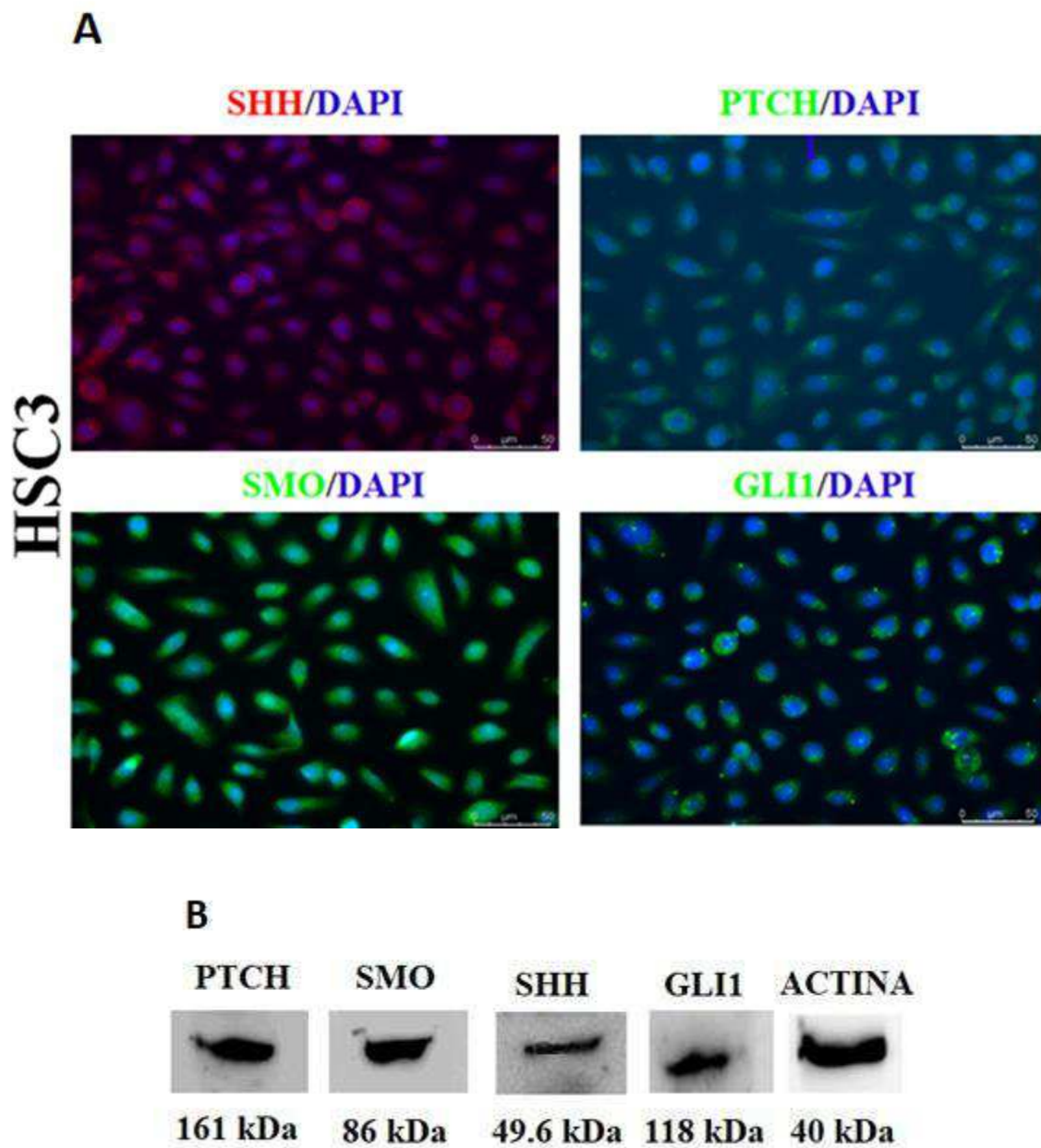


Figura 3. Avaliação das proteínas Hedgehog (SHH, PTCH, SMO e GLI1) em células HSC3 por imunofluorescência (A) e Western Blot (B). A actina foi utilizada como controle endógeno do ensaio de Western Blot.

6.2 Atividade citotóxica do inibidor de GLI1

O estudo da atividade citotóxica do inibidor de GLI1 foi realizado em diferentes linhagens de células tumorais humanas utilizando o ensaio do alamar blue, após 72 horas de incubação. Para análise comparativa, a atividade citotóxica também foi avaliada em células não tumorais (NOF, HaCaT e PBMC). A Tabela 2 apresenta os resultados encontrados. O composto X apresentou citotoxicidade com valores de CI_{50} que variaram de 36 a 110,6 μM para as linhagens HSC3 e SCC4 respectivamente. O 5-FU, utilizado como controle positivo, também apresentou atividade citotóxica, com valores de CI_{50} que variaram de 1,3 μM a 143,2 μM para as linhagens HepG2 e SCC9 respectivamente, a linhagem HSC3 apresentou CI_{50} de 17 μM .

A célula HSC3 apresentou uma maior sensibilidade ao tratamento com o composto X do que as outras células de CEO, além disso, esta célula apresentou uma maior expressão gênica dos fatores de transcrição GLI (GLI1, GLI2 e GLI3). Diante disso, a linhagem HSC3 foi escolhida para os próximos ensaios *in vitro* para uma melhor avaliação dos efeitos do composto X sobre a expressão de genes da via HH, proliferação e morte celular.

Tabela 2. Atividade citotóxica do inibidor de GLI em células tumorais e não-tumorais.

