



**UFBA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



**FIOCRUZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**TESE DE DOUTORADO**

**EFEITOS DOS FIBROBLASTOS ASSOCIADOS AO CÂNCER E DO  
BLOQUEIO FARMACOLÓGICO DE GLI NA INVASÃO E  
MIGRAÇÃO EM CÉLULAS DE CARCINOMA ESCAMOCELULAR  
DE BOCA**

**MANUELA TORRES ANDION VIDAL**

**Salvador – Bahia**

**2020**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**EFEITOS DOS FIBROBLASTOS ASSOCIADOS AO CÂNCER E DO  
BLOQUEIO FARMACOLÓGICO DE GLI NA INVASÃO E  
MIGRAÇÃO EM CÉLULAS DE CARCINOMA ESCAMOCELULAR  
DE BOCA**

**MANUELA TORRES ANDION VIDAL**

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

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em  
Patologia Humana para obtenção do grau de  
Doutor.

**Salvador – Bahia**

**2020**

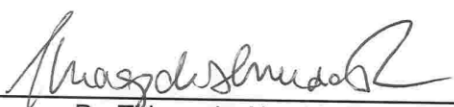
Título da Tese: "EFEITOS DOS FIBROBLASTOS ASSOCIADOS AO CÂNCER E DO BLOQUEIO FARMACOLÓGICO DE GLI NA INVASÃO E MIGRAÇÃO EM CÉLULAS DE CARCINOMA ESCAMOCECULAR DE BOCA"

MANUELA TORRES ANDION VIDAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 08 de janeiro de 2020.

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Thiago de Almeida Pereira  
Professor Visitante  
Stanford University Medical School



Dra. Adna Barros Ismerim  
Professora  
UESB



Dr. Jean Nunes dos Santos  
Professor  
UFBA



Dr. Daniel Abensur Athanazio  
Professora  
UFBA



Dra. Clarissa Araújo Gurgel Rocha  
Pesquisadora  
IGM/Fiocruz

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq

Aos meus pais, Manuel e Cristina,  
fontes do amor mais puro e  
incondicional.

## **AGRADECIMENTOS**

### **Aos meus pais, Manuel e Cristina,**

Por terem me criado com tanto amor e dedicação, sem medir esforços. Por me ensinarem a ser grata pelo que tenho e por me mostrarem, todos os dias, que a felicidade só depende de nós mesmos.

### **Ao meu irmão, Daniel,**

Exemplo de dedicação e perseverança. Ele me ensinou que jamais devemos desistir dos nossos sonhos e que podemos até perder o amigo, mas a piada jamais!

### **Ao meu marido, Danilo,**

Há quinze anos tornando as vitórias mais alegres e as derrotas mais amenas. Com ele, o caminho é mais leve, doce e bem-humorado.

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

Por tantas oportunidades, pela confiança e por todo aprendizado que me proporciona.

### **À Bruno Solano e Thiago Pereira,**

Pelas enriquecedoras discussões científicas ao longo desses anos.

### **Ao Prof. Ricardo Della Coletta,**

Por doar parte das células utilizadas nesse trabalho e pelo auxílio nas etapas dos ensaios funcionais.

### **Aos professores da banca de qualificação,**

Por todas as contribuições para evolução desse trabalho.

### **Ao Prof. Jean Nunes dos Santos,**

Por todo apoio e aprendizado durante o meu início na vida acadêmica e no mestrado.

**À Ludmila Valverde,**

Pela parceria incansável e por tornar cada experimento mais fácil e prazeroso. Serei eternamente grata.

**À Vanessa Guimarães,**

Por todas as pontas que segurou e galhos que quebrou.

**Ao grupo de pesquisa Biopatologia,**

Tenho muito orgulho de fazer parte dessa equipe, tão unida e solícita. Em especial, Rosane Borges, Jessica Mariane, Leonardo Siquara e Paulo Coelho, pelo auxílio em diversas etapas desse trabalho.

**À minha família e amigos,**

Em especial minhas avós, que sempre ajudaram na minha formação.

**À família Guimarães Viana,**

Que me encham de carinho e apoio.

**À equipe de Radiologia da Oral Imagem,**

Pelo carinho, apoio e incentivo na realização do doutorado.

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

Em especial ao corpo docente, por me proporcionar tanto aprendizado e amadurecimento, e à coordenação de ensino.

**À Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP,**

Em especial Dra. Ana Camila, pelo auxílio, acolhimento e dedicação durante o período de execução dos ensaios funcionais em Piracicaba.

**À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia,**

Especialmente aos mestres e funcionários que contribuíram para a minha formação.

**Ao Instituto Gonçalo Moniz (IGM),**

Por me proporcionar a estrutura necessária para a realização dos experimentos.

**Ao Laboratório de Patologia e Biologia Molecular,**

Em especial Dr. Mitermayer e Cleiton, pela convivência agradável.

**Ao Laboratório de Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia,**

Em especial Dr. Daniel, Dra. Milena e ao grupo de Câncer, pelo auxílio intelectual e material na cultura de células.

**À equipe de microscopia do IGM,**

Em especial, Cláudio e Márcio, no auxílio na obtenção das fotos desse trabalho.

**À Biblioteca do IGM,**

Em especial à Sra. Ana Fiscina, pelo auxílio na formatação deste trabalho.

**Ao Conselho Nacional em Pesquisa,**

Pelo apoio financeiro.

**À Deus,**

Por me abençoar e por colocar pessoas maravilhosas em minha vida.



Grandes realizações são possíveis  
quando se dá importância aos  
pequenos começos.

*Lao-Tse*

VIDAL, Manuela Torres Andion. Efeitos dos fibroblastos associados ao câncer e do bloqueio farmacológico de GLI na invasão e migração em células de carcinoma escamocelular de boca. 87 f. il. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz. Salvador, 2019.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** Os cânceres de boca são um problema de saúde pública devido à alta incidência, prevalência e mortalidade. Dentre estes, o carcinoma escamocelular de boca (CEB) é o subtipo histológico mais comum. A via Hedgehog (Hh) já foi descrita em diversos tipos de cânceres, e sua ativação desencadeia a expressão de genes que regulam a proliferação, a angiogênese e a invasão tumoral. A percepção do câncer tem sido ampliada e compreendida em um contexto de microambiente, no qual os fibroblastos associados ao câncer (CAF, do inglês, *carcinoma-associated fibroblasts*) têm sido relacionados com a progressão tumoral. **OBJETIVO:** Avaliar o efeito de CAF na expressão de genes Hh em célula de CEB, bem como analisar se o bloqueio farmacológico desta cascata sinalizadora, em CAF, pode ter efeito na expressão de genes relacionados a cascata Hh, migração e invasão em célula CEB. **MATERIAL E MÉTODOS:** Foram utilizadas linhagens de CEB (CAL27, SCC4, SCC9 e HSC3), culturas primárias de fibroblastos normais de boca (NOF) e CAF de boca (CAF). Em células de CEB e fibroblastos, foram realizadas imunofluorescência, western blot e expressão gênica para caracterização da via Hh nesses tipos celulares. Em amostras de CEBs humanos, foi realizada a imuno-histoquímica para os anticorpos  $\alpha$ -SMA, SHH, IHH, MMP9 e MMP14. As células HSC3 e CAL27 foram estimuladas com o SHH recombinante e analisada a expressão dos genes componentes da via Hh. Para bloqueio farmacológico da via Hh, foi utilizado o GANT61 em CAF e CAL27. Foi coletado meio condicionado por CAFs e por CAFs com a via Hh bloqueada, com o qual as células CAL27 foram incubadas, e avaliada a expressão de genes relacionados à via Hh, invasão e migração celular. **RESULTADOS:** Em CEBs humanos, foi encontrada uma forte correlação positiva entre fibroblastos  $\alpha$ -SMA+ e as proteínas SHH e MMP9, na região de *front* tumoral. A expressão gênica de componentes da via Hh foi observada nas linhagens de CEB, bem como em NOF e em CAF. Nas linhagens de células tumorais (HSC3 e CAL27) e no CAF, foi observada a marcação de proteínas da via Hh. Após estímulo com SHH recombinante, as células HSC3 e CAL27 apresentaram uma maior expressão dos genes PTCH1 e GLI1. Em CAL27, a incubação com o meio condicionado por CAFs foi capaz de aumentar os níveis de transcritos de RNAm de genes da via Hh e genes envolvidos na migração e invasão celular, como MMP9, MMP14, Osteopontina, E-caderina e  $\beta$ -catenina. Após o bloqueio da via, observou-se uma interrupção no aumento da expressão dos genes supracitados, nos diferentes tempos estudados. **CONCLUSÕES:** Os CAFs são fontes de ligantes Hh e regulam a via Hh nas células de CEB, através da sinalização parácrina reversa. O meio condicionado por CAFs aumenta a expressão de genes relacionados à migração e invasão celular, favorecendo a progressão do CEB. E ainda, o bloqueio farmacológico dos CAFs e CAL27 diminui a expressão desses genes. Adicionalmente, a via Hh pode ser considerada um potencial alvo farmacológico no CEB.

**Palavras-chave:** Proteínas Hedgehog, Neoplasias Bucais e Microambiente Tumoral.

VIDAL, Manuela Torres Andion. Effects of cancer-associated fibroblasts and pharmacological GLI blockade on invasion and migration in oral squamous cell carcinoma. 87 f. il. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Oral cancers are a public health problem due to their high incidence, prevalence and mortality. Among these, the oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common histological subtype. The Hedgehog pathway (Hh) has been identified in several types of cancers, and its activation triggers the expression of genes that regulate proliferation, angiogenesis and tumor invasion. The understanding of cancer has been expanded and adapted to a microenvironment context, in which cancer-associated fibroblasts (CAFs) have been linked to tumor progression. **AIMS:** To evaluate the effect of CAF on Hh gene expression in OSCC cells, as well as to analyze if the pharmacological blockade of this signaling cascade in CAF may have effect on the expression of Hh cascade related genes, migration and invasion in OSCC cells. **MATERIAL AND METHODS:** OSCC cell lines (CAL27, SCC4, SCC9 and HSC3), primary cultures of normal oral fibroblasts (NOF) and oral CAF (CAF) were used. In OSCC cells and fibroblasts, immunofluorescence, western blot and gene expression were performed to characterize the Hh pathway in these cell types. In human OSCC samples, immunohistochemistry for  $\alpha$ -SMA, SHH, IHH, MMP9 and MMP14 antibodies was performed. HSC3 and CAL27 cells were stimulated with recombinant SHH and expression of Hh pathway component genes was analyzed. For the pharmacological blockade of the Hh pathway, GANT61 in CAF and CAL27 was used. Medium conditioned by CAF with and without blockage of the Hh pathway were collected, in which CAL27 cells were incubated, and expression of Hh pathway-related genes, invasion and cell migration were evaluated. **RESULTS:** In human OSCCs, a strong positive correlation was found between  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> fibroblasts and SHH and MMP9 proteins in the tumor front region. The gene expression of Hh pathway components was observed in OSCC cell lines, as well as NOF and CAF. In tumor cell lines (HSC3 and CAL27) and CAF, protein staining of the Hh pathway was observed. After stimulation with recombinant SHH, HSC3 and CAL27 cells showed a higher expression of PTCH1 and GLI1 genes. In CAL27 cells, incubation with CAFs conditioned medium was able to increase mRNA transcript levels of Hh pathway genes and genes involved in cell migration and invasion such as MMP9, MMP14, Osteopontin, E-cadherin and  $\beta$ -catenin. After blockade of the Hh pathway, much of this effect was reversed. **CONCLUSIONS:** CAFs are sources of Hh ligands and regulate the Hh pathway in OSCC cells through reverse paracrine signaling. CAFs-conditioned medium increases the expression of genes related to cell migration and invasion, favoring the progression of OSCC. Moreover, pharmacological blockade of CAFs and CAL27 decreases the expression of these genes. Additionally, the Hh pathway can be considered a potential pharmacological target in OSCC.

**Key words:** Hedgehog Proteins, Oral Neoplasms and Tumor Microenvironment.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Desenho esquemático dos componentes da via Hh.	18
<b>Figura 2.</b>	Mecanismos de sinalização Hh no câncer.	20
<b>Figura 3.</b>	Origens dos CAFs, marcadores e papel na progressão do câncer	23
<b>Figura 4.</b>	Distribuição dos casos de CEB por escore e anticorpos analisados.	38
<b>Figura 5.</b>	Imunomarcação de $\alpha$ -SMA, dos ligantes da via Hh (SHH e IHH) e das proteínas envolvidas no processo de migração e invasão (MMP9 e MMP14) em tecidos de CEB humano.	40
<b>Figura 6.</b>	Expressão gênica de componentes da via Hh em linhagens de CEB.	41
<b>Figura 7.</b>	Expressão gênica de componentes da via Hh em NOF e CAF.	42
<b>Figura 8.</b>	Imunoexpressão de proteínas da via Hh em HSC3 e CAL27, por imunofluorescência.	43
<b>Figura 9.</b>	Expressão de proteínas da via Hh, alfa-SMA e S100A4 em NOF e CAF, por imunofluorescência.	45
<b>Figura 10.</b>	Expressão de proteínas da via Hh em HSC3 e CAL27, por western blot	47
<b>Figura 11.</b>	Expressão de proteínas da via Hh, alfa SMA e S100A4 em NOF e CAF, por western blot	47
<b>Figura 12.</b>	Expressão do gene PTCH1 em HSC3, antes e após estímulo com ligante SHH recombinante.	48
<b>Figura 13.</b>	Expressão do gene GLI1 em HSC3, antes e após estímulo com ligante SHH recombinante.	49
<b>Figura 14.</b>	Expressão do gene GLI2 em HSC3, antes e após estímulo com ligante SHH recombinante.	49
<b>Figura 15.</b>	Expressão dos genes PTCH1, GLI1 e GLI2 em CAL27, antes e após estímulo com ligante SHH recombinante, por 12 horas.	50
<b>Figura 16.</b>	Expressão dos genes relacionados à ativação da via Hh, em CAF, após bloqueio com GANT61	51
<b>Figura 17.</b>	Expressão do gene PTCH1, em CAL27, após incubação com meio condicionado por CAFs.	52
<b>Figura 18.</b>	Expressão do gene GLI1, em CAL27, após incubação com meio condicionado por CAFs.	53
<b>Figura 19.</b>	Expressão do gene GLI2, em CAL27, após incubação com meio condicionado por CAFs.	53
<b>Figura 20.</b>	Expressão do gene MMP9, em CAL27, após incubação com meio condicionado por CAFs.	54
<b>Figura 21.</b>	Expressão do gene MMP14, em CAL27, após incubação com meio condicionado por CAFs.	55
<b>Figura 22.</b>	Expressão do gene $\beta$ -catenina, em CAL27, após incubação com meio condicionado por CAFs.	55
<b>Figura 23.</b>	Expressão do gene E-caderina, em CAL27, após incubação com meio condicionado por CAFs.	56
<b>Figura 24.</b>	Expressão do gene Osteopontina, em CAL27, após incubação com meio condicionado por CAFs.	56
<b>Figura 25.</b>	Expressão dos genes da via HH e dos genes alvos envolvidos na migração e na invasão, em CAL27, após incubação com meio e meio + GANT61.	58

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Dados do fabricante, clone, diluição, recuperação antigênica e controle positivo.	27
<b>Tabela 2.</b>	Dados clínicos das linhagens de CEB utilizadas.	28
<b>Tabela 3.</b>	Dados do fabricante, clone e diluição dos anticorpos utilizados.	30
<b>Tabela 4.</b>	Interpretação para valores de Spearman	37
<b>Tabela 5.</b>	Valores de $CI_{50}$ em $\mu\text{g/mL}$ para NOF, CAF e CAL27.	50

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	13
1.1	CARCINOMA ESCAMOCELULAR DE BOCA	13
1.2	VIA DE SINALIZAÇÃO HEDGEHOG E CÂNCER	16
1.3	FIBROBLASTOS ASSOCIADOS AO CÂNCER	21
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE</b>	25
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	26
3.1	OBJETIVO GERAL	26
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	27
4.1	IMUNO-HISTOQUÍMICA	27
4.2	OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS EM CULTURA	28
4.3	OBTENÇÃO DE FIBROBLASTOS ASSOCIADOS AO CÂNCER, MEIO CONDICIONADO POR CAFS E FIBROBLASTOS NORMAIS	29
4.4	CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS DE CEB, FIBROBLASTOS ASSOCIADOS AO CÂNCER E FIBROBLASTOS NORMAIS QUANTO À EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DA VIA HH POR IMUNOFLUORESCÊNCIA	30
4.5	CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS DE CEB, FIBROBLASTOS ASSOCIADOS AO CÂNCER E FIBROBLASTOS NORMAIS QUANTO À EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DA VIA HH POR WESTERN BLOT	31
4.6	CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS DE CEB, FIBROBLASTOS ASSOCIADOS AO CÂNCER E FIBROBLASTOS NORMAIS QUANTO AO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE COMPONENTES DA VIA HH	32
<b>4.6.1</b>	<b>Isolamento de RNA total e transcrição reversa</b>	32
<b>4.6.2</b>	<b>Ensaio de qPCR em tempo real</b>	33
4.7	AVALIAÇÃO DO ESTÍMULO COM LIGANTE SHH EXÓGENO NA EXPRESSÃO DE GENES HH EM CÉLULAS HSC3 E CAL27	33
<b>4.7.1</b>	<b>Isolamento de RNA total, transcrição reversa e qPCR em tempo real</b>	34
4.8	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO GANT61	34
4.9	AVALIAÇÃO DE GENES RELACIONADOS A VIA HH, MIGRAÇÃO E INVASÃO, EM CÉLULAS CAL27 ESTIMULADAS COM MEIO CONDICIONADO POR CAFS, ANTES E APÓS BLOQUEIO FARMACOLÓGICO COM GANT61	35
<b>4.9.1</b>	<b>Isolamento de RNA total, transcrição reversa e qPCR em tempo real</b>	36
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	38
5.1	ASSOCIAÇÃO ENTRE A POPULAÇÃO DE CAFS, VIA HH, MIGRAÇÃO E INVASÃO EM AMOSTRAS TECIDUAIS DE CEB	38
5.2	EXPRESSÃO DOS COMPONENTES DA VIA HH EM CÉLULAS DE CEB E FIBROBLASTOS	41
<b>5.2.1</b>	<b>Expressão gênica</b>	41
<b>5.2.2</b>	<b>Expressão de proteínas por imunofluorescência</b>	42
<b>5.2.3</b>	<b>Expressão de proteínas por Western Blot</b>	46
5.3	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA VIA HH APÓS ESTÍMULO COM SHH RECOMBINANTE	48
5.4	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÉDIA DO GANT61 PARA INIBIÇÃO DA VIA HH	50

	NOS FIBROBLASTOS ASSOCIADOS AO CÂNCER	
5.5	EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À ATIVAÇÃO DA VIA HH EM CAFs APÓS BLOQUEIO COM GANT61	51
5.6	EFEITO DO MEIO CONDICIONADO POR CAFs NA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS A ATIVIDADE DA VIA HH E GENES REGULADOS PELA VIA HH, ENVOLVIDOS NA MIGRAÇÃO E INVASÃO	51
5.6.1	<b>Efeito do Meio Condicionado por CAF e CAF tratado com GANT61 na expressão de genes Hh (PTCH1, GLI1 e GLI2)</b>	52
5.6.2	<b>Genes regulados pela via Hh relacionados à invasão e migração celular após estímulo com meio condicionado por CAFs</b>	54
	5.6.2.1 <i>MMP9</i>	54
	5.6.2.2 <i>MMP14</i>	54
	5.6.2.3 <i>β-catenina</i>	55
	5.6.2.4 <i>E-caderina</i>	56
	5.6.2.5 <i>Osteopontina</i>	56
5.7	EXPRESSÃO DOS GENES DA VIA HH E DOS GENES ALVOS ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE MIGRAÇÃO E INVASÃO EM CAL27 APÓS INCUBAÇÃO COM GANT61	57
6	<b>DISCUSSÃO</b>	59
7	<b>CONCLUSÕES</b>	65
	<b>REFERÊNCIAS</b>	66
	<b>APÊNDICES</b>	78

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CARCINOMA ESCAMOCELULAR DE BOCA

Os cânceres de cabeça e pescoço são um grave problema de saúde pública devido à alta incidência, prevalência e mortalidade (RIVERA; VENEGAS, 2014; CHI; DAY; NEVILLE, 2015; MORO *et al.*, 2018). Dentre estes, destacam-se os cânceres que acometem a cavidade oral, que ocupam, em nível mundial, a 18ª posição entre todos os tumores malignos, com estimativa de 354.864 casos novos para 2018 (BRAY *et al.*, 2018). Para o Brasil, estimam-se 11.200 casos novos de câncer da cavidade oral em homens e 3.500 em mulheres para cada ano do biênio 2018-2019, correspondendo a um risco estimado de 10,86 casos novos a cada 100 mil homens, ocupando a quinta posição; e de 3,28 para cada 100 mil mulheres, sendo o 12º mais frequente entre todos os cânceres (INCA, 2017).

O carcinoma escamocelular de boca (CEB) é o subtipo histológico mais comum da cabeça e pescoço (excluindo o câncer de pele não-melanoma) (BINMADI; BASILE, 2011; SHAH; KAUR, 2014; RIVERA; VENEGAS, 2014; CHI; DAY; NEVILLE, 2015). Os sítios mais acometidos são dois terços anteriores da língua e o assoalho de boca (NOGUTI *et al.*, 2012; RHODUS; KERR; PATEL, 2014; RIVERA, 2015) e apresenta predileção pelo sexo masculino (2:1) (KIMPLE *et al.*, 2014; CHI; DAY; NEVILLE, 2015; CHEN *et al.*, 2018). O CEB ocorre principalmente na população idosa, a partir da quinta década de vida, com idade média de 62 anos durante o diagnóstico, porém a incidência em adultos jovens está aumentando (NOGUTI *et al.*, 2012; RHODUS; KERR; PATEL, 2014; ERNANI; SABA, 2015; LEITE *et al.*, 2018). A taxa de sobrevida em 5 anos encontra-se em aproximadamente 50% (RHODUS; KERR; PATEL, 2014; MORO *et al.*, 2018).

A etiologia do CEB é multifatorial e está relacionada às alterações genéticas causadas por exposição crônica a carcinógenos químicos, irritantes físicos, infecções virais e inflamação crônica, além de susceptibilidade genética (RHODUS; KERR; PATEL, 2014; SASAHIRA; KIRITA; KUNIYASU, 2014). As principais mutações ocorrem nos genes TP53, CDKN2A e PIK3A que estão alterados em 73%, 54% e 48%, respectivamente, dos casos de CEB (GAO *et al.*, 2013; CERAMI *et al.*, 2012). Em geral, ocorrem mutações pontuais, deleções, metilações, amplificação de oncogenes e inativação de genes supressores tumorais (WARNAKULASURIYA, 2009; SASAHIRA; KIRITA; KUNIYASU, 2014; RHODUS; KERR; PATEL, 2014). O uso do tabaco é o fator etiológico determinante, especialmente quando atua sinergicamente com o consumo



excessivo de álcool (KOONTONGKAEW, 2013; CHI; DAY; NEVILLE, 2015; MONTERO; PATEL, 2015; WONG; WIESENFELD, 2018).

A transformação da mucosa oral normal em CEB é uma progressão molecular em múltiplas etapas, na qual a subpopulação de células tronco adultas do tecido, quando expostas a agentes carcinogênicos, passam a acumular mutações em genes responsáveis pelo desenvolvimento tumoral, como TP53, NOTCH1 (homólogo NOTCH1, associado à translocação), EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico), CDKN2A (inibidor da quinase dependente de ciclina 2A), STAT3 (transdutor de sinal e ativador de transcrição 3), Ciclina D1, Rb (retinoblastoma), bem como genes envolvidos na transição epitelial-mesenquimal (TEM) e angiogênese (RIVERA, 2015; ERNANI; SABA, 2015). Algumas lesões pré-malignas têm sido associadas ao desenvolvimento do CEB e apresentam potencial variável para transformação maligna, essas incluem: leucoplasia, eritroplasia, líquen plano e fibrose submucosa oral (MONTERO; PATEL, 2015). Nestas situações, as células adquirem diversas alterações genéticas e há uma cascata de eventos moleculares, que evoluem desde hiperplasia e displasia (discreta, moderada, intensa) e carcinoma *in situ* (RHODUS; KERR; PATEL, 2014; ERNANI; SABA, 2015).

Clinicamente, o CEB pode apresentar características variáveis, dependendo do estágio da lesão. Inicialmente, nenhum sinal ou sintoma está presente, entretanto, sinais sutis, como: alteração de cor (vermelha e/ou branca) e pequenas úlceras persistentes podem ser encontrados. A maioria dos casos, entretanto, são diagnosticados em estágio avançado e são observadas lesões extensas, exofíticas ou ulceradas, áreas endurecidas, sangramento, dor, disfagia, disartria, parestesia e mobilidade dentária (RHODUS; KERR; PATEL, 2014; CHI; DAY; NEVILLE, 2015), além de linfadenopatia, fístulas cutâneas, anemia grave e caquexia (ERNANI; SABA, 2015).

O American Joint Committee on Cancer (AJCC) e a Union for International Cancer Control (UICC) utilizam o sistema TNM de estadiamento para classificação de tumores malignos sólidos, incluindo o CEB (KIMPLE *et al.*, 2014; RHODUS; KERR; PATEL, 2014; MONTERO; PATEL, 2015; CHI; DAY; NEVILLE, 2015). A classificação TNM é baseada no tamanho do tumor (T), no envolvimento linfonodal regional (N) e na presença de metástase (M). Para realização do estadiamento são utilizados achados clínicos e imaginológicos, incluindo radiografias, tomografia computadorizada (TC), ressonância magnética (RM) e tomografia computadorizada por emissão de pósitrons (PET SCAN) (RHODUS; KERR; PATEL, 2014; CHI; DAY; NEVILLE, 2015). Esta classificação é utilizada para determinar a extensão e o prognóstico do câncer, bem como auxiliar no

planejamento terapêutico (RHODUS; KERR; PATEL, 2014; RIVERA, 2015; NOGUTI *et al.*, 2012). Entretanto, os dados fornecidos pelo estadiamento TNM são insuficientes para prever a resposta ao tratamento e, estudos que exploram a biologia deste tumor tornam-se essenciais para a identificação de prováveis biomarcadores, com reflexos na diversificação de possibilidades terapêuticas e, ainda, terapia personalizada (RIVERA, 2015).

A classificação histológica do CEB é baseada na diferenciação do tumor (bem, moderadamente e pouco diferenciado/indiferenciado), que permite a avaliação da taxa de crescimento tumoral e pode estar relacionada ao potencial de invasão, bem como o prognóstico (RIVERA; VENEGAS, 2014; EL-NAGGAR *et al.*, 2017). O CEB bem diferenciado é caracterizado por grandes ninhos, cordões e/ou ilhas de células, com pontes intercelulares proeminentes, núcleos redondos, disqueratose celular e pérolas de queratina. O pleomorfismo celular e nuclear, hipercromatismo nuclear e as figuras de mitose aumentam com a diminuição do grau de diferenciação. Em tumores pouco diferenciados, as características de epitélio escamoso são mínimas e as pérolas de queratina são raras ou ausentes, apresentam pequenas ilhas e células individuais dispersas ou projeções irregulares semelhantes a dedos e a invasão perineural e linfovascular são frequentes. Em alguns casos, pode ser encontrado um estroma desmoplásico com resposta inflamatória em torno de ninhos de células tumorais (EL-NAGGAR *et al.*, 2017).

