



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 MODULADORES DOS FIBROBLASTOS
ASSOCIADOS AO CÂNCER E VIA HEDGEHOG NA
PROLIFERAÇÃO CELULAR E ANGIOGÊNESE NO
CARCINOMA ESCAMOCELULAR DE BOCA**

LUDMILA DE FARO VALVERDE

Salvador – Bahia

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

FACULDADE DE MEDICINA

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**EFEITOS MODULADORES DOS FIBROBLASTOS
ASSOCIADOS AO CÂNCER E VIA HEDGEHOG NA
PROLIFERAÇÃO CELULAR E ANGIOGÊNESE NO
CARCINOMA ESCAMOCELULAR DE BOCA**

LUDMILA DE FARO VALVERDE

Orientadora: Clarissa Araújo Gurgel Rocha

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

Salvador – Bahia

2020

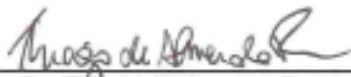
Título da Tese: "EFEITOS MODULADORES DOS FIBROBLASTOS ASSOCIADOS AO CÂNCER E VIA HEDGEHOG NA PROLIFERAÇÃO CELULAR E ANGIOGÊNESE NO CARCINOMA ESCAMOCECULAR DE BOCA"

LUDMILA DE FARO VALVERDE

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 07 de janeiro de 2020.

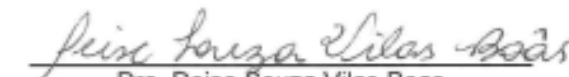
COMISSÃO EXAMINADORA



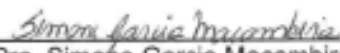
Dr. Thiago de Almeida Pereira
Professor Visitante
Stanford University Medical School



Dra. Aguida Cristina Gomes Henriques
Leitão
Professora
UFBA



Dra. Deise Souza Vilas Boas
Professora
UFBA



Dra. Simone Garcia Macambira
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 Raimundo (*i.m*) e Marileide,

Minha fonte inesgotável de amor.

AGRADECIMENTOS

À Deus,

Por cada benção concedida.

Ao meu pai Raimundo (*in memoriam*),

A minha maior saudade e certeza do amparo espiritual.

A minha mãe Marileide,

Meu maior exemplo e inspiração. Palavras nunca serão suficientes para mensurar a minha gratidão e o meu amor.

As minhas irmãs Larissa e Lorena,

Minhas companheiras e cúmplices em todos os momentos.

A minha orientadora Profa. Dra. Clarissa Gurgel,

Pela confiança, incentivo e apoio. Obrigada por tantas oportunidades concedidas ao longo desses quase 10 anos de convívio e aprendizado.

A meu cunhado Vinícius,

Por estar presente em todos os momentos nesta trajetória.

À Frederico,

Por tornar este último ano mais leve e tranquilo, sempre acreditando em mim.

À Dr. Bruno Solano e Dr. Thiago Almeida,

Pelas idéias compartilhadas na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ricardo Della Coletta,

Por toda a contribuição científica, doação de células para execução dos experimentos e por me receber de portas abertas em seu laboratório.

À Manuela Andion,

Pela intensa parceria durante todo o Doutorado. Passamos por tantas fases e tudo foi muito melhor e mais fácil por seguirmos juntas, mantendo o bom humor, responsabilidade e otimismo.

À Rosane Borges,

Pelo apoio e auxílio sem hesitar, pela presteza e solicitude sempre. Obrigada por me ajudar com as células, com os ensaios de citometria e tantas outras coisas.

À Vanessa Guimarães,

Por sua disponibilidade em colaborar nos experimentos e por pensar sempre em possíveis soluções para qualquer situação.

À Jéssica Mariane,

Pelo enorme auxílio na execução dos ensaios de angiogênese, bem como por sempre me ajudar nas dúvidas científicas. `

À Paulo Coelho,

Pela disponibilidade em ajudar nos ensaios de imunofluorescência e Western Blot.

À Ana Camila Messetti,

Por sua disponibilidade e receptividade na FOP- Piracicaba, permitindo muito aprendizado e momentos de alegria.

Ao Dr. Daniel Pereira Bezerra e Dra. Milena Pereira Botelho Soares,

Por abrirem as portas do laboratório, auxiliando na execução dos experimentos.

A minha família,

Pelo amor, torcida e momentos compartilhados.

Aos meus amigos,

Por estarem sempre presentes na minha vida.

Ao grupo de Biopatologia,

Pela amizade, apoio e parceria ao longo destes anos.

A todos os bolsistas de Iniciação Científica,

Em especial, Leonardo Siquara, pelo empenho e dedicação em nos auxiliar.

Aos Professores da Pós-Graduação em Patologia Humana,

Por todo conhecimento e ensinamentos transmitidos.

Ao Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM),

Em especial, Dr. Mitermayer, pela oportunidade em fazer parte do laboratório.

**Ao Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI),
especialmente ao Grupo de Câncer,**

Por compartilharem os ensinamentos de cultura celular.

A toda a equipe de Radiologia da Oral Imagem,

Pelo incentivo na realização do Doutorado.

Aos professores da banca de qualificação,

Pela disponibilidade e contribuições científicas.

À equipe da Microscopia do IGM,

Pela colaboração nas análises.

À Plataforma de Citometria de Fluxo,

Por contribuir na realização dos experimentos de citometria de fluxo.

À Biblioteca do IGM,

Pelo auxílio na formatação deste trabalho.

À Coordenação de Ensino,

Pela presteza em auxiliar e resolver os nossos problemas.

Ao CNPq,

Pelo apoio financeiro durante a realização do Doutorado.

À FOUFBA,

Local que me orgulho de ter feito a Graduação e onde dei os primeiros passos na ciência.

Ao IGM,

Por contribuir imensamente na minha formação acadêmica.

“O importante é não parar de questionar.”

(Albert Einstein)

VALVERDE, Ludmila de Faro. Efeitos moduladores dos fibroblastos associados ao câncer e via hedgehog na proliferação celular e angiogênese no carcinoma escamocelular de boca. 2020. 83 f. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020.

RESUMO

INTRODUÇÃO: O Carcinoma escamocelular de boca (CEB) é uma neoplasia invasiva e que ainda possui alta taxa de mortalidade. Sabe-se que a ativação da via de sinalização Hedgehog (HH), em tecidos adultos, pode resultar em desenvolvimento tumoral. Os fibroblastos associados ao câncer (no inglês, cancer associated fibroblasts - CAF) representam a maior população celular no estroma e favorecerem a progressão tumoral, sendo que a participação da via HH já foi descrita na ativação destas células. **HIPÓTESE:** CAFs contribuem para a proliferação celular e angiogênese tumoral, através da via de sinalização HH. **OBJETIVO:** Avaliar a participação de CAFs na ativação da via HH, proliferação celular e angiogênese em CEB. **MATERIAL E MÉTODOS:** Foram utilizadas linhagens de CEB (CAL27, SCC4, SCC9 e HSC3) e culturas primárias de fibroblastos normais da cavidade bucal (NOF) e fibroblastos associados ao câncer. Em CEBs humanos, foi realizada a imunomarcagem de S100A4, α -SMA, CD105 e MCM3. A expressão gênica de componentes da via HH foi realizada nas linhagens de CEB e em NOF e CAF. HSC3 e CAL27 foram estimuladas com SHH recombinante e analisada a expressão dos genes PCTH1, GLI1 e GLI2. Foi realizado o ensaio do alamar blue para avaliação da citotoxicidade do GANT61, inibidor de GLI1, em CAL27, NOF e CAF. Meio condicionado (MC) por NOF e MC por CAF (antes e após tratamento com GANT61) foi incubado com CAL27 e, em seguida, avaliada a expressão de genes relacionados à via HH, proliferação e angiogênese. As células CAL27 também foram tratadas com GANT61 e os genes supracitados também foram avaliados. Foi realizado o ensaio do ciclo celular da CAL27 após diferentes estímulos, bem como ensaio de angiogênese utilizando a linhagem endotelial EA.hy926. **RESULTADOS:** Em CEBs humanos, foi encontrada uma associação positiva entre as proteínas α -SMA e S100A4 e o marcador de proliferação celular, MCM3 assim como entre α -SMA e S100A4 com a proteína CD105, positiva em vasos neoformados. A expressão gênica de componentes da via HH foi observada nas linhagens de CEB, bem como em NOF e em CAF. Nas células tumorais (HSC3 e CAL27), bem como em NOF e CAF, foi observada a marcação de proteínas da via HH, sendo esta menor em NOF. Após estímulo com SHH recombinante, as células HSC3 e CAL27 apresentaram uma maior expressão dos genes da via HH (PTCH1 e GLI1). MC CAF, quando incubado com CAL27, aumentou os níveis de transcritos de genes da via HH (PTCH1, GLI1, GLI2), bem como genes alvo desta cascata que estão envolvidos na proliferação (MYC, Ciclina D1) e angiogênese (HIF-1, VEGF-A). Por outro lado, o MC CAF pós GANT61 impediu o aumento da expressão dos genes supracitados, em diferentes tempos. Ainda, este composto também foi capaz de impedir maiores níveis de expressão dos genes supracitados, após incubação com a CAL27. No ciclo celular, observamos uma maior população de células na fase G0-G1, no grupo tratado com MC CAF, além de uma menor população de células em apoptose. Por fim, observamos que a despeito do tipo de fibroblasto (NOF ou CAF), os fatores secretados por estas células exercem um efeito na indução da angiogênese. **CONCLUSÕES:** As moléculas secretadas por CAFs podem mediar a ativação parácrina da via HH e contribuir com a proliferação e angiogênese, em CEB.

Palavras-chave: Carcinoma de células escamosas, Proteínas Hedgehog, Microambiente tumoral.

VALVERDE, Ludmila de Faro. Modulatory effects of cancer associated fibroblasts and via hedgehog on cell proliferation and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. 2020. 83 f. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is an invasive neoplasm that still has a high mortality rate. It is known that activation of the Hedgehog signaling pathway (HH) in adult tissues may result in tumor development. Cancer-associated fibroblasts (CAFs) represent the most abundant cell population in the stroma and favor tumor progression, and the participation of the HH pathway has already been described in the activation of these cells. **HYPOTHESIS:** CAFs contribute to cell proliferation and tumor angiogenesis through the HH signaling pathway. **AIM:** To evaluate the participation of CAFs in HH pathway activation, cell proliferation and angiogenesis in OSCC. **MATERIAL AND METHODS:** OSCC lines (CAL27, SCC4, SCC9 and HSC3) and primary cultures of normal oral cavity fibroblasts (NOF) and cancer-associated fibroblasts (CAF) were used. In human OSCC, immunostaining of S100A4, α -SMA, CD105 and MCM3 was performed. Gene expression of HH pathway components was performed in OSCC lines, NOF and CAF. HSC3 and CAL27 were stimulated with recombinant SHH and expression of PCTH1, GLI1 and GLI2 genes was analyzed. The alamar blue assay was performed to evaluate the cytotoxicity of GANT61, GLI1 inhibitor, in CAL27, NOF and CAF. NOF conditioned medium (CM) and CAF CM (before and after GANT61 treatment) was incubated with CAL27 and then evaluated for expression of genes related to the HH pathway, cell proliferation and angiogenesis. CAL27 cells were also treated with GANT61 and the above genes were also evaluated. The CAL27 cell cycle assay was performed after different stimuli as well as angiogenesis assay using the endothelial cell line EA.hy926. **RESULTS:** In human OSCC, a positive association was found between α -SMA and S100A4 proteins and cell proliferation marker MCM3 as well as between α -SMA and S100A4 with CD105 protein, positive in neofomed vessels. Gene expression of HH pathway components was observed in OSCC line as well as NOF and CAF. In tumor cells (HSC3 and CAL27), as well as NOF and CAF, protein labeling of the HH pathway was observed, which was lower in NOF. After stimulation with recombinant SHH, HSC3 and CAL27 cells showed a higher expression of HH pathway genes (PTCH1 and GLI1). CAF CM, when incubated with CAL27, increased levels of HH pathway gene transcripts (PTCH1, GLI1, GLI2) as well as target genes of this cascade that are involved in proliferation (MYC, Cyclin D1) and angiogenesis (HIF-1, VEGF-A). On the other hand, CAF CM post GANT61 prevented the increased expression of the above genes at different times. Furthermore, this compound was also able to prevent higher levels of expression of the above genes after incubation with CAL27. In the cell cycle, we observed a larger cell population in the G0-G1 phase in the CAF CM treated group, as well as a smaller apoptotic cell population. Finally, we observed that despite the fibroblast type (NOF or CAF), the factors secreted by these cells exert an effect on induction of angiogenesis. **CONCLUSIONS:** CAFs secreted molecules can mediate paracrine activation of the HH pathway and contribute to proliferation and angiogenesis in OSCC.

