



**UFBA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

**INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



**FIOCRUZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DOS INIBIDORES DE *SMOOTHENED* EM  
CARCINOMA ESCAMOCELULAR ORAL**

**RAÍZA DIAS DE FREITAS**

**Salvador - Bahia**

**2018**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

**INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DOS INIBIDORES DE *SMOOTHENED* EM  
CARCINOMA ESCAMOCELULAR ORAL**

**RAÍZA DIAS DE FREITAS**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Clarissa Araújo Gurgel Rocha

Dissertação apresentada ao Curso de  
Pós-graduação em Patologia Humana  
para obtenção do grau de Mestre.

**Salvador – Bahia**

**2018**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

F866p Freitas, Raíza Dias de.  
Potencial terapêutico dos inibidores de *Smoothened* em Carcinoma Escamocelular Oral. / Raíza Dias de Freitas. - 2018.  
58 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Clarissa Araújo Gurgel Rocha, Laboratório de Patologia e Biologia Molecular.

Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, 2018.

1. Carcinoma de células escamosas. 2. Proteínas Hedgehog. 3. Itraconazol.

I. Título.

CDU 616.31-006.6

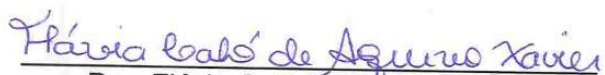
**“POTENCIAL TERAPÊUTICO DOS INIBIDORES DE SMOOTHENED EM CÉLULAS DE CARCINOMA ESCAMOCELULAR ORAL”**

**RAÍZA DIAS DE FREITAS**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Salvador, 07 de fevereiro de 2018

**COMISSÃO EXAMINADORA**



Dra. Flávia Caló de Aquino Xavier  
Professora Adjunta  
UFBA



Dr. Daniel Abensur Athanazio  
Professor Adjunto  
UFBA



Dra. Clarissa Araújo Gurgel Rocha  
Pesquisadora  
IGM/FIOCRUZ

Aos meus pais, Aurízia e Aécio, por terem sempre  
incentivado em mim a busca pelo conhecimento.

## **AGRADECIMENTOS**

**Aos meus pais, Aurízia e Aécio,**

Pelo amor, acima de tudo.

**Aos meus irmãos, Larissa e Adriano,**

Pela certeza de que nunca estarei só.

**À Inarene, Marcela, Vitor e Wesley,**

Por me acolherem e somarem tanto em nossa família.

**Aos meus sobrinhos, Aecinho e Pedro,**

Por me fazerem entender mais sobre o amor.

**À toda a minha família,**

Pela torcida pelo meu sucesso.

**Ao meu namorado, Daniel,**

Pelo amor e por me ajudar tanto na fase final do Mestrado.

**À minha orientadora, Dra. Clarissa Gurgel,**

Meu maior exemplo de professora. Agradeço por ter me proporcionado tantas oportunidades na vida acadêmica, e, principalmente, por ser uma orientadora tão humana.

**À Rosane Borges,**

Pela atenção, disponibilidade e carinho desde minha época de IC. Palavras nunca serão suficientes para agradecer por tudo que fez por mim nesses 4 anos.

**Ao Prof. Dr. Daniel Bezerra,**

Pela oportunidade de trabalhar no LETI e por ter auxiliado no desenvolvimento deste trabalho, sempre disponível para tirar minhas dúvidas.

**Ao Dr. Ricardo Della Coletta e aos pesquisadores do Biophar - UFAM,**

Por terem cedido as células utilizadas neste estudo.

**À Jéssica e Vanessa,**

Por serem tão companheiras nessa jornada e por terem sido fundamentais durante as disciplinas, me ajudando a não me abalar com as dificuldades.

**À Ludmila e Manuela,**

Por me terem sido essenciais no meu projeto e por fazerem as angústias e frustrações com os experimentos se tornarem mais leves e até divertidas.

**Ao grupo de pesquisas Biopatologia,**

Por serem uma segunda família. Em especial, agradeço às minhas companheiras desde os tempos de IC, Taís e Letícia, e à Carol que me ajudou com toda a parte de expressão gênica.

**Aos professores da Faculdade de Odontologia da UFBA,**

Em especial, aos professores da Cariologia e Odontopediatria que me incentivaram na vida clínica.

**Ao Curso de Pós-Graduação em Patologia,**

Em especial, ao corpo docente, pelas oportunidades de aprendizado, e à Ana Carolina, Simone e Noélia, pela ajuda com a burocracia.

**Ao Instituto Gonçalo Moniz (IGM),**

Por proporcionar toda estrutura necessária para o desenvolvimento do meu trabalho.

**À Plataforma de Citometria de Fluxo e Sequenciamento Genético,**

Pela disponibilidade na leitura dos meus experimentos.

**Ao Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM)**

Em especial, a Cleiton, por ser um salva-vidas todos os dias.

**Ao Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI),**

Em especial, a Rute, por ser sempre tão solícita.

**À Biblioteca de Ciências Biomédicas Eurydice Pires de Sant'Anna do IGM,**

Em especial, à Ana Fiscínia, pela correção criteriosa desta dissertação.

**Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq,**

Pela bolsa de mestrado.

**À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia, FAPESB,**

Pelo fomento do projeto.

**Aos meus amigos,**

Em especial, à Amanda, Gustavo, Henrique, Henrique T. e Rafaela, por fazerem este caminho mais alegre.

**A Deus,**

Pela vida e pela oportunidade de conviver com todas essas pessoas, que fazem minha vida mais feliz todos os dias.

Pelos caminhos que ando, um dia vai ser, só não sei quando.

*Paulo Leminski*



FREITAS, Raíza Dias de. Potencial terapêutico dos inibidores de *Smoothened* em Carcinoma Escamocelular Oral. 58 f. il. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** O carcinoma escamocelular oral (CEO) é a neoplasia de cabeça e pescoço mais frequente e, apesar de sua relevância, foram observados poucos avanços na inibição farmacológica de vias relacionadas com a patogênese do CEO, como a via Hedgehog HH. Neste contexto, os inibidores de SMO, vismodegib e itraconazol, têm se destacado como promissores. **OBJETIVO:** O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do vismodegib e itraconazol sobre a expressão gênica dos componentes da via HH (PTCH1, SMO e GLI1), ciclo e morte celular em células de CEO. **MATERIAL E MÉTODOS:** Após a caracterização da expressão da via HH nas células de CEO (CAL27, SCC4, SCC9 e HSC3) através de qPCR, a citotoxicidade dos inibidores de SMO foi determinada em diversas linhagens tumorais através do método Alamar Blue após 72h de tratamento. Este mesmo ensaio foi realizado na CAL27 nos tempos de 6h, 12h, 24h, 48h e 72h. O efeito dos inibidores sobre a viabilidade celular da CAL27 foi avaliado através do Azul de Tripán após 24h e 48h nas concentrações de 25 e 50 µg/mL. Foi realizada a análise da expressão gênica dos componentes da via HH e análise morfológica após 24h de tratamento em ambas as concentrações, bem como a avaliação do ciclo e morte celular por citometria de fluxo após 72h com a maior concentração dos compostos-teste. **RESULTADOS:** A via HH está ativada nas células CAL27, SCC4, SCC9 e HSC3. Os inibidores de SMO não apresentaram atividade citotóxica promissora em células de CEO. Com 48h de tratamento, o vismodegib e o itraconazol de 50 µg/mL diminuíram a viabilidade celular ( $p < 0,05$ ). O tratamento com os inibidores de SMO foi capaz de alterar a morfologia celular, diminuir o tamanho celular (FSC) e aumentar a granulosidade (SCC) das células CAL27. Observou-se redução na expressão dos genes HH (PTCH1, SMO e GLI1) já em 24h após o tratamento da CAL27 com os compostos-teste. O vismodegib e itraconazol de 50 µg/mL aumentaram a população celular na fase Sub-G1 e induziram morte celular por apoptose após 72h. **CONCLUSÕES:** A via HH está ativada nas células de CEO avaliadas neste estudo. O tratamento com vismodegib e itraconazol reduziu a expressão dos componentes desta via na CAL27. Apesar dos inibidores de SMO não apresentarem citotoxicidade promissora nas células de CEO, reduziram a viabilidade celular, alteraram a morfologia das células, aumentaram a fragmentação do DNA e induziram apoptose em células CAL27.

**Palavras-chave:** Carcinoma de células escamosas, Proteínas Hedgehog, Vismodegib, Itraconazol

FREITAS, Raíza Dias de. Potencial terapêutico dos inibidores de *Smoothened* em Carcinoma Escamocelular Oral. 58 f. il. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2018. (Traduzir o título para o inglês)

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) is the most common malignant tumor of the head and neck. However, pharmacological inhibition of pathways related to OSCC tumorigenesis, such as Hedgehog (HH) pathway, has demonstrated minor progress. Interestingly, Smoothened (SMO) inhibition has been shown to be a promising therapeutic target in cancer. **AIM:** The aim of this study was to investigate the effects of vismodegib and itraconazole on HH genes expression (PTCH1, SMO and GLI1), cell cycle and cell death in OSCC cells. **METHODS:** Alamar Blue assay was used to assess cytotoxicity of vismodegib and itraconazole on cancer cell lines after 72h treatment and additional treatments were performed in CAL27 for 6h, 12h, 24h, 48h and 72h. The expression of HH signaling components before and after treatment with vismodegib and itraconazole in both 25 and 50 µg/mL concentrations was evaluated by qPCR. Cell cycle and apoptosis were evaluated by the flow cytometer after 72h treatment with vismodegib and itraconazole (50 µg/mL). **RESULTS:** HH signaling was activated in OSCC cell lines CAL27, SCC4, SCC9 and HSC3. SMO inhibitors have not demonstrated promising cytotoxicity in OSCC cells, however vismodegib and itraconazole (50 µg/mL) significantly reduced cell viability after 48h treatment. The expression of PTCH1, SMO and GLI1 was decreased after treatment with vismodegib and itraconazole for 24h. Furthermore, CAL27 cells exhibited alterations in morphology, cell size (FSC) and cell granularity (SCC). An increase in Sub-G1 population was observed after treatment and both inhibitors induced apoptosis after 72h treatment. **CONCLUSIONS:** HH signaling is activated in OSCC cell lines. SMO inhibitors (vismodegib e itraconazole) reduced HH genes expression on CAL27 cells. Vismodegib and itraconazole reduced cell viability and changed cell morphology. Moreover, both inhibitors induced DNA fragmentation and apoptosis in CAL27 cells.

**Key-words:** Squamous cell carcinoma, Hedgehog proteins, Vismodegib, Itraconazole.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Via de sinalização Hedgehog	18
<b>Figura 2</b>	Modelos de ativação da via Hedgehog no câncer	19
<b>Figura 3</b>	Caracterização da via HH em células de CEO	30
<b>Figura 4</b>	Efeito dos inibidores de SMO sobre a viabilidade de células CAL27	34
<b>Figura 5</b>	Efeitos do itraconazol sobre a morfologia de células CAL27 após 24h de tratamento	36
<b>Figura 6</b>	Efeitos do vismodegib e itraconazol sobre a morfologia de células CAL27 após 24h de tratamento	37
<b>Figura 7</b>	Efeitos do itraconazol sobre a morfologia de células CAL27 após 48h de tratamento	38
<b>Figura 8</b>	Efeitos do vismodegib e itraconazol sobre a morfologia de células CAL27 após 48h de tratamento	39
<b>Figura 9</b>	<i>Dotplots</i> representativos das características de dispersão da luz em células CAL27 tratadas com vismodegib e itraconazol	40
<b>Figura 10</b>	Efeitos do vismodegib e itraconazol sobre a dispersão da luz em células CAL27	41
<b>Figura 11</b>	Perfil de expressão gênica dos componentes da via Hedgehog após tratamento com vismodegib e itraconazol em células CAL27	42
<b>Figura 12</b>	Efeito do vismodegib e itraconazol sobre a externalização da fosfatidilserina em células CAL27	43
<b>Figura 13</b>	<i>Dotplots</i> representativos do efeito do vismodegib e itraconazol sobre a externalização da fosfatidilserina de células CAL27	44
<b>Figura 14</b>	Efeito dos inibidores de SMO sobre o ciclo celular e fragmentação do DNA internucleossomal em células CAL27	45

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Linhagens tumorais humanas utilizadas no ensaio de citotoxicidade	27
<b>Tabela 2</b>	Concentração dos fármacos	28
<b>Tabela 3</b>	Citotoxicidade dos fármacos em linhagens tumorais e não-tumorais	32
<b>Tabela 4</b>	Citotoxicidade dos fármacos na CAL27	33

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-FU	Refere-se ao fármaco 5-Fluorouracil
ATO	Do inglês, <i>Arsenic Trioxide</i>
CAL27 ST	Células CAL27 sem tratamento
CBC	Carcinoma Basocelular
CEO	Carcinoma Escamocelular Oral
DHH	Refere-se ao gene ou proteína <i>Desert Hedgehog</i>
DMEM	Do inglês, <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Do inglês, <i>Dimethyl sulfoxide</i>
DOX	Refere-se ao fármaco Doxorrubicina
FITC	Do inglês, <i>fluorescein isothiocyanate</i>
FSC	Do inglês, <i>Forward Scatter</i>
GANT-61	Refere-se ao fármaco GANT-61
GANT-68	Refere-se ao fármaco GANT-68
GLI1	Refere-se à proteína ou gene <i>GLI family zinc finger 1</i>
GLI2	Refere-se à proteína ou gene <i>GLI family zinc finger 2</i>
GLI3	Refere-se à proteína ou gene <i>GLI family zinc finger 3</i>
HH	Hedgehog
HPV	Do inglês, <i>Human Papillomavirus</i>
HTS	Do inglês, <i>High-Throughput Screening</i>
IHH	Refere-se ao gene ou proteína <i>Indian Hedgehog</i>
IP	Iodeto de Propídio
ITRA 25	Refere-se ao fármaco itraconazol utilizado na dose de 25 µg/mL
ITRA 50	Refere-se ao fármaco itraconazol utilizado na dose de 50 µg/mL
MB	Meduloblastoma

PBMC	Do inglês, <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PCR	Do inglês, <i>Polimerase Chain Reacton</i>
PTCH1	Refere-se ao gene ou proteína <i>Patched 1</i>
RPMI	Do inglês, <i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
RT-PCR	Do inglês, <i>Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction</i>
SBF	Soro Bovino Fetal
SCC	Do inglês, <i>Side Scatter</i>
SHH	Refere-se ao gene ou proteína <i>Sonic Hedgehog</i>
SMO	Refere-se ao gene ou proteína <i>Smoothened</i>
SUFU	Refere-se ao gene ou proteína <i>Suppressor of Fused</i>
TNM	Do inglês, <i>tumor-node-mestastasis</i>
VISMO 25	Refere-se ao fármaco vismodegib utilizado na dose de 25 µg/mL
VISMO 50	Refere-se ao fármaco vismodegib utilizado na dose de 50 µg/mL