Rivera *et al.*, 2011 destacaram a classificação histológica do CEB que leva em consideração o padrão do *front* de invasão do tumor (FIT), constituído pela área da lesão com maior profundidade de invasão e progressão para os tecidos adjacentes. As células do FIT possuem características moleculares distintas quando comparadas com as células nas áreas superficiais do tumor, apresentando características mais invasivas (BANKFALVI; PIFKÒ, 2000; TUMULURI; THOMAS; FRASER, 2002). O FIT é considerado a área mais representativa do tumor e é caracterizado por quatro aspectos: o grau de queratinização, polimorfismo nuclear, infiltração linfocitária e reflete o padrão de invasão predominante (RIVERA *et al.*, 2011; RIVERA; VENEGAS, 2014).

Apesar dos avanços no tratamento oncológico, as opções terapêuticas para o CEB continuam limitadas, sendo a cirurgia e radioterapia as principais formas de abordagem dos pacientes, refletindo em alta morbidade, baixa qualidade de vida das pessoas acometidas pela doença e maior frequência de doença metastática (HARTNER, 2018). 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 quimiorradioterapia (prévia a cirurgia) só é adotada, atualmente, em caso de CEB inoperável, utilizando altas doses de cisplatina e, quando esta estratégia é comparada a 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).

Diante do exposto, faz-se necessário maiores esforços na abordagem de estratégias que possam refletir em melhor desfecho clínico e sobrevida para os pacientes com CEB, já que a morbidade associada ao tratamento cirúrgico (deformidade facial, problemas na fala, deglutição, etc.) é um aspecto grave nesta doença, com impactos sociais, emocionais e econômicos (baixa produtividade no trabalho, dificuldade de reinserção no mercado de trabalho, etc.).

## 1.2 VIA DE SINALIZAÇÃO HEDGEHOG E CÂNCER

O gene Hedgehog foi inicialmente identificado durante o desenvolvimento embrionário de moscas do gênero *Drosophila* (NÜSSLEIN-VOLHARD; WIESCHAUS, 1980; AKYALA; PEPPELENBOSCH, 2018). Em humanos, a via Hedgehog (Hh) participa ativamente do desenvolvimento embrionário de diversos órgãos (CHIANG *et al.*, 1996; INGHAM; MCMAHON, 2001; LI; LI; FENG, 2016; BANGS; ANDERSON, 2017), incluindo córtex adrenal, cerebelo, olho, face, trato gastrointestinal, rim, ossos longos, pulmão, pâncreas, hipófise, próstata, músculo esquelético, glândulas salivares e dentes (JASKOLL *et al.*, 2004; LEE; ZHAO; INGHAM, 2016). Em tecidos adultos, a via Hh está envolvida na homeostase tecidual e no processo de regeneração, sendo limitada a células-tronco de rápida renovação e de modulação do reparo tecidual, como pele e intestino; dessa forma, a via está silenciada na maioria dos tecidos adultos (INGHAM; MCMAHON, 2001; AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013; HANNA; SHEVDE, 2016). A desregulação da via de Hh já foi descrita em diversos tipos de cânceres humanos, indicando que a ativação aberrante da via é um fator importante para tumorigênese (LI; LI; FENG, 2016).

São encontrados três ligantes hedgehog: Indian hedgehog (IHH), Desert hedgehog (DHH) e Sonic hedgehog (SHH) (PEPINSKY *et al.*, 2000). Tais ligantes possuem

afinidade semelhante pelos receptores transmembrânicos e ativam as mesmas cascatas de sinalização. Acredita-se que a diferença entre esses ligantes seja a especificidade tecidual e o nível de expressão em cada tecido (MERCHANT, 2012; FATTAHI; LANGROUDI; AKHAVAN-NIAKI, 2018). Além dos ligantes, a via Hh é composta por um receptor transmembrânico Patched (PTCH), uma proteína transmembrana Smoothed (SMO) e fatores de transcrição da família de oncogenes homólogos associados ao glioma (GLI1, GLI2 e GLI3) (INGHAM; MCMAHON, 2001; RUIZ I ALTABA; SÁNCHEZ; DAHMANE, 2002; COHEN, 2003; MA; XIAO; HE, 2008; TZELEPI *et al.*, 2011; AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013; MASTRANGELO; MILANI, 2018). Os componentes da via Hh se localizam dentro ou próximo de uma organela específica, chamada de cílio primário. Os cílios primários são extensões do citoesqueleto, formados por microtúbulos que se projetam a partir da membrana plasmática da maioria das células. São estruturas dinâmicas que são reabsorvidas durante a progressão do ciclo celular e se estendem na interfase (MICHAUD; YODER, 2006; WONG; REITER, 2009; AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013). Cada célula possui apenas um cílio primário (MERCHANT, 2012). Nos últimos anos, o cílio primário tem sido considerado uma organela importante, uma vez que desempenha funções na detecção e na integração de sinais das vias de sinalização celular, como a via Hh (WONG; REITER, 2009; BANGS; ANDERSON, 2017).

Na ausência do ligante, o receptor PTCH se localiza no cílio primário e reprime a atividade de SMO, impedindo a sua ativação e seu deslocamento para o interior do cílio. Na presença do SHH, IHH ou DHH, o PTCH é deslocado para fora do cílio, permitindo a ativação de SMO e seu acúmulo no interior do cílio. O SMO ativado desencadeia uma cascata de sinalização que resulta na ativação dos fatores de transcrição GLI a partir da liberação do complexo de proteínas inibidoras (supressor de fused (SUFU), Costal-2 (COS2) e Fused (FU)). Os fatores de transcrição GLI ativados são translocados para o núcleo, onde induzem a expressão de vários genes que regulam a proliferação, a diferenciação, a angiogênese e as interações extracelulares envolvidas no desenvolvimento e manutenção tumoral, tais como *Cyclin D1*, *c-MYC*, *BCL2*, *MMPs*, *VEGF* e *SNAIL*. Além disso, outros genes alvo da via Hh constituem mecanismos de feedback positivo, como o GLI1, e feedback negativo, como PTCH e HHIP (INGHAM; MCMAHON, 2001; RUIZ I ALTABA; SÁNCHEZ; DAHMANE, 2002; COHEN, 2003; MA; XIAO; HE, 2008; MIMEAULT; BATRA, 2010; TZELEPI *et al.*, 2011; AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013; HABIB; O'SHAUGHNESSY, 2016; SKODA *et al.*, 2018) (FIGURA 1).

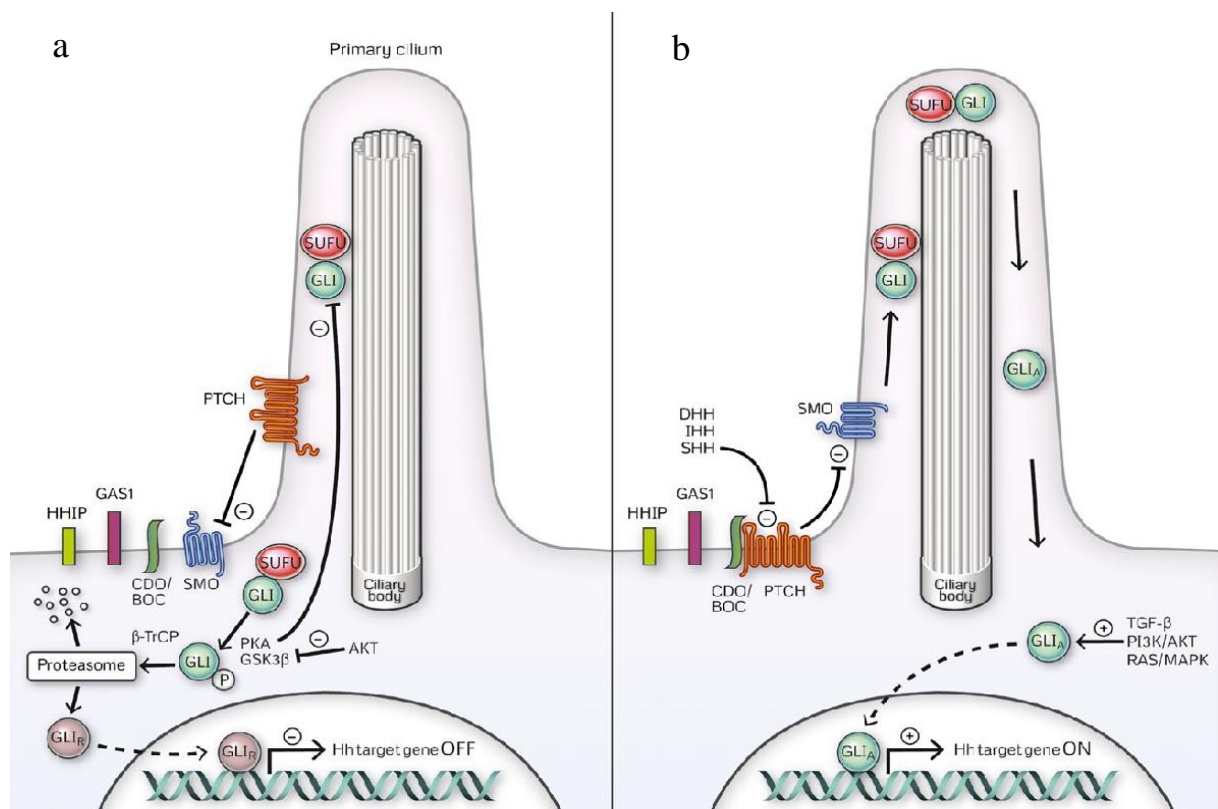


Figura 1: Desenho esquemático dos componentes da via Hh. Em (a) na ausência do ligante e em (b) na presença do SHH (FONTE: HABIB; O'SHAUGHNESSY, 2016).

A ativação da via Hh induzida pela interação entre ligante-receptor é conhecida como via clássica. Porém, a via Hh pode se tornar ativa independente do ligante, conhecida como via alternativa, a qual pode ocorrer de três maneiras: 1) o fator de transcrição GLI é ativado por moléculas ou vias de sinalização independentes do ligante e do SMO; 2) a ativação da via exclusivamente por PTCH; e 3) ativação da via Hh por SMO, acoplado a proteína G desencadeando a transmissão do sinal (BLOTTA *et al.*, 2012; CARBALLO *et al.*, 2018; FATTAHI; LANGROUDI; AKHAVAN-NIAKI, 2018). No entanto, estudos ainda estão sendo realizados para esclarecer a ativação alternativa da via (CARBALLO *et al.*, 2018).

Os fatores de transcrição GLI1, GLI2 e GLI3 apresentam funções distintas na via Hh (PAK; SEGAL, 2016; AKYALA; PEPPELENBOSCH, 2018; PIETROBONO; GAGLIARDI; STECCA, 2019). Um dos alvos da via é a ativação do GLI1, que atua exclusivamente como um ativador transcrricional e não possui domínio repressor. Portanto, o GLI1 é utilizado como um indicador de ativação da via Hh. Por outro lado, GLI2 e GLI3 possuem formas ativadoras (GLI2<sup>A</sup> e GLI3<sup>A</sup>) e repressoras (GLI2<sup>R</sup> e GLI3<sup>R</sup>). No entanto, GLI3 atua principalmente como um repressor da via, enquanto que para o GLI2 predomina

a função ativadora (MERCHANT, 2012; YAN *et al.*, 2013; LEE; ZHAO; INGHAM, 2016; PAK, SEGAL, 2016; AKYALA; PEPPELENBOSCH, 2018; PIETROBONO; GAGLIARDI; STECCA, 2019).

As proteínas SHH, SMO, GLI1 e GLI2 são reguladores positivos da via Hh, enquanto HHIP, SUFU, GLI3 e a família de receptores PTCH são reguladores negativos. Em uma variedade de tumores, a via Hh está ativada de forma aberrante, uma vez que reguladores positivos estão ativados e/ou reguladores negativos estão inativados (KATOH; KATOH, 2009).

Sabendo-se que a regulação positiva da via de sinalização de Hh está envolvida no desenvolvimento de diversos tumores malignos, três modelos básicos para a ativação da via Hh no câncer foram propostos (RUBIN; SAUVAGE, 2006; SCALES; SAUVAGE, 2009; MASTRANGELO; MILANI, 2018). No tipo I, a ativação é independente do ligante, e envolve mutações ou mudanças epigenéticas que promovem a estimulação constitutiva do ligante e de moléculas sinalizadoras, como ocorre no carcinoma basocelular, meduloblastoma e rabdomyosarcoma (Figura 2a). No tipo II, a ativação é mediada pelo ligante, e envolvem mecanismos de sinalização autócrina, no qual as células tumorais produtoras do ligante Hh são também responsivas a este ligante (ex. ovário e pâncreas) (Figura 2b). No tipo IIIa, a ativação também é mediada por ligante, mas através da sinalização parácrina, isto é, as células tumorais produzem o ligante que ativa alvos distantes dentro do estroma. Por sua vez, as células estromais ativadas por Hh, produzem sinais proliferativos, angiogênicos e metastáticos que favorecem o desenvolvimento tumoral (ex. colorretal e mieloma múltiplo) (Figura 2c). Por fim, no tipo IIIb, a ativação também é mediada por ligante, que é secretado pelas células estromais e age nas células tumorais, sendo chamada de sinalização parácrina reversa (Figura 2d) (RUBI; SAUVAGE, 2006; SCALES; SAUVAGE, 2009; SAQUI-SALCES; MERCHANT, 2010; LI; LI; FENG, 2016; HABIB; O'SHAUGHNESSY, 2016; WU *et al.*, 2017a; XIN *et al.*, 2018; SKODA *et al.*, 2018; AKYALA; PEPPELENBOSCH, 2018; MASTRANGELO; MILANI, 2018; FATTAHI; LANGROUDI; AKHAVAN-NIAKI, 2018).

Por outro lado, em tumores de bexiga, a expressão de moléculas HH em CAFs pode estar relacionada a uma inibição da progressão tumoral inicial, através da ativação de mecanismos de reparo, induzidos por Hh (ROBERTS, KERSHNER e BEACHY, 2017). Alguns estudos atuais têm apontado que a expressão de moléculas Hh em CAFs pode estar também relacionado a ativação de programas celulares que favorecem os mecanismos de

reparo e consequente inibição da progressão tumoral, apesar destes estudos tratarem de um tipo específico de câncer de bexiga (LEE et al., 2014; SHIN et al., 2014).

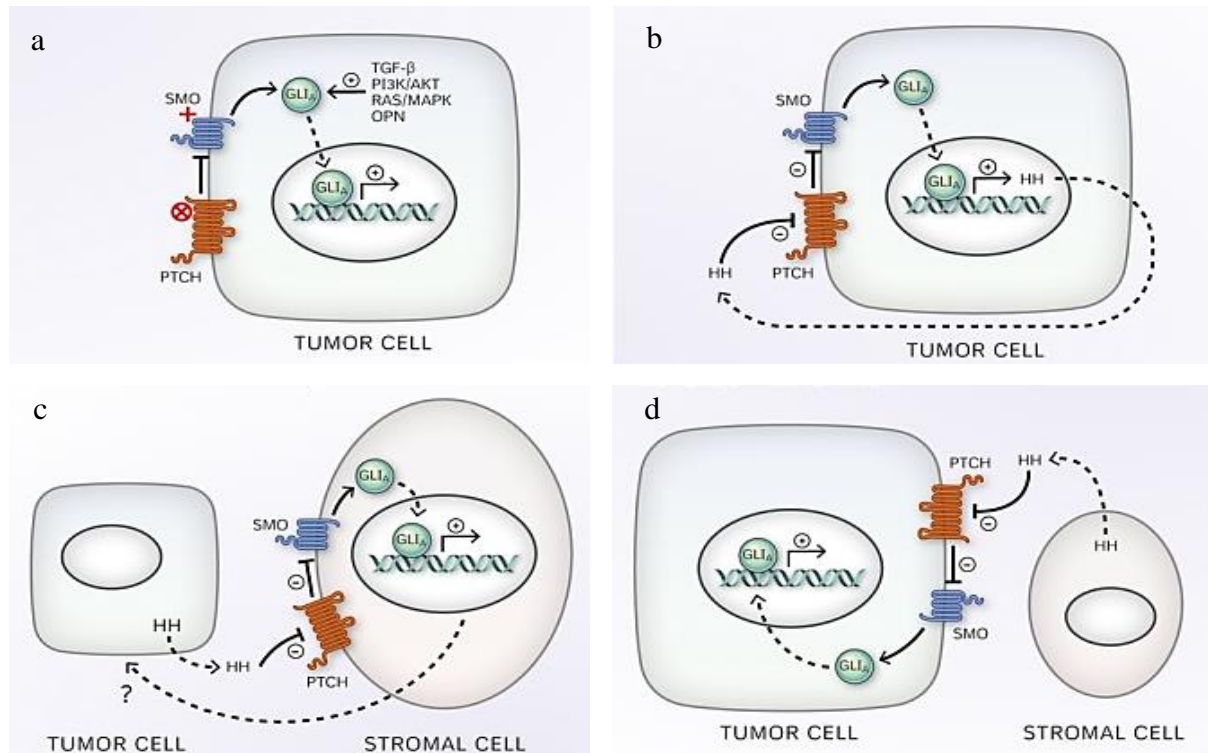


Figura 2. Mecanismos de sinalização Hh no câncer: (a) Tipo I, independente de ligante. (b) Tipo II, sinalização autócrina. (c) Tipo IIIa, sinalização parácrina, (d) Tipo IIIb, sinalização parácrina reversa. (Fonte: adaptado de HABIB; O'SHAUGHNESSY, 2016).

Nosso grupo foi pioneiro em demonstrar que esta cascata está reativada em CEB (CAVICCHIOLI BUIM *et al.*, 2011), assim como ocorre em carcinomas basocelulares (GOODRICH *et al.*, 1996), câncer de mama (IM *et al.*, 2013), esôfago (YANG *et al.*, 2012), estômago (AKYALA; PEPPELENBOSCH, 2018), pâncreas (HAO *et al.*, 2013), fígado (CHENG *et al.*, 2009), próstata (KIM *et al.*, 2011), ovário (LI; LI; FENG, 2016), colorretal (WU *et al.*, 2017b) e glândulas salivares (VIDAL *et al.*, 2016). Outros estudos de nossa equipe apontam que a via Hh já está ativada em estágios iniciais da carcinogênese oral (DIAS *et al.*, 2016), 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). Atualmente, todos os nossos estudos em andamento são direcionados para entender os mecanismos celulares e moleculares de sinalização parácrina, autócrina e parácrina reversa como estratégia para direcionamento de estudos translacionais focados na via Hh como alvo terapêutico.

### 1.3 FIBROBLASTOS ASSOCIADOS AO CÂNCER

Os tumores malignos são tecidos heterogêneos complexos, compostos por células epiteliais malignas e células estromais, como fibroblastos, células do sistema imune, células inflamatórias, pericitos e células endoteliais, além de constituintes não celulares, incluindo colágeno, proteoglicanos e fatores de crescimento solúveis que compõem a matriz extracelular (MEC), que, coletivamente, são chamados de microambiente tumoral (SHIGA *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2016; ERDOGAN; WEBB, 2017; TAO *et al.*, 2017). Por muito tempo, a maioria das pesquisas em câncer esteve voltada para as células malignas, visando identificar o papel dessas células na carcinogênese, progressão, invasão, metástase e angiogênese (SHIGA *et al.*, 2015). Atualmente, sabe-se que os componentes do microambiente tumoral comunicam-se entre si e com as células malignas através de contato célula-célula e por sinalização parácrina, participando ativamente do desenvolvimento e da progressão tumoral (HUANG *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2016; ALKASALIAS *et al.*, 2018; FRANCO *et al.*, 2019).

As células mais abundantes no estroma tumoral são os fibroblastos associados ao câncer (CAF, do inglês, *carcinoma-associated fibroblasts*), sendo os principais mediadores da interação células malignas-estroma (HUANG *et al.*, 2014; SHIGA *et al.*, 2015; ERDOGAN; WEBB, 2017). Os CAFs apresentam propriedades semelhantes aos miofibroblastos ativados encontrados em locais onde está acontecendo a cicatrização de feridas (GANDELLINI *et al.*, 2015), exibindo intensa atividade de síntese proteica e funções contráteis (ALKASALIAS *et al.*, 2018). Entretanto, os CAFs apresentam uma taxa de proliferação mais rápida, produção aumentada de colágeno, fatores de crescimento e moduladores da MEC, com função pró-tumoral (RAFFAGHELLO; DAZZI, 2015).

Ainda não foi identificado um marcador específico e exclusivo para detecção de CAFs, mas uma combinação dos marcadores pode auxiliar nessa identificação (PAULSSON; MICKE, 2014; SHIGA *et al.*, 2015). O marcador mais utilizado é a alfa-actina do músculo liso ( $\alpha$ -SMA), visto que os CAFs apresentam expressão abundante dessa proteína. Outro marcador utilizado é a proteína de ativação de fibroblastos (FAP), no entanto, a distribuição e função tecidual de FAP não estão restritos a fibroblastos estromais, sendo detectável em células epiteliais malignas. Os CAFs também expressam marcadores de fibroblastos, como: proteína específica de fibroblastos 1 (FSP1, também conhecida como S100A4), antígeno neurônio-gliial 2 (NG2), receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR- $\alpha$  e PDGFR- $\beta$ ), vimentina, desmina, tenascina C, periostina,



fibronectina, podoplanina e prolil4-hidroxilase (P4H, 5B5). Entretanto, esses marcadores são não específicos para fibroblastos ativados (HUANG *et al.*, 2014; SHIGA *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2017; MC CARTHY; EL-ASHRY; TURLEY, 2018). Por outro lado, as citoqueratinas e o CD31 são considerados marcadores negativos, uma vez que os CAFs não apresentam características e marcadores epiteliais e endoteliais (SHIGA *et al.*, 2015).

Vários tipos celulares são apontados como precursores dos CAFs, destacando-se os fibroblastos residentes, adipócitos, células tronco mesenquimais, células tronco hematopoiéticas, células epiteliais (transição epitélio-mesenquimal; TEM) e células endoteliais (transição endotelial-mesenquimal; TEndM) (LIAO *et al.*, 2018; ALKASALIAS *et al.*, 2018; LEBLEU; KALLURI, 2018) (Figura 3). Os fibroblastos residentes são considerados a principal fonte de CAFs (LIAO *et al.*, 2018) e acredita-se que fatores e citocinas produzidos pelas células malignas induzam a ativação desses fibroblastos (SHIGA *et al.*, 2015). Uma vez que os adipócitos e os fibroblastos apresentam a mesma origem mesenquimal e estão presentes no estroma tumoral, acredita-se que os adipócitos sejam fonte de CAFs (LIAO *et al.*, 2018; ALKASALIAS *et al.*, 2018).

As células tronco mesenquimais e as células tronco hematopoiéticas também são capazes de originar os CAFs; em um microambiente tumoral favorável, essas células são recrutadas e se podem se diferenciar em CAFs (HUANG *et al.*, 2014). Por fim, as células epiteliais e endoteliais, sob estímulos específicos, como aquele mediado por TGF- $\beta$ , podem ter as vias de TEM e TEndM ativadas e, neste processo, as células deixam de expressar características e marcadores de células epiteliais e endoteliais, respectivamente, e passam a expressar um fenótipo mesenquimal típico de CAFs (HUANG *et al.*, 2014; ALKASALIAS *et al.*, 2018; LEBLEU; KALLURI, 2018).

As funções dos CAFs como promotores da iniciação e progressão tumoral, na transição epitelial-mesenquimal, na manutenção das células tronco, na invasão tumoral, na angiogênese, na metástase e no desenvolvimento de resistência a drogas estão bem estabelecidas (ISHII; NERI, 2016; WANG *et al.*, 2017; MC CARTHY; EL-ASHRY; TURLEY, 2018; ZIANI; CHOUAIB; THIERY, 2018) (Figura 3). No microambiente tumoral, os CAFs interagem com as células malignas e as demais células estromais, e como um sinal de ativação, produzem e secretam vários produtos, tais como: proteínas da MEC (colágenos), enzimas que atuam na remodelação da MEC, como as metaloproteinases de matriz (MMP1, MMP2, MMP3, MMP9, MMP13 e MMP14), proteoglicanos, citocinas,

quimiocinas, fatores pró-angiogênicos e fatores de crescimento que promovem a proliferação celular (ALKASALIAS *et al.*, 2018; ZIANI; CHOUAIB; THIERY, 2018).

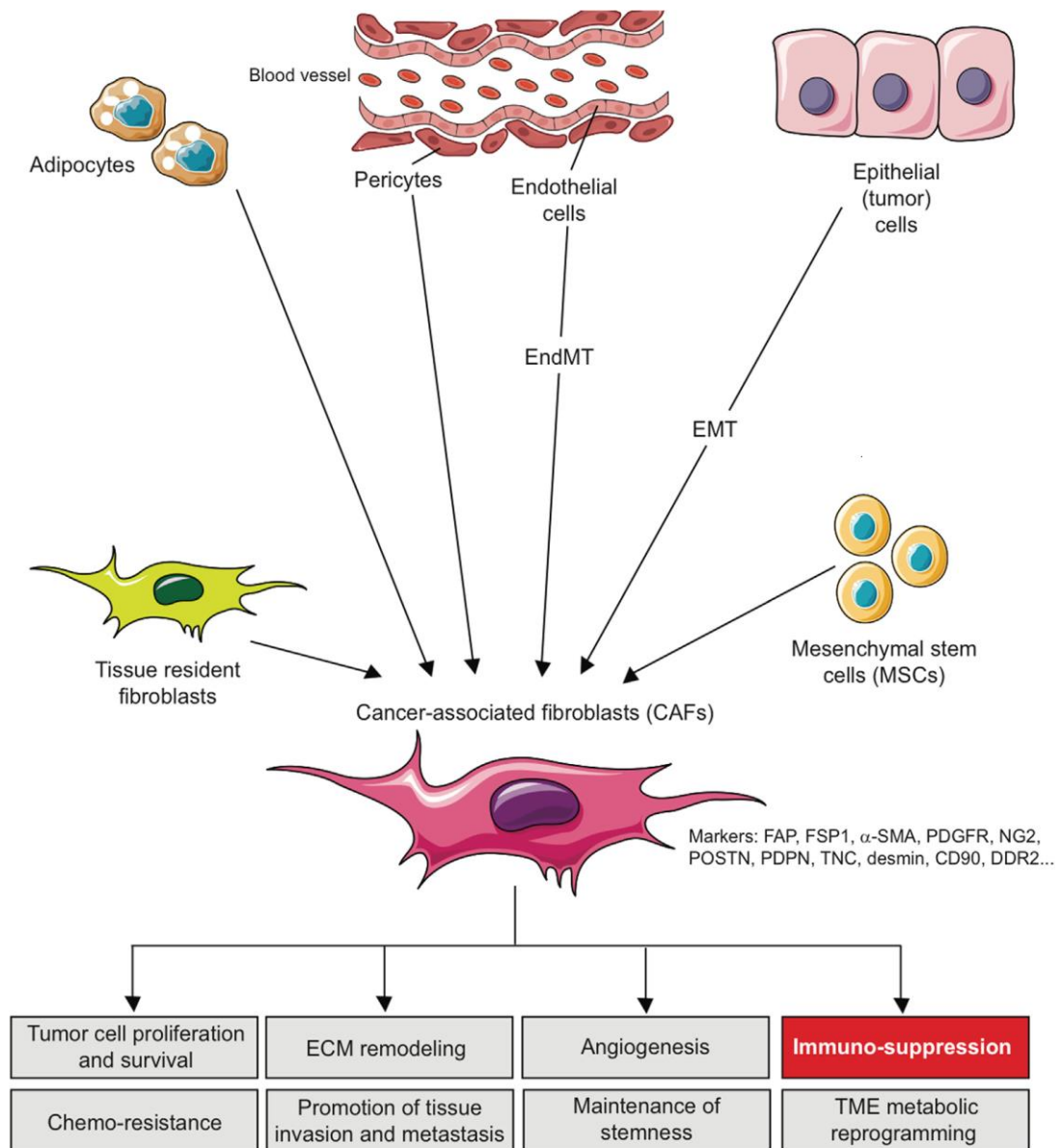


Figura 3: Origens dos CAFs, marcadores e papel na progressão do câncer (Fonte: ZIANI; CHOUAIB; THIERY, 2018).