Keywords: Squamous cell carcinoma, Hedgehog proteins, Tumor microenvironment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Componentes e o funcionamento da via Hedgehog em humanos	22
Figura 2.	Mecanismos de ativação da via HH no câncer	24
Figura 3.	Funções dos CAFs no microambiente tumoral	27
Figura 4.	Distribuição dos casos de CEB por escore e anticorpos analisados	46
Figura 5.	Imunomarcção de CD105, MCM3, S100A4 e α -SMA em CEB	47
Figura 6.	Expressão gênica de componentes da via HH em linhagens de CEB	48
Figura 7.	Expressão gênica de componentes da via HH em NOF e CAF	48
Figura 8.	Expressão de proteínas da via HH em CAL27 e HSC3, por imunofluorescência	49
Figura 9.	Expressão de proteínas da via HH em NOF e CAF, por imunofluorescência	50
Figura 10.	Expressão de proteínas da via HH em CAL27 e HSC3, por Western Blot	50
Figura 11.	Expressão de proteínas da via HH em NOF e CAF, por Western Blot	51
Figura 12.	Expressão do gene PTCH1 em HSC3, antes e após estímulo com ligante SHH recombinante	52
Figura 13.	Expressão do gene GLI1 em HSC3, antes e após estímulo com ligante SHH recombinante	53
Figura 14.	Expressão do gene GLI2 em HSC3, antes e após estímulo com ligante SHH recombinante	53
Figura 15.	Expressão dos genes PTCH1, GLI1 e GLI2 em CAL27, antes e após estímulo com ligante SHH recombinante	54
Figura 16.	Expressão dos genes PTCH1, GLI1 e GLI2 em CAF, após incubação com GANT61	55
Figura 17.	Expressão do gene PTCH1, em CAL27, após incubação com meio condicionado por NOF, CAF e CAF após bloqueio com GANT61	56
Figura 18.	Expressão do gene GLI1, em CAL27, após incubação com meio condicionado por NOF, CAF e CAF após bloqueio com GANT61	56
Figura 19.	Expressão do gene GLI2, em CAL27, após incubação com meio condicionado por NOF, CAF e CAF após bloqueio com GANT61	57
Figura 20.	Expressão do gene MYC, em CAL27, após incubação com meio condicionado por NOF, CAF e CAF após bloqueio com GANT61	57
Figura 21.	Expressão do gene CCND1, em CAL27, após incubação com meio condicionado por NOF, CAF e CAF após bloqueio com GANT61	58
Figura 22.	Expressão do gene HIF-1, em CAL27, após incubação com meio condicionado por NOF, CAF e CAF após bloqueio com GANT61	59
Figura 23.	Expressão do gene VEGF-A, em CAL27, após incubação com meio condicionado por NOF, CAF e CAF após bloqueio com GANT61	59
Figura 24.	Expressão gênica em CAL27, após incubação com meio ou meio + GANT61	60
Figura 25.	Efeito de diferentes estímulos (10% SFB, <i>starvation</i> , MC NOF, MC CAF antes e após tratamento com GANT61) no ciclo celular de CAL27	61
Figura 26.	Características dos vasos formados com os diferentes estímulos	62
Figura 27.	Quantificação das características avaliadas nos vasos formados	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Dados do fabricante, clone, diluição, recuperação antigênica e controle positivo	33
Tabela 2.	Dados sobre as linhagens de CEB utilizadas	35
Tabela 3.	Dados do fabricante, clone e diluição dos anticorpos utilizados	37
Tabela 4.	Interpretação para valores de Coeficiente de ϕ (Phi)	45
Tabela 5.	Valores de CI_{50} de GANT61 em $\mu\text{g/mL}$ para NOF, CAF e CAL27	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -SMA	Refere-se a proteína <i>alpha smooth muscle actin</i>
μ g	Microgramas
μ m	Micrômetros
μ L	Microlitros
mM	Micromolar
°C	Graus Celsius
BCL2	Gene <i>Human B-cell lymphoma 2</i>
CAF	Do inglês, <i>cancer associated fibroblast</i>
CCND1	Ciclina D1
CEB	Carcinoma escamocelular de boca
CI ₅₀	Concentração inibitória de 50%
DEO	Displasia epitelial oral
DHH	Gene ou proteína <i>Desert Hedgehog</i>
DMEM	Do inglês, <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
FAP	Refere-se a proteína <i>fibroblast activation protein</i>
FSP-1	Refere-se a proteína <i>Fibroblast specific protein 1</i>
GAS-1	Do inglês, <i>growth arrest-specific 1</i>
GLI	Gene <i>Glioma associated oncogene homolog</i>
HH	<i>Hedgehog</i>
HHIP	Gene ou proteína <i>hedgehog interacting protein</i>
IGM	Instituto Gonçalo Moniz
IHH	Gene ou proteína <i>Indian Hedgehog</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer
KIF-7	Refere-se à proteína <i>kinesin family member 7</i>
MC	Meio condicionado
MCM3	Refere-se à proteína <i>minichromosome maintenance protein component 3</i>
MDV	Microdensidade vascular
NG2	Do inglês, <i>neuronglial antigen 2</i>
NOF	Do inglês, <i>normal oral fibroblast</i>
PBS	Do inglês, <i>phosphate buffered saline</i>
PDGFR	Do inglês, <i>platelet-derived growth factor receptor</i>
PTCH1	Gene ou proteína <i>Patched 1</i>
rpm	Rotações por minuto
RQ	Do inglês, <i>relative quantification</i>
S100A4	Refere-se a proteína <i>fibroblast activation protein</i>
SFB	Soro fetal bovino
SHH	Gene ou proteína <i>Sonic Hedgehog</i>
SMO	Gene ou proteína <i>Smoothened</i>
SUFU	Gene ou proteína <i>Supressor of fused</i>
TNM	Do inglês, <i>tumor-node-metastasis</i>
VEGF	Proteína <i>Vascular endothelial growth fator</i>
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	
1.1	CARCINOMA ESCAMOCELULAR DE BOCA	15
1.2	VIA DE SINALIZAÇÃO HEDGEHOG E CÂNCER	18
1.3	FIBROBLASTOS ASSOCIADOS AO CÂNCER	25
2	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	30
3	OBJETIVOS	
3.1	OBJETIVO GERAL	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	
4.1	IMUNO-HISTOQUÍMICA	33
4.2	OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS EM CULTURA	35
4.3	OBTENÇÃO DE FIBROBLASTOS ASSOCIADOS AO CÂNCER, FIBROBLASTOS NORMAIS E MEIO CONDICIONADO	36
4.4	IMUNOFLUORESCÊNCIA	37
4.5	WESTERN BLOT	38
4.6	CARACTERIZAÇÃO DAS CULTURAS DE CÉLULAS (CEB, CAF E NOF) QUANTO AO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE COMPONENTES DA VIA HH	38
4.6.1	Isolamento de RNA total e transcrição reversa	39
4.6.2	Ensaio de qPCR em tempo real	39
4.7	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DA VIA HH EM CÉLULAS DE CEB APÓS ESTÍMULO COM LIGANTE SHH RECOMBINANTE	40
4.7.1	Isolamento de RNA total, transcrição reversa e qPCR em tempo real	41
4.8	ENSAIO DO ALAMAR BLUE PARA AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO GANT61	41
4.9	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS A VIA HH, PROLIFERAÇÃO CELULAR E ANGIOGÊNESE EM CAL27 ANTES E APÓS TRATAMENTO DE CAF COM GANT61	42
4.9.1	Isolamento de RNA total, transcrição reversa e qPCR em tempo real	43
4.10	ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR EM CAL27	43
4.11	ENSAIO DE ANGIOGÊNESE	44
4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
5	RESULTADOS	
5.1	ASSOCIAÇÃO ENTRE A POPULAÇÃO DE CAFs, PROLIFERAÇÃO CELULAR E ANGIOGÊNESE	46
5.2	EXPRESSÃO DOS COMPONENTES DA VIA HH EM CÉLULAS DE CEB E CAFs	47
5.3	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA VIA HH APÓS ESTÍMULO COM SHH RECOMBINANTE	52
5.4	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÉDIA DO GANT61 PARA INIBIÇÃO DA VIA HH	54
5.5	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA VIA HH APÓS BLOQUEIO COM GANT61 EM CAF	55
5.6	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO MEIO CONDICIONADO POR CAF NA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À ATIVIDADE DA VIA HH E GENES ALVO ASSOCIADOS À PROLIFERAÇÃO CELULAR E ANGIOGÊNESE TUMORAL, ANTES E APÓS BLOQUEIO COM GANT61	55
5.6.1	PTCH1, GLI1 e GLI2	56
5.6.2	MYC e Ciclina D1	57
5.6.3	HIF-1 e VEGF-A	58
5.7	EXPRESSÃO GÊNICA DE CAL27 (HH, PROLIFERAÇÃO CELULAR E ANGIOGÊNESE) ANTES E APÓS INCUBAÇÃO COM GANT61	60
5.8	ANÁLISE DO CICLO CELULAR DE CAL27	61
5.9	ENSAIO DE ANGIOGÊNESE	62
6	DISCUSSÃO	63
7	CONCLUSÕES	71
	REFERÊNCIAS	72
	APÊNDICE	80

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARCINOMA ESCAMOCELULAR DE BOCA

De acordo com a última estimativa mundial, foram previstos 18,1 milhões de novos casos de câncer por ano e 9,6 milhões de mortes devido à doença. Com relação ao câncer da cavidade oral, cerca de 354 mil novos casos foram estimados para o ano de 2018, bem como mais de 177 mil mortes decorrente deste tipo de tumor (BRAY *et al.*, 2018 - GLOBOCAN, 2018). A maior parte dos óbitos ocorre nos países de baixo e médio desenvolvimento, como o Brasil e, nesse sentido, as neoplasias malignas configuram-se como uma das principais causas de morte da população brasileira, ultrapassadas apenas pelas doenças cardiovasculares (BRASIL, INCA, 2018).

No Brasil, para os anos 2018 e 2019, a estimativa foi de 14.700 novos casos de câncer de boca (BRASIL, INCA, 2018). Na região Nordeste, sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de boca é o 5º mais frequente em homens (n=1890; 6,72/100 mil), e o 11º em mulheres (n=920; 3,12/100 mil). Adicionalmente, a Bahia é o estado responsável pelo maior número de casos da região Nordeste (n=760), ocupando o 6º lugar na incidência em todo o país (BRASIL, INCA, 2018).

Dentre as neoplasias malignas que podem acometer a cavidade bucal, o carcinoma escamocelular de boca (CEB) é o subtipo histológico mais comum e corresponde a mais de 90% dos casos diagnosticados neste sítio anatômico (RODRIGUES *et al.*, 2014; BRANDS *et al.*, 2018; LIU; CHUA; BATSTONE, 2018). De acordo com a classificação de tumores da cavidade bucal e orofaringe da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2017), o CEB é uma neoplasia que se desenvolve a partir de células epiteliais da mucosa bucal, tem caráter invasivo e agressivo, potencial de metástase precoce e extensa em linfonodos. Esta doença acomete principalmente indivíduos adultos na faixa etária da 5ª a 6ª década de vida e tem uma etiologia multifatorial, sendo bem estabelecido que os principais fatores de risco são o tabaco e o álcool (FRONIE *et al.*, 2013; ADRIEN *et al.*, 2014; RIVERA, 2015; YESENSKY *et al.*, 2018).

Indivíduos tabagistas e etilistas possuem um risco maior de desenvolver CEB do que a população em geral, evidenciando a existência de uma sinergia entre o tabagismo e o etilismo (MARKOPOULOS, 2012; CHI; DAY; NEVILLE, 2015; RIVERA, 2015).

O aumento no risco é dose dependente, ou seja, está relacionado com o tempo que a pessoa fuma, número de cigarros fumados por dia e frequência de ingestão de álcool (HASHIBE *et al.*, 2011; WHO, 2017).