Células	Doxorrubicina	5-FU	Composto X
Células tumorais			
CAL 27	3,09 2,22 - 4,3	30,8 13,6 - 70	>116
HSC 3	0,34 0,09 - 1,21	16,75 10,53 - 26,67	35,9 24,86 - 51,9
SCC 4	0,07 0,05- 0,09	N.d.	110,6 77,46 - 157,89
SCC 9	0,8 0,25 - 2,31	143,2 82,02 - 250,1	83,49 27,3 - 255,1
SCC 15	1,5 0,77 - 2,88	N.d.	72,74 36,68 - 144,27
SCC 25	1,4 0,61 - 2,92	N.d.	53,3 34,53 - 82,19
HepG2	0,01 0,01 - 0,73	1,3 0,23 - 6,07	>116
HL60	0,01 0,01 - 0,05	12,6 9,53 - 16,68	>116
K562	0,05 0,04 - 0,09	18,14 9,76 - 33,51	>116
AGP01	1,89 0,82 - 4,3	N.d.	>116
APC02	6,8 1,03 - 44,72	N.d.	>116
APC03	2,3 0,93 - 5,88	N.d.	>116
HT-29	0,3 0,26 - 0,44	N.d.	>116
HCT-116	0,2 0,12 - 0,42	4,07 1,92 - 8,45	>116
Fibroblastos associados ao câncer			
CAF 1	N.d.	>192	3,67 0,48 - 27,65
CAF 2	N.d.	>192	71,46 13,12 - 388,5
Células não tumorais			
NOF	N.d.	39,59 12,3 - 123,4	>116
HaCat	0,1 0,01 - 0,55	N.d.	35,14 18,27 - 67,59
PBMC	5,2 2,55 - 10,43	>192	87,54 34,66 - 221

Dados apresentados como valores de CI_{50} em μM e intervalo de confiança de 95% obtidos por regressão não linear de três experimentos independentes realizados em duplicata, pelo ensaio de alamar blue, após 72 horas de incubação. N.d. Não determinado.

6.3 Efeitos do inibidor de GLI sobre a expressão gênica de componentes da via HH em células HSC3

A expressão gênica dos componentes da via HH (PTCH1, GLI1, GLI2 e GLI3), foi avaliada através de qPCR na linhagem HSC3 de CEO após tratamento de 12 horas com o composto X, nas duas concentrações (18 e 36 μM). Foi possível observar, na maior concentração do composto-teste, redução estatisticamente significativa dos níveis de mRNA do fator de transcrição GLI1, quando comparado ao controle negativo DMSO. Houve redução dos níveis de mRNA dos demais genes avaliados em todas as concentrações testadas, com exceção ao nível de mRNA do gene PTCH1 na concentração de 18 μM , embora não tenha sido observada diferença estatística (Figura 4).

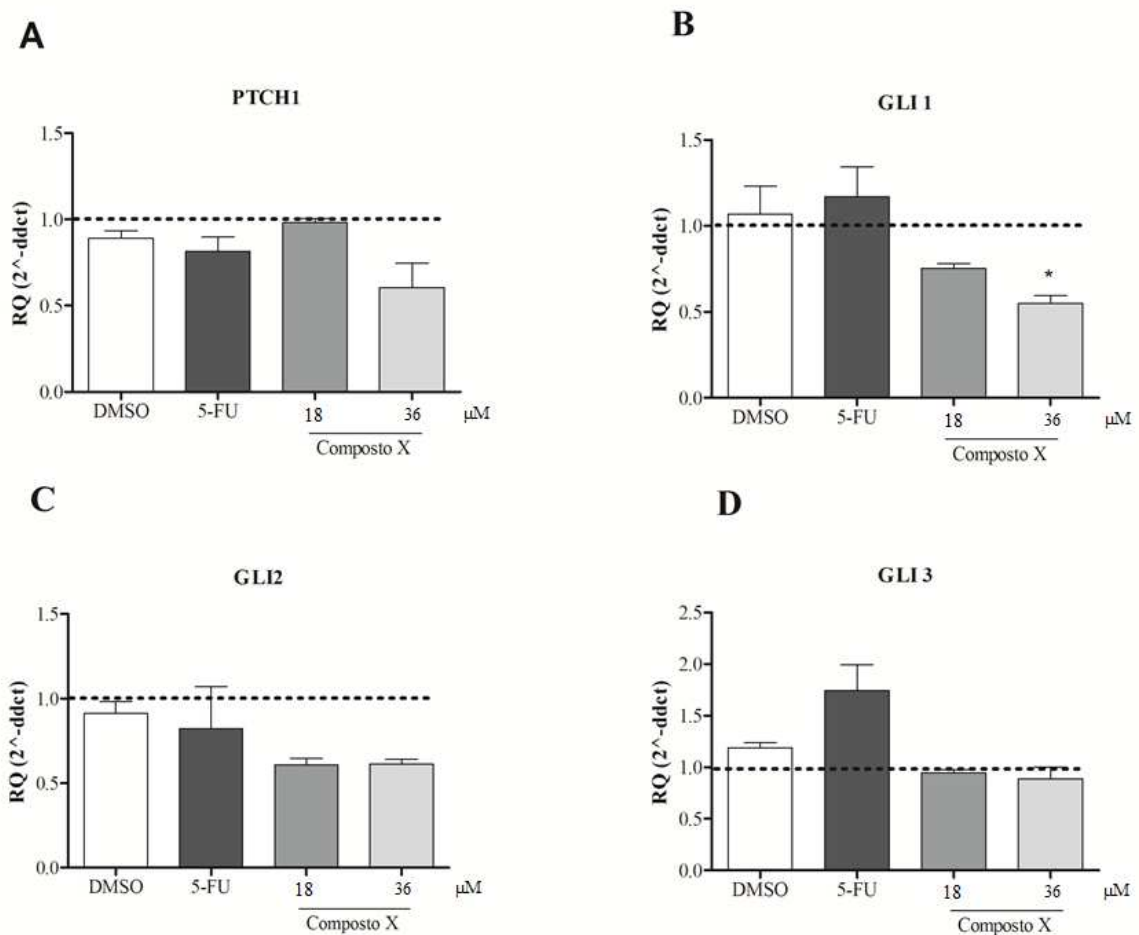


Figura 4. Expressão gênica dos componentes da via HH, PTCH1, GLI1,2 e 3 após 12 horas de tratamento com o composto X (18 e 36 μM). O controle negativo foi tratado com DMSO (0,2%), utilizado para solubilizar e diluir as substâncias teste. O 5-FU (17 μM) foi utilizado como controle positivo. O valor de Cq de cada amostra foi normalizado utilizando o gene referência B2M e calibrado segundo os valores de Cq obtidos para o grupo de células HSC3 sem tratamento (HSC3 ST). As reações de qPCR foram realizadas nas células tratadas e não tratadas com o composto X.