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
1.1	CARCINOMA ESCAMOCELULAR ORAL	15
1.2	VIA DE SINALIZAÇÃO HEDGEHOG	17
1.3	POTENCIAL TERAPÊUTICO DOS INIBIDORES DE SMO	19
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>HIPÓTESE</b>	<b>22</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
4.1	OBJETIVO GERAL	22
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>23</b>
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO	23
5.2	MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS EM CULTURA	23
5.2.1	<b>Obtenção das Células PBMC</b>	23
5.3	EXPRESSÃO GÊNICA DOS COMPONENTES DA VIA HH EM CÉLULAS DE CEO	24
5.3.1	<b>Isolamento de RNA Total e Transcrição Reversa</b>	24
5.3.2	<b>Avaliação da Expressão dos Genes HH</b>	25
5.4	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS INIBIDORES DE SMO – ALAMAR BLUE	25
5.5	CONCENTRAÇÃO DOS INIBIDORES DE SMO	27
5.6	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR – AZUL DE TRIPAN	28
5.7	ANÁLISE MORFOLÓGICA	28
5.8	ESTUDOS SOBRE O CICLO CELULAR E PADRÃO DE MORTE CELULAR	28
5.8.1	<b>Análise da Fragmentação do DNA e Ciclo Celular com Iodeto de Propídio</b>	29
5.8.2	<b>Análise do Padrão de Morte Celular com Anexina V e Iodeto de Propídio</b>	29
5.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>30</b>
6.1	CARACTERIZAÇÃO DA VIA HH EM CÉLULAS DE CEO	30
6.2	CITOTOXICIDADE DOS FÁRMACOS EM CÉLULAS TUMORAIS	31
6.3	CITOTOXICIDADE DO VISMODEGIB E ITRACONAZOL NA CAL27	33
6.4	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR	34
6.5	EFEITO DOS INIBIDORES NA MORFOLOGIA DAS CÉLULAS CAL27	35
6.5.1	<b>Avaliação por Micoropia Ótica</b>	35
6.5.2	<b>Análise de Volume e Granulosidade</b>	35
6.6	EXPRESSÃO GÊNICA DE PTCH1, SMO E GLI1 APÓS O TRATAMENTO	42
6.7	AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR	43
6.8	AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR	45

<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>46</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>50</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>51</b>



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 CARCINOMA ESCAMOCELULAR ORAL

O câncer de boca compreende os tumores que afetam os lábios e a cavidade oral (OMS, 2005). No último levantamento epidemiológico mundial sobre a doença, no ano de 2012, a incidência mundial de câncer de boca foi cerca de 300.000 (FERLAY et al., 2015). No Brasil, para cada ano do biênio 2018/2019, estimam-se 15.700 novos casos desta neoplasia, sendo 11.200 em homens e 3.500 em mulheres. Na região nordeste, o câncer de boca corresponde à quinta neoplasia maligna mais comum em indivíduos do sexo masculino, ratificando sua relevância e impacto socioeconômico (BRASIL, INCA, 2018).

O carcinoma escamocelular oral (CEO) é a neoplasia mais comum de cabeça e pescoço, excluindo-se o câncer de pele não-melanoma. Dentre os agentes fortemente associados à etiologia do CEO estão o álcool, tabaco e a noz de betel (OMS, 2005). Adicionalmente, estudos têm relacionado o CEO com outros fatores como dieta, poluentes ambientais, exposição ocupacional e algumas condições hereditárias, como disceratose congênita e anemia de Fanconi (ALTER et al., 2010; CHI; DAY; NEVILLE, 2015).

Clinicamente, o CEO apresenta-se como uma lesão nodular ulcerada de tamanhos variados, contudo esta manifestação clínica pode variar consideravelmente de acordo com o sítio da lesão (BAGAN; SARRION; JIMENEZ, 2010; OMS, 2005). Geralmente, o CEO, em seus estágios iniciais são assintomáticos ou apresentam sintomas discretos como incômodo e ardência. Entretanto, com a progressão da doença, os pacientes geralmente apresentam dor, dificuldade de falar, engolir, mastigar, dentre outros sintomas (CHI; DAY; NEVILLE, 2015; K. MARKOPOULOS, 2012; OMS, 2005). Os sítios mais acometidos pelo CEO são a língua, assoalho da boca e lábio inferior (CHI; DAY; NEVILLE, 2015; MARKOPOULOS, 2012; RIVERA; VENEGAS, 2014).

Mais de 60% dos pacientes com CEO são diagnosticados em estágios avançados da doença, revelando que existe uma dificuldade dos profissionais e pacientes em detectar a presença das lesões iniciais (LINGEN et al., 2008), refletindo em um prognóstico desfavorável para esta doença (OMS, 2005). 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).

Histologicamente, o CEO apresenta características típicas de uma neoplasia de células escamosas como a formação de queratina, podendo formar aglomerados denominados de pérolas córneas, e crescimento invasivo, que se caracteriza pelo rompimento da membrana basal e invasão de tecidos adjacentes. A gradação histológica do CEO é dada de acordo com o grau de diferenciação e compreende os graus bem, moderadamente e pouco diferenciado, sendo que quanto menor é a diferenciação, maior é o pleomorfismo celular e a quantidade de eventos atípicos. O fronte de invasão também pode variar, podendo apresentar-se de modo expansivo, quando tem grande ilhas tumorais com margens bem definidas, de modo infiltrativo, quando as células estão isoladas ou em cordões com margens com pouca definição, ou pode apresentar os dois padrões de maneira simultânea (OMS, 2005).

A gradação histológica do tumor contribui pouco para determinar o prognóstico do paciente, todavia torna-se mais significativa quando o fronte de invasão é analisado, sendo o padrão expansivo menos agressivo do que o infiltrativo (OMS, 2005). Em contrapartida, o estadiamento do tumor pela classificação TNM, do inglês “*tumor-node-metastasis*”, é importante para o tratamento e prognóstico do CEO. A classificação TNM consiste em um estadiamento anatômico que descreve a extensão do tumor primário, o acometimento de linfonodos e a presença de metástase em tecidos distantes (SOBIN, 2003). O tratamento do CEO depende de muitos fatores como o estadiamento do tumor, saúde geral do paciente, sítio anatômico, qualidade de vida durante o tratamento e estética (YAO et al., 2007).

De maneira geral, o tratamento do CEO é cirúrgico, incluindo a remoção do tumor e 1 a 2 cm de margem livre de tumor. O esvaziamento cervical é realizado quando existe acometimento de pelo menos 1 linfonodo e pode ser do tipo modificado ou radical. A radioterapia pode ser associada ao tratamento no caso de tumores em estadiamento III ou IV e é indicada como terapia exclusiva nos casos considerados inoperáveis (CHI; DAY; NEVILLE, 2015; BRASIL, INCA, 2001). No Brasil, a taxa de sobrevivência dos pacientes com CEO é cerca de 50% em 5 anos (BRASIL, INCA, 2001). Apesar dos avanços científicos relacionados a patogênese dos tumores, a terapêutica para este tumor não evoluiu na mesma velocidade, na última década, especialmente na utilização de fármacos anti-tumorais ou reposicionados direcionados para alvos específicos relacionados a patogênese do CEO, como a Via HH.

## 1.2 VIA DE SINALIZAÇÃO HEDGEHOG

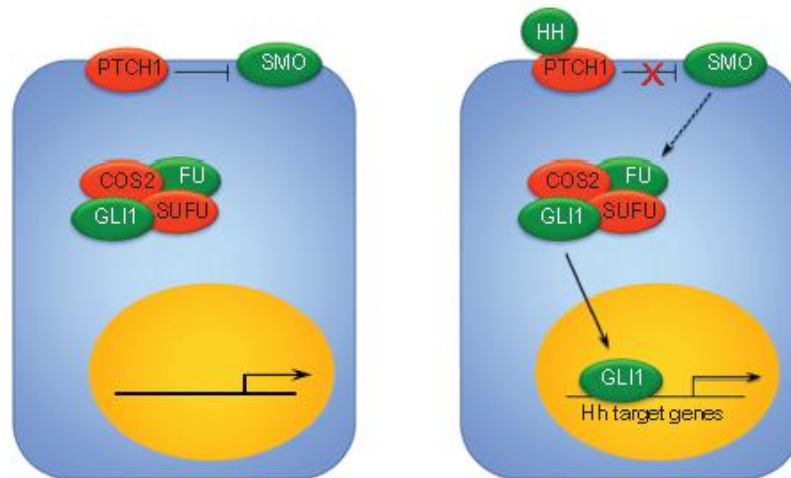
A via de sinalização Hedgehog (HH) foi descrita inicialmente em estudos com *Drosophila melanogaster* (GOODRICH et al., 1997). Esta via exerce um papel fundamental no crescimento e diferenciação celular durante o desenvolvimento embrionário de diversos tecidos (HASSOUNAH; BUNCH; MCDERMOTT, 2012) como dentes (HARDCASTLE et al., 1998), pulmão (GRINDLEY et al., 1997), cólon, mama, esôfago (INGHAM; MCMAHON, 2001), próstata, estômago (CHARI; MCDONNELL, 2007), sistema nervoso (WETMORE, 2003) e pâncreas (THAYER et al., 2003).

A cascata sinalizadora mediada pelos componentes da via HH ocorre no cílio primário (BANGS; ANDERSON, 2017), organela formada por projeções da membrana dependentes de microtúbulos, que captam de sinais extracelulares (HASSOUNAH; BUNCH; MCDERMOTT, 2012). A atividade da via HH envolve três principais ligantes Sonic Hedgehog (SHH), Desert Hedgehog (DHH) e Indian Hedgehog (IHH) e dois receptores Patched1 (PTCH1) e Smoothed (SMO) (HARDCASTLE et al., 1998). A ativação clássica da via HH ocorre quando existe a interação entre o ligante HH e o receptor PTCH1, liberando a proteína SMO para iniciar cascatas intracelulares, que irão culminar na ativação de fatores de transcrição da família *Glioma-associated oncogene* (GLI), em especial a proteína GLI1 (Figura 1).

A ativação de GLI1 resulta na transcrição de genes alvos da via HH, envolvidos em funções relacionadas com o desenvolvimento tumoral, tais como a proliferação e diferenciação celular (ciclina D1 e D2, N-myc, PDGFR, IGF2, FoxM1, Foxa2, FoxF1, Myf5, HES1 e IGFBP3), sobrevivência (Bcl2), auto-renovação e determinação do destino da célula (Bmi1, Nanog), angiogênese (VEGF), transição epitélio-mesenquimal (Snail1, SIP1, Elk1 e Msx2) e invasão (osteopontina). Além destas funções, GLI1 atua como regulador positivo e PTCH1 como regulador negativo da via, sendo que, através dessa retroalimentação/*feedback*, a cascata sinalizadora pode ser amplificada ou atenuada (HOOPER; SCOTT; DRIVE, 2005; PO et al., 2010; STECCA; RUIZ I ALTABA, 2010).

Além da participação na embriogênese, a via HH também desempenha um papel na manutenção e crescimento de células-tronco adultas (ALTABA; SÁNCHEZ; DAHMANE, 2002), reparo tecidual (ASAI et al., 2006) e carcinogênese (ALTABA; SÁNCHEZ; DAHMANE, 2002; CHARI; MCDONNELL, 2007; YANG et al., 2010). A participação da via HH na carcinogênese foi inicialmente demonstrada através de estudos genéticos em pacientes com a síndrome de *Gorlin* (HAHN et al., 1996; JOHNSON et al., 1996). Indivíduos

portadores desta síndrome têm a pré-disposição para o desenvolvimento do carcinoma basocelular (CBC) (GORLIN; GOLTZ, 1960).

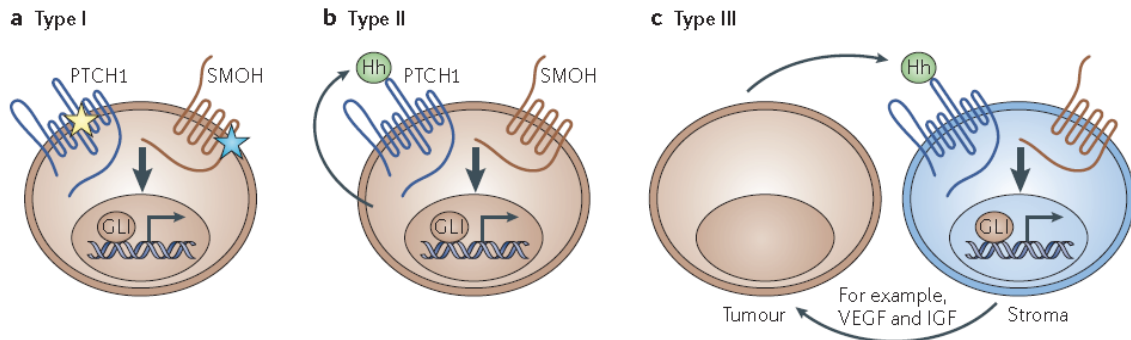


**Figura 1. Via de Sinalização Hedgehog.** Na ausência do ligante, PTCH1 exerce efeito inibitório em SMO, portanto, a cascata de sinalização intracelular não é ativada. Quando há interação entre o ligante e o receptor PTCH1, o efeito inibitório em SMO é liberado. A interação entre SMO e Suppressor of fused (SUFU) promove a ativação e translocação de Gli1 para o núcleo, resultando na transcrição de genes-alvo. Fonte: LIN et al., 2012.

Estudos com estes pacientes identificaram mutação no gene PTCH1, que codifica este receptor transmembranico, levando à inativação da sua inibição sobre SMO, resultando na hiperativação da via de maneira independente do ligante (HAHN et al., 1996; JOHNSON et al., 1996; LIN; MATSUI, 2012). Adicionalmente, foi demonstrada a existência de mutação em SMO, que também leva a via HH ao estado permanentemente ativado (XIE et al., 1998). Além das mutações em PTCH1 e SMO terem sido identificadas nos casos de CBC hereditários, foram também associadas à maioria dos casos esporádicos, destacando o papel da via HH na carcinogênese do CBC (GAILANI et al., 1996; HAHN et al., 1996; JOHNSON et al., 1996; XIE et al., 1998).

A via HH pode ser ativada através de diferentes mecanismos, cuja classificação foi estabelecida considerando as diferentes formas de ativação (RUBIN; DE SAUVAGE, 2006): 1) O modelo de ativação da via HH que ocorre de maneira independente do ligante devido a mutações em PTCH1 e SMO, já descrita previamente, é classificado como tipo I; 2) A ativação autócrina, na qual a própria célula tumoral produz e responde aos ligantes, é classificada como tipo II; 3) No tipo III ou parácrino, as células tumorais secretam o ligante para ativação da via HH nas células estromais, que irão produzir fatores de crescimento que estimulam a progressão tumoral (Figura 2) (RUBIN; DE SAUVAGE, 2006). Adicionalmente, existe uma variação do modelo III, no qual células do estroma produzem o ligante que irá

ativar a via HH nas células tumorais (DIERKS et al., 2007; SCALES; DE SAUVAGE, 2009). Um modelo alternativo sugere que a via HH está ativada exclusivamente em células-tronco tumorais, que produzem o próprio ligante ou respondem ao ligante secretado por outras células (SCALES; DE SAUVAGE, 2009). Independentemente do mecanismo pelo qual está sendo ativada, a inibição farmacológica da via HH tem demonstrado diminuir a população



tumoral. Deste modo, esta via consiste em um alvo terapêutico interessante para alguns tipos de câncer (HUANG et al., 2014; THOMAS et al., 2011; YOU et al., 2014).

**Figura 2. Modelos de ativação da via HH no câncer.** Tipo I: mutação de perda de função em PTCH1 ou ganho de função em SMO, levando à ativação constitutiva da via HH. Tipo II: modelo autócrino, no qual células tumorais produzem o ligante e este ativa a via HH na própria célula. Tipo III: modelo parácrino, no qual as células tumorais secretam o ligante para células do estroma, que produzem fatores para estimular o crescimento tumoral. Fonte: RUBIN, 2006.