A apresentação clínica do CEB é variável e depende do estágio de desenvolvimento da doença (BAGAN; SARRION; JIMENEZ, 2010). Inicialmente, pode se caracterizar como um nódulo ou uma placa branca e/ou eritematosa, sendo assintomático ou causando apenas um leve desconforto (FRONIE *et al.*, 2013). Geralmente, o CEB é diagnosticado em estágio avançado e se apresenta como uma úlcera que não cicatriza e com margens elevadas, além de firme à palpação (BAGAN; SARRION; JIMENEZ, 2010; MARKOPOULOS, 2012; RIVERA, 2015; WHO, 2017). Com a progressão da doença, diversos sintomas podem estar associados, como dor, disfagia, odinofagia, dificuldades da fala, mobilidade reduzida da língua, sangramentos, perda de peso e odor bucal. Nos estágios terminais, os pacientes apresentam fístulas oro-cutâneas, sangramento contínuo, anemia grave e caquexia (WHO, 2005; BAGAN; SARRION; JIMENEZ, 2010).

Embora o CEB possa acometer toda a cavidade bucal, os sítios anatômicos mais acometidos pela doença são os dois terços anteriores da língua e o assoalho bucal (BAGAN; SARRION; JIMENEZ, 2010; RIVERA, 2015; WHO, 2017). Sabe-se, no entanto, que o local acometido pelo CEB está diretamente relacionado com o fator de risco associado. Em populações asiáticas, por exemplo, as lesões afetam principalmente a mucosa bucal, especialmente devido à mastigação do tabaco e da noz de betel (WHO, 2017).

O CEB tem um aspecto histológico variado e, a depender das alterações arquiteturais e citológicas, são utilizadas classificações para caracterizar a diferenciação dos tumores. A classificação histopatológica proposta pela *World Health Organization*, em 2005, aborda o grau de diferenciação celular e organização tecidual e compreende as categorias bem, moderadamente e pouco diferenciado. Os tumores bem diferenciados são caracterizados por cordões e ilhas de células com citoplasma eosinofílico, pontes intercelulares proeminentes e pérolas de queratina. Eventos como pleomorfismo celular e nuclear, anisocitose, anisonucleose, perda da relação núcleo-citoplasma, células aberrantes, figuras de mitoses atípicas bem como padrão de invasão em pequenos grupos ou de forma isolada, aumentam de acordo com a menor diferenciação tumoral.

Dessa forma, no CEB pouco diferenciado, existe um predomínio de células imaturas, de morfologia aberrante, numerosas mitoses típicas e atípicas, bem como mínima/ausente ceratinização, sendo muitas vezes necessária confirmação por marcadores imuno-histoquímicos (FRONIE *et al.*, 2013; WHO, 2017).

Apesar do grau histológico atribuído ao tumor poder estar associado ao prognóstico do paciente, critérios como o tamanho do tumor e o envolvimento dos linfonodos são os fatores prognósticos utilizados pela WHO para o estadiamento da lesão (WHO, 2017). Dessa forma, é necessário também estadiar clinicamente o tumor, a fim de descrever a extensão anatômica da lesão, bem como avaliar a ocorrência de metástase e comprometimento de estruturas adjacentes. O sistema de estadiamento mais utilizado é a classificação TNM (“*tumor-node-metastasis*”) dos Tumores Malignos, o qual baseia-se na extensão anatômica da doença, levando em conta as características do tamanho do tumor primário (T), o acometimento de linfonodos (N) e a presença ou ausência de metástases à distância (M). Estes parâmetros recebem graduações, geralmente de T0 a T4, N0 a N3 e M0 a M1. Dessa forma, os tumores são agrupados em estádios clínicos, que podem variar do I ao IV, sendo o IV o mais grave e de pior prognóstico (BRIERLEY; GOSPODAROWICZ; WITTEKIND, 2017).

O tratamento do CEB irá depender do estágio clínico da lesão, consistindo principalmente na excisão cirúrgica completa do tumor com margens cirúrgicas de 1cm e, se necessário, esvaziamento da cadeia de linfonodos. No pós operatório, a radioterapia é indicada principalmente em indivíduos com doença avançada e com maior risco de recorrência (LIU; CHUA; BATSTONE, 2018). Como terapia exclusiva, a radioterapia pode ser indicada em casos considerados inoperáveis. De forma similar, a quimioterapia pode ser uma terapia associada ou isolada, especialmente em casos de recidiva, onde não seja possível uma reabordagem cirúrgica (TAHARA *et al.*, 2018).

Apesar dos avanços no tratamento oncológico, a taxa de sobrevida global em 5 anos, para o câncer de boca, continua menor que 50% (MARKOPOULOS, 2012; FRONIE *et al.*, 2013; SAGGI *et al.*, 2018). Tal realidade se deve principalmente ao diagnóstico tardio e ao pouco conhecimento sobre a biologia deste tumor e, conseqüentemente, identificação de moléculas que possam melhor direcionar o diagnóstico, prognóstico e sugerir estratégias terapêuticas mais eficientes para estes pacientes.

1.2 VIA DE SINALIZAÇÃO HEDGEHOG E CÂNCER

No processo de desenvolvimento e progressão tumoral, diversos mecanismos regulatórios, especialmente àqueles relacionados ao controle da divisão, diferenciação e morte celular são perdidos/alterados e estão relacionados ao desenvolvimento e manutenção de um fenótipo maligno, que envolve várias capacidades, tais como: manutenção da proliferação, evasão aos supressores de crescimento, resistência à morte celular, imortalidade replicativa, indução da angiogênese, invasão e metástase. Em adição, as células neoplásicas podem reprogramar o seu metabolismo energético de forma a melhor contribuir para o crescimento tumoral, bem como são capazes de escapar da vigilância imunológica (HANAHAN;WEINBERG, 2011).

O papel dos genes supressores tumorais e oncogenes na iniciação e progressão tumoral já está bem definido e, nas últimas décadas, foram alcançados avanços significativos na compreensão da patogênese do câncer. No entanto, apesar da evolução conceitual sobre a biologia dos tumores malignos, bem como um novo direcionamento em terapias personalizadas, um número substancial de neoplasias permanecem refratárias ao tratamento. Atualmente, acredita-se que as células tronco-tumorais desempenham um papel importante na resistência terapêutica e, conseqüentemente, recidiva da doença. Adicionalmente, sabe-se que as células tronco-tumorais são dependentes de mecanismos regulatórios primitivos e, dessa forma, devem ser compreendidas no contexto de vias de sinalização embrionárias (OREN; SMITH, 2017; SKODA *et al.*, 2018). Assim, tem sido demonstrado que a via de sinalização Hedgehog (HH) promove a proliferação de células-tronco tumorais, enquanto que o bloqueio desta via leva à diferenciação celular, bem como limita a auto-renovação (OREN; SMITH, 2017).

Inicialmente descrita em *Drosophila melanogaster* (NÜSSLEIN-VOLHARD; WIESCHAUS, 1980), a via HH foi conservada evolutivamente, embora estudos genéticos apontem que, diversas proteínas necessárias para a cascata sinalizadora em humanos, não tem um papel evidente em *Drosophila*. É bem estabelecido o papel da via HH no desenvolvimento embrionário e na organogênese de vertebrados e invertebrados (SKODA *et al.*, 2018), participando na formação de dentes (HARDCASTLE *et al.*, 1998), pulmões (GRINDLEY *et al.*, 1997), cólon, mama, esôfago (INGHAM; MCMAHON, 2001), próstata e estômago (CHARI; MCDONNELL, 2007). No

desenvolvimento do cérebro humano, por exemplo, a sinalização HH é essencial para regular a proliferação, sobrevivência e diferenciação das células neurais, de forma que a desregulação desta via acarreta defeitos congênitos graves, como holoprosencefalia, ciclopia e microcefalia (COHEN, 2012; AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013; FATTAHI; LANGROUDI; AKHAVAN-NIAKI, 2018).

Em humanos, os componentes centrais da via HH consistem nos três ligantes- *Sonic Hedgehog* (SHH), *Indian Hedgehog* (IHH) e *Desert Hedgehog* (DHH), o receptor transmembrânico *Patched* (PTCH1), a proteína reguladora positiva *Smoothened* (SMO) e os fatores de transcrição da família *Glioma-associated oncogene* (GLI1, GLI2 e GLI3) (HASSOUNAH; BUNCH; MCDERMOTT, 2012; AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013; OTSUKA *et al.*, 2015; SKODA *et al.*, 2018). Dentre os morfógenos que podem ativar a via, o SHH é o mais estudado e que parece exercer maior influência em tecidos já desenvolvidos, enquanto que DHH é predominantemente encontrado nas gônadas e IHH em tecidos ósseos. Adicionalmente, o efeito do morfógeno SHH é dose e distância-dependente (FATTAHI; LANGROUDIC; AKHAVAN-NIAKIC, 2018; XIN *et al.*, 2018).

Além de PTCH1, há outros receptores e co-receptores envolvidos na via HH, como o *Hedgehog-interacting protein* (HHIP) e *growth arrest-specific 1* (GAS1) que, quando ativados, atenuam a atividade HH. Outros, como as proteínas *Cdo* e *Boc* se ligam aos morfógenos HH e regulam positivamente a sinalização, embora ainda não tenha sido esclarecido se esses receptores interagem ou competem com PTCH1 (SKODA *et al.*, 2018; FATTAHI; LANGROUDI; AKHAVAN-NIAKI, 2018).

Classicamente, a via HH ocorre no cílio primário, cujo papel na regulação desta cascata sinalizadora tem sido mais recentemente estudado (HASSOUNAH; BUNCH; MCDERMOTT, 2012; AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013; OTSUKA *et al.*, 2015; SKODA *et al.*, 2018). Por exemplo, mutações no transporte intraflagelar, que normalmente funciona com movimentos retrógrados e anterógrados de moléculas no interior do cílio primário, resulta em perda de função da via HH em camundongos (COHEN, 2012). Esta organela tem forma microtubular, se estende da membrana plasmática e age como uma “antena”, a qual detecta sinais extracelulares e transmite estes sinais para o núcleo, a fim de gerar uma resposta celular. No cílio primário, os componentes centrais da via HH se localizam de maneiras diferentes, dependendo da

presença ou ausência do ligante. Assim, o provável mecanismo funcional deste compartimento subcelular é regular a via HH, por aumentar a concentração local e possibilitar interações protéicas necessárias para a ativação da cascata sinalizadora (HASSOUNAH; BUNCH; MCDERMOTT, 2012).

A sinalização HH é iniciada através da ligação de um dos morfógenos (SHH, IHH ou DHH) ao receptor transmembrânico PTCH1 (Figura 1). Na ausência de ligante, PTCH1 promove a supressão da atividade de SMO, impedindo a translocação desta proteína para o cílio primário. Os fatores de transcrição GLI (GLI1, GLI2 e GLI3) são codificados por genes distintos, sendo que a transdução do sinal intracelular da via HH depende da alteração de equilíbrio entre as formas ativadoras e repressoras de GLI (HASSOUNAH; BUNCH; MCDERMOTT, 2012; AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013; WILS; BIJLSMA, 2018).

Todas as três proteínas GLI apresentam um domínio de ativação C-terminal, enquanto que apenas GLI2 e GLI3 exibem também um domínio repressor, N-terminal. Dessa forma, GLI1 atua apenas como ativador transcricional. Na ausência da sinalização HH, o domínio ativador de GLI2 e GLI3 são fosforilados e seguem para clivagem via ubiquitina-proteassomo em suas formas repressoras (GLI_R), com a proteína *kinesin family member 7* (KIF7) auxiliando no processo. Na forma repressora, os fatores de transcrição são translocados para o núcleo, onde irão se ligar aos promotores dos genes alvos da via HH e, conseqüentemente, bloquear sua transcrição. No entanto, o processamento de GLI2 apresenta uma eficiência significativamente menor quando comparado com o de GLI3, sendo esta última proteína o principal repressor da via HH (WILS; BIJLSMA, 2018; FATTAHI; LANGROUDI; AKHAVAN-NIAKI, 2018).