6.4 Efeitos do inibidor de GLI sobre a viabilidade de células HSC3

A confirmação dos efeitos do composto X sobre a viabilidade de células HSC3 foi realizada através do ensaio de exclusão por azul de tripan (figura 5). Os resultados demonstraram que o tratamento com o composto, nas concentrações testadas (18 μ M e 36 μ M), reduziu significativamente a viabilidade celular das células HSC3, através da redução do número de células viáveis quando comparado com o controle negativo (CTL, DMSO 0,2%), após 24, 48 e 72 horas de exposição. O 5-FU, utilizado como controle positivo (17 μ M), foi capaz de reduzir o número de células viáveis a partir de 24 horas de tratamento. Em relação ao número de células não viáveis, não houve diferenças significativas entre os grupos.

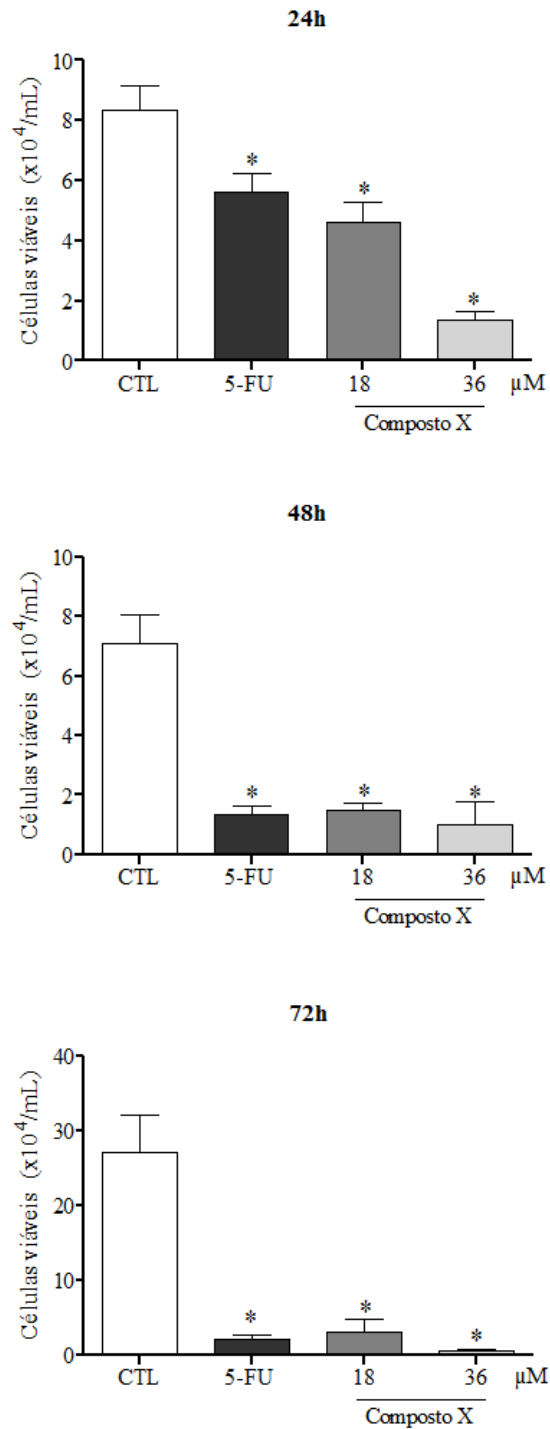


Figura 5. Efeito do composto X sobre a viabilidade de células HSC3, determinado pelo ensaio de exclusão de azul de tripan após 24h, 48h e 72h de tratamento. O controle negativo foi tratado com DMSO (0,2%), utilizado para solubilizar e diluir as substâncias teste. O 5-FU (17 μ M) foi utilizado como controle positivo. Os valores correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

6.5 Efeitos do inibidor de GLI sobre a morfologia das células HSC3

A análise morfológica foi avaliada por citometria de fluxo. O tratamento de células HSC3 com o composto X (18 μ M e 36 μ M) causou encolhimento celular, observado pelo decréscimo da dispersão luminosa para frente (FSC) e condensação nuclear, como observado por um aumento na dispersão lateral (SSC) (Figura 6). O 5-FU, utilizado como controle positivo, também causou alterações condizentes com mecanismos apoptóticos de morte. Conforme demonstrado, os efeitos na morfologia foram concentração e tempo dependente.