### 1.3 POTENCIAL TERAPÊUTICO DOS INIBIDORES DE SMO

Resultados de estudos prévios do nosso grupo demonstraram que a via HH está ativada em CEO (CAVICCHIOLI BUIM et al., 2011), portanto esta cascata sinalizadora pode ser um alvo interessante como estratégia terapêutica deste tumor. Adicionalmente, não é do nosso conhecimento nenhum estudo na literatura que avalie o potencial terapêutico dos inibidores de SMO (vismodegib e itraconazol) em células de CEO.

Devido à participação da via HH no desenvolvimento de neoplasias humanas, sua inibição farmacológica representa uma importante estratégia terapêutica por promover uma diminuição/inibição da proliferação e migração celular e aumento da morte celular (YAN et al., 2011). Dentre as moléculas em teste, destacam-se os inibidores de SMO, como a ciclopamina e vismodegib (MIMEAULT; BATRA, 2010) e os inibidores da atividade de GLI1, como o GANT61 e GANT68 (LAUTH et al., 2007). A descoberta da ciclopamina como um inibidor de SMO foi um avanço na compreensão da via HH como alvo terapêutico. A ciclopamina é um alcaloide esteroidal isolado da planta *Veratrum californicum*, com efeito teratogênico e com atividade antitumoral em CBC e meduloblastoma (MB), decorrente da sua

capacidade de reduzir a atividade da via HH por funcionar como antagonista da proteína SMO (BERMAN et al., 2003; CHEN et al., 2002). No entanto, devido à sua toxicidade, potência limitada e fraca solubilidade oral, este fármaco não é adequado para ensaios clínicos (CHEN et al., 2002).

O vismodegib, também conhecido como GDC-0449, é quimicamente relacionado com a ciclopamina, contudo, ele é capaz de se ligar com maior afinidade e especificidade ao SMO, refletindo em uma maior supressão da via HH. Este fármaco foi aprovado pelas agências americana *Food and Drug Administration* e europeia *European Medicines Agency* para o tratamento de carcinoma de células basais, localmente avançado ou metastático, em pacientes que não são candidatos à ressecção cirúrgica ou radioterapia (DIRIX, 2014; RUDIN, 2012; SEKULIC et al., 2012; WONG et al., 2009). A dose recomendada para o tratamento destes casos é de 150 mg diários que devem ser administrados via oral (SANDHIYA et al., 2013). Alguns dos efeitos colaterais relatados nos estudos clínicos com CBC foram espasmos musculares, alopecia, perda do paladar, perda de peso, fadiga, náuseas, perda de apetite e diarreia (RUDIN, 2012; SEKULIC et al., 2012).

A eficácia do vismodegib em outros tipos de câncer ainda está sendo estudada. Estudos *in vitro* demonstraram que o vismodegib foi capaz de diminuir a viabilidade celular e induzir apoptose em células de câncer de pâncreas e células tronco pancreáticas e, em linhagens de câncer de mama, diminuiu a sobrevivência celular (SINGH, 2011; BENVENUTO, 2016). Muitos estudos clínicos, em diferentes fases, estão em andamento a fim de demonstrar os efeitos do vismodegib em monoterapia ou em conjunto com outras drogas. Os ensaios clínicos estão sendo realizados em diversos tipos de câncer como condrosarcoma avançado (NCT01267955), câncer de mama metastático (NCT01071564), MB (NCT00939484), sarcoma (NCT01154452), dentre outros (U.S., NLM, 2018).

Entretanto, mecanismos de resistência ao tratamento com o vismodegib têm sido demonstrados em estudos com MB e CBC (CHANG; ORO, 2012; RUDIN et al., 2009). A resistência ao tratamento com vismodegib está relacionada com suas propriedades farmacocinéticas como alta afinidade por proteínas do plasma, absorção limitada e lenta eliminação que conferem a este inibidor uma baixa concentração de droga no estroma (GRAHAM et al., 2011; TAKEBE et al., 2015). Esta resistência pode também estar associada à ativação compensatória de outras vias de sinalização, que podem levar GLI a seu estado ativado independentemente de SMO (RAMASWAMY et al., 2012). Adicionalmente, mutações em SMO que favorecem a quebra de ligação entre o agente terapêutico e o receptor foram relacionadas com o fracasso no tratamento com vismodegib (YAUCH et al., 2009).

Neste sentido, o itraconazol destaca-se como um potencial agente de combate à resistência ao tratamento anti-HH, prevenindo o acúmulo de SMO no cílio primário, porém agindo em um sítio diferente dos outros inibidores (KIM et al., 2010). O itraconazol é um antifúngico sistêmico e foi identificado como um potente antagonista da via de sinalização HH através de um HTS, do inglês *high-throughput screening*, de moléculas previamente testadas em humanos (KIM et al., 2010).

Em estudo *in vitro*, o itraconazol demonstrou inibição parcial da expressão de SMO em fibroblastos embrionários murinos com mutação em SMO (SMO<sup>D477G</sup>) resistentes à terapia com vismodegib e inibiu efetivamente a expressão de SMO nos fibroblastos com a forma normal do receptor (SMO<sup>WT</sup>). Adicionalmente, em células de MB murino, o itraconazol inibiu a proliferação e a atividade da via HH em culturas resistentes ao vismodegib (KIM et al., 2013). Em linhagens de melanoma, o itraconazol foi capaz de inibir a proliferação celular, formação de colônias e as vias de sinalização HH e Wnt. Em estudo *in vivo*, o itraconazol inibiu o crescimento do melanoma e aumentou a sobrevivência dos animais (LIANG et al., 2017).

Estudos *in vivo* com MB e CBC também demonstraram que o itraconazol confere uma menor morbidade aos animais (KIM et al., 2013). Um estudo clínico com CBC, avaliando o efeito do tratamento com itraconazol nesta neoplasia, demonstrou que o tratamento reduziu a proliferação celular, a atividade da via HH e também diminuiu o tamanho do tumor (KIM, DJ KIM, 2014). Atualmente, existem diversos ensaios clínicos em andamento que visam compreender o potencial inibitório do itraconazol em diversos tipos de câncer como câncer de esôfago (NCT02749513), câncer de ovário (NCT03081702), carcinoma de pulmão de células não pequenas (NCT02357836), dentre outros (U.S., NLM, 2018).

Apesar dos resultados promissores, o itraconazol parece ter menos relevância clínica como terapia de primeira linha do que o vismodegib. A concentração máxima inibitória do itraconazol é muito menos potente do que a do vismodegib e, além disso, no primeiro mês de tratamento, o itraconazol parece apresentar uma inibição da via HH inferior à do vismodegib. Deste modo, o itraconazol seria uma alternativa interessante para uma terapia de segunda linha (KIM, DJ KIM, 2014; TANG et al., 2012) ou em associação com o vismodegib (YANG; DINEHART, 2017).

## 2. JUSTIFICATIVA

O CEO consiste em um problema de saúde pública mundial, portanto desvendar os mecanismos biológicos envolvidos na patogênese tumoral é essencial para as estratégias de controle e descoberta de novas drogas com potencial anticâncer para tratamento da doença. Neste contexto, o estudo de vias de sinalização embrionárias tem se destacado como um campo promissor. Estas vias participam do desenvolvimento embrionário normal de diversos órgãos e a sua hiperativação tem sido associada com desenvolvimento tumoral. A via Hedgehog tem demonstrado bons resultados como alvo terapêutico *in vitro* e *in vivo*. Adicionalmente, já estão em andamento alguns ensaios clínicos a fim de comprovar os efeitos anti-tumorais do vismodegib e itraconazol em diversos tipos de câncer, todavia ainda não existem na literatura estudos que demonstrem o potencial terapêutico destes inibidores em CEO. Nosso grupo já demonstrou que a via HH encontra-se ativada em CEO humano (CAVICCHIOLI BUIM; GURGEL et al., 2011), inclusive em etapas pré-malignas (DIAS et al., 2015) e estroma tumoral (VALVERDE et al., 2016), portanto, este trabalho visa dar continuidade ao estudo da via HH como alvo terapêutico em CEO.

## 3. HIPÓTESE

Inibidores farmacológicos de SMO (vismodegib e itraconazol) interferem na expressão gênica dos componentes da via HH (SHH, PTCH1, SMO e GLI1), exercem efeitos inibitórios na viabilidade e promovem morte celular.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos dos inibidores de SMO (vismodegib e itraconazol) sobre a expressão gênica dos componentes da via HH (PTCH1, SMO e GLI1), ciclo celular e morte celular em células de CEO.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a expressão dos componentes da via HH (SHH, PTCH1, SMO e GLI1) em células de CEO;



- Avaliar a expressão dos componentes da via HH (PTCH1, SMO e GLI1) após o tratamento com os inibidores de SMO em células de CEO;
- Analisar os efeitos dos inibidores de SMO sobre a viabilidade celular em linhagens de tumores humanos;
- Avaliar os efeitos dos inibidores de SMO sobre a viabilidade, ciclo celular e padrão de morte em células de CEO após o tratamento.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

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

### 5.2 MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS EM CULTURA

As linhagens celulares foram cultivadas em garrafas para cultura de células (75 cm<sup>3</sup>, volume de 250 mL), em meio DMEM (Gibco®), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco®) e 50 µg/mL de gentamicina (Novafarma, Anápolis, GO, BRA). As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C e foi realizado o acompanhamento diário do crescimento celular com a utilização de microscópio de inversão. A manutenção das células com tripsinização foi realizada sempre que o crescimento celular atingiu a confluência necessária, ou seja, preenchia 70 a 80% do volume total da garrafa de cultura. As linhagens deste estudo foram testadas mensalmente para contaminação com micoplasma através do corante Hoechst (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA).

De acordo com os métodos de estudo aplicados, as células de CEO foram submetidas às seguintes condições: 1) *Starvation* por 24h: para caracterização da via HH nas diferentes linhagens celulares de CEO; 2) Redução de soro fetal bovino para 5%: para a avaliação dos efeitos dos inibidores na expressão dos genes HH.

#### 5.2.1 Obtenção de células 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.

As células do PBMC foram isoladas 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 SBF, 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.

### 5.3 EXPRESSÃO GÊNICA DOS COMPONENTES DA VIA HH EM CÉLULAS DE CEO

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

Para isolamento do RNA total, as células foram plaqueadas em placas de 6 poços em uma densidade de  $0,7 \times 10^5$  células/ml, em um volume de 2,5 mL por poço. Foi utilizado o sistema de extração de RNA por microcolunas de sílica (Rneasy® Mini Kit, QIAGEN) e os seguintes métodos de obtenção do lisado de células: 1) Obtenção do RNA total para os ensaios de caracterização da via: lise mecânica, com auxílio de *cell scraper* e tampão de lise RLT (600 µl); 2) Obtenção de RNA total após tratamento com os inibidores: as células foram tripsinizadas e, em seguida, centrifugadas e ressuspensas em 600 µl de RLT. Posteriormente, para intensificar a lise celular, o lisado foi passado por uma agulha de 0,9mm acoplada em uma seringa e em seguida homogeneizado em vortex.

Para a separação de fases, foram acrescentados ao lisado 600 µl de etanol 70%, sendo homogeneizados gentilmente com auxílio de pipeta de 1000 µl. Em seguida, 700 µl deste conteúdo foram transferidos para a microcoluna acoplada a um tubo coletor, que foram centrifugados a 10.000 rpm durante 30s. Esta etapa foi repetida até que o conteúdo do eppendorf fosse finalizado. Para as etapas de lavagem seguintes, 700 µl do tampão RW1 foram passados na microcoluna, seguidos de 500 µl do tampão RPE. Em seguida, o RNA foi eluído com 20 µl de água Rnase/Dnase Free e armazenado em freezer com temperatura de -80°C em tubo devidamente identificado.

A quantidade e pureza do RNA extraído de cada amostra foi analisada em aparelho de fluorimetria (QuBit™, Life Technologies, 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. Todos os experimentos foram realizados em condições DNase/RNase free.

### 5.3.2 Avaliação da expressão dos genes 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 SHH (Hs00179843\_m1), PTCH1 (Hs00181117\_m1), SMO (Hs01090242\_m1) e GLI1 (Hs01110766\_m1), assim como para os genes referências 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 µl. Cada um dos poços continha 2,5ng/µL de cDNA da amostra (4µL), 1µL de Assay (Applied Biosystems™, Foster City, CA), 10µL de Taqman PCR Master Mix Kit (Applied Biosystems™, Foster City, CA) e 5µL de água livre de RNase. O programa de amplificação consistiu de um ciclo inicial de 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

Após as corridas de amplificação e dissociação, os valores de *Quantification Cycles* (Cqs) foram obtidos com o auxílio do Programa Operacional 7500™System SDS (Applied Biosystems, USA). Para quantificação relativa, foi utilizado o método comparativo de Cq ( $2^{-\Delta\Delta CQ}$ ) (Livak, Schmittgen, 2001). O valor de Cq de cada amostra foi normalizado utilizando a média geométrica dos valores de Cq do gene referência B2M (Vandesompele et al., 2002; Huggett et al., 2005) e calibradas com a média geométrica dos valores de Cq das amostras tratadas com DMSO. As reações de qPCR foram realizadas nas células tratadas e não tratadas com inibidores da via Hh, em duas reações independentes, com as amostras em triplicata.

## 5.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS INIBIDORES DE SMO – ALAMAR BLUE

Para avaliar a citotoxicidade dos inibidores de SMO sobre a proliferação de células tumorais e não tumorais (HaCaT e PBMC), o ensaio do alamar blue foi realizado após 72h 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 (RAMBERSAD, 2012). Neste ensaio, todas as células listadas na Tabela 1 foram utilizadas. As células tumorais foram distribuídas em placas de 96 poços numa densidade de  $0,7 \times 10^5$  células/ml em um volume de 100  $\mu$ L.

Os inibidores foram dissolvidos em DMSO, adicionados em cada poço e incubados pela quantidade de horas do experimento. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo com concentrações variando de 0,03 a 5  $\mu$ g/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  $\mu$ L da solução estoque (0,312 mg/mL) de alamar blue foram adicionados a cada poço. As absorbâncias foram mensuradas nos comprimentos de onda de 570 nm (reduzido) e 600 nm (oxidado) utilizando leitora de placas Spectra Max 190.

A viabilidade celular foi calculada utilizando a seguinte fórmula:  $\text{viabilidade} = \frac{\text{ALW}}{\text{AHW} \times \text{R0}}$ . Onde, ALW e AHW são as absorbâncias no menor e maior comprimento de onda, respectivamente. O R0 foi calculado utilizando a seguinte fórmula:  $\text{R0} = \frac{\text{AOLW}}{\text{AOHW}}$ . 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  $\times$  log da concentração e determinado suas  $\text{CI}_{50}$  (concentração inibitória de 50%) realizado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

Em adição, o ensaio de Alamar Blue também foi realizado nos tempos de tratamento de 6h, 12h, 24h, 48h e 72h na linhagem CAL27.