Quando há interação do ligante HH com PTCH1, o receptor transmembrânico interrompe a inibição sobre SMO, permitindo, desta forma, que a sinalização HH seja transmitida. Ocorre o acúmulo ciliar de SMO, bem como a proteína repressora *Suppressor of Fused* (SUFU) libera a forma ativadora de GLI (GLI_A), a qual irá migrar para o núcleo e ativar a transcrição de genes alvo da via HH (HASSOUNAH; BUNCH; MCDERMOTT, 2012; SKODA *et al.*, 2018; FATTAHI; LANGROUDI; AKHAVAN-NIAKI, 2018). Dessa forma, esta cascata sinalizadora pode ser regulada a níveis extracelulares (morfógenos HH), membranares (receptores transmembrânicos),

citoplasmáticos (fatores de transcrição e seus inibidores) e nucleares (genes alvo da via) (FATTAHI; LANGROUDIC; AKHAVAN-NIAKIC, 2018). Vale ressaltar, entretanto, que os eventos previamente descritos ocorrem na sinalização clássica. Na ativação não canônica, existem mecanismos independentes de HH-PTCH-SMO-GLI que transmitem os sinais desta via de sinalização (SKODA *et al.*, 2018; WILS; BIJLSMA, 2018), desde mutações em componentes da via até ativação dos fatores de transcrição mediada por *crosstalk* com outras cascatas sinalizadoras, como TGF- β , EGFR, PI3K, IGF e TNF- α (XIN *et al.*, 2018). A ativação da via HH no contexto do cílio primário está ilustrada esquematicamente na Figura 1.

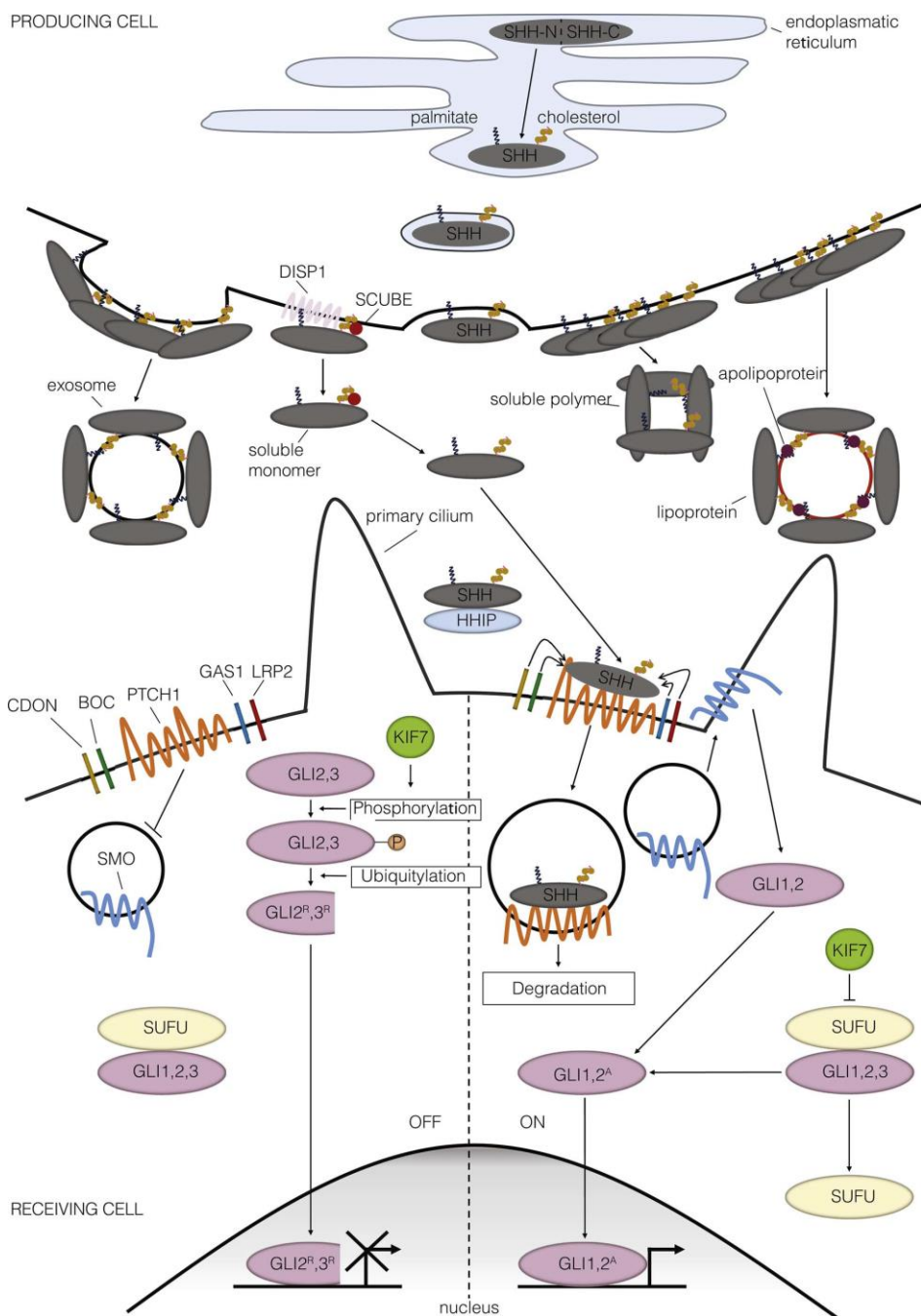


Figura 1. Componentes e o funcionamento da via Hedgehog em humanos. Na ausência do ligante HH, PTCH inibe a atividade de SMO. Na base do cílio primário, GLI2 e GLI3 são fosforilados e seguem para clivagem, resultando nas formas repressoras, processo auxiliado pela KIF7. GLI_R entra no núcleo e inibe a transcrição de genes alvo, enquanto que as formas ativadoras de GLI são mantidas no citoplasma através de SUFU. Na presença do ligante, PTCH é endocitado e degradado, permitindo o acúmulo ciliar de SMO, o qual resulta na dissociação entre fatores de transcrição GLI e SUFU, mudança para a forma ativadora (GLI_A), translocação desta para o núcleo e consequente ativação da transcrição de genes alvo. **Fonte:** WILS; BIJLSMA, 2018.

A atividade da via HH resulta na ativação de genes alvos envolvidos em uma variedade de funções celulares, como controle da proliferação e sobrevivência celular (Myc, Bcl-2, ciclina D1), transição epitélio-mesênquima (Snail, Zeb1, Zeb2) manutenção de células-tronco teciduais (BMP4, Wnt5a), angiogênese (VEGF, angiopoietina-1, angiopoietina-2) e destino celular (Sox2, Nanog) (MERCHANT; SAQUI-SALCES, 2014; FATTAHI; LANGROUDI; AKHAVAN-NIAKI, 2018). Adicionalmente, GLI1 e PTCH1 também são genes alvo da via, envolvidos assim em mecanismos de feedback (COHEN, 2012; MCMILLAN; MATSUI, 2012; MERCHANT; SAQUI-SALCES, 2014; SKODA *et al.*, 2018; XIN *et al.*, 2018).

Vias de sinalização que participam do desenvolvimento embrionário são normalmente mantidas em estado inativo em tecidos não-neoplásicos adultos (COHEN, 2012; MCMILLAN; MATSUI, 2012; AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013; OTSUKA *et al.*, 2015; SKODA *et al.*, 2018). Quando necessário, a via HH pode ser ativada, por exemplo, na cicatrização de feridas. Além disso, esta via está envolvida na manutenção de células-tronco teciduais que são importantes para o reparo tecidual em diversos órgãos (OTSUKA *et al.*, 2015; SKODA *et al.*, 2018; FATTAHI; LANGROUDIC; AKHAVAN-NIAKIC, 2018). Nesse contexto, a ativação da sinalização HH em tecidos adultos pode resultar em desenvolvimento tumoral (COHEN, 2012; MCMILLAN; MATSUI, 2012; AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013; FATTAHI; LANGROUDI; AKHAVAN-NIAKI, 2018).

A conexão inicial entre a expressão aberrante da via HH e o câncer foi descrita na síndrome de Gorlin-Goltz, uma condição rara na qual os indivíduos possuem mutações em componentes da via HH, permitindo a sua ativação constitutiva e, com isso, o desenvolvimento de diversos carcinomas basocelulares (GORLIN *et al.*, 1995). Essa identificação permitiu que, ao longo dos anos, estudos demonstrassem que a via HH tem importante papel na patogênese de diversas neoplasias malignas, como no câncer do trato gastrointestinal (INGHAM; MCMAHON, 2001), de pâncreas (THAYER *et al.*, 2003), pulmão (HWANG *et al.*, 2014), próstata (CHARI; MCDONNELL, 2007) e boca (CAVICCHIOLI BUIM; GURGEL *et al.*, 2011; HONAMI *et al.*, 2012; LEOVIC *et al.*, 2012), além de rabdomiossarcoma, meduloblastoma, glioblastoma, leucemias e linfomas (XIN *et al.*, 2018).

Apesar da relação entre a ativação da via HH e o desenvolvimento do câncer, alguns estudos têm apontado que a expressão de moléculas HH também pode estar relacionada a ativação de programas celulares que favorecem os mecanismos de reparo e consequente inibição da progressão tumoral, no câncer de bexiga (LEE *et al.*, 2014; SHIN *et al.*, 2014).

Apesar de mutações em componentes da via HH, como PTCH1, SMO e SUFU, serem descritas em tumores humanos, existem vários tipos de câncer que não apresentam essas alterações genéticas. Nestes casos, é a superexpressão dos morfógenos que resulta numa sinalização autócrina, parácrina ou parácrina-reversa (Figura 2) e, conseqüentemente, num aumento de atividade da via de sinalização HH (OREN; SMITH, 2017; SKODA *et al.*, 2018; FATTAHI; LANGROUDI; AKHAVAN-NIAKI, 2018). Dessa forma, a ativação desta via e sua contribuição para o desenvolvimento tumoral pode ser de forma autonôma/independente do ligante ou dependente de ligante (SKODA *et al.*, 2018; XIN *et al.*, 2018; NIYAZ; KHAN; MUDASSAR, 2019).

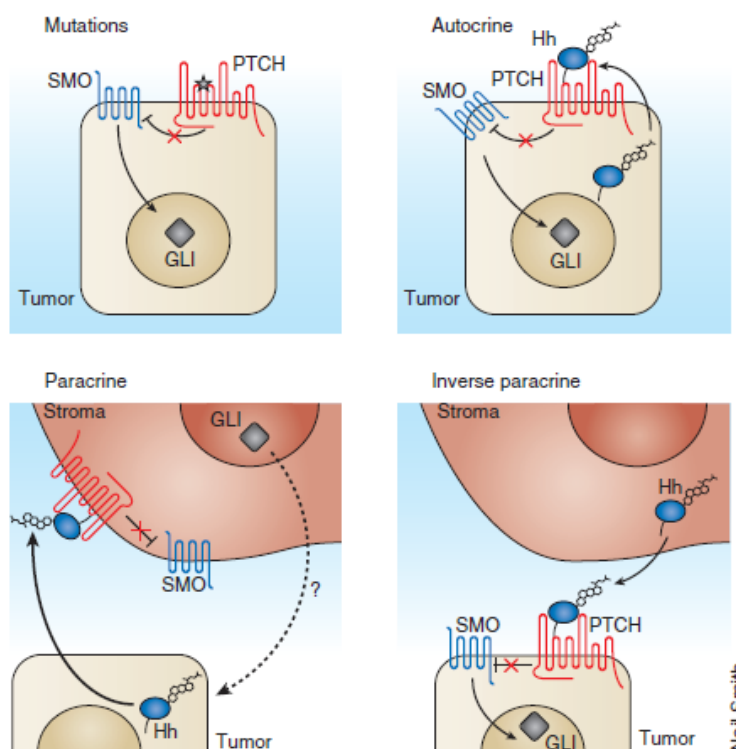


Figura 2. Mecanismos de ativação da via HH no câncer. Através de mutações em um dos componentes da via (PTCH, SMO, SUFU), sendo independente de ligante; sinalização dependente de ligante, que pode ser autócrina, quando a própria célula tumoral produz o morfógeno; parácrina, quando a célula tumoral ativa a célula estromal através do ligante produzido e esta, por sua vez, estimula o crescimento do tumor; parácrina-reversa, quando a célula estromal produz o ligante HH para ativar a célula tumoral. **Fonte:** AMAKYE *et al.*, 2013.