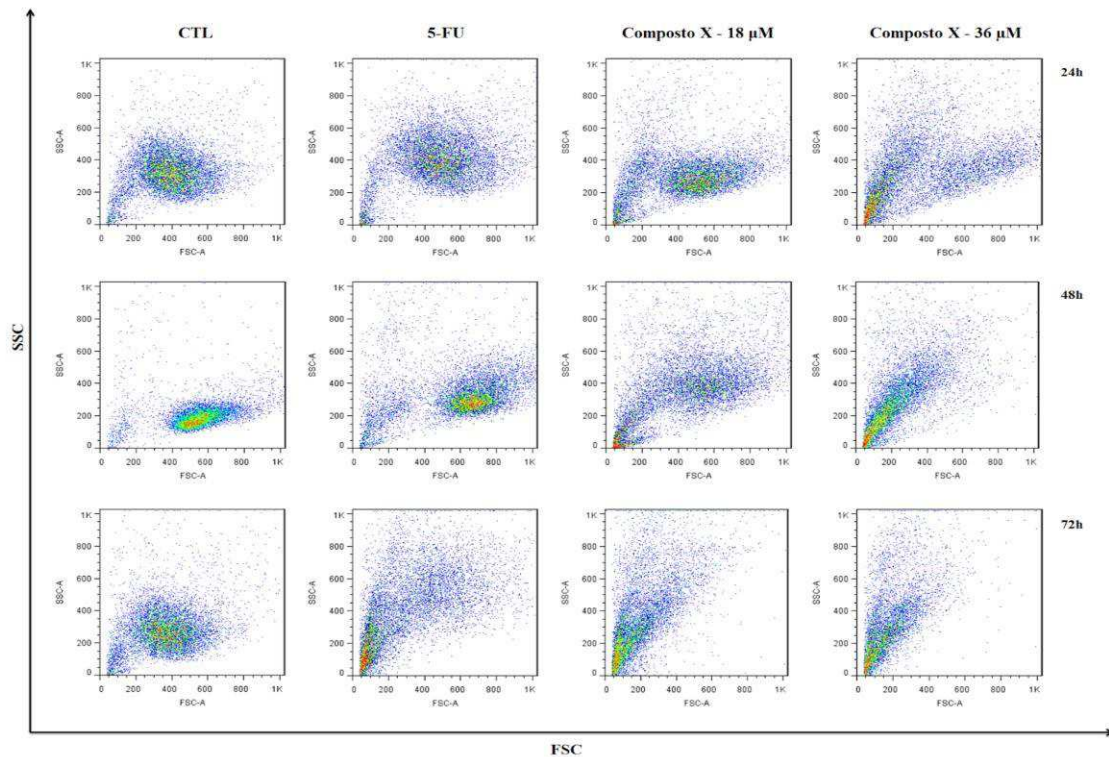


Figura 6. Dotplots representativos das características de dispersão da luz em células HSC3 tratadas com o Composto X. FSC (Forward scatter – desvio de luz para frente) e SSC (Side scatter – desvio de luz para o lado), determinados por citometria, foram utilizados como parâmetros de tamanho relativo e granulosidade ou complexidade interna da célula, respectivamente, após o período de tratamento de 24, 48 e 72 h. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2%) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias. o 5-Fluorouracil (5-FU, 17 μ M) foi utilizado como controle positivo. Os dados são representativos de três experimentos independentes realizados em duplicata. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

6.6 Efeitos do inibidor de GLI sobre o ciclo celular e fragmentação do DNA internucleossomal em células HSC3

A fragmentação do DNA internucleossomal foi analisada por citometria de fluxo, com o intuito de diferenciar as fases do ciclo celular. As células em sub-G₁ foram consideradas como células com fragmentação do DNA internucleossomal. A tabela mostra os resultados encontrados (Tabela 3). Após 12h de incubação, foi observado um aumento significativo de células HSC3 na fase sub-G₁ tratadas na concentração de 36 μ M, representando um aumento da fragmentação nuclear, forte indicativo de morte apoptótica. A partir deste tempo, também foi possível observar uma diminuição significativa do número de células na fase G₀-G₁ tratadas com o composto X (36 μ M), sugerindo uma possível parada do ciclo celular nesta fase.

Ademais, com 48h de incubação, foi possível observar diferença estatística em relação ao aumento de células na fase sub-G₁ nas células tratadas com o controle positivo 5-FU (17 μ M) e com o composto X nas duas concentrações testadas, em relação ao controle negativo DMSO 0,2%, seguindo o mesmo padrão com 72h de incubação.

Tabela 3. Efeito do composto X sobre o ciclo celular e fragmentação do DNA internucleossomal em células HSC3

Tratamento	Concentração (μM)	Distribuição do conteúdo de DNA (%)			
		Sub-G ₀ /G ₁	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
12h de tratamento					
DMSO 0,2%	-	1,26 \pm 0,50	40,33 \pm 3,81	18,43 \pm 4,15	16,91 \pm 2,68
5-FU	17	3,40 \pm 0,39	56,44 \pm 3,70	13,14 \pm 3,31	10,97 \pm 2,01
Composto X	18	6,18 \pm 1,40	39,73 \pm 2,22	19,49 \pm 1,59	17,35 \pm 2,61
	36	12,34 \pm 3,76*	27,57 \pm 2,83*	14,29 \pm 2,06	27,39 \pm 4,17
24h de tratamento					
DMSO 0,2%	-	7,94 \pm 2,92	41,08 \pm 1,68	24,05 \pm 0,84	18,72 \pm 2,58
5-FU	17	12,71 \pm 4,60	49,90 \pm 6,48	19,77 \pm 2,44	8,460 \pm 2,20
Composto X	18	8,29 \pm 2,03	53,58 \pm 3,85	13,10 \pm 1,69*	17,18 \pm 1,58
	36	25,74 \pm 3,05*	22,11 \pm 0,79*	10,48 \pm 2,94*	27,00 \pm 4,41
48h de tratamento					
DMSO 0,2%	-	8,31 \pm 1,38	47,04 \pm 3,21	18,88 \pm 3,37	21,40 \pm 0,89
5-FU	17	41,85 \pm 7,90*	57,42 \pm 4,60*	15,28 \pm 3,30	3,72 \pm 1,21*
Composto X	18	34,19 \pm 4,72*	28,47 \pm 3,27*	9,71 \pm 2,21	9,98 \pm 2,77*
	36	51,25 \pm 10,71*	1,79 \pm 0,54*	1,73 \pm 0,49*	0,74 \pm 0,20*
72h de tratamento					
DMSO 0,2%	-	3,05 \pm 0,99	53,09 \pm 0,94	20,46 \pm 1,82	17,10 \pm 0,92
5-FU	17	71,70 \pm 11,03*	14,96 \pm 7,15*	4,67 \pm 1,60*	1,79 \pm 0,68*
Composto X	18	68,02 \pm 6,01*	9,66 \pm 5,43*	4,28 \pm 1,28*	3,13 \pm 1,74*
	36	77,13 \pm 4,26*	1,08 \pm 0,54*	1,46 \pm 0,59*	0,82 \pm 0,32*