**Tabela 1.** Linhagens tumorais humanas utilizadas no ensaio de citotoxicidade

<b>Linhagem tumoral</b>	<b>Tipo histológico</b>	<b>Fonte</b>
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
CAL27	Carcinoma escamocelular oral	Centro Antoine Lacassagne Laboratório de Bio-Oncologia Nice - França
HepG2	Carcinoma hepatocelular	Instituto de Anatomia e Biologia Wistar, Filadélfia, Pensilvânia
HT-29	Adenocarcinoma de cólon	Instituto Sloan Kettering – EUA
HCT-116	Carcinoma de cólon	Departamento de Bioquímica da Universidade do Alabama - EUA

## 5.5 CONCENTRAÇÃO DOS INIBIDORES DE SMO

Em todos os ensaios com os inibidores, foram utilizados os compostos-teste vismodegib (Selleck Chemicals, USA) e itraconazol (Sigma-Aldrich, USA). A doxorubicina (Laboratório IMA S.A.I.C., Buenos Aires, Argentina) foi utilizada como controle positivo, já que este fármaco é um quimioterápico aprovado pela FDA para tratamento de diversos tipos de câncer como câncer de mama, ovário e estômago (NIH, 2017). Adicionalmente, o 5-Fluorouracil (5-FU) (Sigma-Aldrich, USA) também foi testado em alguns ensaios, por ser um composto aprovado pela FDA como tratamento paliativo para câncer de mama, estômago, pâncreas e cólon-retal (NIH, 2017). Todos os compostos utilizados nos experimentos foram dissolvidos em DMSO e diluídos em salina para concentrações que variaram de acordo com o ensaio realizado (Tabela 2). Estas concentrações foram estabelecidas conforme valores de  $CI_{50}$  obtidos para cada composto nas diferentes linhagens. Para avaliação de possíveis efeitos do veículo da droga, o DMSO também foi testado em alguns ensaios, sempre na concentração de 0,2%.

**Tabela 2.** Concentração dos fármacos

Ensaio	Itraconazol	Vismodegib	Doxorrubicina	5-FU
	Concentração (µg/mL)			
<b>Citotoxicidade – Alamar Blue</b>	0,19 – 50	0,19 – 50	0,19 - 25	0,19 – 25
<b>Viabilidade – Azul de Tripán</b>	25 e 50	25 e 50	-	-
<b>Expressão gênica</b>	25 e 50	25 e 50	1	10
<b>Ciclo celular</b>	50	50	1	10
<b>Morte Celular</b>	50	50	1	10

### 5.6 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR – AZUL DE TRIPAN

O ensaio com Azul de Tripán avalia a viabilidade celular através da integridade de membrana (WARREN, 2001). Portanto, para avaliar a viabilidade das linhagens deste estudo, o ensaio com Azul de Tripán foi realizado após 24h e 48h de exposição aos compostos. As células de CEO foram distribuídas em placas de 6 poços numa densidade de  $0,7 \times 10^5$  células/mL em um volume de 2,5 mL e foram incubadas durante 24h e 48h com vismodegib e itraconazol. Após o tempo de tratamento, o meio foi removido e os poços foram lavados com salina. Em seguida, as células foram tripsinizadas e foram transferidos 90 µL de células para um eppendorf de 500 µL contendo 10 µL de Azul de Tripán. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer e as células não-viáveis apresentavam coloração azul.

### 5.7 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA

Para a realização da análise morfológica, as células CAL27 foram incubadas em placa de cultura de 6 poços numa densidade de  $0,7 \times 10^5$  células/mL em um volume de 2,5 mL. As células foram observadas com o auxílio de microscópio de inversão (Leica DMI8, Wetzlar, Germany) antes e após o tratamento com os inibidores de SMO. As alterações morfológicas foram avaliadas e fotografadas utilizando o software Leica Application Suite X (XLAS X, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Em adição, a morfologia das células CAL27 também foi avaliada por citometria de fluxo através dos parâmetros FSC (tamanho/volume) e SSC (granulosidade).

### 5.8 ESTUDOS SOBRE O CICLO CELULAR E PADRÃO DE MORTE CELULAR

Os experimentos seguintes foram realizados para estudar o efeito do itraconazol e vismodegib sobre o ciclo celular e o padrão de morte celular em células CAL27. Em todos os experimentos, 2,5 mL de uma solução de células ( $0,7 \times 10^5$  cells/mL) foram inseridos em

placas de 6 poços e incubados por *overnight* para permitir a adesão das células na placa. As células foram tratadas por 72 horas com itraconazol e vismodegib. A doxorubicina e o 5-FU foram usados como controles positivos. Os experimentos foram realizados em duplicatas e repetidos pelo menos três vezes. O monitoramento da integridade da membrana celular foi determinado pelo método de exclusão de azul de tripan, de acordo com protocolo já descrito no item 5.5.

### **5.8.1 Análise da fragmentação do DNA e ciclo celular com Iodeto de Propídio**

A determinação do conteúdo de DNA nuclear da célula, que reflete as fases do ciclo celular, foi avaliada 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 (300 µL) contendo 0,1 % de triton X-100, 0,1% de citrato de sódio, 2 µg/mL de IP e 100 µg/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.

### **5.8.2 Análise do padrão de morte celular com Anexina V e Iodeto de Propídio**

Após o tratamento com os inibidores da via HH, 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 µL do tampão de ligação de anexina, 5 µL de IP e 5 µL de anexina V-FITC. Após 15 minutos de incubação em isopor com gelo, na ausência de luminosidade, 400 µL 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 ANÁLISE ESTATÍSTICA

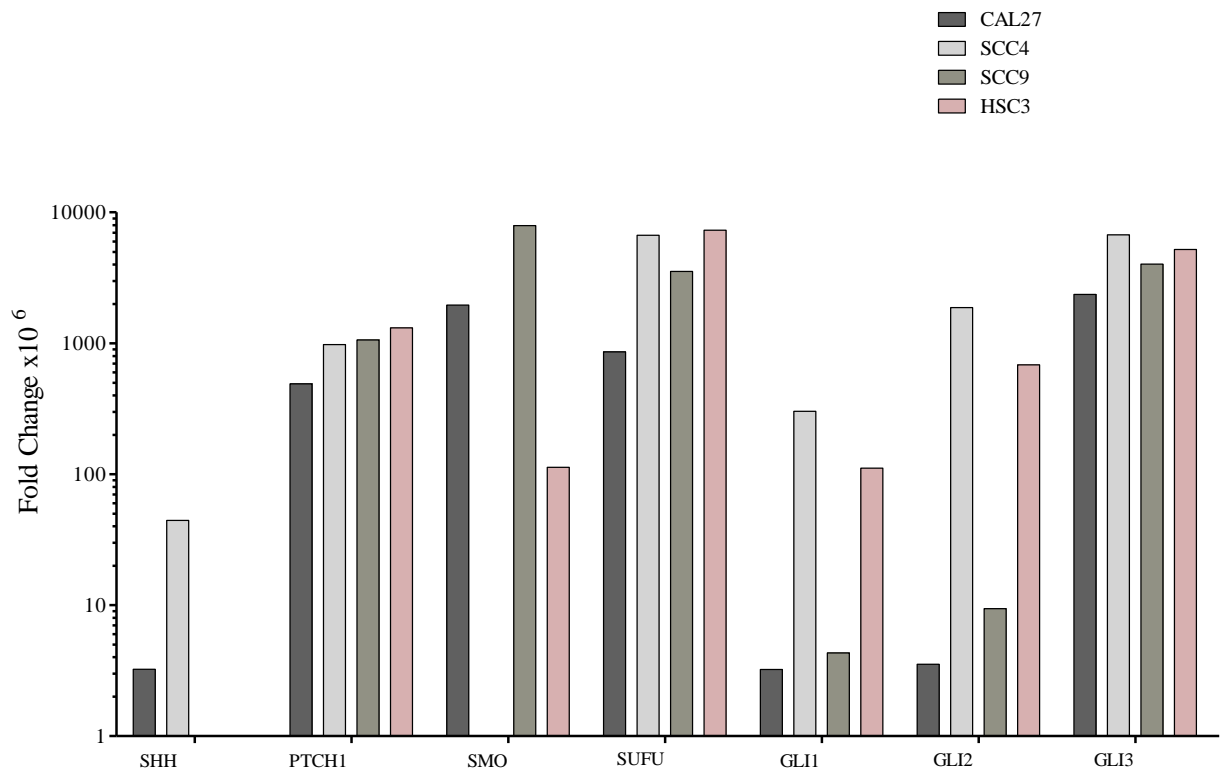
Os resultados obtidos foram compilados em um banco de dados organizado em planilhas do programa operacional Microsoft Excel e a análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism versão 6.03 (*GraphPad Software, Inc., San Diego, USA*). Os dados foram analisados segundo a distribuição 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 de viabilidade celular (Azul de Tripán), citometria (ciclo celular e padrão de morte celular) e qPCR foi avaliada pelo teste ANOVA (análise de variância) seguida do teste de Student-Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ). A análise estatística deste estudo considerará como nível de significância o valor de “p” correspondente a alfa ( $\alpha$ ) menor ou igual a 5%.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 CARACTERIZAÇÃO DA VIA HH EM CÉLULAS DE CEO

A expressão dos genes HH foi avaliada através de qPCR nas linhagens de CEO CAL27, SCC4, SCC9 e HSC3. Os níveis de mRNA dos fatores de transcrição GLI1 e GLI2 e de PTCH1 nas linhagens ratifica a atividade da via HH nestas células (Figura 3). Apenas a SCC4 não apresentou expressão do gene SMO. A CAL27 e a SCC9 foram as linhagens que menos expressaram a forma repressora de GLI, o GLI3, sendo a SCC4 a linhagem que mais expressou este gene, seguida da HSC3. De maneira semelhante, a CAL27 e a SCC9 expressaram menos SUFU, regulador negativo da via HH, em comparação às demais linhagens, sendo que a SCC4 apresentou maiores quantidades de mRNA de SUFU.





**Figura 3.** Perfil de expressão gênica dos componentes da via Hedgehog em linhagens de CEO.

## 6.2 CITOTOXICIDADE DOS FÁRMACOS EM CÉLULAS TUMORAIS

O vismodegib apresentou citotoxicidade com valores de  $CI_{50}$  que variaram de 20,50  $\mu\text{g/mL}$ , para a SCC9, a  $>50 \mu\text{g/mL}$  para as linhagens SCC25, HepG2 e HT-29. Os valores de  $CI_{50}$  do itraconazol variaram de 8,10  $\mu\text{g/mL}$ , para a SCC9, a  $>50 \mu\text{g/mL}$  para as linhagens CAL27, HSC3, SCC25 e HepG2 (Tabela 3). Os controles positivos, doxorrubicina e 5-FU, demonstraram atividade citotóxica para todas as linhagens tumorais. A doxorrubicina apresentou valores de  $CI_{50}$  que variaram de 0,01  $\mu\text{g/mL}$  na HepG2 a 1,68  $\mu\text{g/mL}$  na CAL27 e os valores do 5-FU variaram entre 0,17  $\mu\text{g/mL}$  na HepG2 a 18,64  $\mu\text{g/mL}$  na SCC9 (Tabela 3).

Os compostos-teste e controles-positivos também foram avaliados em duas células não-tumorais, a HaCAT, que é uma linhagem de queratinócitos imortalizados, porém não transformados, e o PBMC, cultura primária de células mononucleares do sangue periférico. O vismodegib apresentou  $CI_{50}$  de 23,81  $\mu\text{g/mL}$  na HaCAT e 31,16  $\mu\text{g/mL}$  no PBMC. O itraconazol demonstrou citotoxicidade com valores de  $CI_{50}$  de 17,66  $\mu\text{g/mL}$  na HaCAT e 15,35  $\mu\text{g/mL}$  no PBMC (Tabela 3).

**Tabela 3.** Citotoxicidade dos fármacos em linhagens tumorais e não-tumorais

Células	CI <sub>50</sub> µg/mL			
	DOX	5-FU	Vismodegib	Itraconazol
<b>Células tumorais</b>				
CAL27	1,68 1,21 - 2,34	5,1 3,7 - 7,2	34,03 29,1 - 39,9	>50
HSC 3	0,19 0,05 - 0,66	2,18 1,37 - 3,47	41,30 25,26 - 67,53	>50
SCC 4	0,04 0,03- 0,06	N.d.	35,03 25,96 - 47,29	49,03 35,17 - 68,35
SCC 9	0,42 0,14 - 1,26	18,64 10,67 - 32,54	20,50 10,41 - 40,36	8,10 1,51- 43,44
SCC 15	0,81 0,42 - 1,57	N.d.	>50	>50
SCC 25	0,57 0,26 - 1,25	N.d.	32,44 24,99 - 42,11	16,70 1,89 - 147,5
HepG2	0,01 0,01 - 0,04	0,17 0,03 - 0,79	>50	>50
HT-29	0,15 0,11 - 0,19	N.d.	>50	34,47 29 - 40,96
HCT-116	0,10 0,05 - 0,18	0,53 0,25 - 1,10	39,86 28,25 - 56,23	24,70 16,19 - 37,68
<b>Células não tumorais</b>				
HaCat	0,06 0,01 - 0,30	N.d.	23,81 4,85 - 116,7	17,66 0,78 - 399,4
PBMC	2,81 1,39 - 5,67	>25	31,16 15,02 - 64,68	15,35 3,68 - 63,96

Dados apresentados como valores de CI<sub>50</sub> em µg/mL 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 CITOTOXICIDADE DO VISMODEGIB E ITRACONAZOL NA CAL27

A citotoxicidade dos inibidores de SMO foi também avaliada nos tempos de 6h, 12h, 34h, 48h e 72h na célula CAL27. No tempo de 6h e 12h, não foi possível determinar a  $CI_{50}$  dos compostos-teste e o controle positivo 5-FU. Após 24h de tratamento, o vismodegib apresentou  $CI_{50}$  de 54,9  $\mu\text{g/mL}$  e, com 48h de tratamento o valor de  $CI_{50}$  do vismodegib foi 41,5  $\mu\text{g/mL}$ . Após 72h, o vismodegib apresentou  $CI_{50}$  de 34,03  $\mu\text{g/mL}$ . Não foi possível determinar o valor da  $CI_{50}$  do itraconazol para nenhum tempo. Os valores das  $CI_{50}$  do controle positivo 5-FU foram de 95,6  $\mu\text{g/mL}$ , 28,2  $\mu\text{g/mL}$  e 5,1  $\mu\text{g/mL}$  em 24h, 48h e 72h de tratamento, respectivamente (Tabela 4).

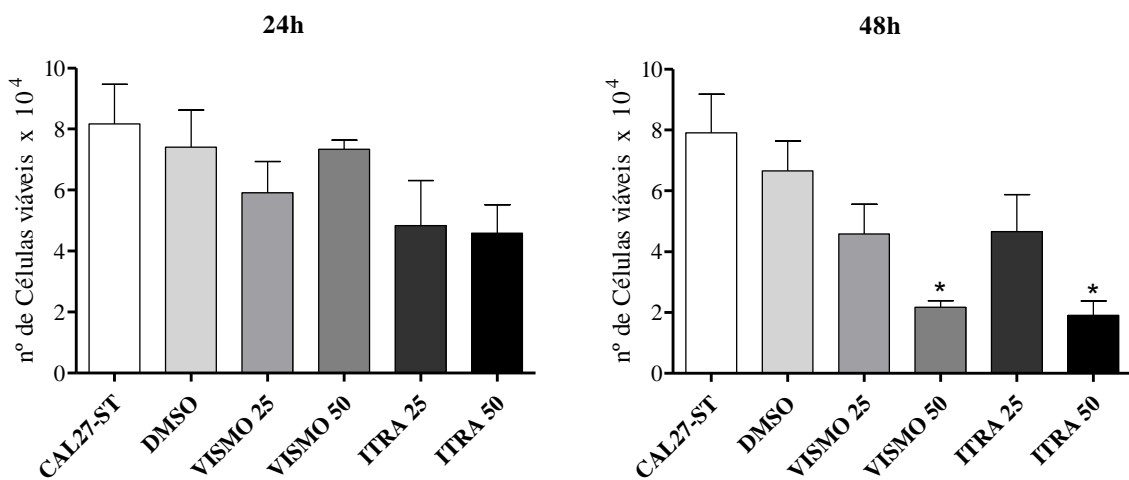
**Tabela 4.** Citotoxicidade dos fármacos na CAL27

Tempo de incubação	$CI_{50}$ em $\mu\text{g/mL}$		
	5-FU	ITRACONAZOL	VISMODEGIB
<b>6h</b>	> 25	> 50	> 50
<b>12h</b>	> 25	> 50	> 50
<b>24h</b>	95,6 (35,6 - 257,0)	>50	54,9 (45,5 - 66,3)
<b>48h</b>	28,2 (12,4 - 64,0)	>50	41,5 (34,4 - 50,2)
<b>72h</b>	5,1 (3,7 - 7,2)	> 50	34,03 (29,1 - 39,9)

Dados apresentados como valores de  $CI_{50}$  em  $\mu\text{g/mL}$  e intervalo de confiança de 95% obtidos por regressão não linear de três experimentos independentes realizados em duplicata, pelo ensaio de alamar blue.