Muitos estudos têm evidenciado a importância dos CAFs no desenvolvimento do CEB (KELLERMANN *et al.*, 2008; THODE *et al.*, 2011; SOBRAL *et al.*, 2011; FUJII *et al.*, 2012; BAE *et al.*, 2014; WHEELER *et al.*, 2014; FONSECA *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2015; STEINBICHLER *et al.*, 2015; ZHOU *et al.*, 2015; KUMAR *et al.*, 2015; KABIR *et al.*, 2016; KAYAMORI *et al.*, 2016; BAGORDAKIS *et al.*, 2016; LIN *et al.*, 2017; PRIME *et al.*, 2017; DOURADO *et al.*, 2017; GRAIZEL *et al.*, 2019).

Em CEB, os CAFs podem desempenhar papéis críticos na progressão tumoral, como indutor de invasão tumoral e angiogênese (SOBRAL *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2015; KUMAR *et al.*, 2015; KAYAMORI *et al.*, 2016; BAGORDAKIS *et al.*, 2016; LIN *et al.*, 2017), no desenvolvimento de resistência à drogas (STEINBICHLER *et al.*, 2015) e na proliferação celular (KELLERMANN *et al.*, 2008). Em adição, a presença dos CAFs está associada a um pior prognóstico (FUJII *et al.*, 2012; DOURADO *et al.*, 2017; GRAIZEL *et al.*, 2019). Sendo assim, os CAFs são considerados um possível alvo terapêutico e muitos estudos têm sido realizados visando a elucidação dos mecanismos de ativação e ação dessas células em CEB.

A relação entre a via Hh e os CAFs já foi descrita em alguns tipos de carcinomas (WALTER *et al.*, 2010; BERMUDEZ *et al.*, 2013; CHOE *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2016; VALENTI *et al.*, 2017). Por exemplo, em tumores de mama, foi demonstrado que células tronco tumorais secretam o ligante SHH, regulando a ativação parácrina da via Hh em CAFs, que por sua vez, secretam fatores que promovem a expansão e auto renovação das células tronco tumorais (VALENTI *et al.*, 2017). Estudo anterior de nosso grupo, em uma série de 70 casos de CEB, demonstrou que CAFs são possíveis fonte dos ligantes SHH e IHH, ao mesmo tempo que apresentaram GLI1 nuclear (Resultados submetidos para publicação). Isso significa que estas células podem participar tanto da sinalização parácrina reversa, como também respondem a atividade Hh, no microambiente tumoral (GUIMARÃES, 2018), podendo participar na regulação da migração e invasão de células malignas, mediada por Hh.

## 2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Considerando-se os desafios relacionados ao desfecho clínico e sobrevida para os pacientes com CEB e alinhado ao conhecimento de que de vias de sinalização embrionárias, como a Hh, são muito importantes para a iniciação e biologia tumoral, além do conhecimento prévio de que CAFs são a maior população de células no estroma tumoral, exercem efeitos modulatórios pró-tumorais e são positivos para componentes Hh (SHH, IHH e GLI1), a nossa hipótese é:

*CAFs produzem os ligantes Hh, ao mesmo tempo que possuem a via Hh ativada e o bloqueio farmacológico de GLI em CAFs subverte a expressão de genes relacionados a migração e invasão, em célula de carcinoma escamocelular boca.*

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito dos CAFs na expressão de genes Hh em célula de CEB, bem como analisar se o bloqueio farmacológico desta cascata sinalizadora, em CAF, pode ter efeito na expressão de genes relacionados a cascata Hh, migração e invasão em célula de carcinoma escamocelular de boca.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Correlacionar a população de CAFs com a via Hh, marcadores de migração e invasão celular, em amostras de CEB humano;
- Caracterizar as células de CEB e CAF quanto ao perfil de expressão de componentes da via Hh;
- Avaliar o efeito parácrino da proteína SHH recombinante na ativação da via Hh em células de CEB;
- Avaliar o efeito do meio condicionado por CAF na expressão de genes relacionados a atividade da via Hh e genes regulados pela via Hh, envolvidos na migração e invasão, em células de CEB, antes e após bloqueio com GANT61, no CAF;
- Estudar a expressão dos genes Hh, de migração e invasão, em células CAL27, antes e após tratamento com GANT61.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Visando avaliar a migração e invasão tumoral mediada por CAFs e pela via Hh em CEB humanos, foram utilizados dez casos de tumor primário obtidos a partir da cirurgia para o tratamento da doença. Os casos foram cedidos pelo Serviço de Anatomia Patológica do Centro de Diagnóstico Pires (Feira de Santana, Bahia). Esta parte do trabalho foi aprovada pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos do Instituto Gonçalo Moniz (IGM, Fiocruz, Bahia), parecer número 2.295.634. Para a revisão e análise histológica dos casos de CEB, cortes de 4µm de espessura foram obtidos dos blocos de parafina e submetidos à coloração pela hematoxilina/eosina, conforme a rotina do Serviço de Histotecnologia do IGM.

Cortes de 4µm de espessura foram obtidos dos espécimes emblocados em parafina, sendo dispostos em lâminas de vidro previamente limpas e silanizadas. A seguir, os casos foram submetidos à imunomarcagem para os anticorpos S100A4 (*Fibroblast Specific Protein*), SHH, IHH,  $\alpha$ -SMA (*alpha-Smooth Muscle Actin*), MMP9 (*Matrix metalloproteinase-9*) e MMP14 (*Matrix metalloproteinase-14*). Dados sobre fabricante, clone, diluição, recuperação antigênica e controle positivo dos anticorpos utilizados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Dados do fabricante, clone, diluição, recuperação antigênica e controle positivo.

Anticorpo	Marca	Clone	Diluição	Recuperação antigênica	Controle positivo
$\alpha$ -SMA	Dako	1A4	1:200	Citrato pH 6,0	Câncer de boca
SHH	NovusBiologicals	5H4	1:1000	Citrato pH 6,0	Placenta
IHH	NovusBiologicals	EP1192Y	1:500	Citrato pH 6,0	Placenta
MMP9	DBS	Policlonal	1:50	Citrato pH 6,0	Câncer de mama
MMP14	NovusBiologicals	EP1264Y	1:100	Citrato pH 6,0	Câncer de mama

Inicialmente, as secções histológicas foram desparafinizadas em xilol e rehidratadas em álcool etílico e água corrente. Para exposição dos epítomos antigênicos, as secções foram submetidas à recuperação antigênica, em calor úmido por 40 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena (Peroxidase Blocking Solution™, Dako, Carpinteria, USA) foi realizado protegido da luz, por 10 minutos e o bloqueio das proteínas teciduais realizado com leite desnatado a 10% por 30 minutos. Os anticorpos primários foram

incubados por 1 hora ( $\alpha$ -SMA e MMP9) em temperatura ambiente ou overnight (SHH, IHH e MMP14), à temperatura de 4°C. Em seguida a incubação do anticorpo primário, os reagentes HRP Link e HRP Enzyme (Advance™, Dako Corporation, Carpinteria, USA) foram aplicados nos cortes histológicos, 20 minutos cada. As reações foram reveladas com 3,3-diaminobenzidina (Dako, Carpinteria, USA), por 5 minutos, em câmara escura e, posteriormente, as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Harris por 1 minuto e montadas com *permount*. Para o controle negativo, cada anticorpo primário foi substituído por solução de TRIS hidrocloreto.

As lâminas foram escaneadas em microscópio digital virtual Aperio (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) e exibidas em um monitor com auxílio do Aperio Image Scope (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Posteriormente, a avaliação semi-quantitativa das imunomarcações foi realizada por um patologista oral, e as proteínas estudadas foram analisadas em locais coincidentes, em duas áreas específicas: *front* de invasão e ilhas tumorais mais profundas. Em seguida, foi atribuído um escore imunohistoquímico para cada área, como segue: escore negativo (-), <5% de células imunomarcadas; escore 1+, 5-25%; escore 2+, 26-50% e escore 3+ >51% de células imunopositivas (ZHANG *et al.*, 2014). Além disso, levou-se em consideração a localização das proteínas: membranar e/ou citoplasmática.

#### 4.2 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS EM CULTURA

Foram utilizadas quatro linhagens de CEB (CAL27, SCC4, SCC9 e HSC3 – American Type Culture Collection, ATCC) (Tabela 2) e duas culturas primárias de fibroblastos (NOF e CAF). A cultura de fibroblastos normais de boca (NOF) foi obtida da gengiva de paciente saudável e a população de fibroblastos associados ao câncer (CAF) foi obtida de paciente com CEB. NOF e CAF foram isolados na Faculdade de Odontologia da UNICAMP, pelo Prof. Ricardo Della Coletta, conforme descrito posteriormente.

Tabela 2: Dados clínicos das linhagens de CEB utilizadas.

Linhagem de CEB	Marca	Localização do tumor	Idade	Gênero	Potencial metastático
CAL27	ATCC	Língua	56	Masculino	Não
SCC4	ATCC	Língua	55	Masculino	Não
SCC9	ATCC	Língua	25	Masculino	Não
HSC3	ATCC	Língua	64	Masculino	Sim

As linhagens celulares foram cultivadas em garrafas para cultura de células (75 cm<sup>3</sup>, volume de 250 mL), em meio DMEM (Gibco®, Waltham, Massachusetts, USA), suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco®, Waltham, Massachusetts, USA) e 1% de Penicillin-Streptomycin (Gibco®, Waltham, Massachusetts, USA). As células foram mantidas em estufas com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C e 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, entre 70 e 80% do volume total da garrafa de cultura. As linhagens manuseadas neste estudo foram testadas mensalmente para contaminação com micoplasma utilizando o Kit MycoAlert™ PLUS (Lonza, Basileia, Suíça).

#### 4.3 OBTENÇÃO DE FIBROBLASTOS ASSOCIADOS AO CÂNCER E FIBROBLASTOS NORMAIS E MEIO CONDICIONADO POR CAFs E POR FIBROBLASTOS NORMAIS

A população de fibroblastos associados ao câncer (CAF) foi obtida conforme descrito por Sobral *et al.* (2011). Resumidamente, fragmentos de carcinoma escamocelular de língua 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  $\alpha$ -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 25cm<sup>2</sup> contendo 1ml de meio DMEM suplementado com 10% de soro de SFB e antibiótico, mantidos em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. 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, a população primária de CAFs (CAF) foi utilizada por, no máximo, 12 passagens. A manutenção do fenótipo de CAF foi avaliada a cada 2 passagens, através da marcação por imunofluorescência para o anticorpo  $\alpha$ -SMA. Para o preparo do meio condicionado (MC) por CAF, 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 o 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 1mL, 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 o CAF, na Faculdade de Odontologia da UNICAMP, e cedida pelo Prof. Ricardo Della Coletta. Essas foram mantidas em cultura, por até 15 passagens. O preparo e armazenamento do meio condicionado (MC) por NOF seguiram o protocolo descrito acima para o MC por CAF.

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS DE CEB, FIBROBLASTOS ASSOCIADOS AO CÂNCER E FIBROBLASTOS NORMAIS QUANTO À EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DA VIA HH POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

A avaliação das proteínas da via Hh foi realizada através de imunofluorescência, em células de CEB (SHH, PTCH1, SMO e GLI1) e nos fibroblastos (SHH e GLI1). Ademais, também foi realizada a marcação de  $\alpha$ -SMA e S100A4, para avaliação do fenótipo, em NOF e CAF. As células foram distribuídas em placas de 24 poços, contendo uma lamínula no interior de cada poço, numa densidade de  $0,7 \times 10^5$  células/mL, incubadas *overnight* para permitir a adesão das células. Após 24 horas, o meio de cultura foi removido e as células foram fixadas com formaldeído 3,7% por 10 minutos e, em seguida, lavadas com PBS. Posteriormente, as células foram permeabilizadas com Triton X-100 por 10 minutos e incubadas por 30 minutos com o anticorpo primário, em temperatura ambiente. Os dados sobre fabricante, clone e diluição dos anticorpos primários utilizados estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Dados do fabricante, clone e diluição.

Anticorpo	Marca	Clone	Diluição
SHH	NovusBiologicals	5H4	1:1000
PTCH1	NovusBiologicals	Policlonal	1:1000
SMO	Abcam	Policlonal	1:1000
GLI1	NovusBiologicals	Policlonal	1:600
$\alpha$ -SMA	Dako	1A4	1:250
S100A4	Dako	Policlonal	1:500

Após nova lavagem com PBS, as células foram incubadas com anticorpo secundário, IgG goat anti-rabbit (1:1000, Molecular Probes – A11008) ou IgG goat anti-mouse (1:1000, Molecular Probes – A 11001) conjugados à anti-rabbit Alexa Fluóor 488 (Life Technologies) e anti-mouse Alexa Fluóor 568 (Life Technologies), respectivamente, por 50 min, protegido da luz e em temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada lavagem com PBS e os núcleos das células foram corados com o agente intercalante de DNA fluorescente 4',6-diamidino-2-phenilindol diidrocloreto (DAPI, Molecular Probes, Eugene, OR) (5µg/mL) durante 10 minutos à temperatura ambiente. Como controle negativo, as reações foram realizadas seguindo os mesmos procedimentos, com exceção da incubação com o anticorpo primário.

As células foram visualizadas e fotografadas com o auxílio do microscópio confocal A1+ (Nikon, Tóquio, Japão).

#### 4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS DE CEB, FIBROBLASTOS ASSOCIADOS AO CÂNCER E FIBROBLASTOS NORMAIS QUANTO À EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DA VIA HH POR WESTERN BLOT

Além da imunofluorescência, também foi realizado Western Blot para avaliação das proteínas da via Hh em células de CEB (SHH, PTCH1, SMO e GLI1) e nos fibroblastos (SHH e GLI1). Para os fibroblastos, também foi realizada a identificação de marcadores do fenótipo CAF,  $\alpha$ -SMA e S100A4. Para esta etapa, as células foram mantidas em garrafas para cultura de células (75 cm<sup>3</sup>, volume de 250 mL), em meio DMEM, após atingirem a confluência necessária (70 a 80%), as células foram lisadas com tampão Tris-HCl 50mM - 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). Após a obtenção dos extratos proteicos, foi realizado o SDS-PAGE para o fracionamento destes e, posteriormente, foi realizada a transferência para membranas de nitrocelulose Hybond-C Extra (GE Healthcare, EUA).

Após a transferência das proteínas, os sítios de ligação inespecífica da membrana foram bloqueados utilizando leite desnatado a 5% (m/v) em salina tamponada com Tris (TBS, NaCl a 137 mM, Tris 24,8 mM, pH 7,5) e Tween 20 a 0,05 % (v/v, TBS-T), por 16 horas, a 4 °C. Em seguida, foi realizada a marcação da membrana de nitrocelulose com anticorpos descritos na Tabela 3. Os anticorpos secundários foram IgG anti-mouse (Santa Cruz Biotecnologia, 1:10.000) e IgG anti-rabbit (GE Health. 1:10.000). Como controle

positivo do ensaio, a membrana foi revelada com anticorpo beta actina (Invitrogen, clone: 15G5A11/E2, 1:10000). A detecção do sinal foi realizada através do sistema de detecção de quimioluminescência ECL + (PerkinElmer, França).

#### 4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS DE CEB, FIBROBLASTOS ASSOCIADOS AO CÂNCER E FIBROBLASTOS NORMAIS QUANTO AO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE COMPONENTES DA VIA HH

Para esta etapa, as células tumorais (CAL27, SCC4, SCC9 e HSC3) e os fibroblastos (NOF e CAF) foram mantidos em garrafas para cultura de células (75 cm<sup>3</sup>, volume de 250 mL), em meio DMEM sem soro, por 24h (carenciadas), quando foram coletadas para extração e análise da expressão dos genes da via Hh (SHH, PTCH1, SMO, SUFU, HHIP, GLI1, GLI2 e GLI3).

##### 4.6.1 Isolamento de RNA total e transcrição reversa

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 meio de cultura foi aspirado, as células lavadas com salina e, em seguida, incubadas com tripsina 1%, a fim de que fossem suspensas. Após adição de meio de cultura contendo soro fetal bovino para inativação da tripsina, as células foram transferidas para um microtubo e centrifugadas a 1500 rpm, durante 5 minutos. O sobrenadante foi aspirado e, em seguida, 600uL do tampão de lise (RLT) foi adicionado para resuspende o *pellet* e a amostra foi misturada durante 1 min, com auxílio do vórtex. Para homogeneização, o lisado foi passado 10 vezes através de uma agulha de 0.9mm, acoplada a uma seringa. Em seguida, foi adicionado 600uL de etanol 70%, misturado gentilmente à amostra, com auxílio de pipeta. Após a transferência para a microcoluna de sílica e lavagens com tampões do kit (RW1 e RPE), o RNA foi eluído com 20uL de água livre de RNase/DNase, pH 7.4 e armazenado em temperatura de -80°C.

A quantidade e pureza do RNA extraído de cada amostra foi analisada em aparelho de espectrofotometria (NanoDrop™, Thermo Scientific, Wilmington, 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.

#### 4.6.2 Ensaio de qPCR em tempo real

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), SUFU (Hs00960520\_m1), HHIP (Hs01011015\_m1), GLI1 (Hs01110766\_m1), GLI2 (Hs01119974\_m1) e GLI3 (Hs00609233\_m1), assim como para o gene referência B2M (Hs99999907\_m1). As reações foram conduzidas em duplicata, no aparelho ABI ViiA7 Fast (Applied Biosystems™, Foster City, CA), utilizando placa de 96 poços e com um volume total de 20 µL, sendo: 8µL de cDNA da amostra (10ng/µL), 1µL de Assay (Applied Biosystems™, Foster City, CA), 10µL de Taqman PCR Master Mix Kit (Applied Biosystems™, Foster City, CA) e 1µL 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.

Três genes endógenos (ACTB, UBC e B2M) foram testados como normalizadores em todos os tipos celulares utilizados e a escolha do gene mais estável foi baseada através da análise da amplificação destes, no programa operacional 7500™ Gene Expression Suite System SDS (Applied Biosystems, USA). Após as corridas de amplificação, os valores de *Quantification Cycles* (CQs) foram obtidos com o auxílio do Programa Operacional ViiA7 System SDS (Applied Biosystems™, USA). A expressão relativa dos genes estudados foi obtida através da fórmula matemática  $2^{-\Delta CQ}$ , onde  $\Delta CQ = CQ \text{ alvo} - CQ \text{ endógeno B2M}$ , conforme Du *et al.* (2013).

#### 4.7 AVALIAÇÃO DO ESTÍMULO COM LIGANTE SHH EXÓGENO NA EXPRESSÃO DE GENES HH EM CÉLULAS HSC3 E CAL27

A partir dos resultados obtidos no experimento anterior, as células HSC3 e CAL27 foram selecionadas para esta etapa, uma vez que a primeira linhagem não apresentou níveis detectáveis do transcrito SHH e, em CAL27, foi possível mensurar o RNAm deste gene. Sendo assim, o objetivo desta etapa foi avaliar o estímulo mediado pela proteína recombinante SHH exógena na ativação da via Hh em células de CEB (efeito parácrino), bem como estudar o efeito aditivo/sinérgico, nas células que já produzem o ligante.

Para isso, inicialmente as células HSC3 foram distribuídas em placas de 6 poços numa densidade de  $0,7 \times 10^5$  células/mL e incubadas *overnight* para permitir a adesão das células. Após 24 horas, o meio foi retirado e as células lavadas com salina, para retirar todo

o SFB. Em seguida, após 24 horas com meio DMEM sem SFB, as células tumorais foram incubadas com o ligante SHH exógeno (R&D Systems) numa concentração de 500 ng/ml por 1h, 3h, 6h, 12h, 24h e 48h. Para as células CAL27, com base nos resultados obtidos com a célula HSC3, foi utilizado o ligante SHH exógeno numa maior concentração (1µg/ml) por 12h. O controle negativo foi o PBS, uma vez que esta solução foi utilizada para diluição do ligante, conforme recomendação do fabricante.

#### **4.7.1 Isolamento de RNA total, transcrição reversa e qPCR em tempo real**

Após o tempo de incubação com o ligante SHH exógeno, o meio de cultura foi aspirado e as células foram mantidas em contato com 600uL da solução de lise (RLT) e removidas da placa com o auxílio de um *cell scraper*. Em seguida, as células foram retiradas da placa e transferidas para um microtubo. A continuação do procedimento de extração de RNA e a etapa de transcrição reversa foram realizados de acordo com o protocolo descrito no item 4.6.1.

A expressão de genes 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) e GLI2 (Hs01119974\_m1), assim como para o gene referência B2M (Hs99999907\_m1). A análise da expressão dos genes supracitados foi avaliada através de reações de qPCR segundo o protocolo descrito no item 4.6.2.

#### **4.8 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO GANT61**

Para as próximas etapas desse estudo, foi realizado o bloqueio farmacológico da via Hh nas células estudadas (CAL27, CAF e NOF), com o auxílio do GANT61. Inicialmente, para obtenção da concentração inibitória média (CI50), foi realizado o ensaio de alamar blue, que consiste em um ensaio colorimétrico e fluorimétrico, para avaliar a viabilidade celular através da capacidade de metabolização da resazurina em resofurina (AHMED, GOGAL, WALSH, 1994).

Neste ensaio, as células CAL27, CAF e NOF foram distribuídas em placas de 96 poços numa densidade de  $7 \times 10^4$  células/mL, em um volume de 100 µL. O inibidor GANT61 (0,19 a 25 µg/mL) foi dissolvido em salina, adicionados em cada poço e incubados por 72 horas. O 5-Fluorouracil (5-FU) (Sigma-Aldrich, USA) foi utilizado como controle positivo com concentrações variando de 0,19 a 25 µg/mL. Antes do final do

período de incubação (4 horas), 20 µL da solução estoque (0,312 mg/mL) de alamar blue (resazurina, Sigma-Aldrich) foram adicionados em 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. Os valores de CI50 e o intervalo de confiança de 95% foram obtidos por regressão não linear de três ensaios independentes, realizados em duplicata.

A fim de demonstrar a ação repressora do GANT61 na via Hh em CAF, estas células foram mantidas em garrafas para cultura (75 cm<sup>3</sup>, volume de 250 mL) até atingirem a confluência de 70-80%. Em seguida, após lavagem com salina, foi adicionado meio DMEM sem soro e 1,58µg/mL de GANT61 por 72 horas, considerando a CI50% calculada, conforme descrito anteriormente. Após esse tempo, o meio condicionado por CAF tratado com GANT61 foi coletado e armazenado como descrito no tópico 4.3 e o CAF foi coletado para extração e análise da expressão dos genes relacionados à ativação da via Hh (PTCH1, GLI1 e GLI2), seguindo os protocolos descritos em 4.6.1 e 4.6.2. As células CAL27 também foram tratadas na mesma concentração calculada para o CAF, uma vez que a CI50% para esta célula foi indeterminada (>50 µg/mL).

#### 4.9 AVALIAÇÃO DE GENES RELACIONADOS A VIA HH, MIGRAÇÃO E INVASÃO, EM CÉLULAS CAL27 ESTIMULADAS COM MEIO CONDICIONADO POR CAFs, ANTES E APÓS BLOQUEIO FARMACOLÓGICO COM GANT61

Os efeitos modulatórios do meio condicionado por CAFs em genes relacionados à Hh, migração e invasão em células tumorais, foi avaliado antes e após bloqueio farmacológico da via Hh em CAFs, utilizando o GANT61 (inibidor de GLI). A linhagem tumoral CAL27 foi selecionada para esse experimento, uma vez que a mesma apresentou níveis importantes de expressão (RNAm) de SHH, PTCH1, GLI1, e, em contrapartida, menores níveis de repressores, como SUFU, HHIP e GLI3, sugerindo a ativação constitutiva da via Hh nesse tipo celular.

As células tumorais foram distribuídas em placas de 6 poços numa densidade de  $0,7 \times 10^5$  células/mL e incubadas *overnight* para permitir a adesão das células. Após 24 horas, o meio foi retirado e as células lavadas com salina, para retirar todo o SFB. Em seguida, após 24 horas com meio DMEM sem soro, as células tumorais foram incubadas em três condições: I- meio condicionado por CAF (MC CAF), diluídos a 50% em DMEM sem soro; II - meio condicionado por CAF tratado com GANT61 (MC CAF/GANT61), diluídos

a 50% em DMEM sem soro, e III - meio condicionado por NOF (MC NOF), diluídos a 50% em DMEM sem soro, e mantidas nessa condição por 24h, 48h e 72h.

#### 4.9.1 Isolamento de RNA total, transcrição reversa e qPCR em tempo real

Após o tempo de incubação com o meio condicionado por CAF, NOF e CAF tratado com GANT61, as células tumorais foram submetidas ao protocolo de extração de RNA e a etapa de transcrição reversa de acordo com o protocolo descrito no item 4.7.1.

A expressão de genes relacionados à via Hh, migração e invasão 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), SPP1 (Osteopontina, Hs00959010\_m1), CTNNB1 (Beta-catenina, Hs00355049\_m1), CDH1 (E-caderina, Hs01023894\_m1), MMP9 (Hs00234579\_m1) e MMP 14 (Hs01037003\_g1), assim como para o gene referência B2M (Hs99999907\_m1). A análise da expressão dos genes supracitados foi avaliada através da fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), sendo que a calibração das reações foi realizada com um grupo DMEN+GANT61, a fim de eliminar, através da fórmula matemática, o efeito do GANT61 residual nos grupos experimentais.

#### 4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram organizados inicialmente em planilhas no programa *GraphPad Prism* versão 6.03 (*GraphPad Software, Inc., San Diego, USA*) e *SPSS* versão 17.0 (*SPSS, Inc, Chicago, IL, USA*). Para as análises estatísticas, a diferença entre os grupos foi avaliada pelo teste ANOVA (análise de variância) seguida do teste de Student-Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ) e Teste T de Student, com correção de Welch. A correlação de Spearman foi utilizada para avaliar a associação entre os marcadores imuno-histoquímicos. Os coeficientes de Spearman variam de -1 a +1, sendo que estes valores representam uma correlação perfeita negativa ou positiva, respectivamente (Tabela 4). A análise estatística deste estudo considerou como nível de significância o valor de “p” correspondente a alfa ( $\alpha$ ) menor ou igual a 5%.

Tabela 4. Interpretação para valores de Spearman.