Devido ao papel desta via em neoplasias humanas, seus componentes têm sido considerados como potenciais alvos terapêuticos (COHEN, 2012; MCMILLAN; MATSUI, 2012; AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013; CONI; INFANTE; GULINO, 2013; OREN; SMITH, 2017; SKODA *et al.*, 2018) e estudos têm sido direcionadas no sentido de desenvolver e reposicionar fármacos, tais como inibidores de SMO e antagonistas de GLI (OTSUKA *et al.*, 2015; SKODA *et al.*, 2018; FATTAHI; LANGROUDI; AKHAVAN-NIAKI, 2018). Apesar de alguns inibidores já serem utilizados na prática clínica, tal como o vismodegib, esses fármacos ainda possuem problemas como indução de alta resistência terapêutica, eficiência reduzida em tumores sólidos, além de efeitos tóxicos sistêmicos (SEKULIC *et al.*, 2012). Nesse sentido, o desenvolvimento e descoberta de novos inibidores de HH que possam ser utilizados em poliquimioterapia é uma área crescente na pesquisa em câncer (XIN *et al.*, 2018).

Embora já bem descritos em outros tipos de câncer, a participação da via HH em eventos biológicos importantes para o desenvolvimento tumoral, tais como a proliferação, angiogênese e ativação estromal, ainda não são amplamente conhecidos no contexto do CEB. Estudos preliminares de nossa equipe, por exemplo, já demonstraram que moléculas HH são detectadas tanto em células tumorais quanto estromais como, por exemplo, macrófagos CD163 e células endoteliais CD105 (VALVERDE *et al.*, 2016). Dados mais recentes (GUIMARÃES, V.S.N., PGPAT, 2018), por sua vez, demonstraram que os fibroblastos associados ao câncer (no inglês, cancer associated fibroblasts – CAF) também podem participar da sinalização HH no contexto do CEB.

1.3 FIBROBLASTOS ASSOCIADOS AO CÂNCER

Por muito tempo, o câncer foi compreendido numa visão reducionista, onde os tumores seriam uma coleção de células neoplásicas e os mecanismos biológicos da doença poderiam ser elucidados, apenas, com o conhecimento das propriedades destas células (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Especialmente na última década, o estroma tumoral tem despontado como um compartimento funcional importante na ativação e/ou manutenção de muitas características das células malignas, refletindo numa percepção do câncer como uma doença de microambiente, no qual interagem células tumorais propriamente ditas e células ditas genotipicamente normais (fibroblastos, células imunes, células endoteliais), dentro da matriz extracelular. Nesse contexto, as neoplasias

malignas são doenças complexas e que não dependem apenas de eventos mutagênicos em células malignas, mas também das interações entre estroma e células malignas (PIETRAS; ÖSTMAN, 2010; HANAHAN; WEINBERG, 2011; GASCARD; TLSTY, 2016; ZHANG; PENG, 2018).

No microambiente tumoral, os fibroblastos são encontrados em várias proporções em diferentes tipos de neoplasias malignas, constituindo, na maioria das vezes, a célula predominante dentre a população de células estromais (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Durante o desenvolvimento e progressão tumoral, os fibroblastos são convertidos fenotipicamente das células progenitoras, principalmente através de interações com células malignas circunjacentes e, dessa forma, resultam nos CAFs (MEZAWA; ORIMO, 2016; GASCARD; TLSTY, 2016). Nesse contexto, os CAFs podem ter origem a partir de diversos tipos celulares, como células-tronco tumorais ou células mesenquimais da medula óssea, células musculares lisas, adipócitos, células epiteliais (transição epitélio-mesênquima), fibroblastos residentes, pericitos e células endoteliais (TAKEBE *et al.*, 2013).

A população de CAFs apresenta características diferentes dos fibroblastos normais, como positividade para *α -smooth muscle actin* (α -SMA), um dos marcadores mais confiáveis para este fenótipo, mas também de outras proteínas, como tenascina-C, *platelet-derived growth factor receptor-alpha/beta* (PDGFR α/β), *fibroblast activation protein* (FAP), *neuronglial antigen 2* (NG2), e *fibroblast surface protein* (FSP-1)/S100A4 (MEZAWA; ORIMO, 2016; GASCARD; TLSTY, 2016). Além da positividade para alguns marcadores, os CAFs apresentam discretas diferenças na morfologia celular, quando comparados aos fibroblastos normais. Enquanto os fibroblastos maduros normalmente são alongados, os CAFs geralmente se apresentam como fibroblastos mais imaturos, com um aspecto mais largo e nucléolo proeminente (GASCARD; TLSTY, 2016). Dentre os processos que podem contribuir para a aquisição de um fenótipo de CAF destacam-se as alterações epigenéticas (metilação do DNA, modificação de histonas e na estrutura do nucleossomo), além de alterações na expressão de microRNAs (GASCARD; TLSTY, 2016; MEZAWA; ORIMO, 2016).

No contexto do desenvolvimento e progressão do câncer, os CAFs produzem diversos fatores de crescimento e citocinas pró-tumorais, bem como aumentam a capacidade contrátil tecidual, facilitando a remodelação da matriz extracelular. Dessa

forma, os CAFs influenciam características essenciais do tumor (Figura 3), como a proliferação das células neoplásicas, apoptose, invasão, metástase, manutenção de células tronco-tumorais, angiogênese, imunossupressão e resistência terapêutica (MEZAWA; ORIMO, 2016; ZHANG; PENG, 2018). Ainda, o papel dos CAFs já é bem estabelecido em alguns tipos de neoplasias humanas, como no câncer gástrico (ZHANG; PENG, 2018), de mama (YU *et al.*, 2014) e pulmão (ABE; TANAKA, 2016), sendo que essas células podem modular o comportamento biológico tumoral, como a capacidade de proliferar, metastatizar e invadir outros órgãos (ZHANG; PENG, 2018).

Os CAFs representam o principal tipo celular no estroma tumoral, compartimento no qual essas células serão importantes fontes dos componentes da matriz extracelular do tecido conjuntivo, bem como de vários tipos de enzimas proteolíticas. Nesse sentido, principalmente em carcinomas em estágios avançados, os CAFs podem contribuir na formação de um estroma desmoplásico (HANAHAN; WEINBERG, 2011; GASCARD; TLSTY, 2016), o qual está associado a um pior prognóstico dos pacientes (MEZAWA; ORIMO, 2016).

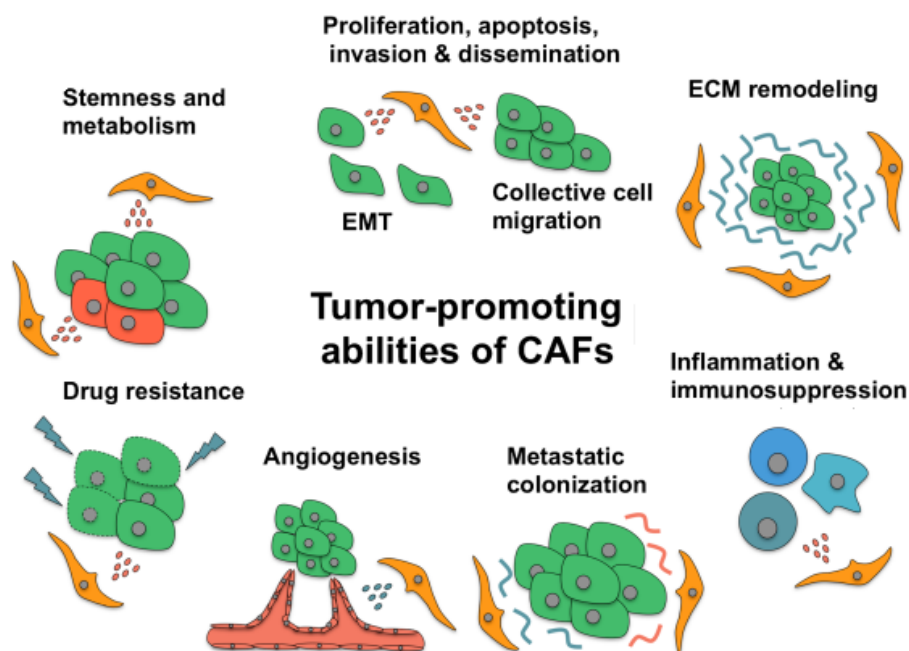


Figura 3. Funções dos CAFs no microambiente tumoral. De forma a favorecer a progressão tumoral, os CAFs adquirem habilidades como influenciar a proliferação de células neoplásicas, metabolismo celular, remodelação da matriz extracelular, angiogênese, imunossupressão, disseminação e colonização metastática, bem como indução de resistência às drogas. **Fonte:** MEZAWA; ORIMO, 2016.

Segundo Potter (2007), o estudo de vias de sinalização e ativação aberrante no câncer aponta para uma participação ativa de morfógenos na microarquitetura tecidual e *crosstalk* entre células fenotipicamente diferentes, em um mesmo tecido. Células estromais podem ser fonte de morfógenos e, dessa forma, podem ter participação fundamental na proliferação, angiogênese, transição epitélio-mesênquima e outros eventos no câncer (POTTER, 2007).

A participação da via HH na ativação dos CAFs já foi descrita (TAKEBE *et al.*, 2013; VALENTI *et al.*, 2017) e, ainda, na produção de ligantes HH que atuam de forma parácrina, em outros tipos celulares, como a população de células neoplásicas, favorecendo mecanismos relacionados a progressão tumoral (ABE; TANAKA, 2016). Recentemente, foram identificados receptores e componentes intracelulares da via HH em CAFs, indicando que essas células são capazes de transduzir a sinalização iniciada pelos morfógenos HH e/ou secretar os ligantes da via para o ambiente tecidual (ABE; TANAKA, 2016; WEI *et al.*, 2017), inclusive no CEB (GUIMARÃES, V.S.N., PGPAT, 2018).

No câncer de boca, alguns estudos já demonstraram que os CAFs estão relacionados a um comportamento biológico mais agressivo deste tipo de tumor, como presença de invasão vascular, linfática e perineural, potencial proliferativo das células neoplásicas, metástase linfonodal e menor sobrevida (KELLERMANN *et al.*, 2007; KELLERMANN *et al.*, 2008; SOBRAL *et al.*, 2011; DOURADO *et al.*, 2018). Em CEB, o perfil de moléculas secretadas por CAFs é diferente do apresentado pelos fibroblastos normais, especialmente com relação às proteínas envolvidas na remodelação da matriz extracelular (BAGORDAKIS *et al.*, 2016). Adicionalmente, já foi demonstrado que as células de CEB podem induzir a diferenciação de fibroblastos normais em CAFs, principalmente através da secreção de TGF- β (KELLERMANN *et al.*, 2008). Ainda, Rodrigues *et al.* (2015) encontraram uma maior população de CAFs em CEBs moderadamente e pouco diferenciados, o que pode indicar uma relação entre a densidade dessas células e grau histológico tumoral.

Embora a maioria dos fármacos atuais utilizados no tratamento do câncer afete diretamente o crescimento e a sobrevivência das células neoplásicas, evidências têm demonstrado que muitos componentes do microambiente tumoral são críticos para a carcinogênese. Dessa forma, o estroma tumoral é um potencial alvo terapêutico, apesar

da sua composição de células genotipicamente “normais”. Nesse sentido, diversas estratégias tem sido empregadas em estudos pré-clínicos na tentativa de eliminar ou bloquear os CAFs, como, exemplo, inibição farmacológica de receptores de PDGF, via de sinalização HH ou proteína de ativação de fibroblastos (PIETRAS; ÖSTMAN, 2010; GASCARD; TLSTY, 2016; MPEKRIS *et al.*, 2017).

Diante do exposto, observa-se que a via HH participa na patogênese de diversos tumores humanos, incluindo o CEB, apresentando um importante papel na formação de novos vasos sanguíneos, proliferação e sobrevivência das células neoplásicas. Ainda, os componentes desta cascata sinalizadora influenciam o microbiente tumoral e, conseqüentemente, as células presentes neste, como os CAFs, os quais podem transduzir a via e contribuir com a progressão tumoral.