#### 6.4 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

Após 24h e 48h de tratamento com os compostos na CAL27, houve uma redução da viabilidade celular nas células tratadas com o vismodegib e itraconazol em ambas as concentrações, em comparação às células CAL27 sem tratamento (CAL27-ST) e com o veículo dos fármacos (DMSO 0,2%). No tempo de 24h, o itraconazol de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  foi o fármaco com maior efeito na viabilidade celular, seguido do itraconazol de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Já no tempo de 48h, foi observada uma redução significativa no número de células viáveis após o tratamento com o itraconazol e vismodegib de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $p < 0,05$ ) (Figura 4).



**Figura 4.** Efeito dos inibidores de SMO sobre a viabilidade de células CAL27, determinado pelo ensaio de exclusão do corante azul de tripan após 24 e 48h de tratamento. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2%) utilizado para solubilizar as substâncias teste. Os valores respondem à média  $\pm$  E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. \*  $p < 0,05$  quando comparado com o grupo DMSO por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

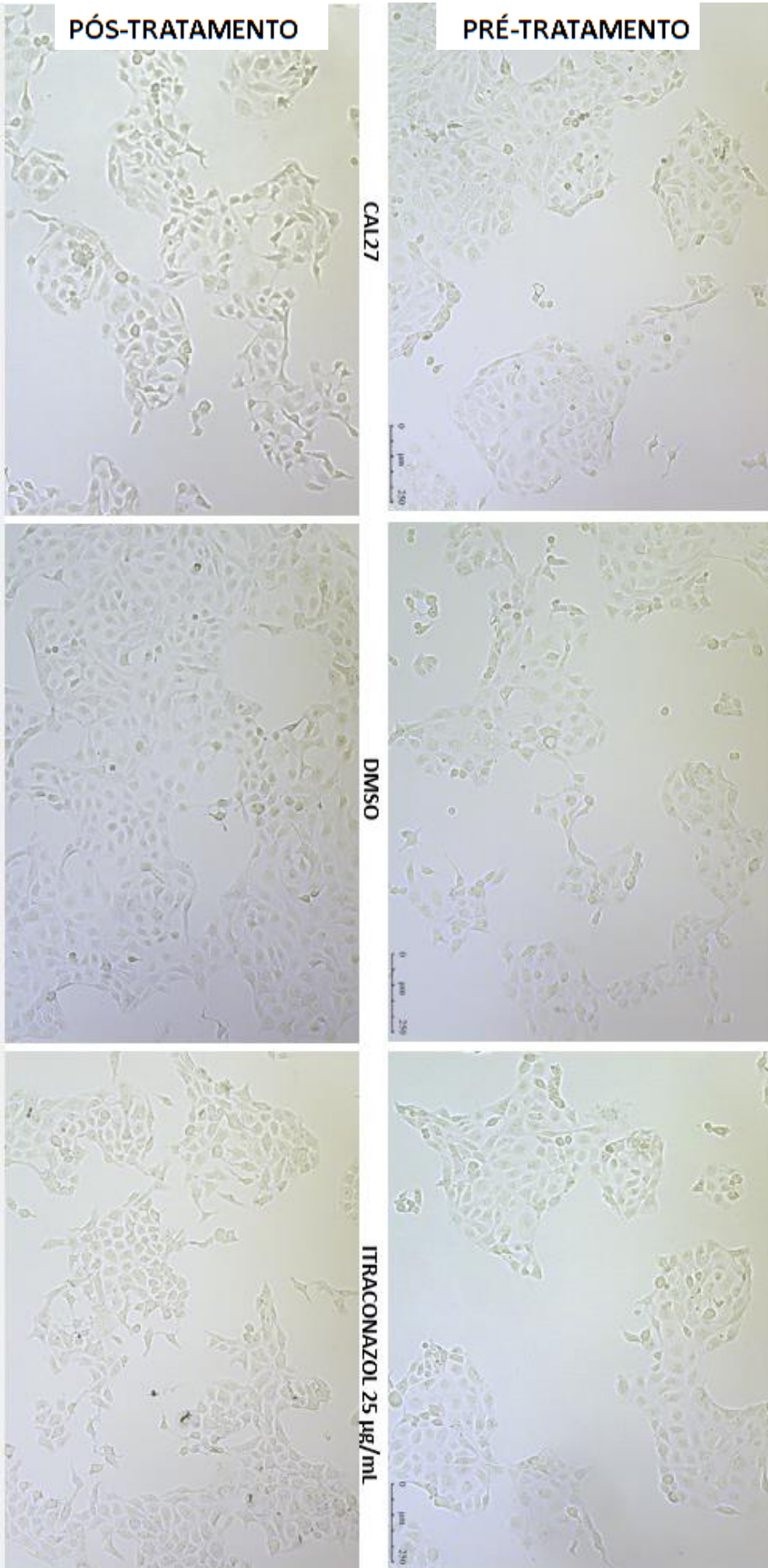
## **6.5 EFEITOS DOS INIBIDORES DE SMO NA MORFOLOGIA DAS CÉLULAS CAL27**

### **6.5.1. Avaliação por Microscopia Óptica**

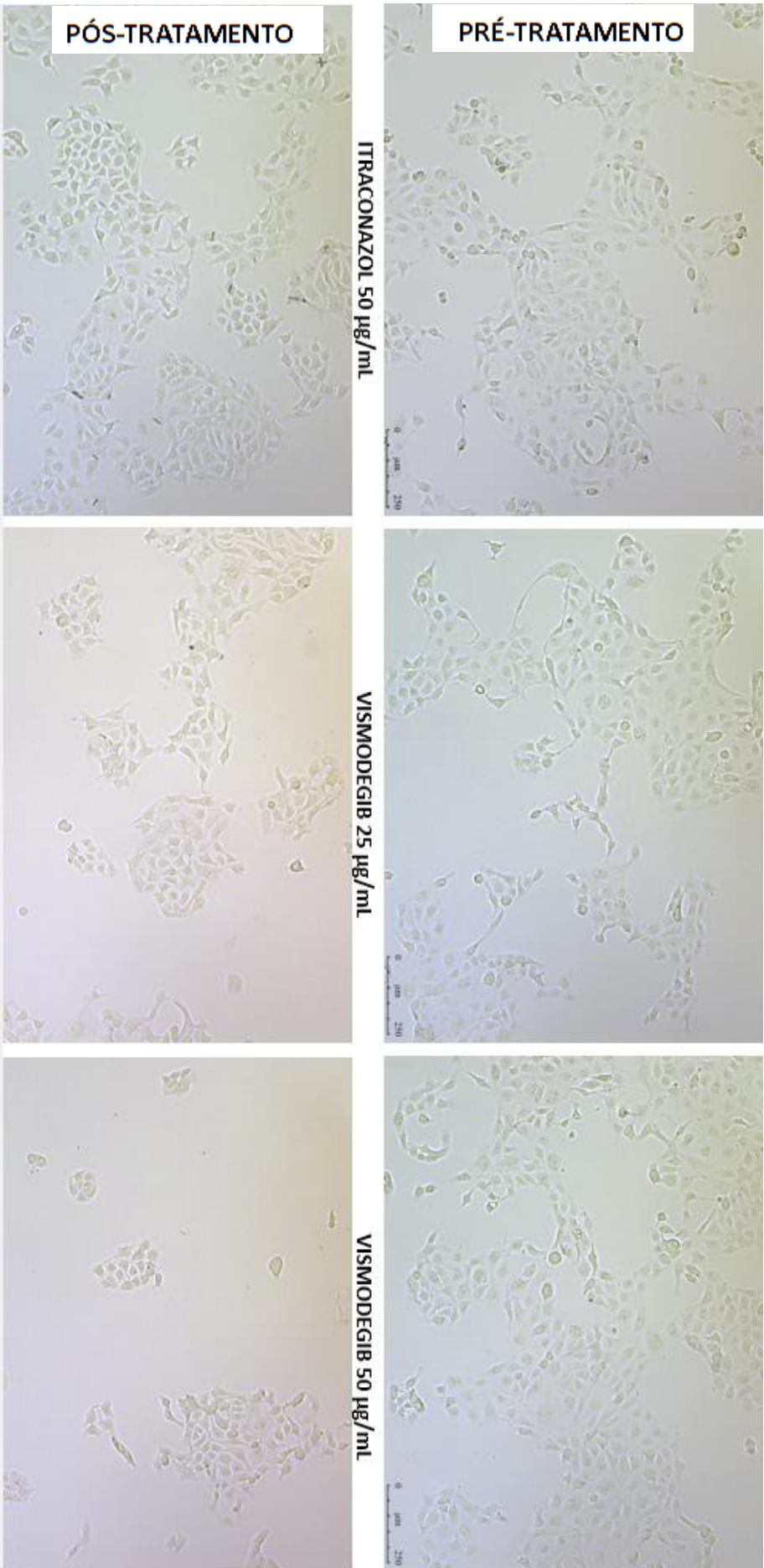
A análise da população e morfologia das células, em comparação com os grupos CAL27-ST e DMSO, demonstrou que, já em 24h, não houve um aumento numérico de células nos poços tratados com vismodegib e itraconazol, sendo este efeito mais evidente em 48h (Figuras 5, 6, 7 e 8). Um aspecto morfológico bem evidente para os grupos tratados foi uma menor visualização de células organizadas em ilhas tumorais e, quando estas existiam, apresentavam um volume reduzido, com células exibindo maior espreadimento, perda de contato e esmaecimento nuclear (Figuras 5, 6, 7 e 8). A retração celular também foi observada, principalmente nas células tratadas por 48h, com o itraconazol (Figuras 7 e 8).

### **6.5.2. Análise de Volume e Granulosidade**

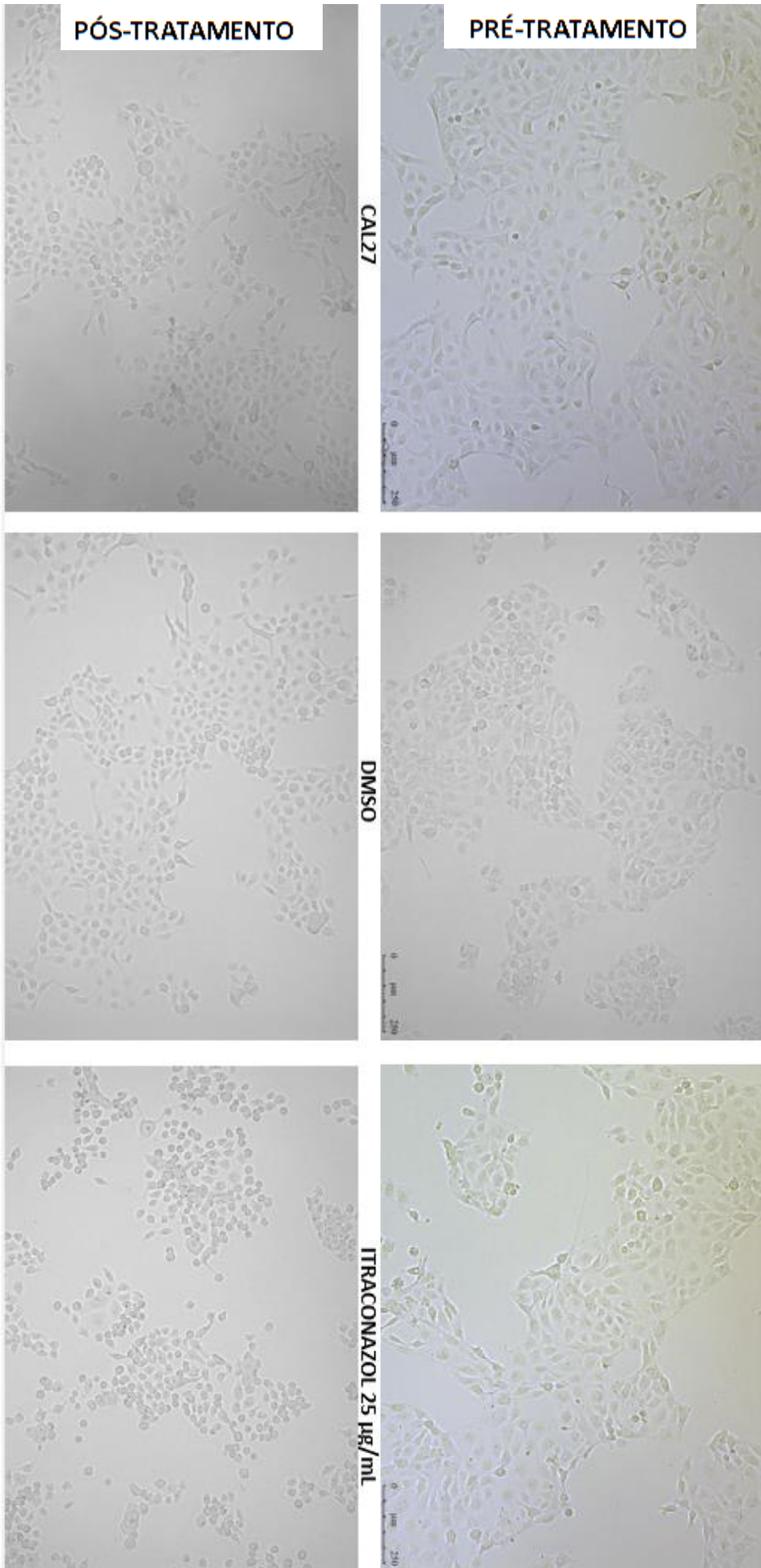
Após 72h de tratamento, a análise por citometria de fluxo também revelou uma retração celular causada pelos inibidores de SMO, observada por uma diminuição em *Forward Light Scatter* (FSC), e uma condensação nuclear por conta do aumento da dispersão lateral (SCC), indicando alterações morfológicas, como demonstram os *dotplots* da Figura 6. Os controles positivos, doxorrubicina e 5-FU, foram capazes de diminuir o tamanho celular ( $p < 0,05$ ). Em adição, estes fármacos e o itraconazol de 50  $\mu\text{g/mL}$  aumentaram a granulosidade das células CAL27 ( $p < 0,05$ ) (Figuras 9 e 10).



**Figura 5.** Efeitos do itraconazol sobre a morfologia de células CAL27 observados com o auxílio de microscópio de inversão (Leica DMi8, Wetzlar, Germany) antes e após 24h de tratamento.