Valor de Spearman r	Interpretação
0,00 – 0,19	Correlação bem fraca
0,20 – 0,39	Correlação fraca
0,40 – 0,69	Correlação moderada
0,70 – 0,89	Correlação forte
0,90 – 1,00	Correlação muito forte

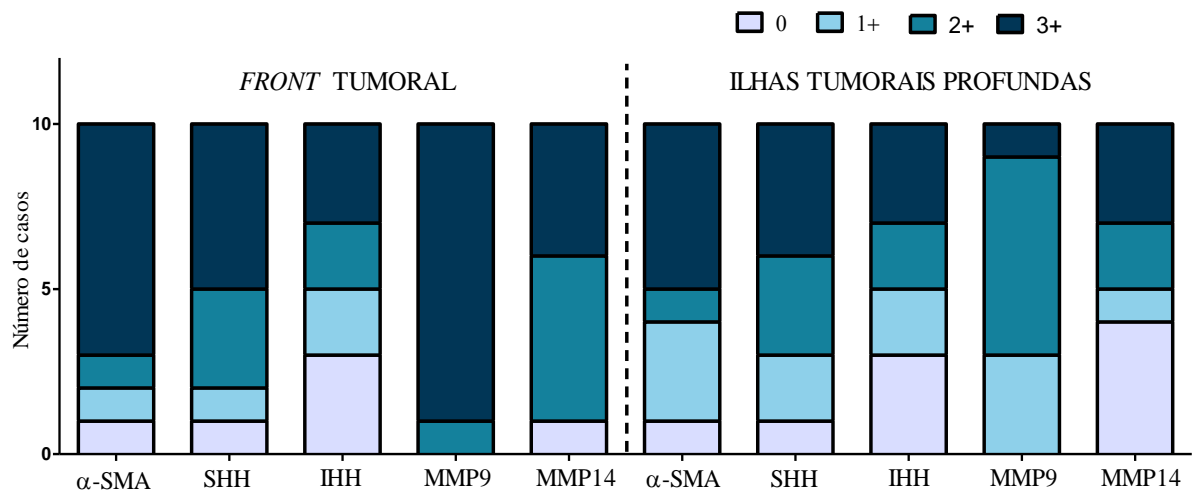
Fonte: Finney DJ. Statistics for biologists. London: Chapman and Hall; 1980.



## 5 RESULTADOS

### 5.1 ASSOCIAÇÃO ENTRE A POPULAÇÃO DE CAFs, VIA HH, MIGRAÇÃO E INVASÃO EM AMOSTRAS TECIDUAIS DE CEB

Nos casos de CEB humanos avaliados, a proteína  $\alpha$ -SMA foi identificada exclusivamente em membrana e citoplasma de células morfológicamente semelhantes a fibroblastos, localizadas adjacente as ilhas tumorais profundas e, principalmente, na região de *front* tumoral. As proteínas SHH e IHH foram identificadas tanto no citoplasma de células tumorais, quanto em células do estroma que exibiam morfologia de fibroblastos. Para fins de gradação por escore foi levada em consideração apenas a marcação no citoplasma deste último tipo celular. O padrão de distribuição das proteínas SHH e IHH foi semelhante em *front* e ilhas tumorais ( $p=1,0$ ), enquanto que as proteínas MMP9 e MMP14 foram identificadas em membrana e citoplasma de células das ilhas tumorais, na periferia destas ilhas e, principalmente, na região de *front* tumoral, sendo essa diferença estatisticamente significativa para MMP9 ( $p<0.001$ ). A Figura 4 apresenta a distribuição dos escores imuno-histoquímicos por anticorpo analisado.

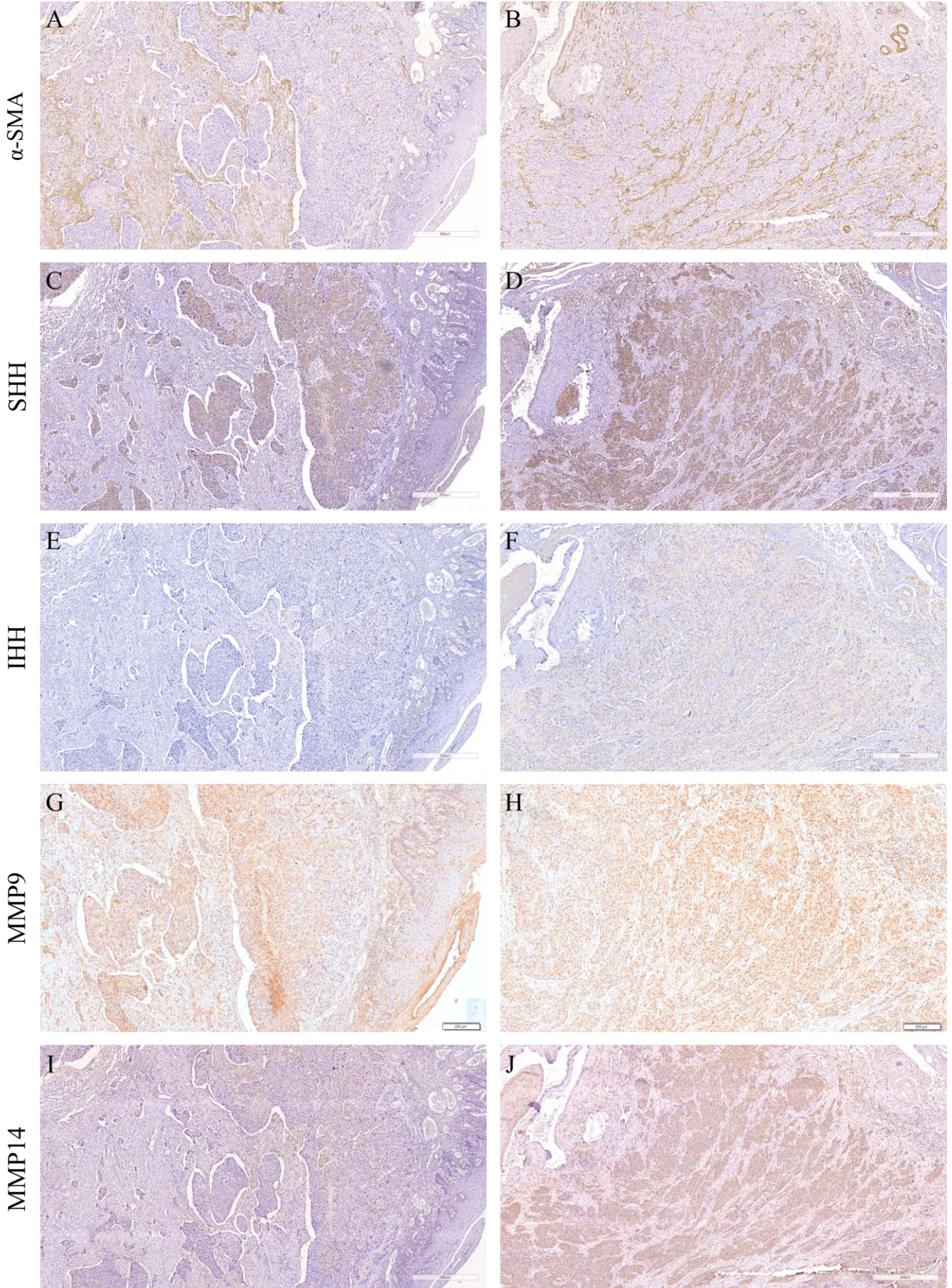


**Figura 4.** Distribuição dos casos de CEB por escore e anticorpos analisados.

No *front* tumoral, foi observada uma associação positiva forte entre as proteínas  $\alpha$ -SMA e SHH (Spearman  $r=0,816$ ;  $p=0,333$ ), assim como entre  $\alpha$ -SMA e MMP9 (Spearman  $r=0,816$ ;  $p=0,333$ ). Por outro lado, observou-se uma associação positiva moderada entre as proteínas  $\alpha$ -SMA e IHH (Spearman  $r=0,577$ ;  $p=0,416$ ), e uma associação positiva fraca entre  $\alpha$ -SMA e MMP14 (Spearman  $r=0,258$ ;  $p=0,750$ ).

Na região de ilhas tumorais mais profundas, foi observada uma associação positiva forte entre as proteínas  $\alpha$ -SMA e SHH (Spearman  $r=0,632$ ;  $p=0,416$ ), e uma associação positiva fraca entre as proteínas  $\alpha$ -SMA e o IHH (Spearman  $r=0,235$ ;  $p=0,916$ ). Por outro lado, foi observada uma fraca associação negativa entre  $\alpha$ -SMA e as proteínas MMP9 (Spearman  $r= -0,105$ ;  $p=0,916$ ) e MMP14 (Spearman  $r= -0,210$ ;  $p=0,916$ ).

Na Figura 5, observamos a imunomarcacão para os anticorpos estudados, no *front* tumoral e nas ilhas tumorais profundas.

*Front Tumoral**Ilha Tumerais Profundas*

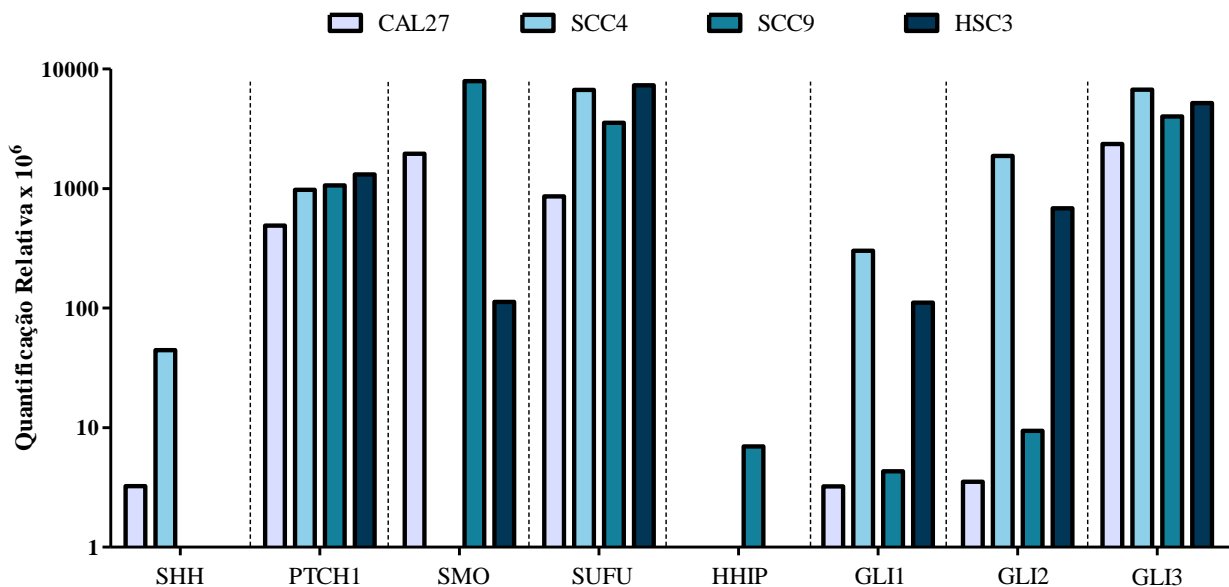
**Figura 5.** Imunomarcaco de  $\alpha$ -SMA, dos ligantes da via Hh (SHH e IHH) e das proteínas envolvidas no processo de migrao e invasão (MMP9 e MMP14) em tecidos de CEB humano.

## 5.2 EXPRESSÃO DOS COMPONENTES DA VIA Hh EM CÉLULAS DE CEB E FIBROBLASTOS

### 5.2.1 Expressão gênica

Inicialmente, foi realizada a caracterização da via Hh nas linhagens de CEB (SCC4, SCC9, HSC3 e CAL27), na cultura primária de fibroblastos normais de boca (NOF) e na população de fibroblastos associados ao câncer (CAF) através da análise de expressão gênica dos componentes da via Hh (SHH, PTCH1, SMO, SUFU, HHIP, GLI1, GLI2 e GLI3).

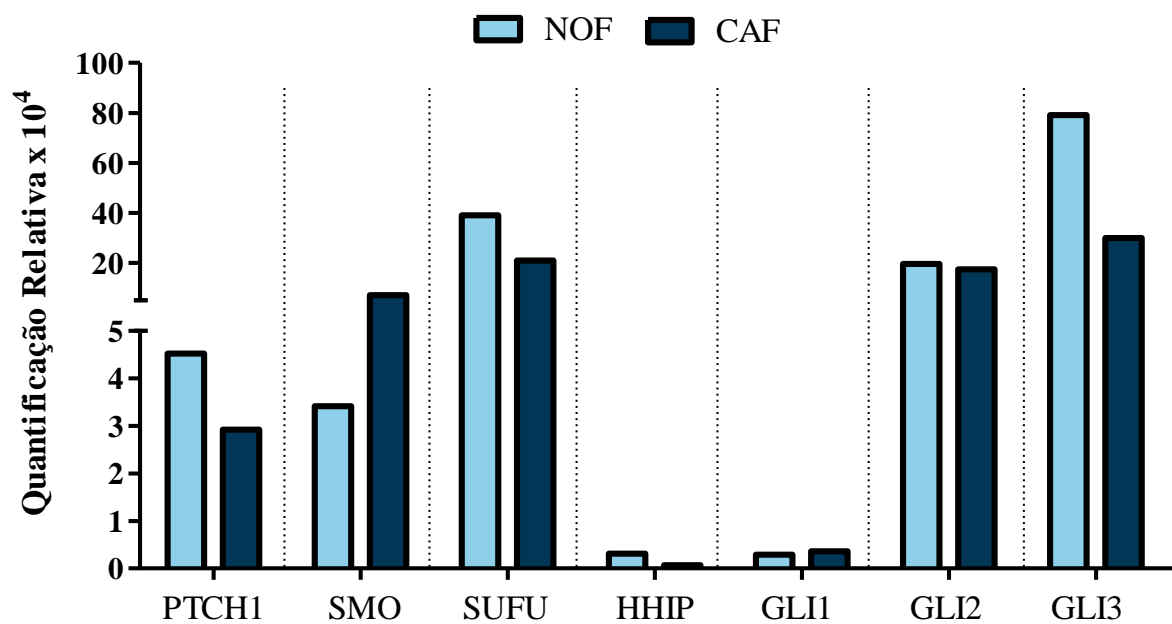
Nas linhagens de CEB, o gene SHH apresentou níveis detectáveis de RNAm nas linhagens CAL27 e SCC4. Por outro lado, o gene PTCH1, que codifica o principal receptor da via Hh e que também é um gene alvo, foi expresso em todas as linhagens estudadas. Transcritos de SMO, cuja proteína atua como um transdutor de sinal da via, foi detectado em CAL27, SCC9 e HSC3. RNAm dos fatores de transcrição da via, GLI1 e GLI2, bem como a forma repressora, GLI3 foram identificados em todas as linhagens de CEB, sendo que este último estava mais expresso nas células SCC4 e HSC3 (Figura 6).



**Figura 6.** Expressão gênica de componentes da via Hh em linhagens de CEB.

É importante destacar que a linhagem CAL27 foi selecionada para as demais etapas deste trabalho, uma vez que a atividade Hh estava mantida, com menor atividade de repressão da cascata Hh (GLI3, HHIP e SUFU) (Figura 6), além de ser uma célula de fácil manejo.

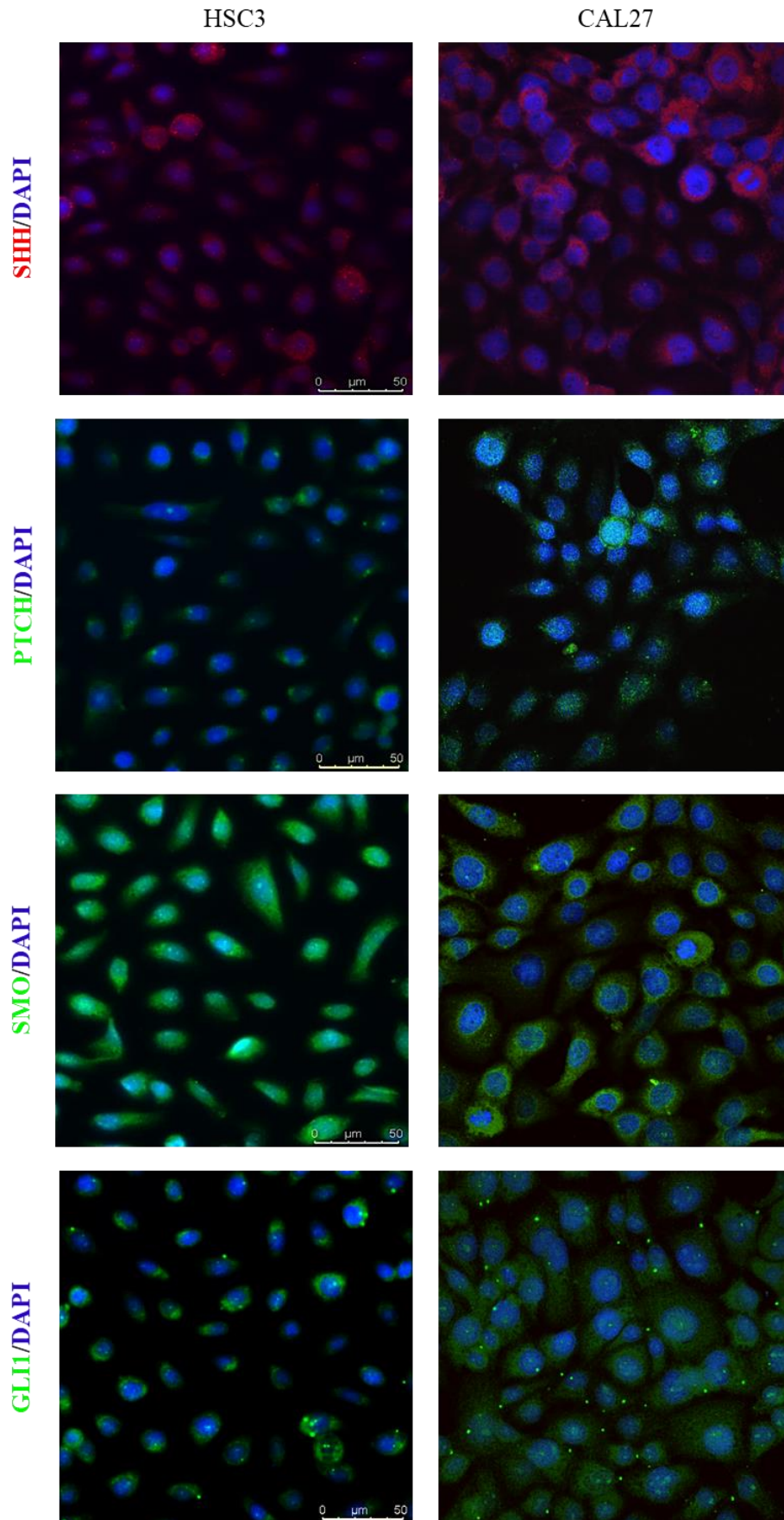
Comparados aos fibroblastos normais (NOF), o CAF apresentou maiores níveis de expressão gênica do fator de transcrição GLI1 e do transdutor de sinal SMO. Para o GLI2, observou-se níveis de transcrito discretamente maiores em NOF. O gene PTCH1, receptor da via Hh, foi mais expresso em NOF, assim como os reguladores negativos SUFU, HHIP e GLI3. Adicionalmente, o gene SHH não foi identificado nas células NOF e CAF (Figura 7).



**Figura 7.** Expressão gênica de componentes da via Hh em NOF e CAF.

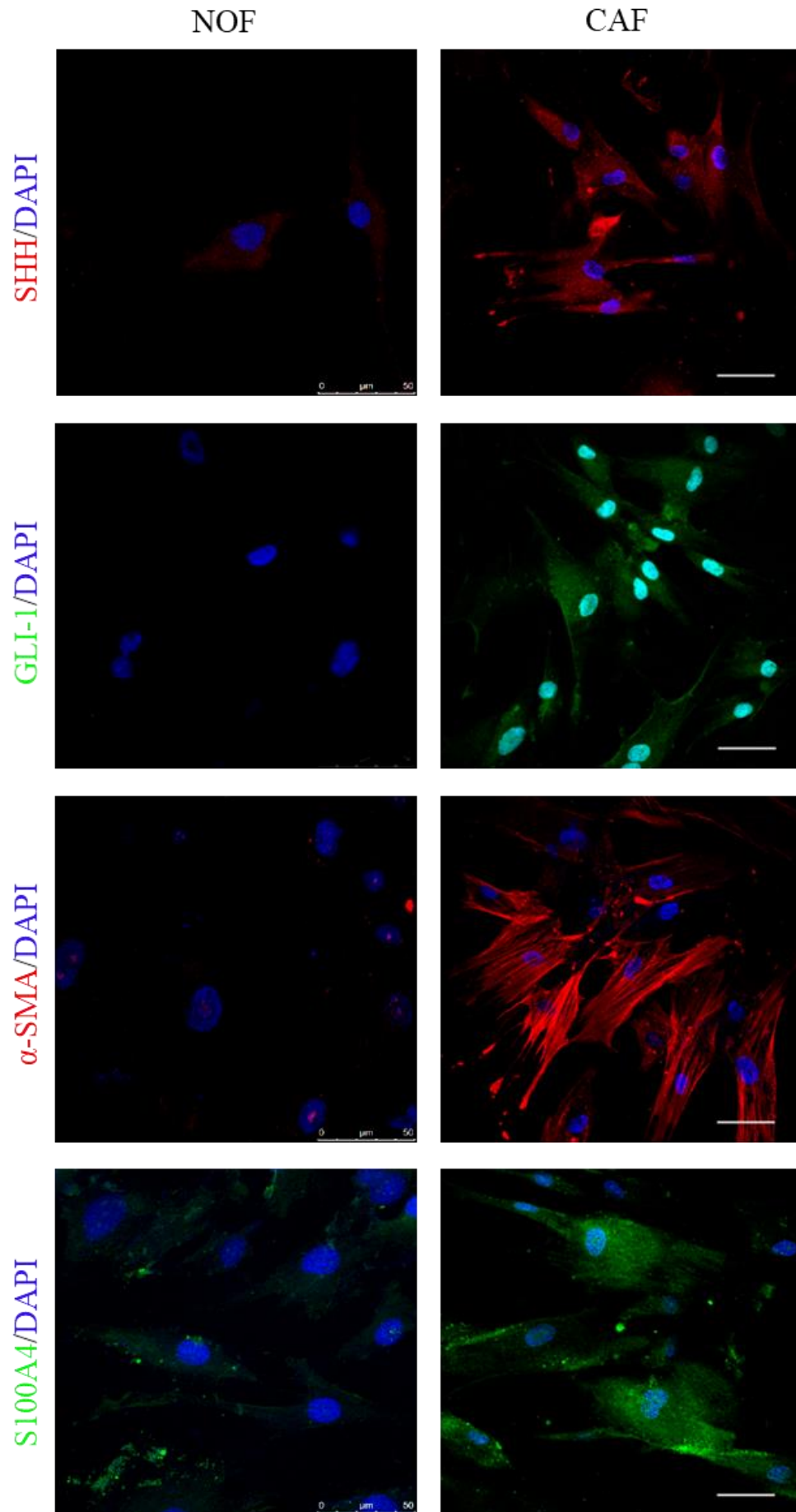
### 5.2.2 Expressão de proteínas por imunofluorescência

A fim de caracterizar a expressão de proteínas Hh nas células tumorais CAL27 e HSC3, cujos perfis de expressão gênica relacionados a atividade Hh foram mais significantes, foi realizada a imunofluorescência nessas linhagens. Para o ligante SHH, o receptor PTCH1 e o transdutor de sinal SMO, foi observada marcação citoplasmática em ambas as linhagens. Por fim, o fator de transcrição GLI1 foi identificado no núcleo e citoplasma das células tumorais (Figura 8 e Apêndice A e B).



**Figura 8.** Expressão de proteínas da via Hh em células tumorais, por imunofluorescência.

O ligante SHH e o fator de transcrição GLI1 foram avaliados nas diferentes populações de fibroblastos. Em NOF, o ligante SHH apresentou discreta marcação citoplasmática, enquanto que em CAF a marcação foi intensa no citoplasma. A proteína GLI1 não foi detectada no NOF. Já em CAF, observou-se marcação citoplasmática e nuclear para GLI1. Ademais, como esperado, o NOF apresentou discreta marcação citoplasmática para S100A4 e ausência de marcação para  $\alpha$ -SMA, enquanto o CAF apresentou expressiva marcação citoplasmática para ambos marcadores de CAFs, destacamos a presença de fibras de estresse nessas células (Figura 9).



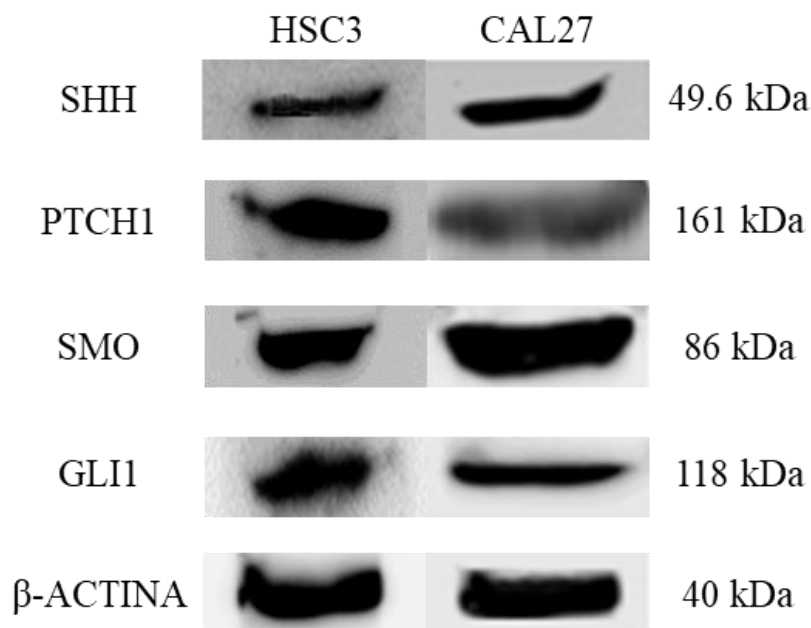
**Figura 9.** Expressão de proteínas da via Hh,  $\alpha$ -SMA e S100A4 em fibroblastos, por imunofluorescência.



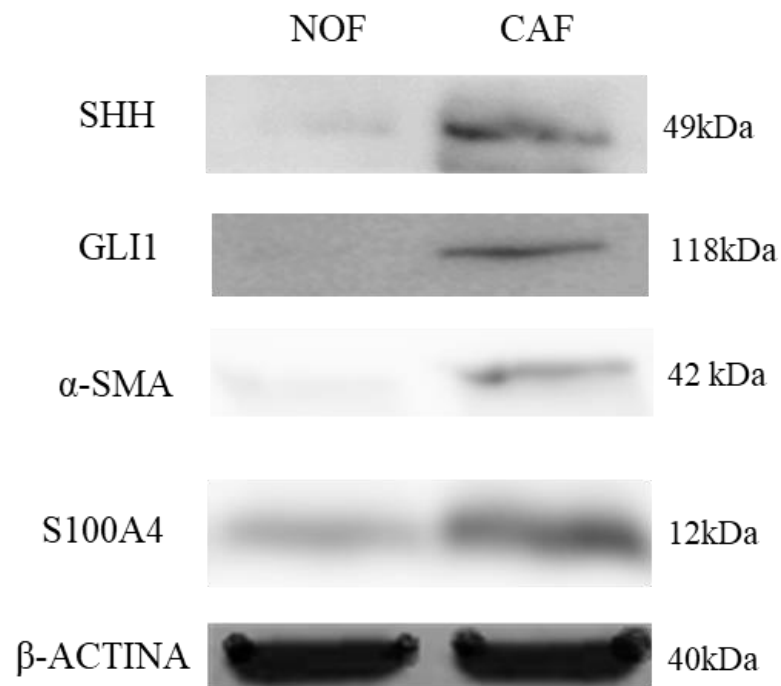
### 5.2.3 Expressão de proteínas por Western Blot

Além da imunofluorescência, também foi realizada a técnica de western blot para identificação das proteínas da via Hh nas células tumorais e nos fibroblastos. Para HSC3 e CAL27, foi observada intensa expressão das proteínas SHH, PTCH1, SMO e GLI1 (Figura 10).