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

O câncer de boca é considerado um problema de saúde pública mundial, especialmente pela alta incidência e morbi-mortalidade, apesar da sua fácil prevenção, detecção precoce e avanços no tratamento. Nesse contexto, por se configurar como uma doença agressiva e que, muitas vezes, é diagnosticada em estágios avançados, a taxa de sobrevivência dos pacientes é baixa, cerca de 30% em 5 anos (ADRIEN *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2014; SAGGI *et al.*, 2018). Dessa forma, estudos sobre a patogênese do CEB colaboram para a identificação de moléculas que possam funcionar como biomarcadores de diagnóstico e prognóstico, bem como alvos de terapias oncológicas.

Vias de sinalização que participam do desenvolvimento embrionário são normalmente mantidas em estado inativo em tecidos não-neoplásicos adultos e a reativação destas pode contribuir para o desenvolvimento tumoral (COHEN, 2012), demonstrado, inclusive, no câncer de boca (CAVICCHIOLI BUIM; GURGEL *et al.*, 2011; HONAMI *et al.*, 2012; LEOVIC *et al.*, 2012). Além de influenciar nos mecanismos biológicos do CEB humano, a via HH está ativada em etapas pré-malignas (DIAS *et al.*, 2016) e no estroma tumoral (VALVERDE *et al.*, 2016) deste tipo de tumor. Considerando-se que o bloqueio da via HH no tratamento do câncer é um campo de pesquisa promissor (COHEN, 2012; MCMILLAN; MATSUI, 2012; AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013; CONI; INFANTE; GULINO, 2013; OREN; SMITH, 2017; SKODA *et al.*, 2018), entender os mecanismos de participação das moléculas HH no microambiente e progressão tumoral é um campo de interesse crescente.

Atualmente, o câncer é compreendido como uma doença de microambiente, ou seja, as células estromais também são importantes para o desfecho de diversos eventos biológicos associados às neoplasias malignas, como proliferação celular, angiogênese tumoral e transição epitélio-mesênquima (POTTER, 2007; PIETRAS; ÖSTMAN, 2010; MEZAWA; ORIMO, 2016; GASCARD; TLSTY, 2016). Dentre as células presentes no estroma tumoral, os CAFs são predominantes e estão associados à diversos eventos no câncer. Estas células, além de fonte de fatores de crescimento, contribuem para os mecanismos de angiogênese, invasão e metástase (POTTER, 2007; PIETRAS; ÖSTMAN, 2010; MEZAWA; ORIMO, 2016; ERDOGAN; WEBB, 2017; ZHANG; PENG, 2018).

Desde 2009, nossa equipe tem se empenhado em avaliar a participação da via HH carcinogênese oral. Inicialmente, descrevemos a ativação desta cascata sinalizadora em amostras tumorais humanas de CEB (CAVICCHIOLI BUIM; GURGEL *et al.*, 2011), bem como em lesões displásicas orais (DIAS *et al.*, 2016). Além disso, detectamos a presença do ligante IHH em macrófagos CD163+ (VALVERDE *et al.*, 2016). Células estromais são potenciais fontes de ligantes HH no contexto dos tumores malignos, como no de mama (MPEKRIS *et al.*, 2017) e pulmão (ABE; TANAKA, 2016) e resultados recentes de nossa equipe (GUIMARÃES, V.S.N., PGPAT, 2018) apontam que fibroblastos associados ao CEB (S100A4+, α -SMA+ e GLI1+) são importantes para a ativação estromal e sinalização parácrina para as células tumorais e endoteliais.

Diante do exposto, a hipótese deste trabalho é de que os CAFs contribuem para a proliferação celular e angiogênese tumoral, através da via de sinalização HH, em CEB.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a participação de CAFs na ativação da via HH, proliferação celular e angiogênese em CEB.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Correlacionar a população de CAFs com a proliferação celular e densidade de vasos CD105+, em amostras de CEB humano;
- Analisar o perfil de expressão de genes HH em células de CEB e fibroblastos, bem como a resposta das células malignas mediada por SHH recombinante;
- Avaliar o efeito do meio condicionado por CAFs na expressão de genes relacionados a atividade da via HH e genes alvos envolvidos em proliferação celular e angiogênese tumoral, em células de CEB, antes e após o bloqueio farmacológico de GLI1 nos CAFs;
- Avaliar os efeitos do GANT61 na expressão de genes relacionados à via HH, proliferação celular e angiogênese em células de CEB, antes e após o bloqueio farmacológico de GLI1 nas células malignas;
- Estudar o efeito do meio condicionado por CAFs na proliferação de células de CEB e no processo de angiogênese tumoral, antes e após bloqueio farmacológico de GLI1 em CAFs.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 IMUNO-HISTOQUÍMICA

A fim de caracterizar, em CEB humanos, a relação dos CAFs com a proliferação celular e angiogênese tumoral, nove casos do tumor primário foram obtidos a partir da cirurgia para o tratamento desta 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 morfológica 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 imunomarcção para os anticorpos S100A4 (*Fibroblast Specific Protein*), α -SMA (*alpha-Smooth Muscle Actin*), CD105 (*endogлина*) e MCM3 (*minichromosome maintenance complex component 3*). 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
α -SMA	Dako	1A4	1:200	Citrato pH 6,0	Câncer de boca
S100A4	Novus Biologicals	1C4	1:1000	Citrato pH 6,0	Câncer de mama
CD105	Dako	SN6h	1:50	Citrato pH 9,0	Placenta
MCM3	Dako	101	1:50	Citrato pH 9,0	Câncer de mama

As secções histológicas seguiram para desparafinização em xilol e re-hidratação com 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 (α -SMA) em temperatura ambiente ou overnight (S100A4 e CD105), 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 bálsamo do Canadá natural. Para o controle negativo, cada anticorpo primário foi substituído por soro normal de mesmo isotipo.

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). Foram selecionadas um mínimo de cinco e máximo de sete áreas representativas dos tumores e, em cada uma destas, considerou-se uma proporção mínima de 50% de estroma. Cabe ressaltar que estas áreas supracitadas foram escolhidas para um único marcador (α -SMA). Em seguida, estas mesmas áreas foram selecionadas para os marcadores: S100A4, CD105 e MCM3.

A avaliação das imunomarcações foi realizada por um patologista oral e levou-se em consideração a localização das proteínas: membranas e/ou citoplasmática e citoplasmática e/ou nuclear (apenas para a proteína MCM3). Em seguida, para os marcadores α -SMA, S100A4 e MCM3 foi atribuído um escore imuno-histoquímico, como segue: escore negativo (-), <5% de células imunomarcadas; escore 1+, 5-25%; escore 2+, 26-50% e escore 3+ >51% de células imunopositivas. Para a proteína CD105, foram considerados positivos qualquer vaso sanguíneo que apresentasse lúmen e coloração acastanhada. Com auxílio do Aperio Image Scope (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha), as áreas em aumento de 200x foram medidas, os vasos sanguíneos contados e o resultado final obtido como microdensidade vascular (MDV) por mm². Em seguida, foi atribuído um escore para o valor da MDV, conforme descrito a seguir:

escore negativo (-), 0-7,5 vasos/mm²; escore 1+, 8-36,5 vasos/mm²; escore 2+, 37-73 vasos/mm² e escore 3+, 74-146 vasos/mm².

4.2 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS EM CULTURA

Para a realização deste estudo foram utilizadas linhagens de CEB (CAL27, SCC4, SCC9 e HSC3 – American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA, EUA) (Tabela 2). Além das linhagens tumorais de CEB, foram utilizadas culturas primárias de fibroblastos normais da cavidade bucal (NOF) e de CAF, isolados na Faculdade de Odontologia da UNICAMP (Piracicaba, SP, Brasil), pelo Prof. Ricardo Della Coletta, conforme descrito posteriormente.

Tabela 2. Dados sobre as linhagens de CEB utilizadas.

Linhagem	Sítio do tumor	Idade	Gênero	Potencial metastático
CAL27	Língua	56	Masculino	Não
SCC4	Língua	55	Masculino	Não
SCC9	Língua	25	Masculino	Sim
HSC3	Língua	64	Masculino	Sim

As linhagens celulares foram cultivadas em garrafas para cultura de células (75 cm³, volume de 250 mL), em meio DMEM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e Penicilin-Streptomycin 1% (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). As células foram mantidas em estufas com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C e acompanhamento diário do crescimento celular com a utilização de microscópio invertido. A manutenção das células com tripsinização foi realizada sempre que o crescimento celular atingiu a confluência necessária, ou seja, preencheu 70 a 80% do volume total da garrafa de cultura. As linhagens utilizadas neste estudo foram

testadas mensalmente para contaminação com micoplasma através do MycoAlert™ Plus (Lonza, Basileia, Suíça).

4.3 OBTENÇÃO DE FIBROBLASTOS ASSOCIADOS AO CÂNCER, FIBROBLASTOS NORMAIS E MEIO CONDICIONADO

A população de CAF foi obtida a partir da colaboração com Dr. Ricardo Della Coletta, sendo que o isolamento e caracterização destas células estão detalhadamente descritos em estudo prévio (SOBRAL *et al.*, 2011). Basicamente, fragmentos de tecido de pacientes portadores de CEB, localizado em língua, foram removidos e divididos em duas partes: uma secção foi fixada em formol e embebida em parafina para posterior coloração com hematoxilina-eosina e imunohistoquímica para o anticorpo α -SMA; outro fragmento foi lavado com PBS e incubado em meio DMEM suplementado com 10% de soro de SFB e antibiótico, a 4°C.

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

Neste estudo, a cultura primária de CAF foi utilizada por no máximo 12 passagens. A manutenção do fenótipo de CAF foi avaliada através da marcação imunocitoquímica para o anticorpo α -SMA. Para uma análise comparativa, foi utilizada cultura primária de fibroblastos normais da cavidade bucal (NOF – do inglês, *normal oral fibroblasts*), isolados a partir de fragmentos de gengiva de paciente saudável, utilizando a mesma técnica descrita anteriormente, na Faculdade de Odontologia da UNICAMP, e cedida pelo Prof. Ricardo Della Coletta. Essas células foram mantidas em cultura por até 12 passagens.

Para o preparo do meio condicionado (MC) por CAF e NOF, os fibroblastos foram mantidos em cultura até atingir uma confluência de 70-80%; a garrafa de cultura

foi lavada com salina, no intuito de remover resíduos de SFB e então foi colocado meio DMEM sem soro, por 72 horas. Após esse período, o meio foi coletado, centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm para remoção de debris celulares e armazenado em alíquotas de 1mL, em temperatura de -80°C.

4.4 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para análise da expressão de um painel mínimo de proteínas da via HH em células de CEB (HSC3 e CAL27), foi realizada a imunofluorescência com os anticorpos SHH, PTCH1, SMO e GLI1. Para as células de CAF e NOF, foram utilizados os anticorpos SHH, GLI1, α -SMA e S100A4. As células foram distribuídas em poços fixados em uma lâmina específica para o cultivo de células (CellView Cell Culture Slide, Greiner Bio-One), incubadas *overnight* para permitir a adesão. Após 24 horas, o meio foi retirado, as células foram fixadas com acetona/metanol gelado por 10 minutos e, posteriormente, lavadas com PBS. Após as lavagens, as lâminas seguiram para o bloqueio de sítio inespecífico, onde foram incubadas em solução de PBS 1x + BSA a 1% por 30 minutos. Dados sobre fabricante, clone e diluição dos anticorpos utilizados estão descritos na Tabela 3. Os anticorpos primários foram diluídos em PBS/BSA a 1% nas concentrações e tempo segundo orientações dos fabricantes.

Tabela 3. Dados do fabricante, clone e diluição dos anticorpos utilizados.

Anticorpo	Marca	Clone	Diluição
SHH	Novus Biologicals	5H4	1:500
PTCH1	Novus Biologicals	Policlonal	1:500
SMO	Abcam	Policlonal	1:1000
GLI1	Novus Biologicals	Policlonal	1:500
GLI2	Abcam	Policlonal	1:500
α-SMA	DAKO	1A4	1:250
S100A4	DAKO	Policlonal	1:500

Após o tempo de incubação do anticorpo primário, as células foram lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo secundário, IgG goat anti-rabbit (1:1000; Molecular

Probes, A11008) ou IgG goat anti-mouse (1:1000; Molecular Probes, A11001), conjugados à Alexa Fluor 488. Após o tempo de incubação, os núcleos das células foram corados com o agente intercalante de DNA fluorescente 4',6-diamidino-2-phenilindol diidroclorido (DAPI, Molecular Probes, Eugene, OR) (5µg/mL) durante 10 minutos à temperatura ambiente. As células foram então lavadas com PBS, e com o auxílio do microscópio confocal A1+ (Nikon, Tóquio, Japão) foram visualizadas e fotografadas. Para todas as reações, os controles negativos foram realizados seguindo os mesmos procedimentos, com exceção da incubação com o anticorpo primário.