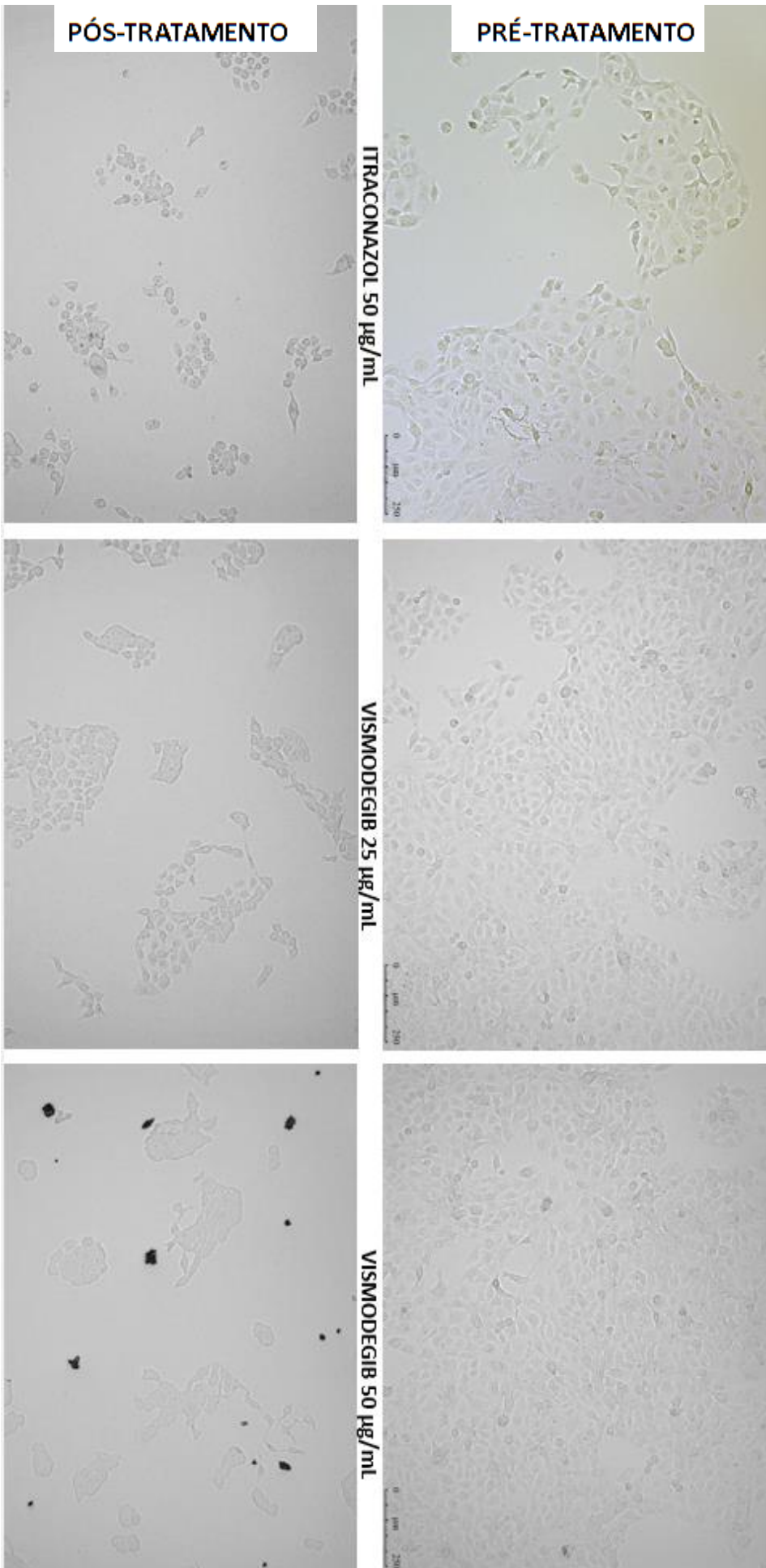


**Figura 6.** Efeitos do vismodegib e itraconazol sobre a morfologia de células CAL27 observados com o auxílio de microscópio de inversão (Leica DMI8, Wetzlar, Germany) antes e após 24h de tratamento.

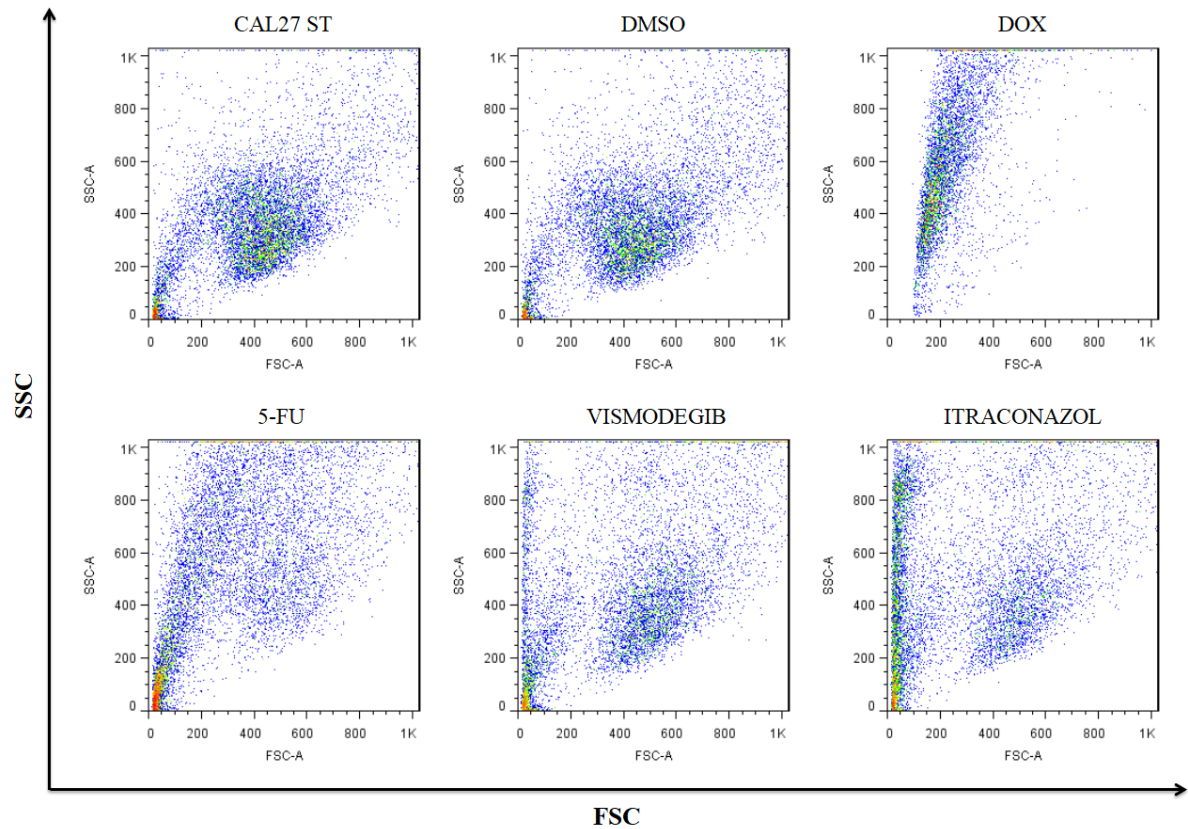


**Figura 7.** Efeitos do itraconazol sobre a morfologia de células CAL27 observados com o auxílio de microscópio de inversão (Leica DM18, Wetzlar, Germany) antes e após 48h de tratamento.

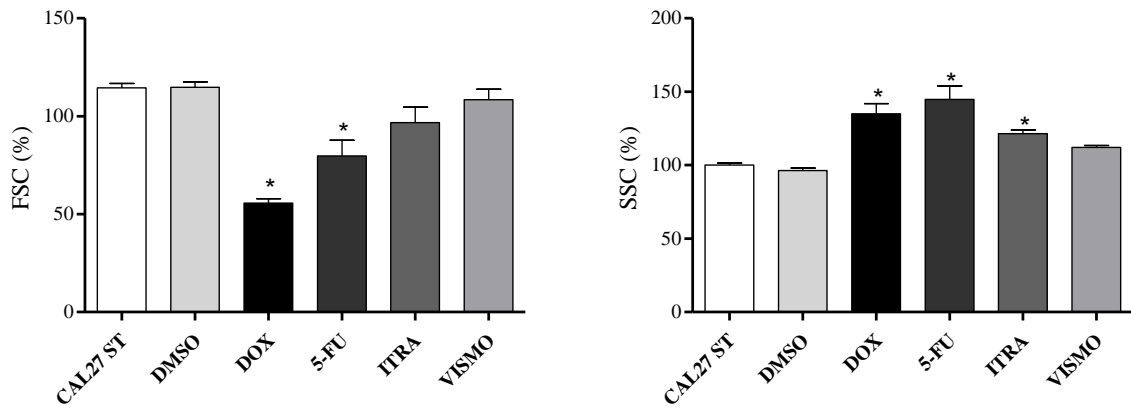




**Figura 8.** Efeitos do vismodegib e itraconazol sobre a morfologia de células CAL27 observados com o auxílio de microscópio de inversão (Leica DMi8, Wetzlar, Germany) antes e após 48h de tratamento.



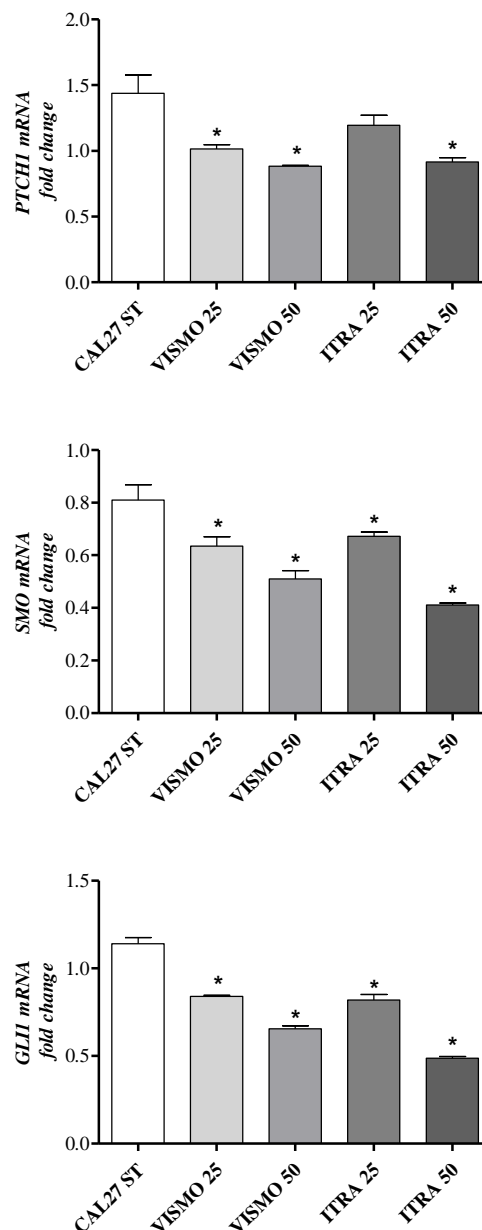
**Figura 9.** Dotplots representativos das características de dispersão da luz em células CAL27 tratadas com vismodegib e itraconazol, determinadas por citometria de fluxo usando o FSC (*Forward scatter* – desvio de luz para frente) e SSC (*Side scatter* – desvio de luz para o lado) como parâmetros de tamanho relativo e granulosidade ou complexidade interna da célula, respectivamente, após o período de tratamento de 72 h. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2%) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias. A doxorubicina (DOX, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e o 5-FU (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foram utilizados como controles positivos. Os dados são representativos de três experimentos independentes realizados em duplicata. Os *debris* celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.



**Figura 10.** Efeitos do vismodegib e itraconazol sobre a dispersão da luz em células CAL27, determinados por citometria de fluxo usando o FSC (*Forward scatter* – desvio de luz para frente) e SSC (*Side scatter* – desvio de luz para o lado) como parâmetros de tamanho relativo e granulosidade ou complexidade interna da célula, respectivamente, após o período de tratamento de 72 h. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2%) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias. A doxorubicina (DOX, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e o 5-FU (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foram utilizados como controles positivos. Os dados são representativos de três experimentos independentes realizados em duplicata. Os *debris* celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

## 6.6 EXPRESSÃO GÊNICA DE PTCH1, SMO E GLI1 APÓS O TRATAMENTO

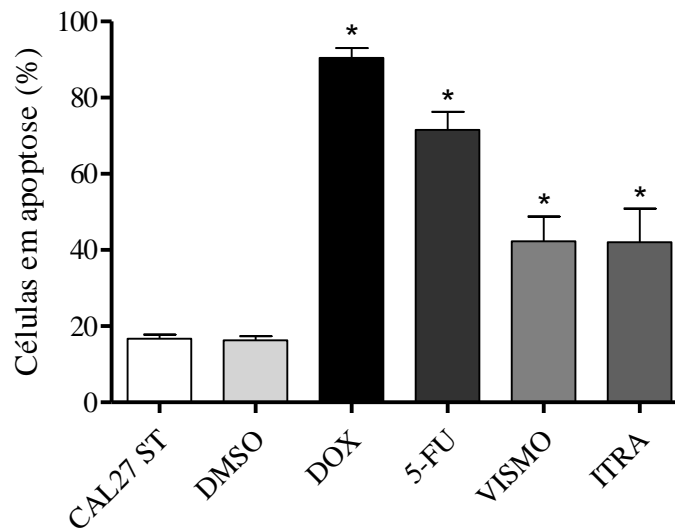
Os genes HH PTCH1, SMO e GLI1 foram avaliados por qPCR após 24h de tratamento com os compostos-teste, nas diferentes concentrações (25 e 50 $\mu$ g/mL). No tempo considerado, houve redução significativa dos níveis de mRNA dos genes PTCH1, SMO e GLI1, exceto para a expressão do gene PTCH1 para o itraconazol na concentração de 25 $\mu$ g/mL.