Em NOF, observou-se uma baixa expressão do ligante SHH, enquanto que em CAF a expressão foi intensa. A proteína GLI1 não foi detectada no NOF, já em CAF, a proteína GLI1 esteve presente. Ademais, como esperado, o NOF apresentou discreta expressão de S100A4 e  $\alpha$ -SMA, já no CAF a expressão para esses marcadores foi mais expressiva (Figura 11).



**Figura 10.** Expressão de proteínas da via Hh em células tumorais, por western blot.

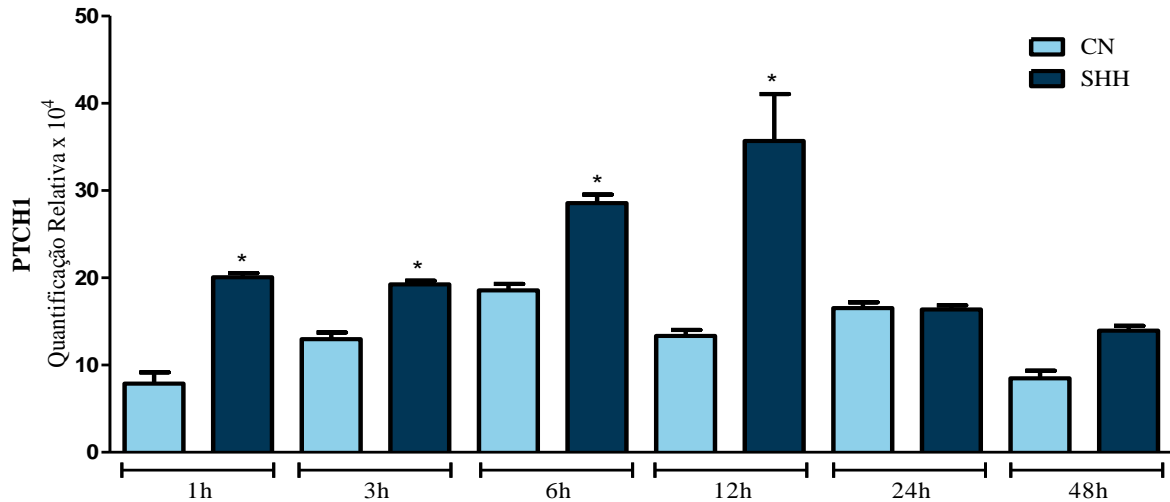


**Figura 11.** Expressão de proteínas da via Hh em fibroblastos, por western blot.

### 5.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA VIA HH APÓS ESTÍMULO COM SHH RECOMBINANTE

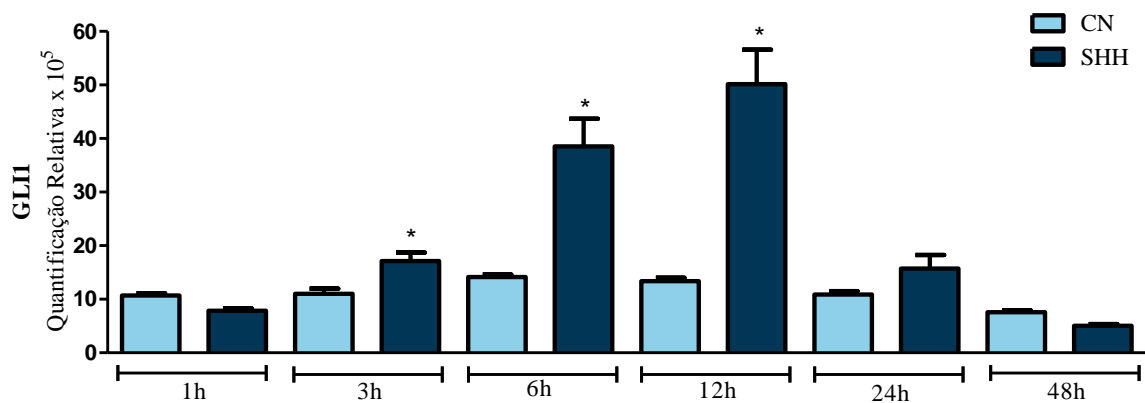
De acordo com estudo anterior realizado por nosso grupo, CAFs são prováveis fonte dos ligantes Hh (GUIMARÃES, 2018), podendo promover a ativação parácrina da via, em células tumorais. Para testar se SHH exógeno é capaz de acentuar a atividade Hh, estimulamos a linhagem HSC3 (que não apresenta expressão do gene SHH) com a proteína recombinante SHH. Inicialmente, para definir o melhor tempo de resposta e ativação da via Hh, estas células foram incubadas com a proteína recombinante SHH (500 ng/ml) por 1h, 3h, 6h, 12h, 24h e 48h.

Para o gene PTCH1, observou-se que, desde a primeira hora de estímulo, houve um aumento significativo de expressão ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o controle negativo, padrão que foi mantido até 12 horas de incubação com SHH recombinante (Figura 12).

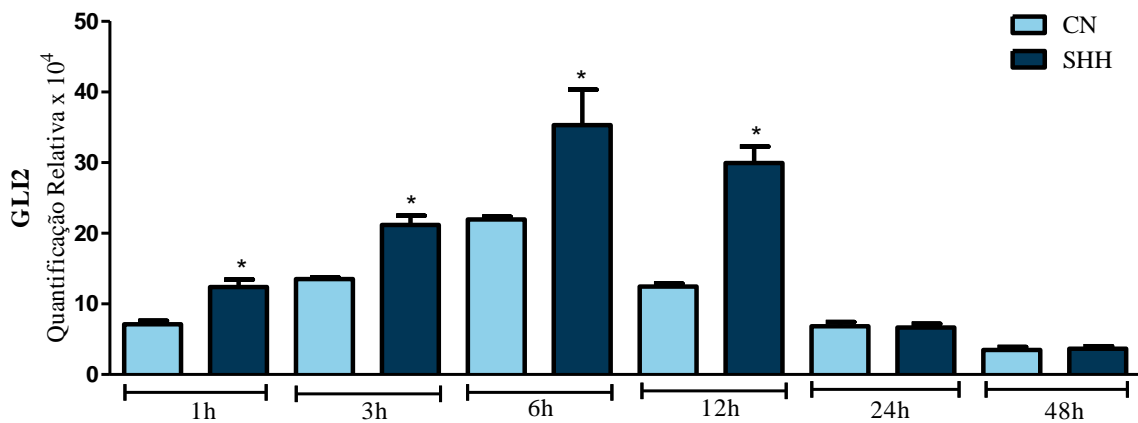


**Figura 12.** Expressão do gene PTCH1 em HSC3, antes e após estímulo com ligante SHH recombinante.

Para GLI1 e GLI2, observou-se um aumento significativo na expressão desses genes ( $p < 0,05$ ) quando as células HSC3 foram estimuladas com SHH recombinante por 3h, 6h e 12h (Figuras 13 e 14). Em adição, maiores níveis de transcritos GLI2 também foram observados com 1h de incubação com o ligante exógeno (Figura 14).

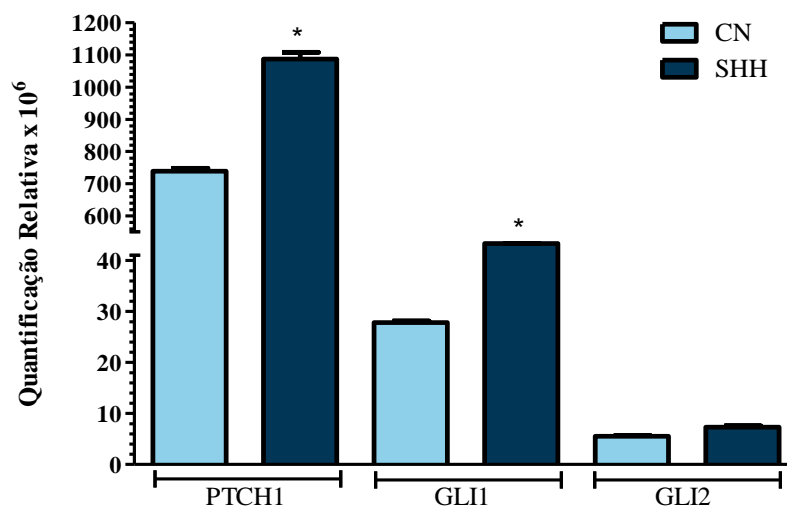


**Figura 13.** Expressão do gene GLI1 em HSC3, antes e após estímulo com ligante SHH recombinante.



**Figura 14.** Expressão do gene GLI2 em HSC3, antes e após estímulo com ligante SHH recombinante.

Posteriormente, a linhagem CAL27 (que expressou níveis detectáveis do gene SHH) foi selecionada para avaliar se a proteína exógena SHH também era capaz de atuar sinergicamente e/ou de forma antagônica na expressão de genes da via Hh. Para isso, as células CAL27 foram incubadas com o ligante SHH recombinante, por 12h. Observou-se um aumento significativo de expressão dos genes PTCH1 e GLI1 ( $p < 0,05$ ), enquanto que, para o gene GLI2, os níveis de expressão foram similares, antes e após estímulo com ligante (Figura 15).



**Figura 15.** Expressão dos genes PTCH1, GLI1 e GLI2 em CAL27, antes e após estímulo com ligante SHH recombinante, por 12 horas.

#### 5.4 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÉDIA DO GANT61 PARA INIBIÇÃO DA VIA HH NOS FIBROBLASTOS ASSOCIADOS AO CÂNCER E NAS CÉLULAS CAL27

Nos experimentos seguintes, para avaliar participação da via Hh na ativação de genes envolvidos na migração e invasão, mediada por CAFs, foi realizado o bloqueio da via Hh nos fibroblastos, utilizando o inibidor GANT61, que atua bloqueando a ativação dos fatores de transcrição GLI (LAUTH *et al.*, 2007; AGYEMAN *et al.*, 2014; RÉDA *et al.*, 2018). O GANT61 apresentou citotoxicidade com valores de  $CI_{50}$ :  $>50 \mu\text{g/mL}$  e  $1,58 \mu\text{g/mL}$ , para NOF e CAF, respectivamente (Tabela 5). Para célula tumoral CAL27, a  $CI_{50}$  foi  $>50$ . O inibidor apresentou uma atividade citotóxica mais potente para CAF, por apresentar valor de  $CI_{50}$  menor, quando comparado com o NOF e com a CAL27. Os valores de  $CI_{50}$  para o controle 5-FU se encontram na Tabela 5.

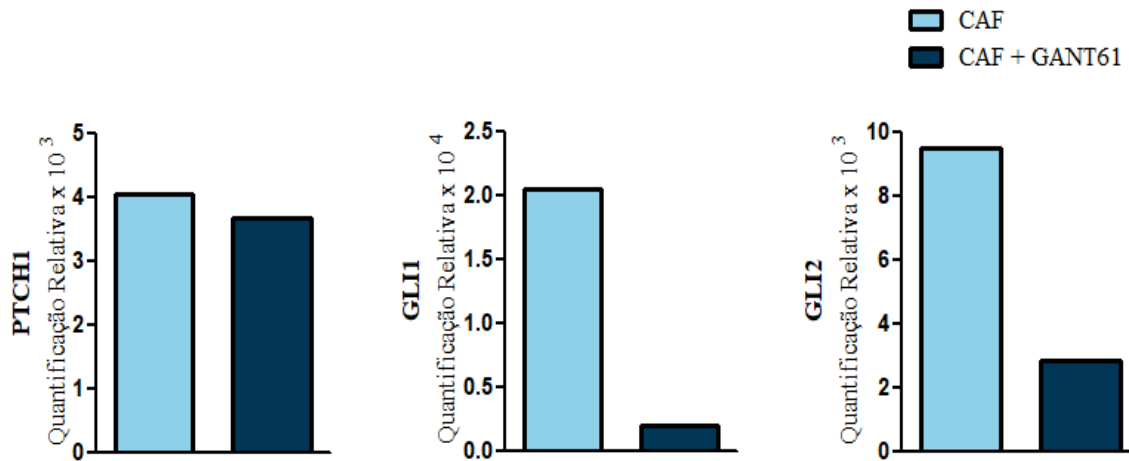
**Tabela 5.** Valores de  $CI_{50}$  em  $\mu\text{g/mL}$  para NOF, CAF e CAL27.

Células	$CI_{50}$ em $\mu\text{g/mL}$	
	5-FU	GANT61
NOF	5,15	$>50$
	1,6 – 16,06	
CAF	$>25$	1,58
		0,21 – 11,88
CAL27	4,01	$>50$
	1,77 – 9,11	

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, após 72 horas de incubação.

#### 5.5 EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À ATIVAÇÃO DA VIA HH EM CAFs APÓS BLOQUEIO COM GANT61

Para confirmar a diminuição da atividade da via Hh em CAF após o tratamento com GANT61, foi avaliada a expressão gênica de PTCH1, GLI1 e GLI2, indicadores importantes de ativação da via. Para todos os genes estudados, observou-se diminuição na sua expressão, em especial dos fatores de transcrição GLI (Figura 16), ratificando o bloqueio farmacológico de GANT61 para via Hh, em CAF.



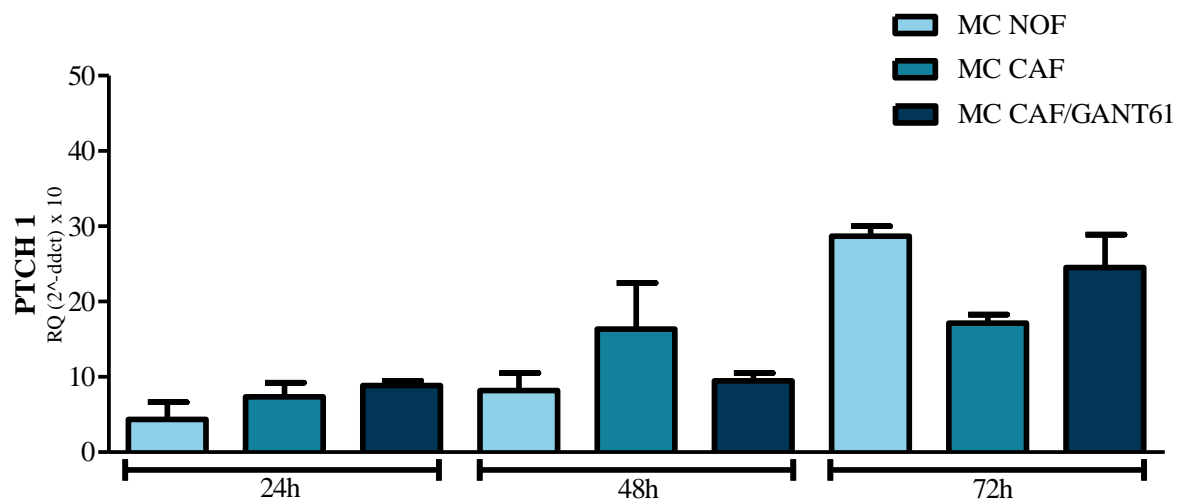
**Figura 16.** Expressão dos genes relacionados à ativação da via Hh, em CAF, após bloqueio com GANT61.

## 5.6 EFEITO DO MEIO CONDICIONADO POR CAFs NA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS A ATIVIDADE DA VIA HH E GENES REGULADOS PELA VIA HH, ENVOLVIDOS NA MIGRAÇÃO E INVASÃO

Os resultados anteriores, utilizando o recombinante SHH, indicaram que a atividade Hh é mais acentuada em 12 horas e, a partir deste tempo, há uma atenuação importante desta cascata, indicando que os mecanismos de *feedback* negativo são ativados e/ou o recombinante pode não ter mais ação efetiva (degradação e/ou meia vida curta) na manutenção da atividade Hh. Sendo assim, a fim de corroborar com a nossa hipótese de que CAFs participam da ativação da via Hh e promovem um ambiente pró-tumorigênico que favorece a migração e invasão de células malignas de CEB, avaliamos se o meio condicionado por estas células foi capaz de manter por 24 horas ou mais a atividade Hh, bem como o efeito deste em genes regulados pela via Hh, envolvidos na migração e invasão. Para comparação, foi utilizado meio condicionado por NOF e meio condicionado por CAF tratado com GANT61.

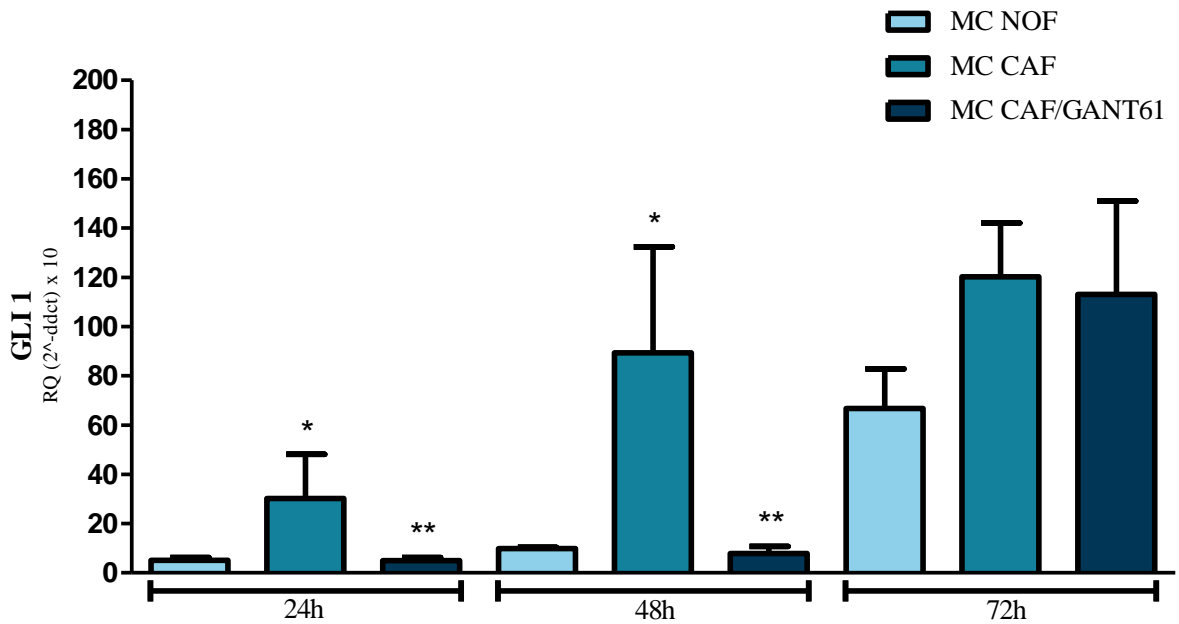
### 5.6.1 Efeito do Meio Condicionado por CAF e CAF tratado com GANT61 na expressão de genes Hh (PTCH1, GLI1 e GLI2)

O meio condicionado por CAF foi capaz de aumentar a expressão do gene PTCH1, em 24 e 48 horas de incubação, quando comparado com o MC NOF (Figura 17). Por outro lado, observamos um aumento da expressão de PTCH1 em 72 horas, mesmo sem o estímulo do meio condicionado pelos CAFs. O meio condicionado por CAF com a via Hh bloqueada por GANT61 foi capaz de reduzir os níveis de expressão de PTCH1 em 48h (Figura 17). Para o gene PTCH1 não foi observada diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ).



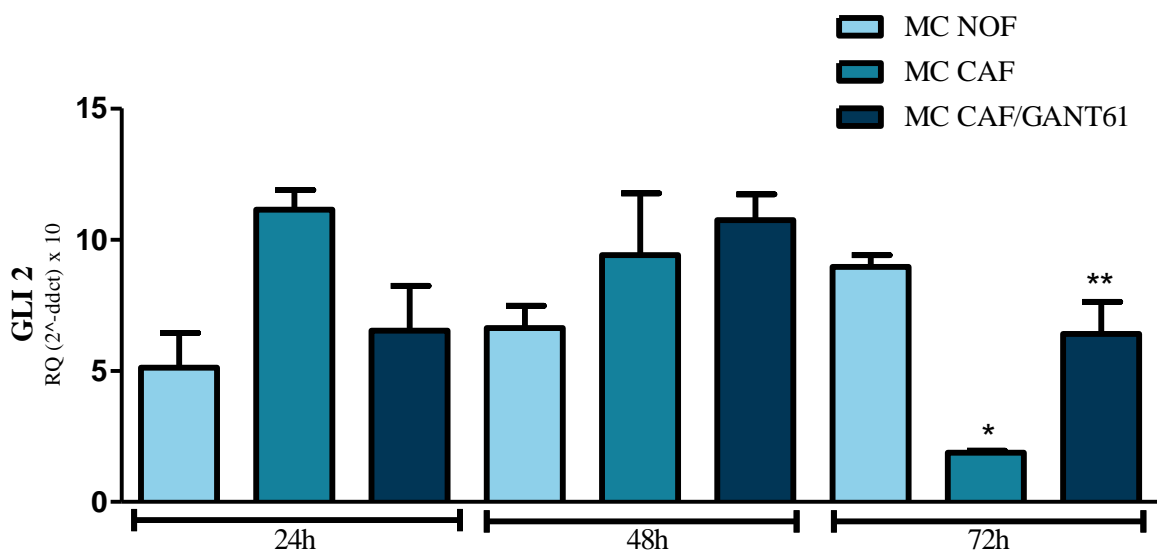
**Figura 17.** Expressão do gene PTCH1, em CAL27, após incubação com meio condicionado por CAFs.

Para GLI1, os níveis do transcrito foram maiores após 24 e 48 horas de incubação com MC CAF ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o MC NOF. No grupo MC CAF bloqueado por GANT61, observou-se uma redução significativa na expressão de GLI1 nas células tumorais nesses tempos ( $p < 0,05$ ). Entretanto, de forma similar ao PTCH1, observamos um aumento da expressão de GLI1 em 72 horas, sem o estímulo do meio condicionado pelos CAF (Figura 18).



**Figura 18.** Expressão do gene GLI1, em CAL27, após incubação com meio condicionado por CAF. \*Comparação entre MC NOF e MC CAF. \*\*Comparação entre MC CAF e MC CAF/GANT61.

Por fim, em relação ao fator de transcrição GLI2, observou-se um aumento nos níveis de transcrito quando incubado com MC CAF por 24h e uma redução nesses níveis quando incubado com MC CAF/GANT61 também por 24h ( $p > 0.05$ ). Para o tempo de 48h, não foi observada alteração na expressão desse gene após incubação com MC CAF/GANT61. Entretanto, no tempo de 72h, foram observados níveis elevados de GLI2 após incubação com MC NOF, quando comparado com MC CAF e MC CAF/GANT61 ( $p < 0.05$ ) (Figura 19).



**Figura 19.** Expressão do gene GLI2, em CAL27, após incubação com meio condicionado por CAFs. \*Comparação entre MC NOF e MC CAF. \*\*Comparação entre MC CAF e MC CAF/GANT61.

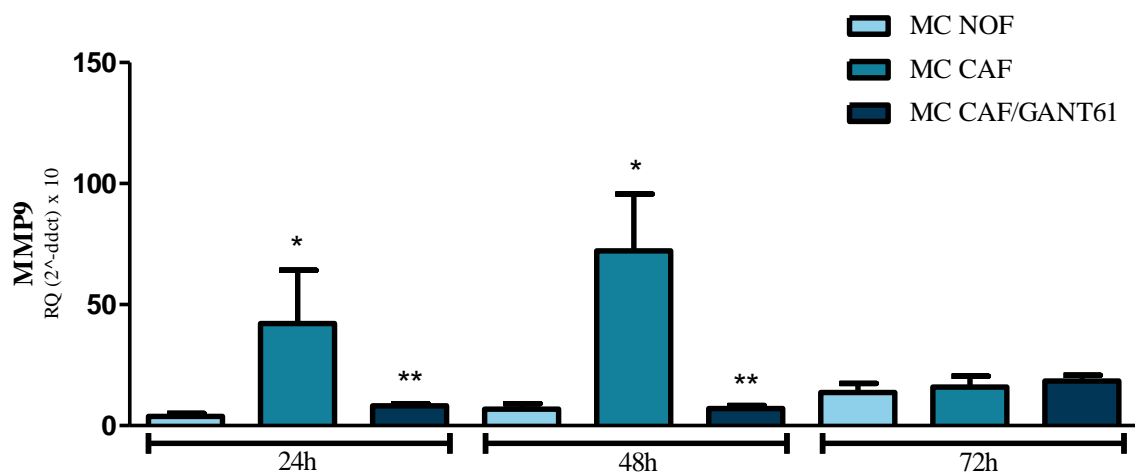


### 5.6.2 Genes regulados pela via Hh relacionados à invasão e migração celular após estímulo com meio condicionado por CAFs

Dentre os genes regulados pela via Hh que estão relacionados à invasão e migração celular, destacamos MMP9, MMP14,  $\beta$ -catenina, E-caderina e Osteopontina. As metaloproteinases são importantes no processo de remodelação da matriz celular, facilitando a invasão celular. A  $\beta$ -catenina e a E-caderina são marcadores de células epiteliais, e estão relacionadas com o processo de transição epitélio-mesênquima, além disso, a  $\beta$ -catenina pode atuar como um regulador transcricional. Por fim, a osteopontina atua na promoção tumoral, estimulando a invasão e a transição epitélio-mesênquima.

#### 5.6.2.1 MMP9

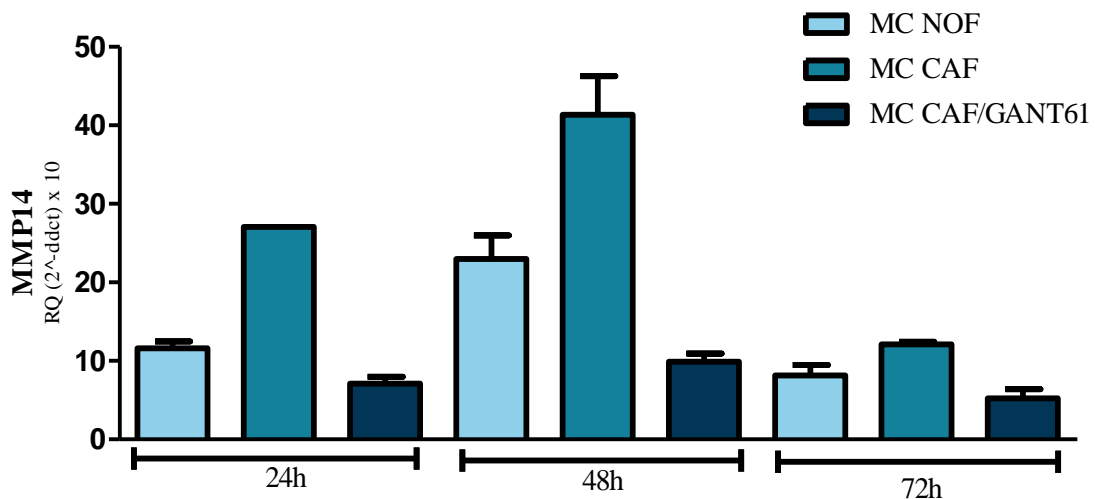
Nos tempos de 24 e 48 horas, o MC CAF foi capaz de aumentar significativamente a expressão de MMP9 ( $p < 0,05$ ) nas células de CEB. Após o bloqueio da via Hh em CAF, esse efeito foi revertido nesses tempos ( $p < 0,05$ ) (Figura 20).