4.5 WESTERN BLOT

Após o cultivo das células de CEB (HSC3 e CAL27), CAF e NOF até aproximadamente 70-80% de confluência, as células foram lavadas com PBS e a lise celular para extração das proteínas foi realizada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4 contendo Triton X-100 a 1%, NaCl 150 mM, EGTA 0,5 mM, EDTA 0,5 mM e cocktail anti-protease (Complete Pro- inibidor Cocktail Tablets, Roche, França). Os extratos protéicos (50 µg) foram separados por SDS-PAGE e transferidos para membranas de nitrocelulose Hybond-C Extra (GE Healthcare, EUA). Para as células de CEB, foram utilizados os anticorpos SHH, PTCH1, SMO e GLI1, enquanto que para as células de CAF e NOF foram avaliados SHH, GLI1, α -SMA e S100A4, de acordo com as informações descrita 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). A detecção do sinal foi realizada com o Sistema de detecção de quimioluminescência ECL + (PerkinElmer, França). O controle utilizado foi o anticorpo β -actina.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS CULTURAS DE CÉLULAS (CEB, CAF E NOF) QUANTO AO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE COMPONENTES DA VIA HH

A fim de caracterizar o perfil de expressão gênica de componentes da via HH (SHH, PTCH1, SMO, SUFU, HHIP, GLI1, GLI2 e GLI3), as células CAL27, SCC4, SCC9, HSC3 (linhagens de CEB), CAF e NOF foram mantidas sem soro por 24h, uma vez que a presença do SFB pode exercer efeito inibitório sobre a atividade HH

(FERRUZI *et al.*, 2012). Após este período, as células foram coletadas em suspensão (10 mL) e seguiram para extração de RNA.

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 separadas. 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, 600 µL do tampão de lise RLT foi transferido para 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 600 µL de etanol 70% e o mesmo misturado gentilmente à amostra, com auxílio de pipeta. Após a passagem para microcoluna de sílica e lavagens com tampões do kit (RW1 e RPE), o RNA foi eluído com 20 µL de água Rnase/Dnase Free 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. Cada um dos poços possuía: 10ng/µL de cDNA da amostra (8µL), 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 todas os tipos celulares supracitados e a escolha do gene mais estável foi baseada através da análise da amplificação destes, no programa operacional Gene Expression Suite *System SDS* (AppliedByosistemas, USA). Após as corridas de amplificação os valores de *Quantification Cycles* (Cqs) foram obtidos com o auxílio do Programa Operacional *ViiA7 System SDS* (AppliedByosistemas™, 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 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DA VIA HH EM CÉLULAS DE CEB APÓS ESTÍMULO COM LIGANTE SHH RECOMBINANTE

Para caracterizar a resposta das células de CEB a estímulos mediados por SHH, as células HSC3 e CAL27 foram estimuladas com o SHH recombinante. A escolha destas linhagens celulares baseou-se na análise prévia da caracterização da via HH, a qual demonstrou que células HSC3 não apresentaram níveis detectáveis de RNAm SHH e, portanto, era esperado uma resposta importante ao estímulo exógeno; enquanto que CAL27 apresentou expressão do gene SHH e, por isso, permitiria avaliar o efeito aditivo/sinérgico dos ligantes endógeno e exógeno.

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. Células tumorais incubadas com PBS foram o controle negativo, 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 600 µL da solução lise (RLT) e soltas da placa com o auxílio de um *cell scraper*. Em seguida, as células já imersas no tampão de lise foram retiradas da placa e transferidas para um microtubo, onde a amostra foi homogeneizada durante 1 minuto, com auxílio do vórtex e através de uma agulha de 0.9 mm, acoplada a uma seringa. 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 HH após o estímulo com o ligante SHH exógeno foi avaliada através de reações de qPCR, utilizando TaqMan Gene Expression AssaysTM 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 ENSAIO DO ALAMAR BLUE PARA AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO GANT61

Com o objetivo de avaliar se há a participação da via HH nos processos de proliferação celular e angiogênese mediados por CAF, foi realizado o bloqueio desta cascata sinalizadora no CAF, utilizando o inibidor GANT61, que atua bloqueando a ativação dos fatores de transcrição GLI. Nesse sentido, 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 cavidades numa densidade de $0,7 \times 10^5$ células/mL, em um volume de 100 µL. O

inibidor GANT61 (0,19 a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi dissolvido em salina, adicionadas em cada poço e incubadas por 72 horas. O 5-Fluorouracil (5-FU) (Sigma-Aldrich, USA) foi utilizado como controle positivo com concentrações variando de 0,19 a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 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 a cada poço. As absorvâncias foram mensuradas nos comprimentos de onda de 570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado) utilizando leitora de placas Spectra Max 190. Os valores de CI_{50} e o intervalo de confiança de 95% foram obtidos por regressão não linear de três ensaios independentes, realizados em duplicata.

Para confirmar o bloqueio da via HH após incubação do CAF com o GANT61, foi realizado qPCR em tempo real para genes alvos da via (PTCH1, GLI1 e GLI2), sendo que estes experimentos foram realizados como descrito nos itens 4.6.1 e 4.6.2.

4.9 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS A VIA HH, PROLIFERAÇÃO CELULAR E ANGIOGÊNESE EM CAL27 ANTES E APÓS TRATAMENTO DE CAF COM GANT61

Para os experimentos subsequentes, foi utilizada a linhagem CAL27, uma vez que a mesma apresentou níveis importantes de expressão (RNAm) de SHH, PTCH1, GLI1, e, em contrapartida, menores níveis de repressores, como HHIP, SUFU e GLI3.

Buscando avaliar o efeito do meio condicionado por FACs na expressão de genes relacionados à via HH, proliferação celular e angiogênese tumoral em uma linhagem de CEB (CAL27), 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 com meio condicionado por CAF, diluídos a 50% em meio DMEM, e mantidas nessa condição por 24h, 48h e 72h. O controle negativo foi constituído por células tumorais incubadas com meio condicionado por NOF.

Além disso, este ensaio também foi realizado, sob as mesmas condições, após o bloqueio farmacológico de GLI1 em CAF. Para isso, CAFs foram mantidos em cultura até atingir cerca de 70-80% de confluência e, a seguir, foram tratados com o inibidor de GLI1, GANT61. As concentrações utilizadas foram baseadas no valor de

CI50 obtido para este composto neste tipo celular. Após esse período, o meio condicionado foi obtido da mesma forma descrita previamente.

As células tumorais CAL27 também foram tratadas com GANT61, na mesma concentração calculada para os CAFs, uma vez que a CI50 para estas células foi indeterminado (>50ug/mL). Sendo assim, utilizando o racional de que o tratamento oncológico não é compartimentalizado e células malignas e do estroma são afetadas ao mesmo tempo, quando da quimioterapia, avaliamos o efeito do GANT61 em genes relacionados a proliferação e angiogênese.

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 (antes e após tratamento com GANT61), foi realizado o procedimento de extração de RNA e a etapa de transcrição reversa de acordo com o protocolo descrito no item 4.6.1.

A expressão de genes relacionados à via HH, proliferação celular e angiogênese 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), Myc (Hs00153408_m1), Ciclina D1 (Hs00765553_m1), VEGF (Hs00900055_m1) e HIF-1 (Hs00153153_m1), assim como para o gene referência B2M (Hs99999907_m1). Para a análise da expressão dos genes supracitados, o grupo DMEM + GANT61 foi considerado o calibrador e foi aplicada a fórmula $2^{-\Delta\Delta CQ}$ para o cálculo do RQ.

4.10 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR EM CAL27

Para estudar os efeitos do meio condicionado por CAF sobre a proliferação da linhagem CAL27, 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 foram tratadas com meio condicionado por CAF antes e após tratamento com GANT61, diluído a 50% em meio DMEM, por 24 horas. O controle negativo consistiu de células

tumorais incubadas com meio condicionado por NOF. Os experimentos foram realizados em duplicatas e repetidos pelo menos três vezes.

A determinação do conteúdo de DNA nuclear da célula, que reflete as fases do ciclo celular, foi avaliado por citometria de fluxo, utilizando o IP (iodeto de propídio) como agente fluorógeno. Após o período de incubação com o meio condicionado, o sobrenadante foi coletado, os poços foram lavados com solução salina, as células foram tripsinizadas e centrifugadas juntamente com o sobrenadante. Em seguida, as células foram diluídas com a solução de permeabilização (200 μ L) contendo 0,1 % de triton X-100, 0,1% de citrato de sódio, 2 μ g/mL de IP e 100 μ g/mL de RNase em água destilada, na ausência de luz e a temperatura ambiente. Após 30 minutos, as células foram adquiridas e analisadas em citômetro de fluxo BD LSRFortessa através do software BD FACSDiva versão 6.2 (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, EUA). As fases do ciclo celular foram obtidas utilizando o software Flowjo, versão 10 (Flowjo LCC, Ashland, OR, EUA). Os debris celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

4.11 ENSAIO DE ANGIOGÊNESE

Para avaliar o potencial dos diferentes estímulos (meio condicionado de NOF e meio condicionado de CAF antes e após tratamento com GANT61) em promover a formação de novos vasos, células endoteliais da linhagem EA.hy926 (ATCC, Manassas, VA, EUA) foram utilizadas para realização do ensaio de angiogênese.

Em uma placa de 96 poços foi adicionado 40 μ L de matriz extracelular (Geltrex, Life Technologies), a qual foi incubada por 30 minutos, a 37°C, para a sua completa solidificação. Em seguida, células endoteliais na concentração de 4×10^4 células foram distribuídas sob a matriz (Geltrex) já solidificada, com os seguintes meios: a) meio EGM2-MV (controle positivo); b) meio condicionado de NOF, diluído a 50% em meio DMEM; c) meio condicionado de CAF, diluído a 50% em meio DMEM, d) meio condicionado de CAF tratado com GANT61, diluído a 50% em meio DMEM. A placa foi incubada *overnight*, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂. Posteriormente, foi feita a aquisição das imagens no Operetta (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA), sendo obtidas 30 fotos de cada poço. O conjunto das fotos gerou uma única imagem que, por sua vez,

foi utilizada para a quantificação do ensaio de angiogênese, através da ferramenta online Tube Formation ACAS Image Analysis (IBID®). Características como a extensão dos vasos, número de ramificações, total de comunicações e pontos de entrelaçamento foram consideradas pelo *software*.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram organizados inicialmente em planilhas do programa operacional Microsoft Excel e, a seguir, analisados nos programas *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, seguido pela correção de Welch.

A correlação de ϕ (Phi) foi utilizada para avaliar a associação entre os marcadores imuno-histoquímicos. Os coeficientes de ϕ variam de -1 a +1, sendo que estes valores representam uma correlação perfeita negativa ou positiva, respectivamente. Neste aspecto, a tabela 4 demonstra interpretação para os valores de coeficientes de ϕ . A análise estatística deste estudo considerou como nível de significância o valor de “p” correspondente a alfa (α) menor ou igual a 5%.

Tabela 4. Interpretação para valores de Coeficiente de ϕ (Phi)

0,70 ou +	Associação positiva muito forte
0,50 – 0,69	Associação positiva forte
0,30 – 0,49	Associação moderadamente positiva
0,10 -0,29	Fraca associação positiva
0,1 – 0,09	Associação positiva indiferente
0,00	Sem associação
-0,1 – -0,09	Associação negativa indiferente
-0,10 – -0,29	Fraca associação negativa
-0,30 – -0,49	Associação moderadamente negativa
-0,50 – -0,69	Associação negativa forte
-0,70 ou -	Associação negativa muito forte

Fonte: Adaptado de James A Davis. *Elementary Survey Analysis*. Englewood Cliffs, NJ.: Prentice-Hall, 1971, p. 49.