Efeitos do composto X nas fases do ciclo celular em células HSC3. A tabela apresenta valores correspondentes à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes, realizados em duplicata. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2%), utilizado para solubilizar e diluir as substâncias. O 5-FU foi usado como controle positivo. Os debris celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

6.7 Efeitos do inibidor de GLI sobre a externalização da fosfatidilserina em células HSC3

O tratamento de células HSC3 com o composto X nas diferentes concentrações, causou uma diminuição considerável no número de células viáveis. O 5-FU, utilizado como controle positivo, também causou alterações condizentes com mecanismos apoptóticos de morte. A avaliação do perfil de morte celular foi verificada a partir da externalização da fosfatidilserina e permeabilidade da membrana citoplasmática utilizando anexina V-FITC e IP (figura 7). Os resultados obtidos demonstram uma exposição significativa de fosfatidilserina em células HSC3 tratadas com o composto X na concentração de 36 μ M em todos os tempos avaliados, quando comparados com o grupo controle negativo DMSO (0,2%). O composto X na concentração de 18 μ M apresentou um aumento significativo de células em apoptose após 48h de incubação, seguindo o mesmo padrão após 72h. No entanto, só foi possível observar um aumento significativo das células em apoptose no grupo controle positivo (5-FU) a partir de 72h de incubação.

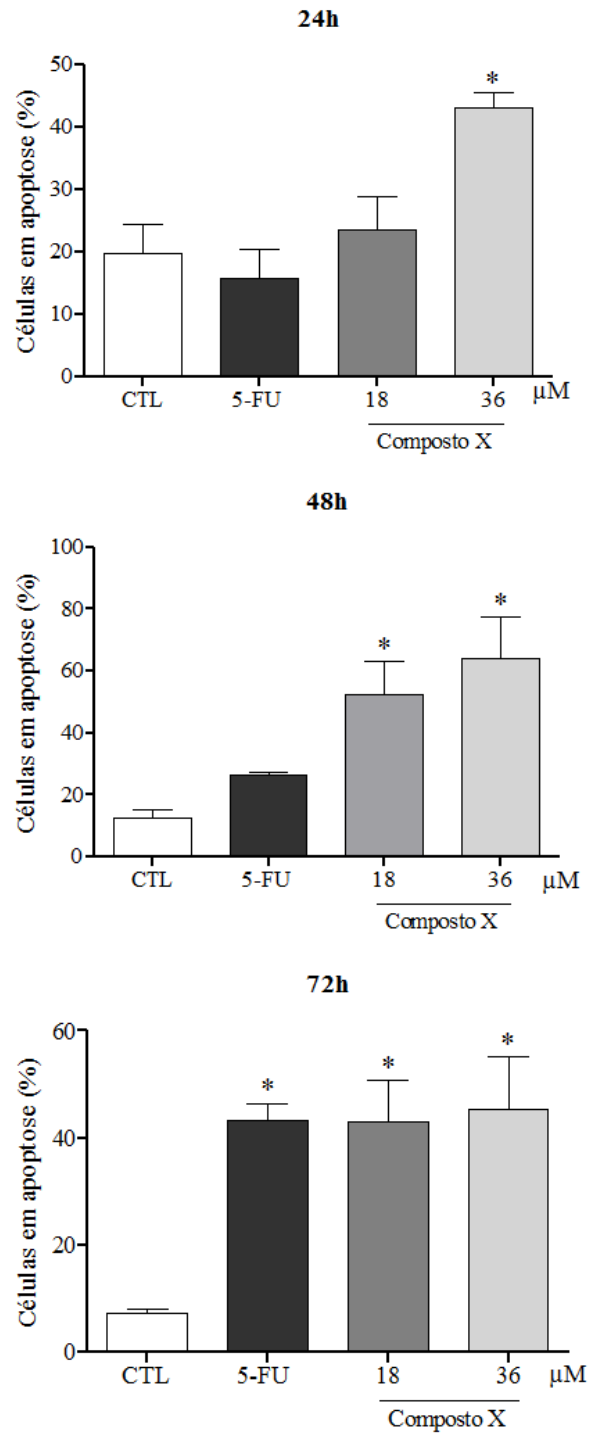


Figura 7. Efeito do composto X sobre a externalização da fosfatidilserina em células HSC3 determinado por citometria de fluxo usando Anexina V-FITC. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2%) utilizado para solubilizar e diluir a substância teste. O 5-FU (17 μM) foi usado como controle positivo. Os valores correspondem à média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. Os debris celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

7 DISCUSSÃO

Os fatores de transcrição da família *glioma* (GLI) são ativados em uma ampla variedade de cânceres humanos. No carcinoma escamocelular oral, a reativação dessa via embrionária tanto pela via clássica, como por vias independentes dos sinais mediados pelo complexo PTCH1/SMO, está diretamente relacionada a casos mais avançados da doença, especialmente por ativar genes envolvidos na iniciação, progressão e manutenção de células-tronco tumorais (AGYEMAN, et al., 2014).

Resultados prévios de nosso grupo demonstraram uma reativação da via HH em células de CEO (FREITAS, 2018), sendo que a HSC3, destacou-se por apresentar uma maior expressão dos genes que codificam os fatores de transcrição GLI. A atividade da via HH, neste trabalho, foi confirmada através da detecção das proteínas HH, especialmente GLI-1 nuclear e, além disso, a presença dos componentes da via HH (SHH, PTCH1, SMO e GLI1) demonstrou que as células HSC3 são capazes de responder a sinais exógenos que culminam na ativação desta cascata sinalizadora.

Sabendo-se do potencial farmacológico da via HH, bem como da busca constante por fármacos que possam contribuir para o tratamento adjuvante de neoplasias malignas da cavidade oral, o presente estudo teve o objetivo de avaliar a ação antitumoral do inibidor de GLI (composto X) e seus efeitos sobre a expressão gênica de componentes da via HH, proliferação e morte em células de CEO.