**Figura 20.** Expressão do gene MMP9, em CAL27, após incubação com meio condicionado por CAFs. \*Comparação entre MC NOF e MC CAF. \*\*Comparação entre MC CAF e MC CAF/GANT61

#### 5.6.2.2 MMP14

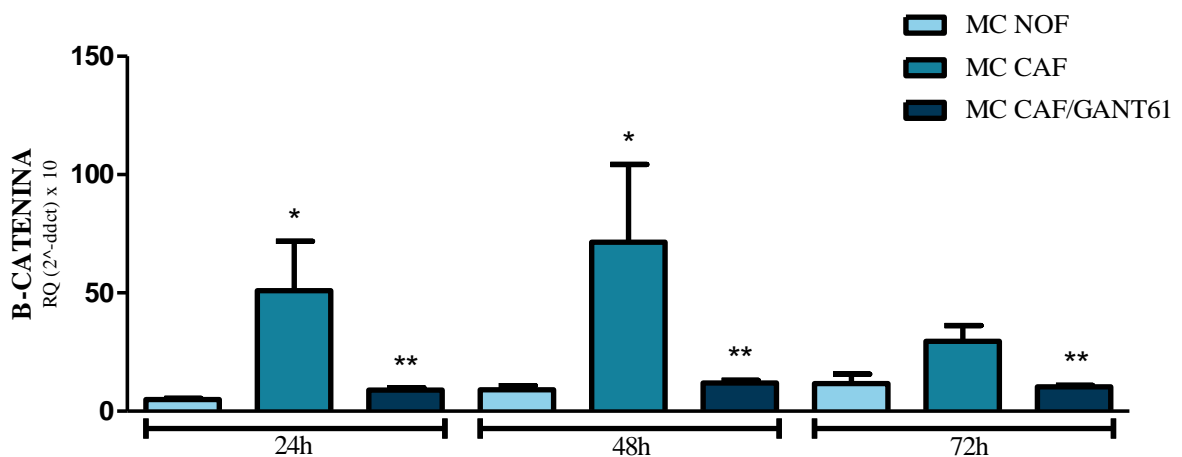
Para o gene MMP14, o MC CAF aumentou a expressão deste transcrito em CAL27 nos tempos de 24, 48 e 72 horas, sendo este efeito revertido no grupo MC CAF/GANT61, em todos os tempos estudados, entretanto, essas diferenças não foram estatisticamente significantes (Figura 21).



**Figura 21.** Expressão do gene MMP14, em CAL27, após incubação com meio condicionado por CAFs.

### 5.6.2.3 $\beta$ -catenina

Após a incubação por 24, 48 e 72 horas com MC CAF, foi observado um aumento na expressão do gene  $\beta$ -catenina, sendo esta diferença significativa nos dois primeiros tempos ( $p < 0,05$ ). Observou-se uma diminuição significativa na expressão desse gene em todos os tempos estudados quando incubados com MC CAF após bloqueio da via Hh ( $p < 0,05$ ) (Figura 22).

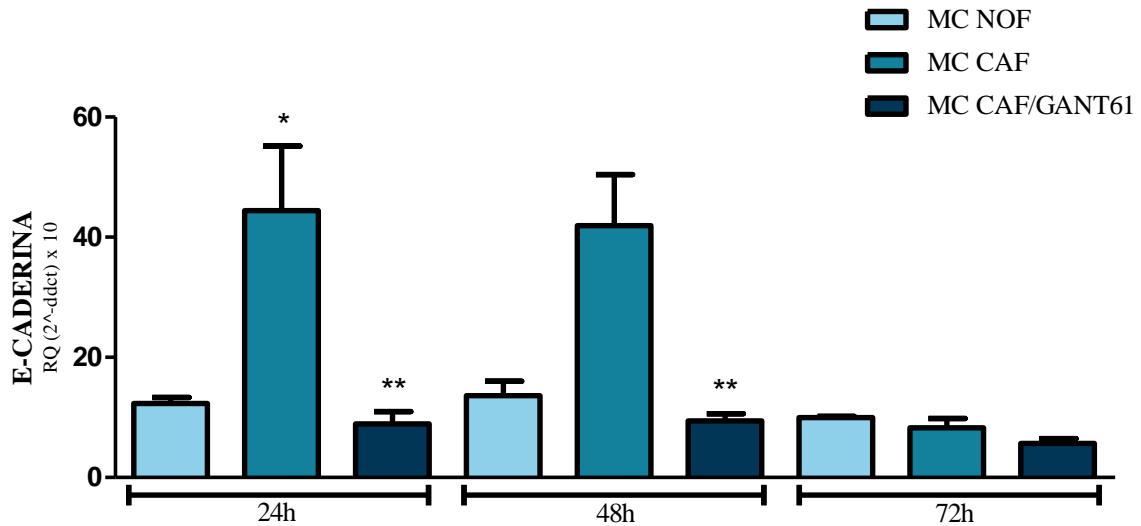


**Figura 22.** Expressão do gene  $\beta$ -catenina, em CAL27, após incubação com meio condicionado por CAFs.

\*Comparação entre MC NOF e MC CAF. \*\*Comparação entre MC CAF e MC CAF/GANT61.

#### 5.6.2.4 E-caderina

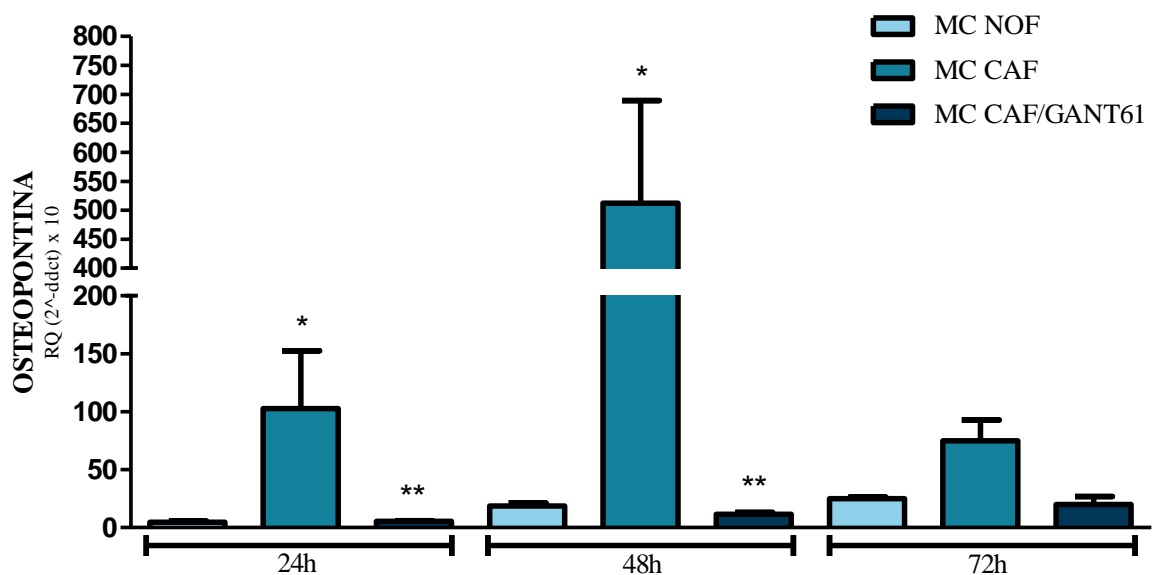
Para o gene E-caderina, observou-se aumento na expressão quando incubado com MC CAF por 24 horas ( $p < 0,05$ ) e 48 horas ( $p > 0,05$ ) e esse efeito foi revertido após incubação com MC CAF/GANT61 nesses tempos ( $p < 0,05$ ) (Figura 23).



**Figura 23.** Expressão do gene E-caderina, em CAL27, após incubação com meio condicionado por CAFs. \*Comparação entre MC NOF e MC CAF. \*\*Comparação entre MC CAF e MC CAF/GANT61.

#### 5.6.2.5 Osteopontina

Após os tempos de 24 e 48 horas de incubação com MC CAF, foi observado um aumento significativo nos transcritos de osteopontina ( $p < 0,05$ ). Após o bloqueio da via Hh em CAF, esse efeito foi completamente revertido nesses tempos ( $p < 0,05$ ) (Figura 24).

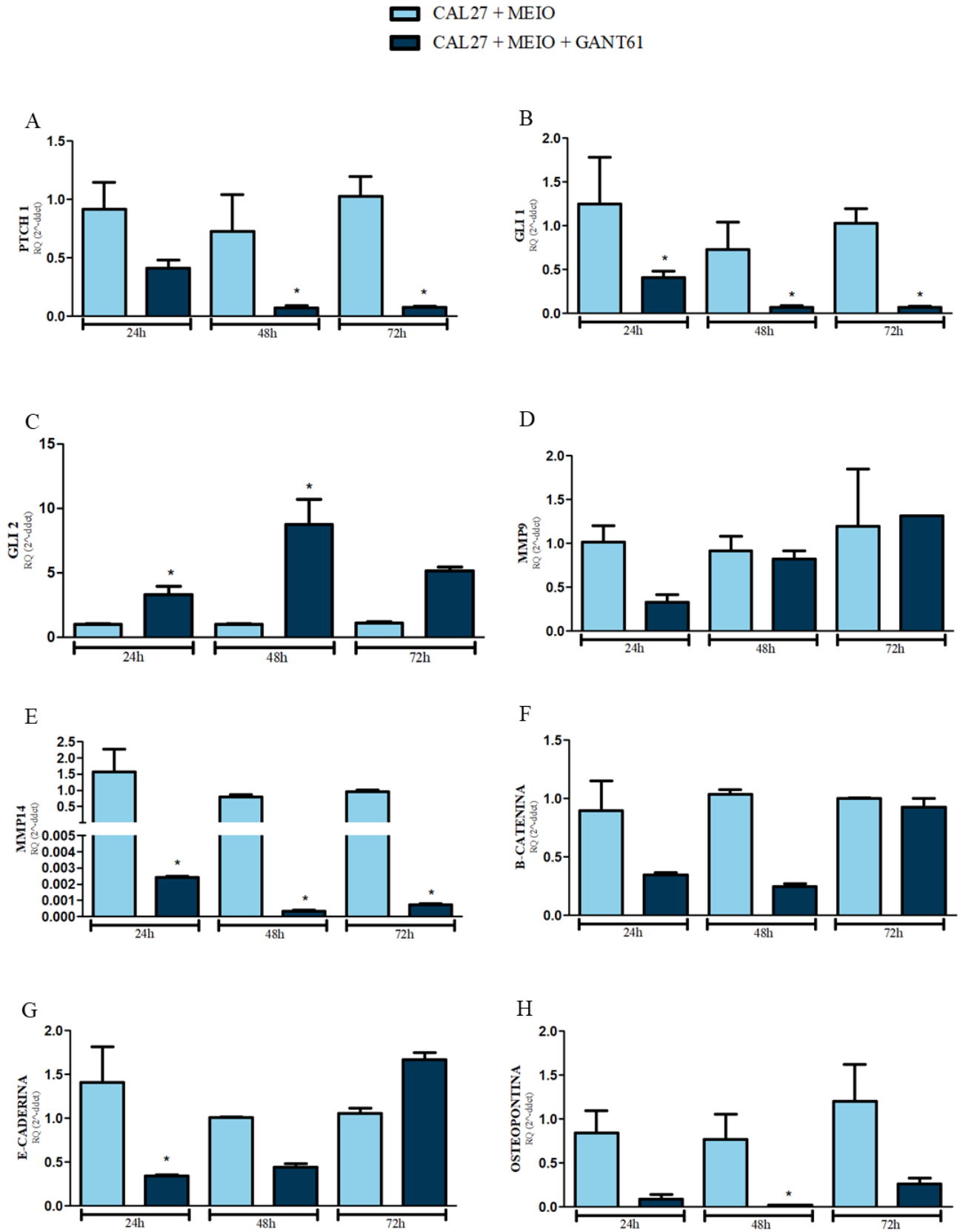


**Figura 24.** Expressão do gene Osteopontina, em CAL27, após incubação com meio condicionado por CAFs. \*Comparação entre MC NOF e MC CAF. \*\*Comparação entre MC CAF e MC CAF/GANT61.

## **5.7 EXPRESSÃO DOS GENES DA VIA HH E DOS GENES ALVOS RELACIONADOS A MIGRAÇÃO E INVASÃO EM CÉLULAS CAL27**

Como não foi possível calcular a CI50% do GANT61 em células CAL27 (CI50% indeterminado), avaliamos o bloqueio farmacológico destas células com GANT61, na mesma concentração utilizada para o CAF. Após incubação da CAL27 com MEIO+GANT61, observamos uma diminuição nos genes PTCH e GLI1 em todos os tempos estudados (Figura 25 - A e B). Ao analisarmos os genes envolvidos nos processos de migração e invasão, regulados por Hh, em CAL27, observamos uma diminuição nos transcritos após a incubação com MEIO+GANT61, principalmente nos tempos de 24 e 48 horas (Figura 25 - D, E, F, G e H).

\*Observação: ensaios funcionais relacionados a invasão e migração estão em andamento e os resultados parciais estão descrito no apêndice, no final deste documento (Apêndice C).



**Figura 25.** Expressão dos genes da via HH e dos genes alvos envolvidos na migração e na invasão, em CAL27, após incubação com meio e meio + GANT61.

## 6 DISCUSSÃO

Desde 2009, nossa equipe tem se empenhado em avaliar a participação da via Hh em CEB. Inicialmente, descrevemos a ativação desta cascata sinalizadora em amostras tumorais humanas (CAVICCHIOLI BUIM *et al.*, 2011), bem como em lesões pré-malignas (DIAS *et al.*, 2016), além de identificarmos que macrófagos CD163+ são potenciais fonte do ligante IHH (VALVERDE *et al.*, 2016). Corroborando com a participação de células estromais na sinalização Hh no contexto dos tumores malignos (ABE; TANAKA, 2016; MPEKRIS *et al.*, 2017), bem como os resultados recentes de nossa equipe (GUIMARÃES, 2018) que apontam que fibroblastos associados ao CEB (S100A4+,  $\alpha$ -SMA+) são positivos para SHH e GLI1, e, dessa forma, são importantes para a ativação estromal e sinalização parácrina reversa para as células tumorais, este trabalho avaliou se os CAFs favorecem a expressão de genes envolvidos nos processos de migração e invasão de células tumorais, mediada pela via Hh.

No presente trabalho, foi demonstrado, em amostras de tecidos humanos, uma forte correlação positiva entre fibroblastos  $\alpha$ -SMA+ e as proteínas SHH e MMP9, na região de *front* tumoral. Tais resultados apontaram para uma possível participação da via Hh na invasão do CEB mediada por CAFs. Um estudo realizado em CEBs humanos, também demonstrou a correlação entre fibroblastos  $\alpha$ -SMA+ e MMP9 (LIN *et al.*, 2017), entretanto, não é do nosso conhecimento, estudos que relacionem a via Hh com CAFs e MMP9. É importante ressaltar que a nossa amostra de CEBs humanos foi de 10 casos, com o intuito de caracterizar a presença de CAFs e sua relação com a via Hh e proteínas relacionadas a invasão, e por isso, apesar de ser observadas correlações fortes, não foram consideradas estatisticamente significantes.

Diante de resultados prévios com amostras de CEB humanos (CAVICCHIOLI BUIM *et al.*, 2011; DIAS *et al.*, 2016; VALVERDE *et al.*, 2016; GUIMARÃES, 2018), realizamos a caracterização da via Hh, através de expressão gênica, imunofluorescência e western blot, em linhagens de CEB (SCC4, SCC9, HSC3 e CAL27) e culturas primárias de fibroblastos (NOF e CAF). Nas linhagens de CEB, o gene SHH apresentou níveis detectáveis de RNAm em CAL27 e SCC4. Por outro lado, o gene PTCH1 foi expresso em todas as linhagens estudadas. Transcritos de SMO foram detectados em CAL27, SCC9 e HSC3. RNAm de GLI1, GLI2, bem como a forma repressora, GLI3 foram identificados em todas as linhagens de CEB, sendo que este último estava mais expresso nas células SCC4 e HSC3. Em nível de proteína, CAL27 e HSC3 apresentaram expressão de todas as proteínas

estudadas (SHH, PTCH1, SMO e GLI1). A atividade Hh já havia sido demonstrada em células de CEB, no trabalho de Yan *et al.* (2011). Entretanto, as análises destes autores foi "*end-point*", enquanto que, neste trabalho, foi possível mensurar a expressão relativa dos genes Hh e estabelecer um perfil de expressão gênica que direcionasse de forma mais robusta, para os ensaios funcionais subsequentes.

Em relação a caracterização da via Hh em fibroblastos, quando comparados aos fibroblastos normais (NOF), o CAF apresentou maiores níveis de RNAm do fator de transcrição GLI1 e do transdutor de sinal SMO. O gene PTCH1, receptor da via Hh, foi mais expresso em NOF, assim como os reguladores negativos SUFU, HHIP e GLI3. Adicionalmente, o gene SHH não foi identificado nos fibroblastos. Ao analisar a expressão de proteínas, observou-se uma baixa expressão do ligante SHH em NOF, enquanto que em CAF a expressão foi intensa. A proteína GLI1 não foi detectada no NOF, enquanto que em CAF, a proteína GLI1 esteve presente. Os resultados encontrados sugerem que a via Hh pode participar na manutenção do fenótipo CAF, corroborando com outros estudos (HORN *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2014) e, conseqüentemente, participar de eventos pró-tumorais modulados por estas células, tais como a migração e invasão. Em relação a detecção da proteína SHH, mesmo com a ausência de transcrito, os mecanismos de regulação da expressão deste gene e acúmulo/degradação desta proteína, ainda precisam ser melhor estudados.

As linhagens de CEB, HSC3 e CAL27, apresentaram um aumento na expressão gênica de PTCH1, GLI1 e GLI2, quando estimuladas com o ligante SHH recombinante, nos tempos de 1, 3, 6 e, principalmente, 12 horas. De forma semelhante, um estudo realizado por Du *et al.* 2016, demonstrou que o SHH recombinante foi capaz de ativar a via Hh em uma linhagem de câncer de cólon (HCT116), através do aumento da expressão das proteínas PTCH1, SMO e GLI1. Outro estudo, realizado em células de câncer de endométrio (HHUA), também detectou o aumento de RNAm de GLI1 e PTCH1 após o tratamento com o SHH recombinante (FENG *et al.*, 2007). Esses achados indicam que o SHH exógeno é capaz de ativar a via Hh em células tumorais, corroborando para a participação de outras células do microambiente tumoral na sinalização Hh.

A importância das células estromais para a iniciação e progressão do tumoral tem recebido maior atenção na última década (POLYAK; HAVIV; CAMPBELL, 2009). Os CAFs, por exemplo, se destacam por serem as células mais abundantes no estroma tumoral, sendo os principais mediadores da interação estroma-células malignas (HUANG *et al.*, 2014; SHIGA *et al.*, 2015; ERDOGAN; WEBB, 2017; HUANG; GUAN; FU, 2019),

através da produção de fatores de crescimento e modulando a interação com a MEC (RAFFAGHELLO; DAZZI, 2015). No presente estudo, avaliamos o efeito do meio condicionado por CAFs na ativação da via Hh em células de CEB, e foi observada uma maior expressão gênica de PTCH1, GLI1 e GLI2, após incubação por 24 e 48 horas com meio condicionado por CAFs. Um estudo realizado por Liu *et al.* (2016), utilizando meio condicionado por CAFs e células de carcinoma hepatocelular, obtiveram resultados semelhantes, no qual foi observado um aumento na expressão de RNAm de SHH e GLI1 nas células tumorais. Dessa forma, nossos resultados demonstram que há uma possível participação dos CAFs na ativação parácrina reversa da via Hh, em células de CEB.

A fim de corroborar com as evidências de que CAFs podem mediar uma sinalização parácrina e ativação da cascata Hh em tumores (AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013; GASCARD; TLSTY, 2016), avaliamos se, após o bloqueio farmacológico do CAF, com GANT61, haveria alguma alteração nos genes Hh, em CAL27. Apesar deste composto ter apresentado atividade citotóxica promissora apenas para CAF (CI50% < 4 µg/mL), também avaliamos o efeito deste composto, nos mesmos genes, em células CAL27, utilizando a mesma concentração calculada para o CAF.

O GANT61 é um inibidor farmacológico da via Hh, capaz de bloquear diretamente a capacidade de ligação dos fatores de transcrição GLI ao DNA e, conseqüentemente, inibir a transcrição de genes mediada por GLI (LAUTH *et al.*, 2007; AGYEMAN *et al.*, 2014; RÉDA *et al.*, 2018). Estudos realizados em linhagens celulares de câncer de ovário (CHEN *et al.*, 2014), tumores pediátricos (ARNHOLD; BOOS; LANVERS-KAMINSKY, 2016) e câncer gástrico (LIANG *et al.*, 2018), demonstraram que o GANT61 é capaz de inibir a via Hh nesses tipos tumorais, bem como diminuir a proliferação e invasão celular. Um estudo realizado em linhagens celulares de CEB, demonstrou que o GANT61 pode inibir a via de sinalização Hh, em CAL27 (YAN *et al.*, 2011), corroborando com os resultados obtidos neste trabalho.

Em CAF de CEB, não encontramos estudos na literatura que tenham avaliado a ação do GANT61 na via Hh. Observamos uma diminuição dos níveis de transcritos dos genes GLI1, GLI2 e PTCH1, em CAF, demonstrando que o GANT61 atenua a expressão de genes da via Hh, corroborando para o potencial terapêutico desta cascata, neste tipo celular. Ao tempo que a CI 50% > 50 µg/mL em NOF, demonstrou que este composto não é citotóxico para fibroblastos normais.

Nossos resultados com meio condicionado por CAF demonstraram que há uma possível participação dos CAFs na ativação parácrina reversa da via Hh, em células de



CEB. Considerando este aspecto, avaliamos o efeito do meio condicionado por CAFs tratados com GANT61 em células de CEB. Observamos uma diminuição significativa na expressão gênica de GLI1 em CAL27, nos tempos de 24 e 48 horas. Esses resultados corroboram com a ativação de Hh mediada por CAF, ao tempo que contribui positivamente para a hipótese de nosso trabalho de que CAFs produzem o ligante (SHH), ao mesmo tempo que possuem a via Hh ativada, o que promove um ambiente pró-tumorigênico que favorece a migração e invasão de células malignas de CEB.

Diante das complexidades de estudar vias de sinalização no contexto do câncer, nossos resultados, até aqui, apontam para questões relevantes: 1) células de CEB possuem a via Hh ativada; 2) células de CEB respondem ao ligante SHH exógeno; 3) CAFs são fonte de ligantes Hh, ao mesmo tempo que respondem a esta sinalização. De forma a compreender a relevância da via Hh para eventos pró-tumorigênicos, avaliamos o efeito destas células em genes regulados pela via Hh, envolvidos no processo de migração e invasão tumoral, como: MMP9, MMP14,  $\beta$ -catenina, E-caderina e Osteopontina em célula de CEB.

Nossos resultados exibiram um aumento significativo na expressão de MMP9 em CAL27, após o estímulo do meio condicionado por CAFs nos tempos de 24 e 48h. Para MMP14, observou-se aumento na expressão desse transcrito em todos os tempos estudados. Após o tratamento com MC CAF/GANT61, esse efeito foi revertido para ambos os genes, nos respectivos tempos de incubação. Em adição, uma redução na expressão destes genes também foi observada nas células CAL27 tratadas com o GANT61. As metaloproteinases de matriz desempenham papel fundamental na degradação e remodelação da MEC, favorecendo a migração e invasão das células tumorais, e estão sobreexpressas no carcinoma escamocelular de cabeça e pescoço, sendo MMP1, MMP2, MMP9 e MMP14 as mais associadas com a progressão da doença (ROSENTHAL; MATRISIAN, 2006; MARKWELL; WEED, 2015; DENG *et al.*, 2019; MIGUEL *et al.*, 2019). Muitos estudos em casos de CEB humano, têm relacionado a expressão de MMP9 com o processo de invasão, metástase e pior prognóstico nesse tipo tumoral (DE VICENTE *et al.*, 2005; BAKER *et al.*, 2006; PATEL *et al.*, 2007; MONTEIRO-AMADO *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2018). Um estudo realizado com linhagem de células de CEB (SCC4), demonstrou, através do co-cultivo entre células tumorais e CAFs, que o aumento do potencial invasivo das células de CEB devido a superexpressão de MMP9, pode ser regulado pelos CAFs (LIN *et al.*, 2017). Além disso, estudos realizados em carcinoma escamocelular de boca (FAN *et al.*, 2017), melanoma

(FAIÃO-FLORES *et al.*, 2017), glioblastoma (CHANG *et al.*, 2015) e câncer de vesícula biliar (MATSUSHITA *et al.*, 2014) demonstraram que a expressão de MMP9 nesses tumores é regulada pela via Hh. Sendo assim, os nossos resultados indicam uma possível regulação de MMP9 e MMP14 por CAFs em células de CEB, mediado pela via Hh.

Ao avaliar o gene E-caderina, observamos um aumento na expressão desse gene quando incubado com MC CAF por 24 horas e 48 horas, sendo esse efeito atenuado após incubação com MC CAF/GANT61. Da mesma forma, o composto também provocou esse efeito na expressão de e-caderina das células tumorais. Nesina, Iurchenko e Buchynska (2018), utilizando amostras humanas de carcinoma de endométrio, sugeriram que a progressão desse tumor ocorre no contexto de alterações moleculares, incluindo a diminuição na expressão das proteínas de adesão celular, como E-caderina. De forma similar, Shan *et al.* (2017) demonstrou que, em câncer de pâncreas, os CAFs são capazes de ativar a via Hh em células malignas, de forma parácrina reversa, o que estimula a ativação do fator de transcrição Snail (gene alvo da via) e favorece o processo de TEM, através da regulação negativa da expressão da E-caderina (SHAN *et al.*, 2017).

Um estudo, utilizando 40 amostras de CEB, detectou a diminuição na expressão do gene e-caderina nesses tumores, quando comparado com mucosa oral normal (LÓPEZ-VERDÍN *et al.*, 2019). Diante dos achados da literatura, deve-se levar em consideração que o nosso estudo foi realizado *in vitro* e que os CAFs promovem proliferação de células tumorais (ALKASALIAS *et al.*, 2018; ZIANI; CHOUAIB; THIERY, 2018) e, adicionalmente, as células CAL27 *in vitro*, proliferam em padrão de ilhas tumorais, cujas células interconectam-se entre si, formando junções celulares bem definidas e, nestas, há uma regulação positiva de e-caderina.

Para  $\beta$ -catenina, em todos os tempos estudados, foi observado um aumento na expressão desse gene após incubação com MC CAF e uma redução significativa após incubação com MC CAF tratado com GANT61. Nossos achados sugerem que os CAFs podem regular, a via WNT/ $\beta$ -catenina em células de CEB ou contribuir para a manutenção de um fenótipo pró-invasor. Sabe-se que a  $\beta$ -catenina é uma proteína multifuncional, que atua como uma proteína adaptadora para adesão celular e como um regulador transcricional (SHANG; HUA; HU, 2017). Devido ao seu papel na regulação transcricional, a expressão aberrante dessa molécula tem sido associada ao desenvolvimento de diversos tipos de câncer (SHANG; HUA; HU, 2017). Um aspecto interessante sobre este resultado diz respeito a interação desta proteína e e-caderina, nos complexos de adesão focal (NESINA; IURCHENKO; BUCHYNSKA, 2018) e, portanto, o

padrão de expressão destes genes tenderia a ser parecido. Mas, conforme já ressaltado anteriormente,  $\beta$ -catenina exerce funções como co-fator para ativação dos fatores TCF-LEF (NUSSE; CLEVERS, 2017) e regulação da via WNT, cuja atividade também pode ser regulada por CAF (HUANG; GUAN; FU, 2019).