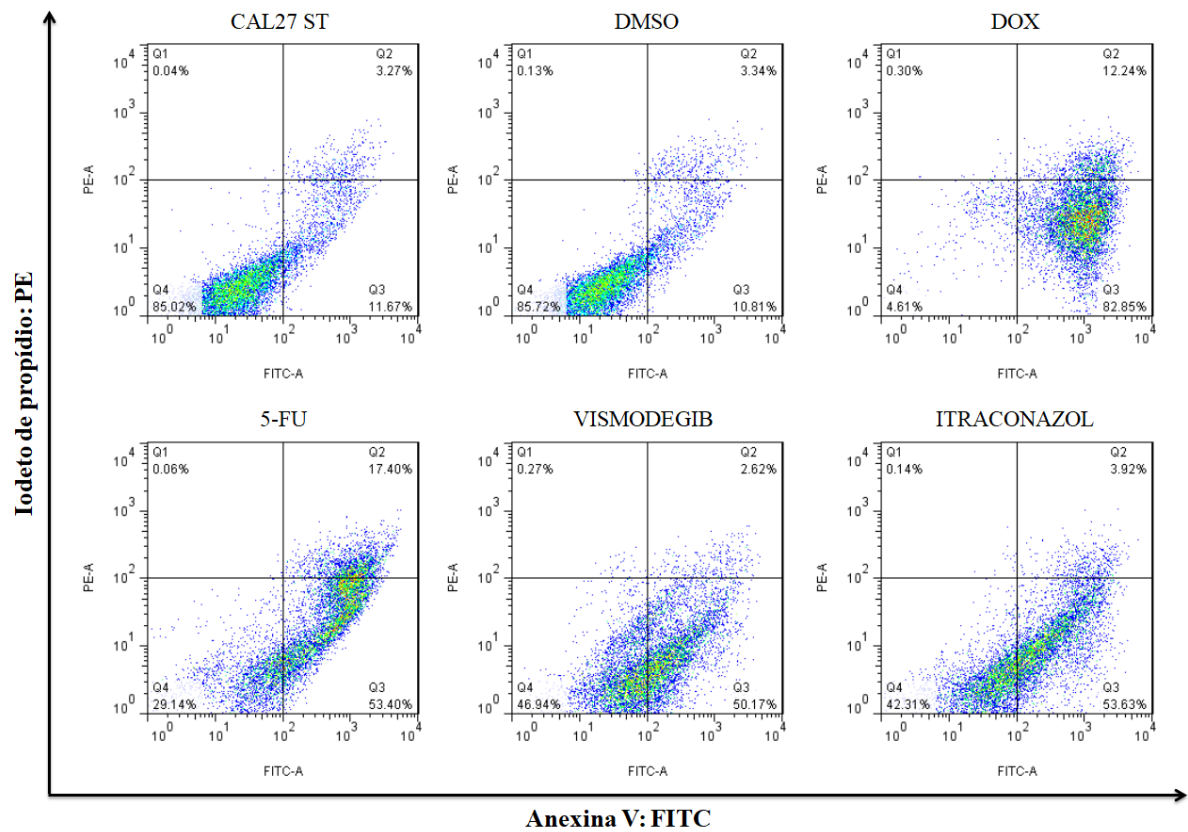
**Figura 11.** Perfil de expressão gênica dos componentes da via Hedgehog após 24h de tratamento com vismodegib e itraconazol em células CAL27.

## 6.7 AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR

Após 72h de tratamento com o vismodegib e itraconazol, houve um aumento no número de células CAL27 em apoptose, em comparação com o controle negativo e o DMSO. Os controles positivos, doxorrubicina e 5-FU, também aumentaram significativamente a população de células em apoptose ( $p < 0,05$ ) (Figura 12). Os dotplots da Figura 13 representam o padrão de morte celular induzido pelos fármacos após o tratamento.



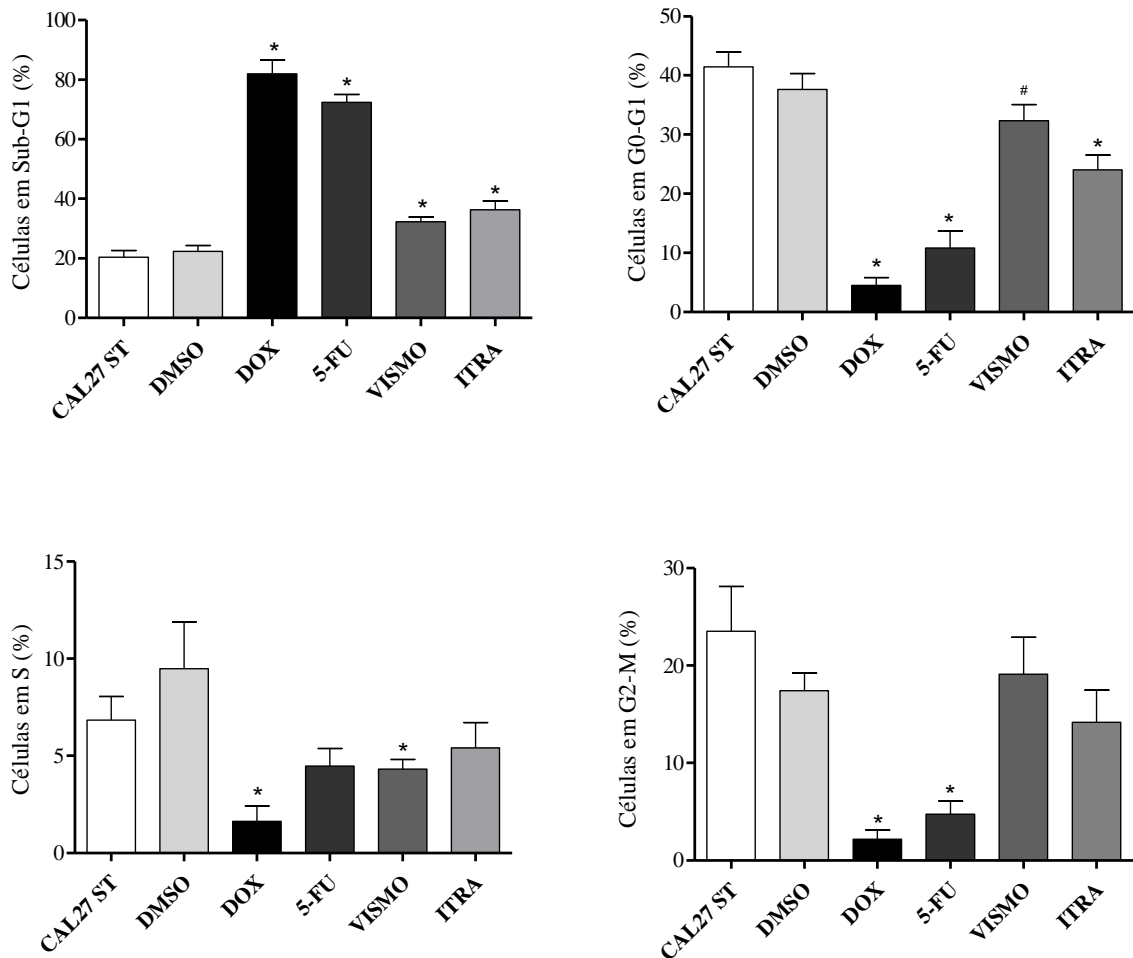
**Figura 12.** Efeito do vismodegib e itraconazol sobre a externalização da fosfatidilserina em células CAL27 determinando por citometria de fluxo usando anexina V-FITC. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2%) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias teste. A doxorrubicina (DOX, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e o 5-FU (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foram usados como controles positivos. Os valores respondem à média  $\pm$  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.



**Figura 13.** Dotplots representativos do efeito do vismodegib e itraconazol sobre a externalização da fosfatidilserina de células CAL27, determinados por citometria de fluxo usando anexina V-FITC. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2%) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias testes. A doxorrubicina (DOX, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e o 5-FU (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foram usados como controles positivos. Os dados são representativos de três experimentos independentes realizados em duplicata. Os debris celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

## 6.8 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR

Através de análise por citometria de fluxo, foi possível determinar que o tratamento de 72h com o vismodegib e itraconazol, ambos 50  $\mu\text{g/mL}$ , aumentou a quantidade de células CAL27 na fase Sub-G1, em comparação com os controles negativos (CAL27 ST e DMSO), além de reduzir a população das células nas fases G0-G1 e S (Figura 14).



**Figura 14.** Efeito dos inibidores de SMO sobre o ciclo celular e fragmentação do DNA internucleossomal em células CAL27 após 72h de tratamento. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2%) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias testes. A doxorubicina (DOX, 1  $\mu\text{g/mL}$ ) e o 5-FU (10  $\mu\text{g/mL}$ ) foram usados como controles positivos. Os dados são representativos de três experimentos independentes realizados em duplicata. Os debris celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

Nota: \* e # indicam diferença em relação ao DMSO e CAL27-ST, respectivamente.

## 7. DISCUSSÃO

A via HH está associada com a patogênese de diversos tipos de câncer, como o de mama, meduloblastoma, carcinoma basocelular, dentre outros (BENVENUTO et al., 2016; GUPTA; TAKEBE; LORUSSO, 2010). Nosso grupo já demonstrou que esta via está ativa em amostras de CEO humano (CAVICCHIOLI BUIM; GURGEL, 2011) e o presente trabalho ratificou, através de qPCR, que a via HH também está ativada em linhagens de CEO. A expressão dos componentes da via HH (SHH, PTCH1, SMO, GLI1 e GLI3) nas células CAL27, SCC4, SCC9 e HSC3 confirma a ativação da via HH nestas linhagens. A expressão do ligante SHH nas linhagens SCC9 e HSC3 não foi detectada, corroborando com os achados de Nishimaki et al. (2004), que demonstraram ausência de expressão do ligante SHH nas células HSC3.

Yan et al. (2011) também demonstraram a ativação da via HH em CEO nas células CAL27, SCC4 e SCC9, contudo a expressão de SHH foi detectada na SCC9, bem como a expressão de SMO na SCC4, divergindo do presente estudo. Esta diferença pode estar relacionada com as metodologias utilizadas, sendo que a técnica de PCR quantitativo em tempo real utilizada no presente estudo é mais sensível do que o PCR convencional. Cabe considerar ainda, que o gene SHH, por codificar um morfógeno (HÉBERT; FISHELL, 2008), é de baixíssima expressão em tecidos adultos e, em muitos casos, os transcritos do gene só podem ser detectados através de PCR digital.

A expressão de GLI repressor (GLI3) e SUFU, regulador negativo da via, foi detectada em todas as células de CEO. O *feedback* negativo das vias de sinalização é um mecanismo através do qual as células proliferantes tentam controlar o processo de proliferação aberrante. Deste modo, células que são capazes de evadir deste mecanismo, expressando menos GLI3, por exemplo, tendem a se proliferar mais (GORDON; ZHANG; YANG, 2017). Dentro deste contexto, as células CAL27 e SCC9 representam as melhores células para a condução de estudos *in vitro*, que avaliam terapias anti-HH. A CAL27 foi a escolhida para ser utilizada nos ensaios de viabilidade, citometria de fluxo e expressão gênica pós-tratamento, por terem apresentado menor expressão de GLI3 e SUFU entre todas as linhagens avaliadas.

A citotoxicidade dos compostos-teste e de outros fármacos já utilizados na terapia anticâncer, como a doxorrubicina e 5-FU, foi avaliada em diversos tipos de células tumorais e não-tumorais. De acordo com este estudo inicial, foi possível verificar que os inibidores vismodegib e itraconazol não apresentaram potencial citotóxico. Adicionalmente, na curva de



tempo realizada com as células CAL27, ratificamos que os inibidores não apresentaram citotoxicidade promissora. Sobre este aspecto, cabe considerar que inibidores HH são utilizados em concentrações muito divergentes nos estudos *in vitro* (HUANG et al., 2014; KIM et al., 2013; LIANG et al., 2017) e que possuem mecanismos de ação específicos, cujos desfechos podem ser semelhantes aos fármacos reconhecidamente citotóxicos.

Destarte, a terapia anticâncer atual apresenta um grande avanço com as descobertas dos mecanismos associados à patogênese tumoral. Deste modo, as pesquisas nesta área também avançaram de um contexto focado na citotoxicidade para tratamentos associados a alvos genéticos e moleculares (MAHINDROO; PUNCHIHEWA; FUJII, 2010). As terapias alvo em câncer visam atingir moléculas características das células dos diversos tipos tumorais e trazem uma expectativa aos pacientes nos quais a quimioterapia citotóxica não favorece a cura. Assim como a terapia citotóxica, as terapias alvo também têm a desvantagem da aquisição de resistência, todavia representam um avanço na inibição farmacológica do crescimento tumoral (MASUI et al., 2013).

Neste contexto, a terapia anti-HH utilizando inibidores de SMO já foi avaliada *in vitro*, *in vivo* e em ensaios clínicos em câncer (BENVENUTO et al., 2016; KIM et al., 2015; TAKEBE et al., 2015), todavia não é do nosso conhecimento estudos na literatura científica que avaliem o potencial do vismodegib e itraconazol em células de CEO. Para avaliar o potencial terapêutico destes inibidores na CAL27, foi inicialmente realizado o ensaio de viabilidade após 24h e 48h de tratamento. Os inibidores de HH e os controles positivos (doxorubicina e 5-FU) reduziram a viabilidade celular em 24h e 48h de tratamento, sendo que o vismodegib e itraconazol, em suas maiores concentrações, também reduziram significativamente a viabilidade celular, após 48h.

De maneira semelhante, estudo com células de câncer de pâncreas identificou que o vismodegib foi capaz de reduzir a viabilidade celular com 24h de tratamento, mas os efeitos foram significativos apenas com 48h, atingindo máximos resultados com 72h. Este estudo também demonstrou que os maiores impactos sobre a viabilidade celular eram atingidos pelas maiores concentrações do vismodegib (SINGH, 2011), aspecto este ratificado pela análise morfológica das células tratadas.

Os inibidores alteraram a morfologia celular da CAL27 nos dois tempos de tratamento, sendo que a redução do volume das ilhas tumorais, retração e espraiamento foram mais evidentes após 48h de tratamento e na maior concentração, para ambos compostos-teste. Portanto, as alterações morfológicas celulares foram concentração e tempo-dependentes. Este resultado corrobora com os achados de Liang et al. (2017), que demonstraram que o

tratamento com itraconazol diminuiu a população de células de melanoma, sendo mais eficaz nas maiores concentrações. Em adição, os compostos-teste diminuíram o tamanho e aumentaram a granulosidade, após 72h de tratamento, sendo que o itraconazol em sua maior concentração aumentou significativamente a granulosidade das células CAL27. O aumento da granulosidade intracelular está associado aos processos de morte celular ou senescência, estado no qual a célula perde o seu potencial proliferativo. Este efeito é observado no uso de quimioterápicos e pode ser um marcador interessante para a seleção de novos fármacos com potencial anticâncer (CHANG et al., 2002; HAYNES et al., 2009).

As alterações morfológicas observadas já em 24h, para ambos compostos-teste, sugerem que, neste tempo, já pode ter ocorrido mudanças no perfil do transcriptoma celular. Sendo assim, avaliamos, neste tempo, o efeito dos inibidores de SMO na variação nos níveis de genes HH. Conforme demonstrado, houve uma redução nos níveis de mRNA PTCH1, SMO e GLI1, cujo padrão de expressão é o principal indicador de atividade desta cascata sinalizadora (HU et al., 2017), corroborando com o estudo de You et al. (2014), que demonstrou, em 24h de tratamento com os inibidores de SMO, uma redução de mRNA GLI1 em células de mesotelioma. Nosso estudo foi pioneiro em demonstrar os efeitos dos compostos-teste na redução da atividade HH em células de CEO já em 24h. Outros estudos *in vitro*, como os de Hu et al. (2017) e Li et al. (2013) encontraram redução dos níveis de GLI1 após o tratamento com o itraconazol por 48h e, após 30h, com o vismodegib, respectivamente.

Um dos efeitos da terapia anti-HH através dos inibidores de SMO é a indução da apoptose em células tumorais (LI et al., 2013; SONG; DU; TAO, 2017), o que efetivamente observamos com o tratamento com vismodegib e itraconazol (50 µg/mL), em células CAL27, após 72h através do ensaio de dupla marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídio (IP). Corroborando com este resultado, a maior parte da população celular estava na fase Sub-G1, indicando que a apoptose é uma importante via de morte celular induzida pelos compostos-teste.