Inicialmente, o ensaio de citotoxicidade foi realizado em um painel de células tumorais e não tumorais, bem como com fibroblastos primários associados ao câncer de boca (CAF 1 e CAF2). Os resultados do ensaio de citotoxicidade demonstraram que a linhagem de CEO, HSC3, apresentou maior sensibilidade ao inibidor de GLI quando comparada às outras células tumorais testadas e, desta forma, foi selecionada para a condução dos estudos *in vitro* subsequentes. Adicionalmente, cabe aqui destacar que, no painel de células testadas, um resultado promissor diz respeito ao CAF, cuja sensibilidade foi muito superior aos fibroblastos normais (NOF). Tem sido demonstrado na literatura que CAFs possuem atividade HH (VALENTINI, et al., 2017; QU, et al., 2018; CAZER, et al., 2018) e, em conjunto com outros resultados alcançados pela equipe, o composto X foi capaz de atuar não somente na célula maligna, mas também teve efeito citotóxico em fibroblastos associados ao câncer, que representam o tipo celular de maior população do estroma tumoral (MUELLER, et al; 2007; LI, et al; 2012; GANJRE, 2019). Os efeitos funcionais do Composto X nas atividades pró-tumorais de CAFs dependentes de HH estão sendo avaliados por outros estudos do grupo, uma vez que estas células promovem um microambiente favorável a progressão tumoral através da

estimulação do crescimento, migração e invasão de células epiteliais. logo constituem alvos terapêuticos importantes para estudo (LI, et al., 2015; GANJRE, 2019).

O efeito citotóxico do composto X tem sido testado em diferentes tipos histológicos tumorais, como em tumores de cólon, neuroblastoma, colo do útero, leucemia mieloide, pâncreas, pulmão, mesotélio pleural, trato biliar e rabdomiossarcoma, com valores de CI₅₀ variando de 5 a 15 μM na maioria das linhagens celulares estudadas (GONNISSEN et al., 2015). Neste estudo, os ensaios *in vitro* foram conduzidos tanto com a concentração referente ao valor da CI₅₀ encontrada (36 μM), quanto com a metade deste valor, 18 μM e, para ambas concentrações analisadas, observamos redução da viabilidade celular e aumento da fragmentação nuclear e apoptose em células HSC3. Importante salientar que os efeitos farmacológicos do composto X testado neste trabalho foram melhores ao observado no grupo controle positivo (5-FU), que é um quimioterápico utilizado na prática clínica do tratamento de pacientes com carcinoma escamocelular de cabeça e pescoço avançado (PIGNON et al., 2004).

Os genes da via PTCH1, GLI1, GLI2 e GLI3 foram avaliados por qPCR após 12 horas de tratamento com o composto-teste, nas diferentes concentrações (18 e 36 μM). No tempo considerado, houve redução dos níveis de mRNA de todos os genes avaliados, com exceção de PTCH1 na concentração de 18 μM , quando comparado ao controle DMSO. É importante ressaltar que foi possível observar, com apenas 12 horas de tratamento, uma redução estatisticamente significativa nos níveis de mRNA de GLI1 nas células HSC3, em sua maior concentração testada. Esses resultados se assemelham aos encontrados por Lim et al., em células de meduloblastoma tratadas com o composto X por 24 horas, onde foi observado inibição significativa da expressão gênica e proteica de GLI1 e GLI2, bem como a redução do mRNA relacionado ao oncogene Bcl2, em todas as concentrações testadas (10, 20 e 40 μM), de modo que os autores sugerem que a regulação negativa de Bcl-2 pode ser responsável pelo aumento da morte celular que ocorre após a supressão de GLI, em combinação com danos no DNA (LIM et al., 2016).

Nas diferentes linhagens celulares de câncer de mama, incluindo linhagens de células-tronco tumorais associadas a este câncer, avaliadas por Kurebayashi et al., 2017, o composto X foi capaz de diminuir significativamente os níveis de expressão de GLI1 e / ou GLI2, mas não de GLI3 nas respectivas linhagens celulares, de forma dose-dependente (KUREBAYASHI, et al., 2017). Resultados semelhantes foram observados em diferentes linhagens de câncer humano após tratamento com o composto X, demonstrando redução da expressão gênica e proteica dos genes alvo GLI1 e PTCH1, bem como redução da produção transcricional, através

de ensaios inventoriados de GLI (LAUTH et al., 2007). Em células tronco tumorais de câncer de pâncreas, o tratamento com o composto X (10 μ M) inibiu a expressão dos fatores GLI1 e 2, PTCH 1 e 2 e SMO, além disso, foi observado que a expressão de Shh não foi detectada nas células tratadas, sugerindo que o composto X pode regular as características das células tronco tumorais através da inibição de componentes da via HH. (FU, et al., 2013).

No que diz respeito a viabilidade celular, neste trabalho, o composto X agiu de forma tempo e concentração-dependente. O inibidor de GLI reduziu significativamente o número de células HSC3 viáveis quando comparados ao grupo controle negativo a partir de 24h de tratamento, em todas as concentrações testadas. Em estudo realizado por Kurebayashi et al., foi observado que, embora concentrações baixas (0,1 a 1 μ M) do composto X não tenham inibido o crescimento de qualquer linhagem de células de câncer de mama receptor de estrogênio positivas testadas, em condições de privação de estrogênio ou de suplementação de estrogênio, altas concentrações (5-20 μ M) do composto X inibiram de forma concentração-dependente o seu crescimento (KUREBAYASHI, et al., 2017). Em outro estudo, também utilizando diferentes linhagens de câncer de mama, Benvenuto et al., observaram redução significativa de células viáveis, comparadas ao controle negativo DMSO, tratadas com o composto X (5 a 20 μ M), em 7 das 8 linhagens celulares examinadas após 48 horas de tratamento, e em todas as linhagens após 72 horas de incubação, confirmando a sua atuação tempo e concentração dependente (BENVENUTO et al., 2016).