Corroborando com os dados obtidos para MMP9 e MMP14, foi observado um aumento nos transcritos de osteopontina em células de CEB, após a incubação com meios condicionados por CAFs, em todos os tempos estudados, sendo este significativo nos tempos de 24 e 48 horas. Após incubação com MC CAF/GANT61 ou GANT61 em CAL27, observou-se a diminuição na expressão desse gene. Estes dados tem grande relevância no contexto do estudo da participação da via Hh na invasão e migração, uma vez que o gene osteopontina é alvo da via Hh (DAS *et al.*, 2009; DAS; SAMANT; SHEVDE, 2011). Tais resultados indicam não somente que os CAFs podem regular a expressão da osteopontina em CAL27, através da via Hh, mas que também o estímulo autócrino de ativação Hh em CAL27 é importante para a regulação deste gene. A osteopontina é uma proteína multifuncional da matriz óssea que regula a reabsorção óssea e vias de sinalização envolvidas na expressão de oncogenes (DAS; SAMANT; SHEVDE, 2011; QIN *et al.*, 2018). Em câncer de boca, alguns estudos demonstraram uma alta expressão de osteopontina, associando com piores prognósticos, recidiva e metástase (MATSUZAKI *et al.*, 2007; INGALE *et al.*, 2014; SUBRAMANI *et al.*, 2015). Uma pesquisa realizada por Qinet *al.* (2018), utilizando co-cultura de CAL27 e CAFs, demonstrou que os CAFs são capazes de regular a expressão de osteopontina em CAL27, favorecendo a migração e invasão das células tumorais.

Todos os resultados discutidos acima, em conjunto, corroboram para a participação dos CAFs na expressão de genes Hh em célula de CEB e que o bloqueio farmacológico desta cascata, com o GANT61, reduz a expressão de genes relacionados a cascata Hh, migração e invasão em células de carcinoma escamocelular de boca.

## 7 CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos, podemos concluir que os CAFs são fontes de ligantes Hh em CEB e regulam a ativação da via Hh nas células tumorais, através da sinalização parácrina reversa. Nossos resultados também indicam que a via Hh é importante para a manutenção do fenótipo de CAF, sendo que o meio condicionado por estas células aumenta a expressão de genes relacionados à migração e invasão celular, o que pode favorecer a progressão do CEB. E ainda, o bloqueio farmacológico dos CAFs e CAL27 com GANT61 diminui a expressão de genes alvo da via Hh envolvidos nos processos de migração e invasão. Adicionalmente, a via Hh pode ser considerada um potencial alvo farmacológico no CEB.

## REFERÊNCIAS

- ABE, Y.; TANAKA, N. The hedgehog signaling networks in lung cancer: the mechanisms and roles in tumor progression and implications for cancer therapy. **BioMed. Res. Int.**, v. 2016, p. 1-11, 2016.
- AGYEMAN, A. *et al.* Mode and specificity of binding of the small molecule GANT61 to GLI determines inhibition of GLI-DNA binding. **Oncotarget**, v. 5, n. 12, p. 4492-4503, 2014.
- AHMED, S.A.; GOGAL, R.M.J.; WALSH, J.E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. **J. Immunol. Methods**, v. 170, p. 211-224, 1994.
- AKYALA, A.I.; PEPPELENBOSCH, M.P. Gastric cancer and Hedgehog signaling pathway: emerging new paradigms. **Genes Cancer**, v. 9, n. 1-2, p. 1-10, 2018.
- ALKASALIAS, T. *et al.* Fibroblasts in the Tumor Microenvironment: Shield or Spear? **Int. J. Mol. Sci.**, v. 19, n. 5, p.ii:E1532, 2018.
- AMAKYE, D.; JAGANI, Z.; DORSCH, M. Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer. **Nat. Med.**, v. 19, n. 11, p. 1410–1422, 2013.
- ARNHOLD, V.; BOOS, J.; LANVERS-KAMINSKY, C. Targeting hedgehog signaling pathway in pediatric tumors: in vitro evaluation of SMO and GLI inhibitors. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v.77, n.3, p.495-505, 2016.
- BAE, J.Y. *et al.* Reciprocal interaction between carcinoma-associated fibroblasts and squamous carcinoma cells through interleukin-1 $\alpha$  induces cancer progression. **Neoplasia**, v.16, n.11, p.928-938, 2014.
- BAGORDAKIS, E. *et al.* Secretome profiling of oral squamous cell carcinoma-associated fibroblasts reveals organization and disassembly of extracellular matrix and collagen metabolic process signatures. **Tumour Biol.**, v.37, n.7, p.9045-9057, 2016.
- BAKER, E.A. *et al.* The matrix metalloproteinase system in oral squamous cell carcinoma. **Br J Oral Maxillofac. Surg.**, v.44, n.6, p.482-486, 2006.
- BANGS, F.; ANDERSON, K.V. Primary Cilia and Mammalian Hedgehog Signaling. **Cold Spring Harb Perspect. Biol.**, v.9, n.5, p.a028175, 2017.
- BÀNKFALVI, A.; PIFFKÒ, J. Prognostic and predictive factors in oral cancer: the role of the invasive tumour front. **J. Oral Pathol. Med.**, v.29, n.7, p.291-298, 2000.
- 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.
- BERMUDEZ, O. *et al.* Gli1 mediates lung cancer cell proliferation and Sonic Hedgehog-dependent mesenchymal cell activation. **PLoS One**, v.8, n.5, p.e63226, 2013.

- BINMADI, N.O.; BASILE, J.R. Perineural invasion in oral squamous cell carcinoma: a discussion of significance and review of the literature. **Oral Oncol.**, v.47, n. 11, p.1005-1010, 2011.
- BLANCHARD, P. *et al.* Outcomes and prognostic factors for squamous cell carcinoma of the oral tongue in young adults: a single-institution case-matched analysis. **Eur. Arch. Otorhinolaryngol.**, v.274, n.3, p.1683-1690, 2016.
- BLOTTA, S. *et al.* Canonical and noncanonical Hedgehog pathway in the pathogenesis of multiple myeloma. **Blood**, v.120, n.25, p.5002–5013, 2012.
- BRASIL. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva.** Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro, Brasil: INCA, 2017. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Acesso em: 10 de set. 2018.
- BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J. Clin.**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.
- CARBALLO, G.B. *et al.* A highlight on Sonic hedgehog pathway. **Cell Commun. Signal**, v.16, n.1, p.11, 2018.
- CAVICCHIOLI BUIM, M.E. *et al.* Activation of sonic hedgehog signaling in oral squamous cell carcinomas: a preliminary study. **Hum. Pathol.**, v.42, n.10, p.1484-1490, 2011.
- CERAMI, E. *et al.* The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. **Cancer Discov.**, v.2, n.5, p.401-404, 2012.
- CHANG, L. *et al.* Activation of sonic hedgehog signaling enhances cell migration and invasion by induction of matrix metalloproteinase-2 and -9 via the phosphoinositide-3 kinase/AKT signaling pathway in glioblastoma. **Mol. Med. Rep.**, v. 12, n. 5, p. 6702-6710, 2015.
- CHEN, F. *et al.* Nomograms and risk scores for predicting the risk of oral cancer in different sexes: a large-scale case-control study. **J. Cancer**, v.9, n.14, p.2543-2548, 2018.
- CHEN, Q. *et al.* Down-regulation of Gli transcription factor leads to the inhibition of migration and invasion of ovarian cancer cells via integrin  $\beta$ 4-mediated FAK signaling. **PLoS One**, v.9, n.2, p.e88386, 2014.
- CHENG, W. *et al.* Role of Hedgehog signaling pathway in proliferation and invasiveness of hepatocellular carcinoma cells. **Int. J. Oncol.**, v. 34, n. 3, p. 829–836, 2009.
- CHI, A.C.; DAY, T.A.; NEVILLE, B.W. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma-an update. **CA Cancer J. Clin.**, v.65, n.5, p. 401-421, 2015.
- CHIANG, C. *et al.* Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. **Nature**, v. 383, p. 407-413.

CHOE, C. *et al.* Crosstalk with cancer-associated fibroblasts induces resistance of non-small cell lung cancer cells to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibition. **Onco Targets Ther.**, v.8, p.3665-3678, 2015.

COHEN, M.M. The hedgehog signaling network. **Am. J. Med. Genet.**, v. 123A, n. 1, p. 5–28, 2003.

COHEN, R.B. Current challenges and clinical investigations of epidermal growth factor receptor (EGFR)- and ErbB family-targeted agents in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). **Cancer Treat. Ver.**, v.40, n.4, p.567-577, 2014.

DAS, S. *et al.* The hedgehog pathway transcription factor GLI1 promotes malignant behavior of cancer cells by up-regulating osteopontin. **J. Biol. Chem.**, v.284, n.34, p.22888-228897, 2009.

DAS, S.; SAMANT, R.S.; SHEVDE, L.A. Hedgehog signaling induced by breast cancer cells promotes osteoclastogenesis and osteolysis. **J. Biol. Chem.**, v. 286, n.11, p. 9612-9622, 2011.

DE VICENTE, J.C. *et al.* Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol.**, v.41, n.3, p.283-293, 2005.

DENG, W. *et al.* Overexpression of MMPs functions as a prognostic biomarker for oral cancer patients: a systematic review and meta-analysis. **Oral Health Prev. Dent.**, v. 17, n. 6, p. 505-514, 2019.

DIAS, R.B. *et al.* Enhanced Expression of Hedgehog Pathway Proteins in Oral Epithelial Dysplasia. **Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.**, v.24, n.8, p.595-602, 2016.

DING, S. *et al.* MRC-5 fibroblast-conditioned medium influences multiple pathways regulating invasion, migration, proliferation, and apoptosis in hepatocellular carcinoma. **J. Transl. Med.**, v.13, p.237, 2015.

DOURADO, M.R. *et al.* Prognostic value of the immunohistochemical detection of cancer-associated fibroblasts in oral cancer: A systematic review and meta-analysis. **J. Oral Pathol. Med.**, v.47, n.5, p.443-453, 2017.

DU, X. *et al.* The detection of ESR1/PGR/ERBB2 mRNA levels by RT-QPCR: a better approach for subtyping breast cancer and predicting prognosis. **Breast Cancer Res. Treat.**, v.138, n.1, p.59-67, 2013.

DU, Z. *et al.* The hedgehog/Gli-1 signaling pathways is involved in the inhibitory effect of resveratrol on human colorectal cancer HCT116 cells. **Iran J. Basic Med. Sci.**, v.19, n.11, p.1171-1176, 2016.

EL-NAGGAR, A.K. *et al.* **WHO Classification of Head and Neck Tumours.** 4. ed. Lyon, França: IARC, 2017.

ERDOGAN, B.; WEBB, D.J. Cancer-associated fibroblasts modulate growth factor signaling and extracellular matrix remodeling to regulate tumor metastasis. **Biochem. Soc. Trans.**, v.45, n.1, p.229-236, 2017.

ERNANI, V.; SABA, N.F. Oral cavity cancer: risk factors, pathology, and management. **Oncology**, v.89, n.4, p.187-195, 2015.

EUA. **A to Z List of Cancer Drugs: TPF**. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/TPF>. Acesso em: 10 de out. 2018.

FAIÃO-FLORES, F. *et al.* Targeting the hedgehog transcription factors GLI1 and GLI2 restores sensitivity to vemurafenib-resistant human melanoma cells. **Oncogene**, v.36, n.13, p.1849-1861, 2017.

FAN, H. *et al.* Doxorubicin combined with low intensity ultrasound suppresses the growth of oral squamous cell carcinoma in culture and in xenografts. **J. Exp. Clin. Cancer Res.**, v.36, n.1, p.163, 2017.

FATTAHI, S.; LANGROUDI, M.; AKHAVAN-NIAKI, H. Hedgehog signaling pathway: Epigenetic regulation and role in disease and cancer development. **J. Cell Physiol.**, v.233, n.8, p.5726-5735, 2018.

FENG, Y.Z. *et al.* Overexpression of hedgehog signaling molecules and its involvement in the proliferation of endometrial carcinoma cells. **Clin. Cancer Res.**, v.13, n.5, p.1389-1398, 2007.

FINNEY, D. J. **Statistics for biologists**. Londres, Inglaterra: Chapman and Hall, 1980.

FONSECA, F.P. *et al.* Stromal myofibroblasts in squamous cell carcinoma of the tongue in young patients - a multicenter collaborative study. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.**, v. 118, n. 4, p. 483-489, 2014

FRANCO, P.I.R. *et al.* Tumor microenvironment components: Allies of cancer progression. **Pathol Res. Pract.**, v. 152729, 2019.

FUJII, N. *et al.* Cancer-associated fibroblasts and CD163-positive macrophages in oral squamous cell carcinoma: their clinicopathological and prognostic significance. **J. Oral Pathol. Med.**, v.41, n.6, p.444-451, 2012.

GANDELLINI, P. *et al.* Complexity in the tumour microenvironment: Cancer associated fibroblast gene expression patterns identify both common and unique features of tumour-stroma crosstalk across cancer types. **Semin. Cancer Biol.**, v.35, p.96-106, 2015.

GAO, J. *et al.* Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. **Sci. Signal**, v.6, n.269, p.11, 2013.

GASCARD, P.; TLSTY, T.D. Carcinoma-associated fibroblasts: Orchestrating the composition of malignancy. **Genes Dev**, v. 30, p.1002–1019, 2016.



GOODRICH, L.V. *et al.* Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog. **Genes Dev**, v.10, n.3, p.301-312, 1996.

GRAIZEL, D. *et al.* Oral cancer-associated fibroblasts predict poor survival: Systematic review and meta-analysis. **Oral Dis.**, 2019.

GUIMARÃES, V.S.N. **Fibroblastos associados ao carcinoma escamocelular de boca: relação com moléculas hedgehog e MMP14.** 2018. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) - Universidade Federal da Bahia. Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2018.

HABIB, J.G.; O'SHAUGHNESSY, J.A. The hedgehog pathway in triple-negative breast cancer. **Cancer Med**, v.5, n.10, p.2989-3006, 2016.

HANNA, A.; SHEVDE, L.A. Hedgehog signaling: modulation of cancer properties and tumor microenvironment. **Mol. Cancer**, v. 15, p. 24, 2016.

HAO, K. *et al.* Hedgehog signaling pathway regulates human pancreatic cancer cell proliferation and metastasis. **Oncol. Rep.**, v.29, n.3, p.1124–1132, 2013.

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

HORN, A. *et al.* Hedgehog signaling controls fibroblast activation and tissue fibrosis in systemic sclerosis. **Arthritis Rheum.**, v. 64, p. 2724–2733, 2012.

HUANG, L. *et al.* Cancer-associated fibroblasts in digestive tumors. **World J. Gastroenterol.**, v.20, n.47, p.17804-17818, 2014.

HUANG, T.X.; GUAN, X.Y.; FU, L. Therapeutic targeting of the crosstalk between cancer-associated fibroblasts and cancer stem cells. **Am. J. Cancer Res.**, v.9, n.9, p.889-1904, 2019.

IM, S. *et al.* Hedgehog related protein expression in breast cancer: GLI-2 is associated with poor overall survival. **Korean J. Pathol.**, v.47, n.2, p.116–123, 2013.

INGALE, Y. *et al.* Evaluating the efficacy of osteopontin expression as a prognostic marker in oral squamous cell carcinoma in the Indian subpopulation. **J. Oral Maxillofac. Pathol.**, v.18, n.Suppl 1, p.S11-115, 2014.

INGHAM, P.W.; MCMAHON, A.P. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. **Genes & Develop.**, v.15, n.23, p.3059–3087, 2001.

ISHII, G.; OCHIAI, A.; NERI, S. Phenotypic and functional heterogeneity of cancer-associated fibroblast within the tumor microenvironment. **Adv Drug Deliv. Ver.**, v.99, n.Pt B, p.186-196, 2016.

JASKOLL, T. *et al.* Sonic hedgehog signaling plays an essential role during embryonic salivary gland epithelial branching morphogenesis. **Develop. Dyn.**, v. 229, n. 4, p. 722–732, 2004.

KABIR, T.D. *et al.* A miR-335/COX-2/PTEN axis regulates the secretory phenotype of senescent cancer-associated fibroblasts. **Aging**, v.8, n.8, p.1608-1635, 2016.

KARHADKAR, SS. *et al.* Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. **Nature**, v.431, n.7009, p.707-712, 2004.

KATOH, Y.; KATOH, M. Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation. **Curr. Mol. Med.**, v.9, n.7, p.873–886, 2009.

KAYAMORI, K. *et al.* NOTCH3 Is Induced in cancer-associated fibroblasts and promotes angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. **PLoS One**, v.11, n.4, p.e0154112, 2016.

KELLERMANN, M.G. *et al.* Mutual paracrine effects of oral squamous cell carcinoma cells and normal oral fibroblasts: induction of fibroblast to myofibroblast transdifferentiation and modulation of tumor cell proliferation. **Oral Oncol.**, v.44, n.5, p.509-517, 2008.

KIM, T. J. *et al.* Hedgehog signaling protein expression and its association with prognostic parameters in prostate cancer: a retrospective study from the view point of new 2010 anatomic stage/prognostic groups. **J. Surg. Oncol.**, v.104, n.5, p.472–479, 2011.

KIMPLE, A.J. *et al.* Oral cavity squamous cell carcinoma-an overview. **Oral Health Dent. Manag.**, v. 13, n.3, p. 877-882, 2014.

KOONTONGKAEW, S. The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. **J. Cancer**, v.4, n.1, p.66-83, 2013.

KUMAR, D. *et al.* mitigation of tumor-associated fibroblast-facilitated head and neck cancer progression with anti-hepatocyte growth factor antibody ficlatuzumab. **Jama Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v.141, n.12, p.1133-1139, 2015.

LAUTH, M. *et al.* Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v.104, n.20, p.8455–8460, 2007.

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

LEE, R.T.; ZHAO, Z.; INGHAM, P.W. Hedgehog signalling. **Development**, v. 143, n.3, p.367-372, 2016.

LEE, J. J. *et al.* Stromal response to Hedgehog signaling restrains pancreatic cancer progression. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, n. 111, v. 30, p. 3091-3100, jul. 2014.

LEITE, A.A. *et al.* Oral squamous cell carcinoma: a clinicopathological study on 194 cases in northeastern Brazil. A cross-sectional retrospective study. **Sao Paulo Med. J.**, v.136, n.2, p.165-169, 2018.

LI, H.; LI, J.; FENG, L. Hedgehog signaling pathway as a therapeutic target for ovarian cancer. **Cancer Epidemiol.**, v.40, p.152-157, 2016.

LI, M. *et al.* Targeting of cancer-associated fibroblasts enhances the efficacy of cancer chemotherapy by regulating the tumor microenvironment. **Mol. Med. Rep.**, v.13, n.3, p.2476-2484, 2016.

LIANG, M. *et al.* GLI-1 facilitates the EMT induced by TGF- $\beta$ 1 in gastric cancer. **Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.**, v.22, n.20, p.6809-6815, 2018.

LIAO, Z. *et al.* Cancer-associated fibroblasts in tumor microenvironment - Accomplices in tumor malignancy. **Cell Immunol.**, v.pii: S0008-8749, n.17. p.30222-8, 2018.

LIN, N.N. *et al.* Significance of oral cancer-associated fibroblasts in angiogenesis, lymphangiogenesis, and tumor invasion in oral squamous cell carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, v.46, n.1, p.21-30, 2017.

LIU, J. *et al.* Cancer-associated fibroblasts promote hepatocellular carcinoma metastasis through chemokine-activated hedgehog and TGF- $\beta$  pathways. **Cancer Lett.**, v.379, n.1, p.49-59, 2016.

LIU, Q. *et al.* Gli1 promotes transforming growth factor-beta1- and epidermal growth factor-induced epithelial to mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. **Surgery**, v.158, n.1, p.211-224, 2015.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n, 4, p, 402-408, 2001.

LÓPEZ-VERDÍN, S. E-Cadherin gene expression in oral cancer: Clinical and prospective data. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.** v.24, n. 4, p.e444-e451, 2019.

MA, G.; XIAO, Y.; HE, L. Recent progress in the study of Hedgehog signaling. **J. Genet. Genomics**, v.35, n.3, p.129-137, 2008.

MPEKRIS, F. *et al.* Sonic-Hedgehog pathway inhibition normalizes desmoplastic tumor microenvironment to improve chemo- and nanotherapy. **J. Control Release.**, v.261, p.105-112, 2017.

MARKWELL, S.M.; WEED, S.A. Tumor and stromal-based contributions to head and neck squamous cell carcinoma invasion. **Cancers**, v.7, n.1, p.382-406, 2015.

MASTRANGELO, E.; MILANI, M. Role and inhibition of GLI1 protein in cancer. **Lung Cancer**, v.9, p.35-43, 2018.

- MATSUSHITA, S. *et al.* Hedgehog signaling pathway is a potential therapeutic target for gallbladder cancer. **Cancer Sci.**, v.105, n.3, p.272-280, 2014.
- MATSUZAKI, H. *et al.* Osteopontin as biomarker in early invasion by squamous cell carcinoma in tongue. **J. Oral Pathol. Med.**, v.36, n.1, p. 30-34, 2007.
- MCCARTHY, JB.; EL-ASHRY, D.; TURLEY, E.A. Hyaluronan, cancer-associated fibroblasts and the tumor microenvironment in malignant progression. **Front Cell Dev. Biol.**, v.6, p.48, 2018.
- MERCHANT, J. L. Hedgehog signalling in gut development, physiology and cancer. **The J. Physiol.**, v.590, n. 3, p. 421–432, 2012.
- MICHAUD, E. J.; YODER, B. K. The primary cilium in cell signaling and cancer. **Cancer Res.**, v.66, n.13, p.6463–6467, 2006.
- MIGUEL, A.F.P. *et al.* Association between immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases and metastasis in oral squamous cell carcinoma: Systematic review and meta-analysis. **Head Neck**, 2019.
- 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. **Pharmacol. Rev.**, v.62, n.3, p.497–524, 2010.
- MONTEIRO-AMADO, F. *et al.* Immunohistochemical evaluation of MMP-2, MMP-9 and CD31/microvascular density in squamous cell carcinomas of the floor of the mouth. **Braz. Dent. J.**, v.24, n.1, p.3-9, 2013.
- MONTERO, P.H.; PATEL, S.G. Cancer of the oral cavity. **Surg. Oncol. Clin. N. Am.**, v.24, n.3, p.491-508, 2015.
- MORO, J.D.S. *et al.* Oral and oropharyngeal cancer: epidemiology and survival analysis. **Einstein**, v.16, n.2, p.eAO4248, 2018.
- NESINA, I.P.; IURCHENKO, N.P.; BUCHYNSKA, L.G. Markers of the epithelial-mesenchymal transition in cells of endometrial carcinoma. **Exp. Oncol.**, v.40, n.3, p.218-222, 2018.
- NOGUTI, J. *et al.* Metastasis from oral cancer: an overview. **Cancer Genomics Prot.**, v.9, n.5, p.29-35, 2012.
- NUSSE, R.; CLEVERS, H. Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities. **Cell**, v.169, n.6, p.985-999, 2017.
- NÜSSLEIN-VOLHARD, C.; WIESCHAUS, E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. **Nature**, v.287, n.5785, p.795–801, 1980.
- PAK, E.; SEGAL, R.A. Hedgehog signal transduction: key players, oncogenic drivers, and cancer therapy. **Dev Cell**, v.38, n.4, p.333-344, 2016.

PATEL, B.P. *et al.* Clinical significance of MMP-2 and MMP-9 in patients with oral cancer. **Head Neck**, v.29, n.6, p.564-572, 2007.

PAULSSON, J.; MICKE, P. Prognostic relevance of cancer-associated fibroblasts in human cancer. **Semin Cancer Biol**, v.25, p.61-68, 2014.

PEPINSKY, R. B. *et al.* Mapping sonic hedgehog-receptor interactions by steric interference. **J. Biol. Chem.**, v.275, n.15, p.10995–10001, 2000.

PIETROBONO, S.; GAGLIARDI, S.; STECCA, B. Non-canonical Hedgehog Signaling Pathway in Cancer: Activation of GLI Transcription Factors Beyond Smoothed. **Front Genet.** v. 10, n. 556, 2019.

PIGNON, J.P. *et al.* Adjusting for patient selection suggests the addition of docetaxel to 5-fluorouracil-cisplatin induction therapy may offer survival benefit in squamous cell cancer of the head and neck. **Anticancer Drugs**, v.15, n.4, p.331-340, 2004.

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

POLYAK, K.; HAVIV, I.; CAMPBELL, I.G. Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. **Trends Genet.**, v.25, n.1, p.30-38, 2009.

QIN, X. *et al.* Cancer-associated fibroblast-derived IL-6 promotes head and neck cancer progression via the osteopontin-nf-kappa b signaling pathway. **Theranostic**, v.8, n.4, p.921-940, 2018.

RAFFAGHELLO, L.; DAZZI, F. Classification and biology of tumour associated stromal cells. **Immunol. Lett.**, v.168, n.2, p.175-182, 2015.

RÉDA, J. *et al.* Widespread expression of hedgehog pathway components in a large panel of human tumor cells and inhibition of tumor growth by GANT61: Implications for Cancer Therapy. **Int. J. Mol. Sci.** v.19, n.9, 2018.

RHODUS. N.L.; KERR, A.R.; PATEL, K. Oral cancer: leukoplakia, premalignancy, and squamous cell carcinoma. **Dent. Clin. North Am.**, v.58, n.2, p.315-340, 2014.

RIVERA, C. Essentials of oral cancer. **Int. J. Clin. Exp. Pathol.**, v.8, n.9, p.11884-11894, 2015.

RIVERA, C.; VENEGAS, B. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review). **Oncol Lett.**, v.8, n.1, p.7-11, 2014.

RIVERA, C.A. *et al.* Chronic restraint stress in oral squamous cell carcinoma. **J. Dent. Res.**, v.90, n.6, p.799-803, 2011.

ROBERTS, K.J.; KERSHNER, A.M.; BEACHY, P.A. The Stromal niche for epithelial stem cells: a template for regeneration and a brake on malignancy. **Cancer Cell.** v. 32, n. 4, p. 404-410, out. 2017.

RODRIGUES, P.C. *et al.* Stromal myofibroblasts in potentially malignant and malignant lesions of the oral cavity. **Oncol. Lett.**, v.9, n.2, p.667-670, 2015.

ROSENTHAL, E.L.; MATRISIAN, L.M. Matrix metalloproteases in head and neck cancer. **Head Neck**, v.28, n.7, p. 639–648, 2006.

RUBIN, L.L.; DE SAUVAGE, F.J. Targeting the Hedgehog pathway in cancer. **Nat. Rev. Drug Discov**, v.5, n.12, p.1026-33, 2006.

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

SALES, C.B. *et al.* Elevated VEGFA mRNA levels in oral squamous cell carcinomas and tumor margins: a preliminary study. **J. Oral Pathol. Med.**, v.45, n.7, p.481-485, 2016.