As células em apoptose apresentam como uma das principais características a fragmentação do DNA, que pode ser detectada através da presença de população celular na fase Sub-G1 (KAJSTURA et al., 2007). Outros dados da literatura reforçam os achados supracitados em células de câncer de estômago, melanoma e próstata (HU et al., 2017; LIANG et al., 2017; MIMEAULT et al., 2015). As terapias-alvo em câncer apresentam a indução de apoptose em células tumorais como um de seus mecanismos de ação, representando uma alternativa terapêutica interessante quando existe aquisição de resistência à terapia convencional. (HASSAN et al., 2014). Por fim, os resultados deste estudo

demonstram que os inibidores HH possuem um potencial terapêutico em células CAL27, com efeitos na viabilidade, morfologia, expressão dos genes HH, ciclo e morte celular, ampliando as possibilidades de estudos que avaliem a eficácia em modelos *in vivo* de CEO, em mono e terapia combinada com outros inibidores HH (ex: GANT61).

## 8. CONCLUSÕES

Diante dos resultados deste estudo, pode-se concluir que a via HH está ativada nas células de CEO (CAL27, SSC4, SCC9 e HSC3) e a inibição farmacológica desta via com os inibidores de SMO 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 não apresentaram citotoxicidade promissora nas células de CEO, contudo, foram capazes de reduzir a viabilidade e alterar a morfologia das células CAL27, de maneira tempo e concentração-dependente. Em adição, estes inibidores induziram apoptose e aumentaram da fragmentação do DNA em células CAL27.

## REFERÊNCIAS

ALTABA, A.; SÁNCHEZ, P.; DAHMANE, N. Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 5, p. 361–372, 2002.

ALTER, B. P. et al. Malignancies and survival patterns in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndromes cohort study. **British Journal of Haematology**, v. 150, n. 2, p. 179–188, 2010.

ASAI, J. et al. Topical sonic hedgehog gene therapy accelerates wound healing in diabetes by enhancing endothelial progenitor cell-mediated microvascular remodeling. **Circulation**, v. 113, n. 20, p. 2413–2424, 2006.

BAGAN, J.; SARRION, G.; JIMENEZ, Y. Oral cancer: Clinical features. **Oral Oncology**, v. 46, n. 6, p. 414–417, 2010.

BANGS, F.; ANDERSON, K. V. Primary cilia and mammalian hedgehog signaling. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 9, n. 5, p. 1–22, 2017.

BARNES, L. et al. **World Health Organization Classification of tumours. pathology and genetics of head and neck tumours**. IARC Press: Lyon 2005.

BENVENUTO, M. et al. In vitro and in vivo inhibition of breast cancer cell growth by targeting the Hedgehog/GLI pathway with SMO (GDC-0449) or GLI (GANT-61) inhibitors. **Oncotarget**, v. 7, n. 8, p. 9250–9270, 2016.

BERMAN, D. M. et al. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. **Nature**, v. 425, n. 6960, p. 846–851, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. INCA. Instituto Nacional do Câncer. Carcinoma Epidermoide da Cabeça e Pescoço. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 4, p. 361–376, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. INCA. Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/boca/definicao>. Acesso em: 20 dez. 2017.

CAVICCHIOLI BUIM, M. E. et al. Activation of sonic hedgehog signaling in oral squamous cell carcinomas: a preliminary study. **Human Pathology**, v. 42, n. 10, p. 1484–90, 2011.

CHANG, A. L. S.; ORO, A. E. Initial Assessment of Tumor Regrowth After Vismodegib in Advanced Basal Cell Carcinoma. **Archives of Dermatology**, v. 148, n. 11, p. 1324–1325, 2012.

CHANG, B.-D. et al. Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 1, p. 389–94, 2002.

CHARI, N. S.; MCDONNELL, T. J. The sonic hedgehog signaling network in development and neoplasia. **Advances Anatomy Pathology**, v. 14, n. 5, p. 344–352, 2007.

CHEN, J. K. et al. Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. **Genes and Development**, v. 16, n. 21, p. 2743–2748, 2002.

CHI, A. C.; DAY, T. A.; NEVILLE, B. W. Oral Cavity and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma—An Update. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, n. 5, p. 401–421, 2015.

DIAS, R. B. et al. Enhanced expression of hedgehog pathway proteins in oral epithelial Dysplasia. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology: AIMM**, v. 24, n. 8, p. 595–602, 2015.

DIERKS, C. et al. Essential role of stromally induced hedgehog signaling in B-cell malignancies. **Nature Medicine**, v. 13, n. 8, p. 944–951, 2007.

DIRIX, L. Discovery and Exploitation of Novel Targets by Approved Drugs. **Journal of Clinical Oncology**, v. 32, p. 1–2, 2014.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-386, 2015.

GAILANI, M. R. et al. The role of the human homologue of *Drosophila* patched in sporadic basal cell carcinoma. **Nature Genetics**, v. 14, n. 1, p. 78–81, 1996.

GOODRICH, L. V et al. Altered Neural Cell Fates and Medulloblastoma in Mouse patched Mutants Altered Neural Cell Fates and Medulloblastoma in Mouse patched Mutants. **Science**, v. 277, n. 5329, p. 1109–1113, 1997.

GORDON, R. E.; ZHANG, L.; YANG, Z. J. Restore the brake on tumor progression. **Biochemical Pharmacology**, v. 138, n. April, p. 1–6, 2017.

GORLIN, R. J.; GOLTZ, R. W. Multiple nevoid basal-cell epithelioma, jaw cysts and bifid rib: A syndrome. **The New England Journal of Medicine**, v. 262, p. 908–912, 1960.

GRAHAM, R. A. et al. Pharmacokinetics of hedgehog pathway inhibitor vismodegib (GDC-0449) in patients with locally advanced or metastatic solid tumors: The role of alpha-1-acid glycoprotein binding. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 8, p. 2512–2520, 2011.

GRINDLEY, J. C. et al. Evidence for the involvement of the Gli gene family in embryonic mouse lung development. **Developmental Biology**, v. 188, n. 2, p. 337–348, 1997.

GUPTA, S.; TAKEBE, N.; LORUSSO, P. Targeting the Hedgehog pathway in cancer. p. 237–250, 2010.

HAHN, H. et al. Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. **Cell**, v. 85, n. 6, p. 841–851, 1996.

HARDCASTLE, Z. et al. The Shh signalling pathway in tooth development: defects in Gli2 and Gli3 mutants. **Development (Cambridge, England)**, v. 125, n. 15, p. 2803–2811, 1998.

HASSAN, M. et al. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. **BioMedical Research International**, v. 2014, 2014.

HASSOUNAH, N. B.; BUNCH, T. A.; MCDERMOTT, K. M. NIH Public Access. v. 18, n. 9, p. 2429–2435, 2012.

HAYNES, M. K. et al. NIH Public Access. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 14, n. 6, p. 596–609, 2009.

HÉBERT, J. M.; FISHELL, G. The genetics of early telencephalon patterning: Some assembly required. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 9, p. 678–685, 2008.

HOOPER, J. E.; SCOTT, M. P.; DRIVE, C. Communicating With Hedgehogs. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. April, p. 18–20, 2005. (Conferir se não faltou o título da revista)

HU, Q. et al. Itraconazole induces apoptosis and cell cycle arrest via inhibiting Hedgehog signaling in gastric cancer cells. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 36, n. 1, p. 50, 2017.

HUANG, L. et al. Hedgehog – GLI Signaling Inhibition Suppresses Tumor Growth in Squamous Lung. **Cancer**, v. 20, n. 6, p. 1566–1576, 2014.

INGHAM, P. W.; MCMAHON, A. P. Hedgehog signaling in animal development : paradigms and principles. **Genes & Development**, p. 3059–3087, 2001. (faltou o título da revista)

JOHNSON, R. L. et al. Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. **Science**, v. 272, n. 5268, p. 1668–1671, 1996.

KAJSTURA, M. et al. Quality Assessment of Confocal Microscopy Slide Based Systems: Performance. **Journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 71, n. 3, p. 125–131, 2007.

KIM, DJ KIM, J. Itraconazole Has Activity in Patients with Basal Cell Carcinoma. **Cancer Discovery**, v. 4, n. 4, p. 385, 2014.

KIM, H.-A. et al. Inhibition of hedgehog signaling reduces the side population in human malignant mesothelioma cell lines. **Cancer Gene Therapy**, v. 22, n. 8, p. 387–395, 2015.

KIM, J. et al. Itraconazole, a Commonly Used Antifungal that Inhibits Hedgehog Pathway Activity and Cancer Growth. **Cancer Cell**, v. 17, n. 4, p. 388–399, 2010.

KIM, J. et al. Itraconazole and Arsenic Trioxide Inhibit Hedgehog Pathway Activation and Tumor Growth Associated with Acquired Resistance to Smoothed Antagonists. **Cancer Cell**, v. 23, n. 1, p. 23–34, 2013.

LAUTH, M. et al. Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 20, p. 8455–8460, 2007.

LI, H. et al. Gli as a Novel Therapeutic Target in Malignant Pleural Mesothelioma. **PLoS**



**ONE**, v. 8, n. 3, 2013.

LIANG, G. et al. Itraconazole exerts its anti-melanoma effect by suppressing Hedgehog, Wnt, and PI3K/mTOR signaling pathways. **Oncotarget**, v. 8, n. 17, p. 28510–28525, 2017.

LIN, T. L.; MATSUI, W. Hedgehog pathway as a drug target: Smoothed inhibitors in development. **OncoTargets and Therapy**, v. 5, p. 47–58, 2012.

LINGEN, M. et al. Critical evaluation of diagnostic Aids for the detection of oral cancer. **Oral Oncology**, v. 44, n. 1, p. 10–22, 2008.

MAHINDROO, N.; PUNCHIHEWA, C.; FUJII, N. Hedgehog-Gli Signaling Pathway Inhibitors as Anticancer Agents. **Journal of Medical Chemistry**, v. 52, n. 13, p. 3829–3845, 2010.

MARKOPOULOS, A. K. Current Aspects on Oral Squamous Cell Carcinoma. **The Open Dentistry Journal**, v. 6, n. 1, p. 126–130, 2012.

MASUI, K. et al. A tale of two approaches: Complementary mechanisms of cytotoxic and targeted therapy resistance may inform next-generation cancer treatments. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 4, p. 725–738, 2013.

MIMEAULT, M. et al. Inhibition of hedgehog signaling improves the anti-carcinogenic effects of docetaxel in prostate cancer. **Oncotarget**, v. 6, n. 6, p. 3887–903, 2015.

MIMEAULT, M.; BATRA, S. K. Frequent deregulations in the hedgehog signaling network and cross-talks with the epidermal growth factor receptor pathway involved in cancer progression and targeted therapies. **Pharmacological Reviews**, v. 62, n. 3, p. 497–524, 2010. (Faltou o titulo da revista)

PO, A. et al. Hedgehog controls neural stem cells through p53-independent regulation of Nanog. **EMBO Journal**, v. 29, n. 15, p. 2646–2658, 2010.

RAMASWAMY, B. et al. Hedgehog signaling is a novel therapeutic target in tamoxifen-resistant breast cancer aberrantly activated by PI3K/AKT pathway. **Cancer Research**, v. 72, n. 19, p. 5048–5059, 2012.

- RAMPERSAD, S. N. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. **Sensors**, v. 12, n. 9, p. 12347–12360, 2012.
- RIVERA, C.; VENEGAS, B. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review). **Oncology Letters**, p. 7–11, 2014.
- RUBIN, L. L.; DE SAUVAGE, F. J. Targeting the Hedgehog pathway in cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 12, p. 1026–1033, 2006.
- RUDIN, C. M. et al. Treatment of Medulloblastoma with Hedgehog Pathway Inhibitor GDC-0449. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 12, p. 1173–1178, 2009.
- RUDIN, C. M. Vismodegib. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 12, p. 3218–3222, 2012. (Faltou o título da revista)
- SANDHIYA, S. et al. The dawn of hedgehog inhibitors: Vismodegib. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 4, n. 1, p. 4, 2013.
- SCALES, S. J.; DE SAUVAGE, F. J. Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 30, n. 6, p. 303–312, 2009.
- SEKULIC, A. et al. Efficacy and safety of vismodegib in advanced basal-cell carcinoma. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 23, p. 2171–2179, 2012.
- SOBIN, L. H. TNM: Evolution and relation to other prognostic factors. **Seminars in Surgical Oncology**, v. 21, n. 1, p. 3–7, 2003.
- SONG, Z.; DU, Y.; TAO, Y. Blockade of sonic hedgehog signaling decreases viability and induces apoptosis in retinoblastoma cells: The key role of the Pi3K/Akt pathway. **Oncology Letters**, v. 14, n. 4, p. 4099–4105, 2017.
- STECCA, B.; RUIZ I ALTABA, A. Context-dependent regulation of the GLI code in cancer by HEDGEHOG and non-HEDGEHOG signals. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 2, n. 2, p. 84–95, 2010.
- TAKEBE, N. et al. Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells:

Clinical update. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 12, n. 8, p. 445–464, 2015.

TANG, J. Y. et al. Inhibiting the Hedgehog Pathway in Patients with the Basal-Cell Nevus Syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 23, p. 2180–2188, 2012.

THAYER, S. P. et al. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. **Nature**, v. 425, n. 6960, p. 851–856, 2003.

THOMAS, Z. I. et al. Targeting GLI1 expression in human inflammatory breast cancer cells enhances apoptosis and attenuates migration. **British Journal Cancer**, v. 104, n. 10, p. 1575–1586, 2011.

VALVERDE, L. DE F. et al. Macrophages and endothelial cells orchestrate tumor-associated angiogenesis in oral cancer via hedgehog pathway activation. **Tumor Biology**, v. 37, n. 7, p. 9233–9241, 2016.

VAN DER WAAL, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. **Oral Oncology**, v. 45, n. 4–5, p. 317–323, 2009.

WARREN, S. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Current Protocols Immunology**, v. 3, p. 2–3, 2001.

WETMORE, C. Sonic hedgehog in normal and neoplastic proliferation: Insight gained from human tumors and animal models. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 13, n. 1, p. 34–42, 2003.

WHO. Chapter 4: Tumours of the Oral Cavity and Oropharynx. **World Health Organization Classification of tumours: pathology and genetics of head and neck tumours**, p. 163–208, 2005.

WONG, H. et al. Preclinical assessment of the absorption, distribution, metabolism and excretion of GDC-0449 (2-chloro- *N*-(4-chloro-3-(pyridin-2-yl)phenyl)-4-(methylsulfonyl)benzamide), an orally bioavailable systemic Hedgehog signalling pathway inhibitor. **Xenobiotica**, v. 39, n. 11, p. 850–861, 2009.

XIE, J. et al. Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. **Nature**, v. 391, n. 6662, p. 90–92, 1998. (Faltou o titulo da revista)

YAN, M. et al. HH/GLI signalling as a new therapeutic target for patients with oral squamous cell carcinoma. **Oral oncology**, v. 47, n. 6, p. 504–9, 2011.

YANG, L. et al. Activation of the hedgehog-signaling pathway in human cancer and the clinical implications. **Oncogene**, v. 29, n. 4, p. 469–481, 2010.

YANG, X.; DINEHART, M. S. Triple Hedgehog Pathway Inhibition for Basal Cell Carcinoma. **The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, v. 10, n. 4, p. 47–49, 2017.

YAO, M. et al. Current surgical treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. **Oral Oncology**, v. 43, n. 3, p. 213–223, 2007.

YAUCH, R. L. et al. Smoothed Mutation Confers Resistance to a Hedgehog Pathway Inhibitor in Medulloblastoma. **Science**, v. 326, n. 5952, p. 572–574, 2009.

YOU, M. et al. Targeting of the Hedgehog signal transduction pathway suppresses survival of malignant pleural mesothelioma cells in vitro. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 147, n. 1, p. 508–516, 2014.