De modo semelhante, Fu et al., avaliaram através do ensaio com Azul de Tripán, a viabilidade de células tronco tumorais de pâncreas, tratadas com o composto X, tanto em cultura 2D (monocamada), como em modelo 3D (esferoides em suspensão) nas concentrações de 1,0 μ M, 5,0 μ M e 10 μ M, onde foi possível observar redução significativa de células viáveis após 48h e 72h de tratamento, além de indução de apoptose de forma tempo e concentração dependente (FU et al., 2013). Corroborando com esses achados, o estudo realizado por Lin et al., avaliando o efeito de diferentes concentrações do composto X (10 μ M, 20 μ M e 40 μ M) sobre a viabilidade de células de meduloblastoma, apresentou tanto uma redução estatisticamente significativa da população celular viável, quanto um aumento considerável do número de células em apoptose após 24 horas de tratamento através da análise de citometria de fluxo (LIN, et al., 2016).

No presente estudo, foi possível observar que o composto X com 12 horas de tratamento, na maior concentração testada, foi capaz de induzir um aumento significativo de fragmentação nuclear na fase sub-G1, forte indicativo de morte apoptótica, além de uma redução

estatisticamente significativa das fases G1 e S a partir de 12 horas de tratamento, e na fase G2/M a partir de 48 horas de tratamento. Os resultados obtidos se assemelham aos encontrados por Lim et al., 2015, ao avaliar a ação antiproliferativa do composto X (20 μ M) em células de mesotelioma maligno. Neste estudo, foi observada parada no ciclo celular na fase G1 com 24 horas de tratamento, quando comparado ao controle negativo, além de haver acúmulo de células na fração sub-G1 em 48-72h, sugerindo morte por apoptose (LIM et al., 2015).

Ainda corroborando com esses resultados, Kurebayashi et al., 2017 demonstrou que o composto X também aumentou de forma concentração-dependente a proporção de células na fase sub-G1, diminuiu a proporção de células na fase S e causou um retardamento do ciclo celular G1-S em todas as linhagens celulares de câncer de mama testadas em seu estudo. Somado a isto, o Composto X aumentou a apoptose em todas as linhagens celulares testadas quando em associação a um supressor de um inibidor apoptótico (survinin). (KUREBAYASHI, et al., 2017).

Os resultados da avaliação do perfil de morte celular das células tratadas com o composto X no presente trabalho, indicam morte apoptótica pelo aumento significativo de células com exposição de fosfatidilserina a partir de 24h de tratamento. De modo semelhante, Lim et al., 2015 observou aumento paralelo na morte celular apoptótica de um modo tempo e concentração dependente nas células de mesotelioma maligno tratadas com o composto X (LIM et al., 2015). No presente estudo, é interessante ressaltar que o inibidor de GLI nas duas concentrações testadas, apresentou ação apoptótica superior ao controle positivo 5-FU, o qual só alcançou aumento estatisticamente significativo das células em apoptose após 72 de tratamento, quando comparado ao controle negativo DMSO 0,2%. Em relação ao efeito do composto X sobre a morfologia das células HSC3 tratadas, foi possível observar por citometria de fluxo através dos parâmetros FSC (tamanho/volume) e SSC (granulosidade), considerável encolhimento celular e aumento da granulosidade celular de forma tempo e concentração-dependente. Essas alterações são compatíveis com o aumento da fragmentação internucleossomal e redução da viabilidade celular promovidos pelo tratamento com o composto X, como previamente discutidos.

Os resultados iniciais do presente estudo demonstram o potencial terapêutico do composto X em células HSC3 de carcinoma escamocelular oral, contudo, ainda há lacunas importantes para a geração de conhecimentos e avanços deste estudo. Dessa forma, como perspectivas futuras, o nosso grupo pretende realizar ensaios funcionais de proliferação, migração e invasão, para uma melhor avaliação dos efeitos da inibição farmacológica de GLI.

Ainda, outros ensaios serão conduzidos para analisar os efeitos do composto X sobre o potencial transmembrânico das mitocôndrias, a produção de espécies reativas de oxigênio e ativação das caspases, e com isso, contribuir para um melhor conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na ativação da apoptose pelo composto X.

8 CONCLUSÕES

Os resultados relacionados ao potencial terapêutico do composto X, em ensaios *in vitro* 2D, demonstraram que as células HSC3 apresentaram uma maior sensibilidade ao composto-teste. A inibição farmacológica de GLI reduziu a expressão dos genes da via HH em células HSC3, indicando uma redução da atividade da cascata sinalizadora após 12 horas de tratamento. Ainda, o tratamento com o composto X foi capaz de reduzir a viabilidade celular, alterar a morfologia celular, aumentar a fragmentação nuclear e induzir a apoptose em células HSC3.

REFERÊNCIAS

ADRIEN, J.; et al. **Oral Oncol.** v. 50, n. 2, p. 90-7, 2014.

ADKINS, D.; et al. **Clinical Oncology.** 2019

AGYEMAN, A, et al. **Oncotarget**, v. 5, n. 12, p. 4492-4503, 2014.

AMAKYE, D.; JAGANI, Z.; DORSCH, M. **Nature Medicine.** v. 19, n. 11, p. 1410-22, 2013.

BAGAN, J; SARRION, G; JIMENEZ, Y. **Oral Oncology.** v.46, p. 414-417, 2010.

BENVENUTO, M. et al. **Oncotarget**, v. 7, n. 8, p. 9250–9270, 2016.

BLANCHARD, P, et al. **Oral Oncol.** v. 62, p. 44-53, 2016.

BRANDS, M.T.; et al. **Eur J Surg Oncol.** v. 44, n. 5, p. 559-565, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. INCA: Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2019/dados-apresentados.pdf>. Acesso em 02 de junho de 2018.