SAQUI-SALCES, M.; MERCHANT, J.L. Hedgehog signaling and gastrointestinal cancer. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1803, n.7, p.786-795, 2010.

SASAHIRA, T.; KIRITA, T.; KUNIYASU, H. Update of molecular pathobiology in oral cancer: a review. **Int. J. Clin. Oncol.**, v.19, n.3, p.431-436, 2014.

SCALES, S.J.; DE SAUVAGE, F.J. Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. **Trends Pharmacol. Sci.**, v.30, n.6, p.303-312, 2009.

SHAH, S.; KAUR, M. Biomarkers and chemopreventives in oral carcinogenesis and its prevention. **J. Oral Maxillofac. Pathol.**, v.18, n.1, p.69-76, 2014.

SHAN, T. *et al.* Prometastatic mechanisms of CAF-mediated EMT regulation in pancreatic cancer cells. **Int. J. Oncol.**, v.50, n.1, p.121-128, 2017.

SHANG, S.; HUA, F.; HU, Z.W. The regulation of  $\beta$ -catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities. **Oncotarget**, v.8, n.20, p.33972-33989, 2017.

SHIGA, K. *et al.* Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth. **Cancers**, v.7, n.4, p.2443-2458, 2015.

SHIN, K. *et al.* Hedgehog signaling restrains bladder cancer progression by eliciting stromal production of urothelial differentiation factors. **Cancer Cell**, v. 26, p. 521–533, 2014.

SILVA, R.N.F. *et al.* Immunohistochemical analysis of neutrophils, interleukin-17, matrix metalloproteinase-9, and neofomed vessels in oral squamous cell carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.** v.47, n.9, p.856-863, 2018.

SKODA, A.M. *et al.* The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. **Bosn J. Basic Med. Sci.**, v.18, n.1, p.8-20, 2018.

SOBRAL, L.M. *et al.* Isolation and characterization of myofibroblast cell lines from oral squamous cell carcinoma. **Oncol. Rep.**, v.25, n.4, p.1013-1020, 2011.

STEINBICHLER, T.B. *et al.* Tumor-associated fibroblast-conditioned medium induces CDDP resistance in HNSCC cells. **Oncotarget**, v.7, n.3, p.2508-2518, 2015.

SUBRAMANI, V.N. *et al.* Expression of osteopontin in oral squamous cell carcinoma and its surgical margins-an immunohistochemical study. **J. Clin. Diagn. Res.**, v.9, n.11, p.ZC66-9, 2015.

TAO, L. *et al.* Cancer associated fibroblasts: An essential role in the tumor microenvironment. **Oncol. Lett.**, v.14, n.3, p.2611-20, 2017.

THODE, C. *et al.* Significance of myofibroblasts in oral squamous cell carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, v.40, n.3, p.201-207, 2011.

TUMULURI, V.; THOMAS, G.A.; FRASER, I.S. Analysis of the Ki-67 antigen at the invasive tumour front of human oral squamous cell carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, v.31, n.10, p.598-604, 2002.

TZELEPI, V. *et al.* Expression of hedgehog pathway components in prostate carcinoma microenvironment: shifting the balance towards autocrine signalling. **Histopathology**, v.58, n.7, p.1037-1047, 2011.

VALENTI, G. *et al.* Cancer stem cells regulate cancer-associated fibroblasts via activation of hedgehog signaling in mammary gland tumors. **Cancer Res.**, v.77, n.8, p.2134-2147, 2017.

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

VIDAL, M.T.A. *et al.* The sonic hedgehog signaling pathway contributes to the development of salivary gland neoplasms regardless of perineural infiltration. **Tumour Biol.**, v.37, n.7, p.9587-9601, 2016.

WALTER, K. *et al.* Overexpression of smoothened activates the sonic hedgehog signaling pathway in pancreatic cancer-associated fibroblasts. **Clin. Cancer Res.**, v.16, n.6, p.1781-1789, 2010.

WANG, K. *et al.* Sonic Hedgehog/GLI<sub>1</sub> signaling pathway inhibition restricts cell migration and invasion in humangliomas. **Neurol. Res.**, v.32, n.9, p.975-980, 2010.

WANG, M. *et al.* Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. **J. Cancer**, v.8, n.5, p.761-773, 2017.

WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncol.**, v.45, n.4-5, p.309-316, 2009.

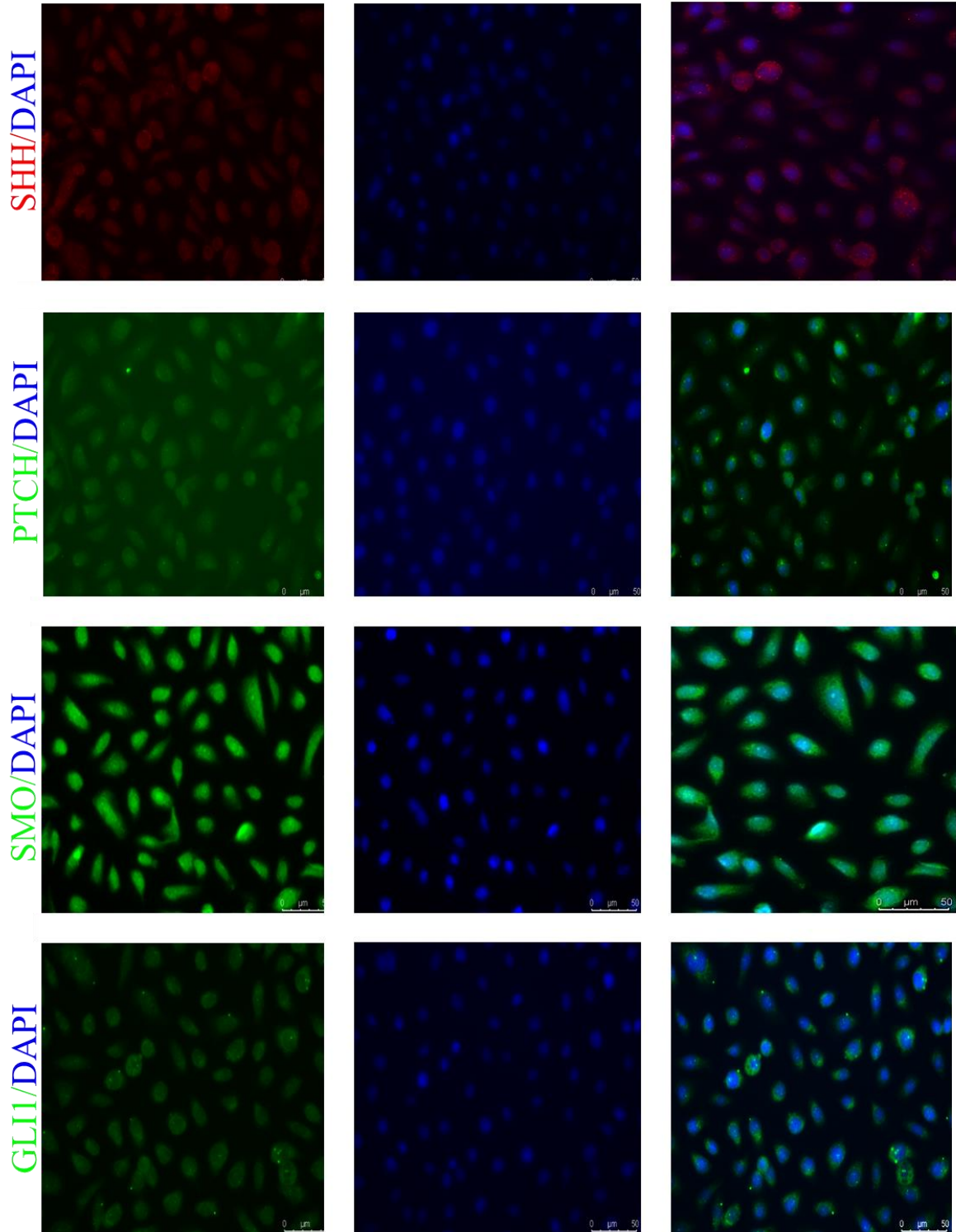
WHEELER, S.E. *et al.* Enhancement of head and neck squamous cell carcinoma proliferation, invasion, and metastasis by tumor-associated fibroblasts in preclinical models. **Head Neck**, v.36, n.3, p.385-392, 2014.

- WONG, S. Y.; REITER, J. F. The primary cilium at the crossroads of mammalian hedgehog signaling. **Curr. Develop. Biol.**, v.85, p.225-260, 2009.
- WONG, T.; WIESENFELD, D. Oral Cancer. **Aust. Dent. J.**, v.63, n.Suppl 1, p.S91-S99, 2018.
- WU, C. *et al.* Hedgehog signaling pathway in colorectal cancer: function, mechanism, and therapy. **Onco Targets Ther**, v.10, p.3249-3259, 2017b.
- WU, F. *et al.* Hedgehog signaling: from basic biology to cancer therapy. **Cell Chem. Biol.**, v.24, n.3, p.252-280, 2017a.
- XIN, M. *et al.* Strategies to target the Hedgehog signaling pathway for cancer therapy. **Med. Res. Ver.**, v.38, n.3, p.870-913, 2018.
- YAN, M. *et al.* HH/GLI signalling as a new therapeutic target for patients with oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol.**, v.47, n.6, p.504-509, 2011.
- YAN, R. *et al.* Suppression of growth and migration by blocking the Hedgehog signaling pathway in gastric cancer cells. **Cell. Oncol.**, v.36, n.5, p. 421–435, 2013.
- YANG, L. *et al.* Hedgehog signaling activation in the development of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of esophagus. **Int. J. Biochem. Mol. Biol.**, v.3, n.1, p.46–57, 2012.
- ZHANG, S. *et al.* Loss of VHL expression contributes to epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol.**, v.50, n.9, p.809–817, 2014.
- ZHOU, B. *et al.* A role for cancer-associated fibroblasts in inducing the epithelial-to-mesenchymal transition in human tongue squamous cell carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 43, p. 585–592, 2014.
- ZHOU, B. *et al.* Tumor necrosis factor  $\alpha$  induces myofibroblast differentiation in human tongue cancer and promotes invasiveness and angiogenesis via secretion of stromal cell-derived factor-1. **Oral Oncol.**, v.51, n.12, p.1095-1102, 2015.
- ZIANI, L.; CHOUAIB, S.; THIERY, J. Alteration of the Antitumor Immune Response by Cancer-Associated Fibroblasts. **Front. Immunol.**, v.9, p. 414, 2018.



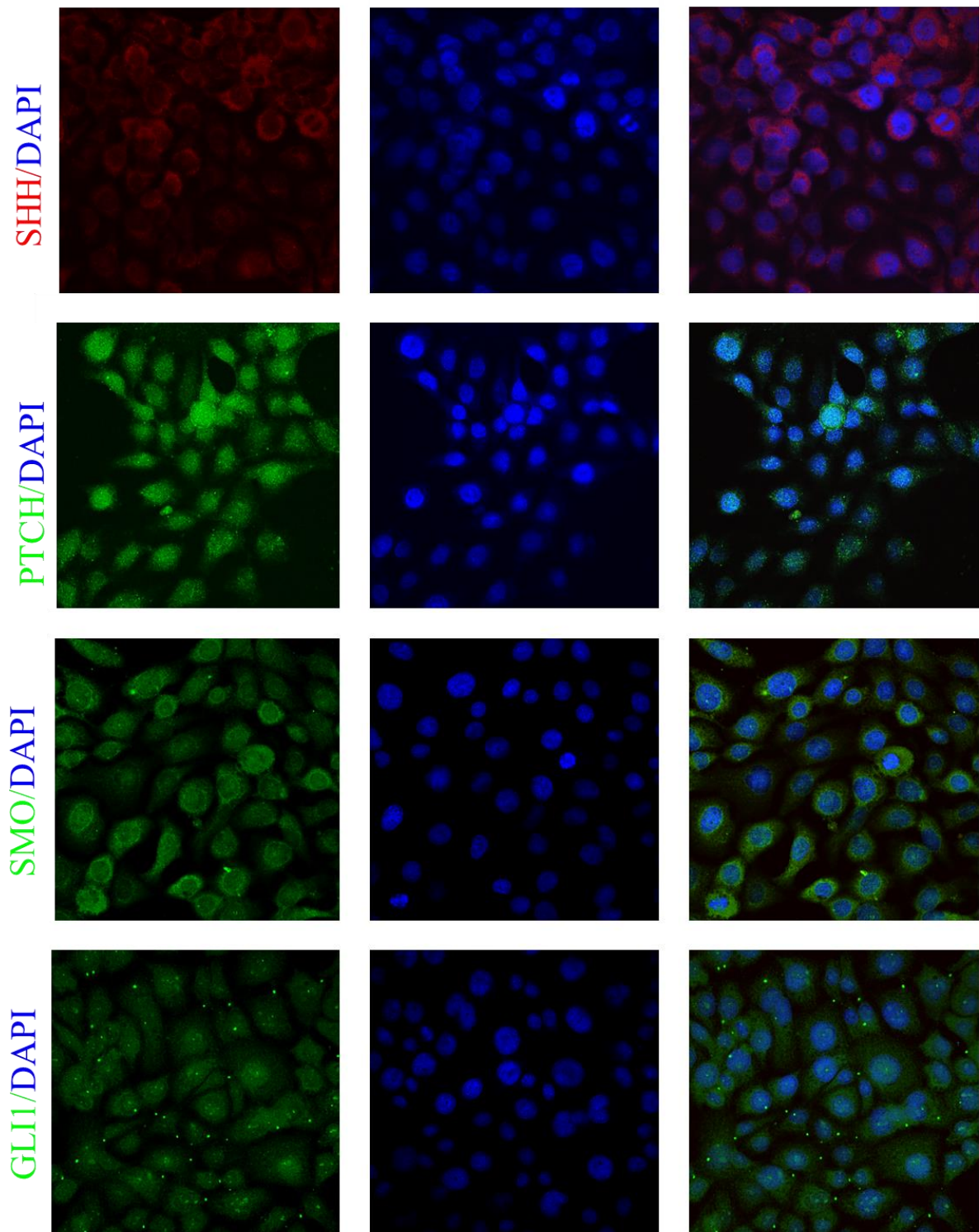
## APÊNDICES

## APÊNDICE A



**Figura 1.** Expressão de proteínas da via Hh em células HSC3, por imunofluorescência.

## APÊNDICE B



**Figura 2.** Expressão de proteínas da via Hh em células CAL27, por imunofluorescência.

## APÊNDICE C

### Experimentos em andamento:

#### **Análise dos processos de invasão e migração em CAL27 estimuladas por CAF**

Para avaliação dos processos de invasão e migração celular, foi realizado um ensaio piloto na Faculdade de Odontologia da UNICAMP, no laboratório do Prof. Ricardo Della Coletta, utilizando membranas de policarbonato. Buscando avaliar o efeito dos CAFs no processo de invasão celular, NOF e CAF foram distribuídos em placas de 24 poços, numa densidade de  $8 \times 10^4$  células/mL, e incubadas *overnight* para permitir a adesão das células. Após 24 horas, o meio foi retirado e as células lavadas com salina, para retirar todo o SFB. Após 24 horas em meio carenciado, foi aplicada 50 µl de solução de myogel (2.4 mg/ml) e colágeno (Collagen Bovin Type I, BD Biosciences – cat.354231/ ~ 3 mg/ml) no interior de cada *Transwell*(Corning 3422, membrana de 0.8µm) que estavam sobre uma placa de 24 poços contendo NOF e CAF. Posteriormente, o conjunto placa + *transwell* foi colocado na estufa, a 37°C por 30 minutos, para o gel solidificar. E então, as células tumorais (CAL27), previamente carenciadas, foram distribuídas sobre o gel solidificado em cada *transwell*, numa densidade de  $8 \times 10^4$  células/mL e incubada em estufa a 37°C por 72h (Figura 3- A e B).

Para avaliar o efeito dos CAFs no processo de migração celular, foi realizado um experimento utilizando *transwells*, semelhante ao descrito acima, entretanto, não foi adicionada a solução de myogel + colágeno, sendo assim, as células tumorais (CAL27) foram distribuídas diretamente sobre a membrana do *transwell*. O tempo de incubação foi de 48h (Figura 3– C e D). Para ambos experimentos, foi utilizado meio DMEM sem SFB como controle negativo e meio DMEM com 10% de SFB como controle positivo.

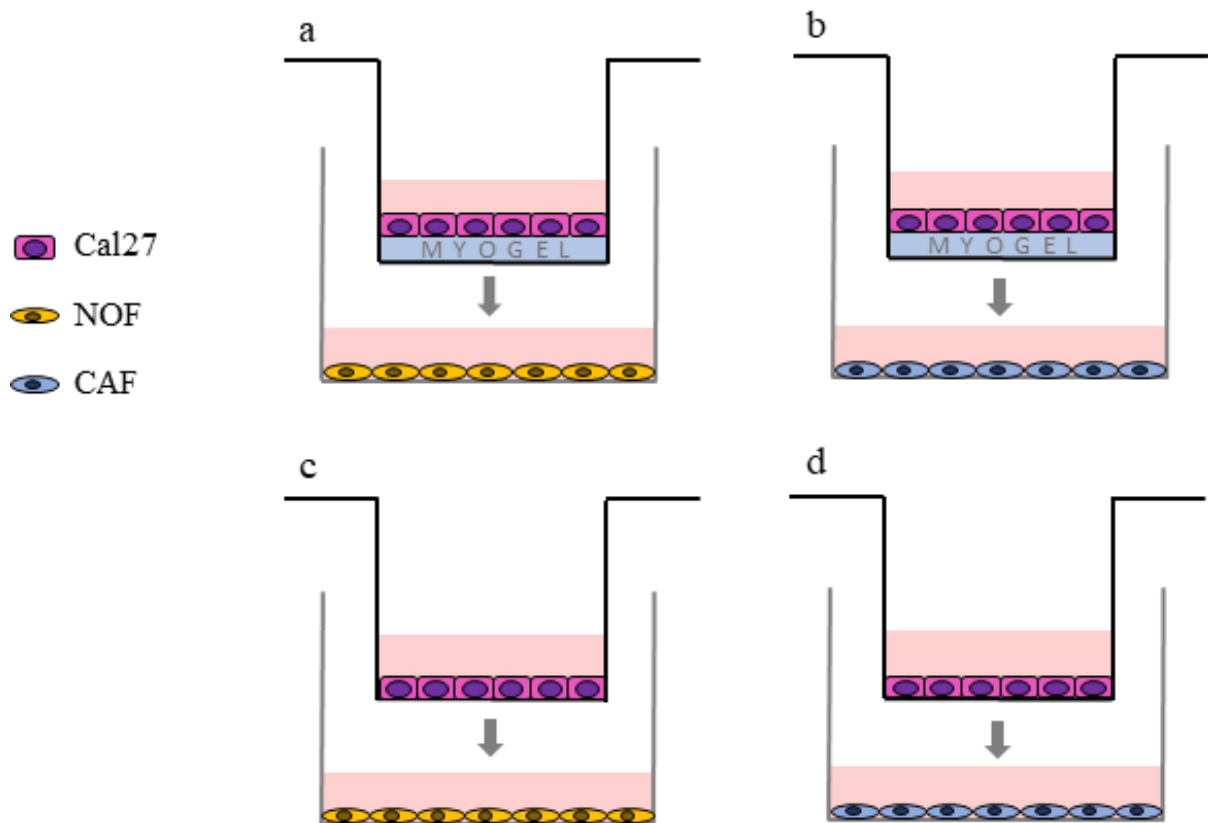


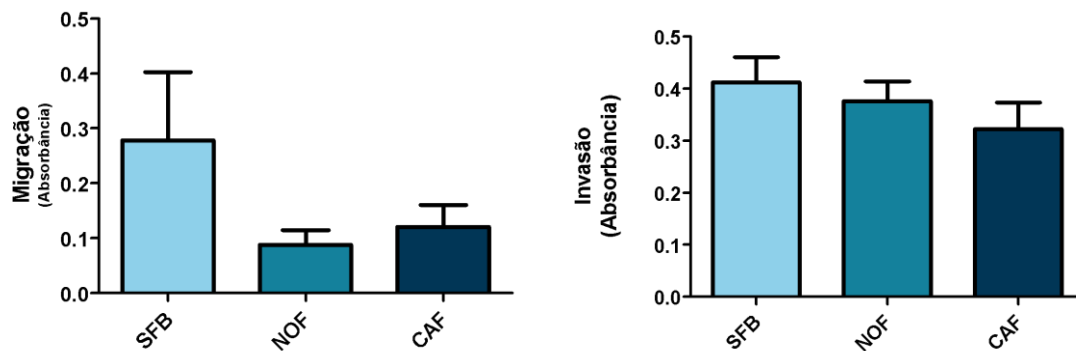
Figura 3: Esquema dos experimentos de invasão e migração, utilizando *transwell*.

Após os tempos de incubação - 72 horas para invasão e 48h para migração -, o meio de cultura foi removido do fundo de cada poço, e 1ml de formol a 10% foi adicionado no interior de cada *transwell*, por duas horas, em temperatura ambiente, para fixação das células na membrana. Em seguida, as membranas foram lavadas com 1ml de PBS1x para remoção do excesso de formol. Posteriormente, as células foram coradas com 500  $\mu$ l de azul de toluidina (azul de toluidina 1% filtrado + Borax 1% diluído em água destilada), inseridos no interior de cada *transwell*, durante 15 minutos, em temperatura ambiente. Para remoção do excesso de corante, foram realizadas três lavagens seriadas das membranas em béqueres contendo água destilada. O acúmulo de corante nas laterais do interior do *transwell* foi removido com o auxílio de hastes flexíveis de algodão. Para mensurar as células que migraram e invadiram, foi realizada eluição da membrana utilizando 200  $\mu$ l de SDS 1%. Em seguida, o conteúdo de cada poço foi transferido para uma placa de 96 poços, e realizada a leitura utilizando o leitor de placas Spectra Max 190, em um comprimento de onda de 655nm.

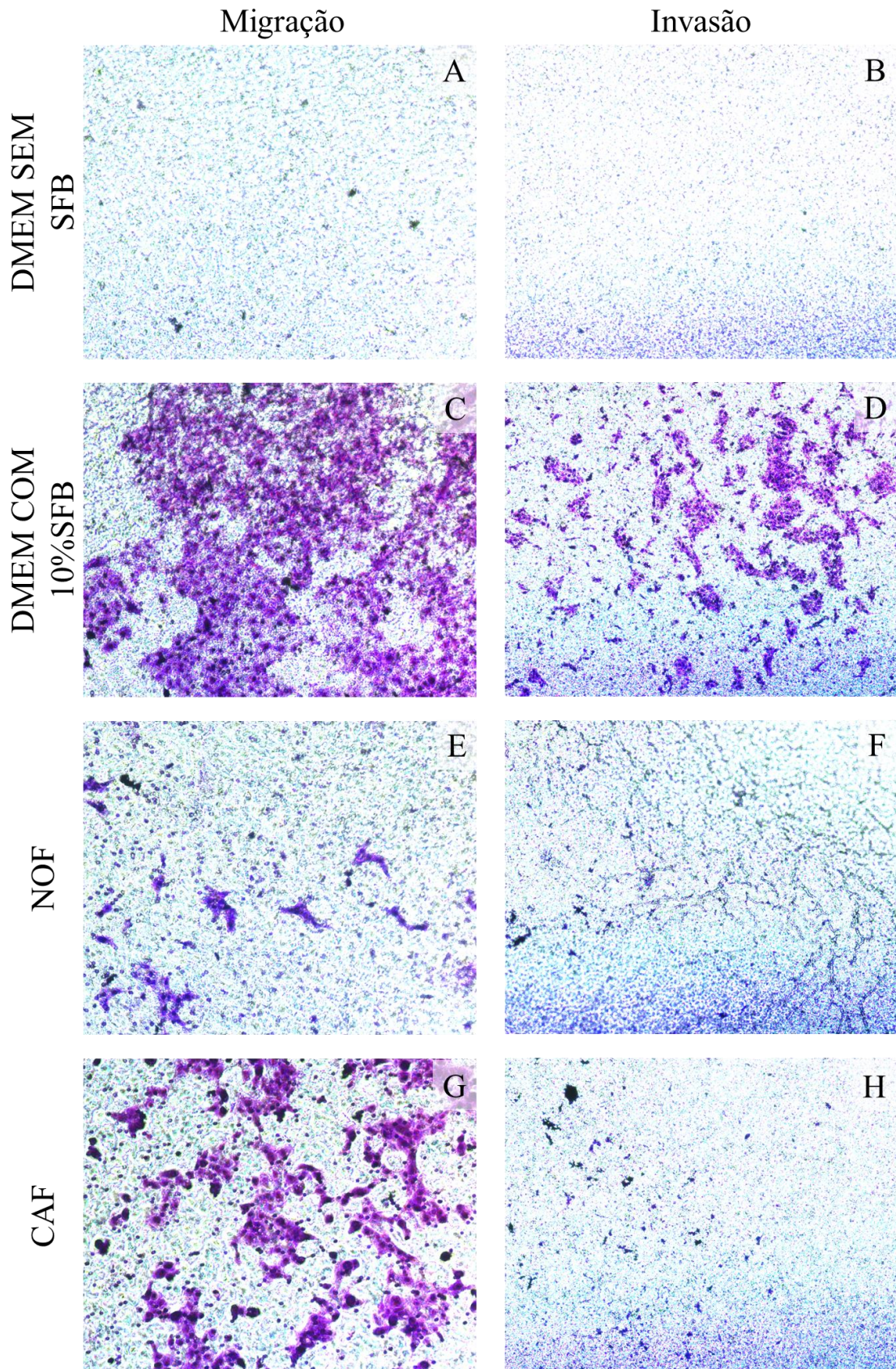
A análise foi feita através dos valores de absorbância (excluindo o valor do branco).

### Efeito dos CAFs no processo de migração e invasão, em células de CEB.

Nesta etapa, realizamos, inicialmente, um ensaio piloto com membranas de policarbonato, a fim de avaliar o efeito dos CAFs na migração e invasão de CAL27. Observamos um discreto aumento na migração celular em CAL27 quando atraídas por CAF em comparação com o NOF (Figuras 4 e 5).



**Figura 4.** Absorbância após os ensaios de migração e invasão em células CAL27, induzidas DMEM com 10% de SFB, NOF e CAF.



**Figura 5.** Fotomicrografia das membranas dos *transwells* após os ensaios de migração e invasão com células CAL27, induzidas por DMEM sem SFB, DMEM com 10% de SFB, NOF e CAF.

Entretanto, após estes ensaios iniciais, percebemos a necessidade de ajustes no tempo de incubação e concentração de células. Dessa forma, poderemos refinar a avaliação dos processos de migração e invasão celular induzidos pelos CAFs. Neste ensaio inicial, utilizamos uma concentração de células menor do que indicado pela literatura, o que pode ter interferido no resultado inicial. Os novos ensaios estão em andamento e serão realizados utilizando concentrações maiores de células, como descrito previamente na literatura:  $1 \times 10^5$  (CHANG *et al.*, 2015) e  $2 \times 10^5$  (KARHADKAR *et al.*, 2004; LIANG *et al.*, 2018) e tempos menores de incubação, como: 20 horas (KARHADKAR *et al.*, 2004), 24 horas (WANG *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2015; CHANG *et al.*, 2015; FAN *et al.*, 2017; QIN *et al.*, 2018) e 48 horas (DING *et al.*, 2015; SHAN., *et al.*, 2017).