CAVICCHIOLI, B. M. E.; et al. **Human Pathology.** v. 42, n. 10, p. 1484–90, 2011.

CAZETI, AS; et al. **Nature Communications.** v. 9, n. 2897, p. 1-18, 2018.

CHANG, H.Y. **Cell Cycle**, v.7, n.23, p. 3622-4, 2008.

CHI, A. C.; DAY, T. A.; NEVILLE, B. W. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, n. 5, p. 401–421, 2015.

CHUNG, CH., et al. **J Clin Oncol.** v. 29, p.1326-1334, 2011.

COHEN, R.B. **Cancer Treat Ver**, v.40, n.4, p. 567-77, 2014.

DESCH, P; et al. **Oncogene.** v. 29, p. 4885-4895, 2010.

DIAS, R. B.; et al. **AIMM**, v. 24, n. 8, p. 595–602, 2015.

DIAZ, E. M.; et al. **Head Neck**, v. 25, n. 4, p. 267-73, 2003.

FAN, H.X.; et al., **Med Oncol.**, p 31-41, 2014.

FERLAY, J.; et al. **Int J Cancer**, v. 136, n. 5, p. 359-86, 2015.

FREITAS, R.D. Potencial terapêutico dos inibidores de *Smoothed* em Carcinoma Escamocelular Oral. 2018. 58f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – UFBA/FIOCRUZ.

FRONIE, A.; et al., **Morphol Embryol**, v. 54, n. 2, p. 343-8, 2013.

FU, J; et al. **Cancer Lett**, v. 330, n.1, p. 22-32, 2013.

GANJRE, AP. **J Can Res Ther**, v.15, p. 690-2, 2019.

GONNISSEN, A; ISEBAERT S, HAUSTERMANS K. **Oncotarget**, v. 6, p. 13899–913, 2015.

GOODRICH, L. V.; et al. **Science**, v. 277, n. 5329, p. 1109–1113, 1997.

GUIMARÃES, V.S.N. Moléculas Hedgehog em Fibroblastos Associados ao Carcinoma Escamocelular de Boca: Relação Angiogênese e Invasão. 2018. 102f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – UFBA/FIOCRUZ.

HAHN, H.; et al. **Cell**, v. 85, n. 6, p. 841–851, 1996.

HARDCASTLE, Z.; et al., **Development**, v. 125, n. 15, p. 2803-11, 1998.

HARTNER, L. **Dent Clin North Am**. v. 62, n. 1, p. 87-97, 2018.

KITAMOTO, HN.; et al. **International Journal of Cancer**. v. 136, p. 1276–1284, 2014.

KUREBAYASHI, J.; et al. **Cancer Sci**. v. 108, n. 5, p. 918-930, 2017.

LAUTH, M; et al. **PNAS**. v. 104, n. 20, p. 8455 - 8460, 2007.

LI, H; et al. **J Transl Med**, v. 198, n.13, p. 1-10, 2015.

LIM, CB; et l. **Oncotarget**, v. 6, n. 3, p. 1519-1530, 2015.

LIU, T.; CHUA, B.; BATSTONE, M.; **J Oral Maxillofac Surg**. v. 76, n. 7, p. 1565-1570, 2018.

MARKOPOULOS, A. K. **The Open Dentistry Journal**, v. 6, n. 1, p. 126–130, 2012.

MAS, C; ATALBA, A. **Biochemical Pharmacology** . v.80, p. 712–723, 2010.

- MUELLER, L; et al. **The American Journal of Pathology**. v. 171, n.5, p. 1608- 1618, 2007.
- NG, J.M.; CURRAN, T. **Nat Rev Cancer**. v.11, p. 493-501, 2011.
- NIEWIADOMSKI, P; et al. **Cells**, v. 147, n. 8, p. 1-36.
- PIGNON JP; et al. **Anticancer Drugs**. v. 15, n. 4, p. 331-40, 2004.
- PO, A.; et al.,**EMBO Journal**, v. 29, n. 15, p. 2646–2658, 2010.
- QU, C; et al. **Integrative Cancer Therapies**, v. 17, n. 4, p. 1016-1019, 2018.
- RIVERA, C., **Int J Clin Exp Pathol**, v. 8, n.9, p. 11884-95, 2015.
- RODRIGUES, P.C.; et al.**Int J Oral Maxillofac Surg**.v. 43, n. 7, p. 795-801, 2014.
- SAGGI, S.; et al. **Otolaryngol Head Neck Surg**. v. 159, n. 1, p. 51-58, 2018.
- SALES, C.B.S. Expressão de Componentes da Via de Sinalização *Sonic Hedgehog* (HHIP, PTCH1 e SHH) e VEGF-A em Carcinoma Escamocelular Oral: associação com imunomarcção de VEGF-A e microdensidade vascular. Dissertação (Mestrado em Patologia) – UFBA/FIOCRUZ, Salvador, 2012.
- STECCA, B.; RUIZ,I.; ALTABA, A. **J Biol**. v.1, n. 9, 2002.
- STECCA, B.; RUIZ I ALTABA, A. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 2, n.2, p. 84–95, 2010.
- VALENTINI, G; et al. **Cancer Res**. v. 77, p. 2134–2147, 2017.
- VALVERDE, L. de F.; et al. **Tumor Biology**, v. 37, n. 7, p. 9233–9241, 2016.
- VAN DER WAAL, I. **Oral Oncology**, v. 45, n. 4–5, p. 317–323, 2009.
- WICKSTROM, M; et al. **Int J Cancer**, v. 132, p. 1516-1524.
- WHO. Chapter 4: Tumours of the oral cavity and mobile tongue. **World Health Organization Classification of head and neck tumours**, 4^a ed., 2017.
- YESENSKY, J.A.; et al. **Head Neck**. v. 40, n. 4, p. 784-792, 2018.
- YOU, M; et al. **J Thorac Cardiovasc Surg**. v. 147, n.1, p. 508-516, 2014.