5 RESULTADOS

5.1 ASSOCIAÇÃO ENTRE A POPULAÇÃO DE FACS, PROLIFERAÇÃO CELULAR E ANGIOGÊNESE

Nos casos de CEB avaliados, foi observada uma associação moderadamente positiva entre a proteína α -SMA e o marcador de proliferação celular, MCM3 ($\phi=0,422$; $p=0,620$), assim como entre α -SMA e CD105, proteína positiva especialmente em vasos neoformados ($\phi=0,422$; $p=0,620$). Analogamente, a proteína S100A4 também apresentou correlação moderadamente positiva com MCM3 ($\phi=0,358$; $p=0,793$) e CD105 ($\phi=0,358$; $p=0,793$). A figura 4 apresenta a distribuição dos escores imuno-histoquímicos por anticorpo analisado.

A proteína α -SMA foi identificada exclusivamente em membrana e citoplasma de células do estroma, localizada adjacente às ilhas tumorais, com predomínio em células morfológicamente semelhantes a fibroblastos. De forma similar, a proteína S100A4 foi identificada principalmente na membrana e citoplasma de CAFs. No entanto, outras células estromais também foram positivas, como células endoteliais e células inflamatórias. A proteína MCM3 estava localizada no núcleo e citoplasma das células malignas, especialmente na periferia das ilhas tumorais. O marcador CD105, por sua vez, foi observado em vasos sanguíneos presentes no estroma adjacente às ilhas tumorais (Figura 5).

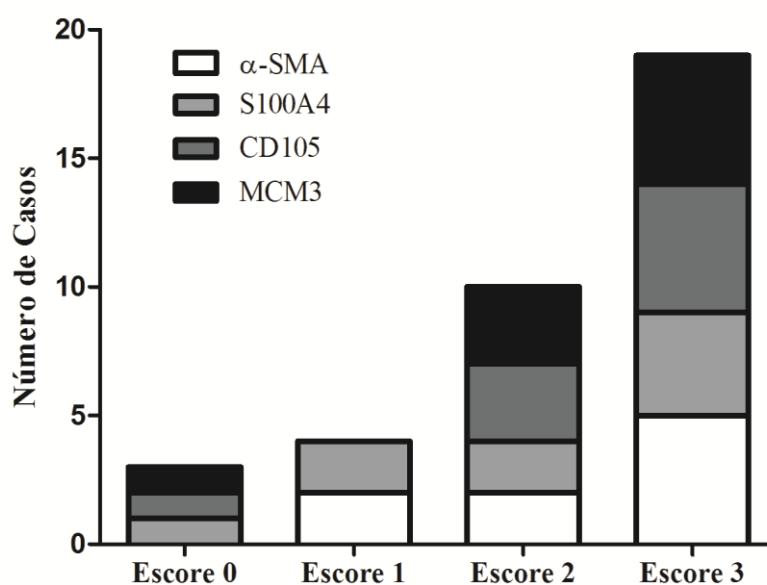


Figura 4. Distribuição dos casos de CEB por escore e anticorpos analisados.

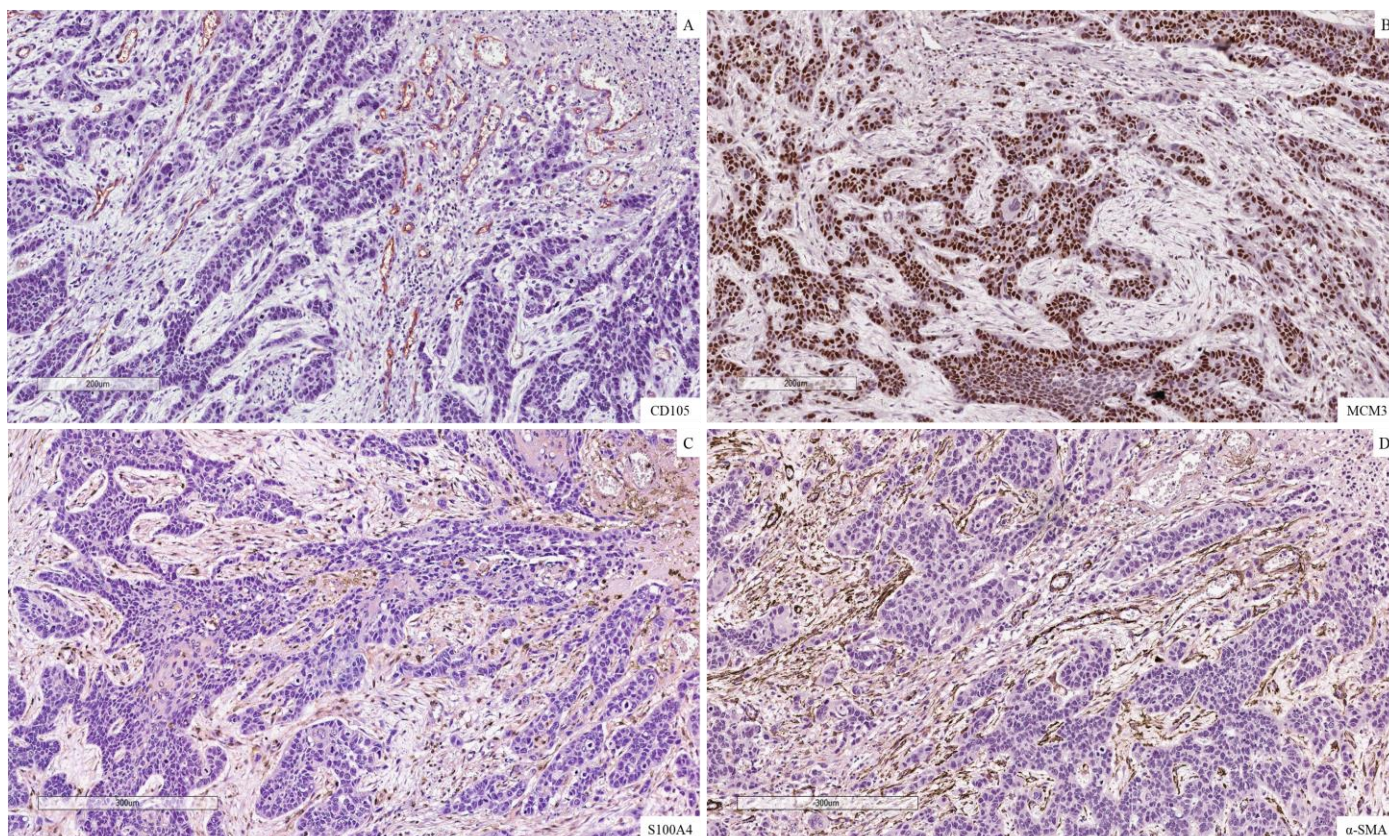


Figura 5. Imunomarcção de CD105, MCM3, S100A4 e α -SMA em CEB.

5.2 EXPRESSÃO DOS COMPONENTES DA VIA HH EM CÉLULAS DE CEB E FACS

A expressão gênica de componentes da via HH (SHH, PTCH1, SMO, SUFU, HHIP, GLI1, GLI2 e GLI3) foi avaliada nas linhagens de CEB (SCC4, SCC9, HSC3 e CAL27) (Figura 6) e nas culturas primárias de NOF e em CAF (Figura 7).

Com relação às linhagens de CEB, o gene SHH, ligante da via, apresentou expressão nas linhagens CAL27 e SCC4, enquanto que o receptor da via e também um dos seus genes alvo, PTCH1, foi expresso em todas as linhagens estudadas. Com exceção da SCC4, todas as linhagens apresentaram expressão do gene SMO. Os fatores de transcrição da via, GLI1 e GLI2, foram identificados em todas as linhagens, bem como a forma repressora, GLI3, a qual apresentou maior expressão nas células SCC4 e HSC3. Vale ressaltar que a linhagem CAL27, utilizada para os demais ensaios,

apresentou os menores níveis de RNAm de regulares negativos da via (SUFU e GLI3), bem como ausência de expressão de HHIP, gene que inibe a transdução de sinal HH.

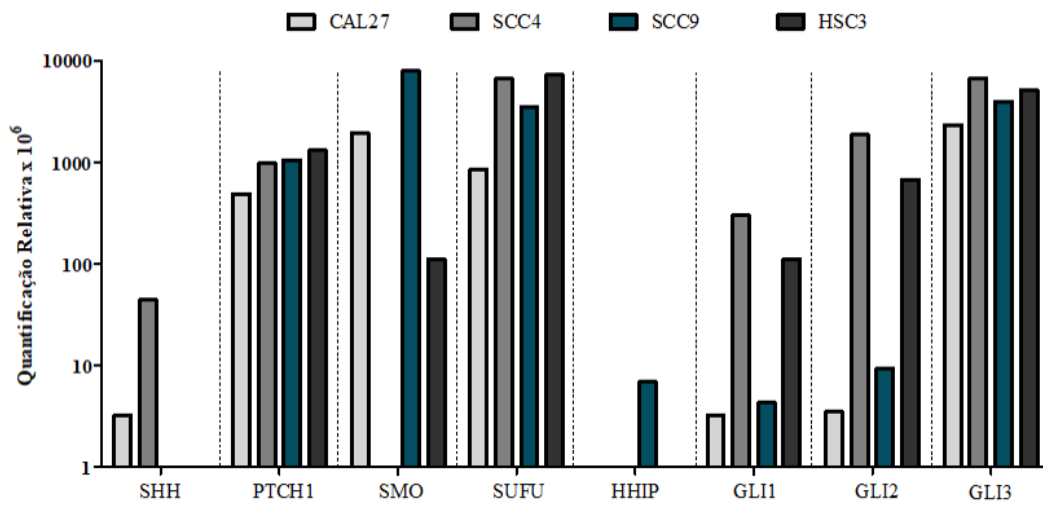


Figura 6. Expressão gênica de componentes da via HH em linhagens de CEB.

NOFs apresentaram maiores níveis dos regulares negativos da via HH (SUFU, HHIP e GLI3), enquanto que uma maior expressão de SMO foi encontrada em CAFs (Figura 7). Níveis similares dos fatores de transcrição GLI1 e GLI2 foram observados para ambas células (NOF e CAF), enquanto que transcritos do receptor PTCH1 foi mais expresso em NOF. Adicionalmente, expressão do gene SHH não foi identificado nas culturas primárias de NOF e CAF.

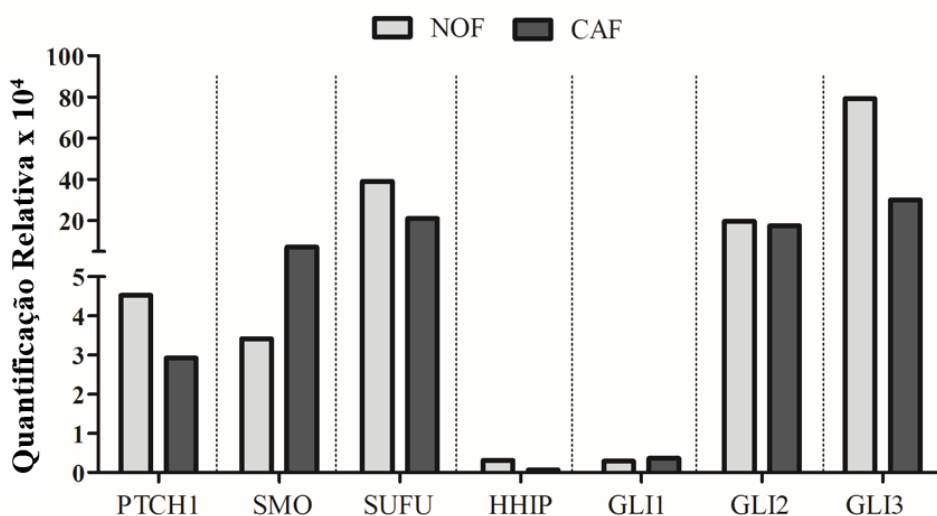


Figura 7. Expressão gênica de componentes da via HH em NOF e CAF.

A fim de confirmar os resultados de qPCR e demonstrar a presença de moléculas HH importantes para a ativação desta cascata, foi realizada a imunofluorescência nas linhagens de células tumorais CAL27 e HSC3, uma vez que estas foram escolhidas para os ensaios de avaliação do SHH recombinante como ativador da via HH, *in vitro*. Em ambas as linhagens foi observada a presença, em citoplasma, do ligante SHH, do receptor PTCH1 e da proteína SMO. O fator de transcrição GLI1 foi identificado no núcleo e citoplasma das células tumorais (Figura 8).

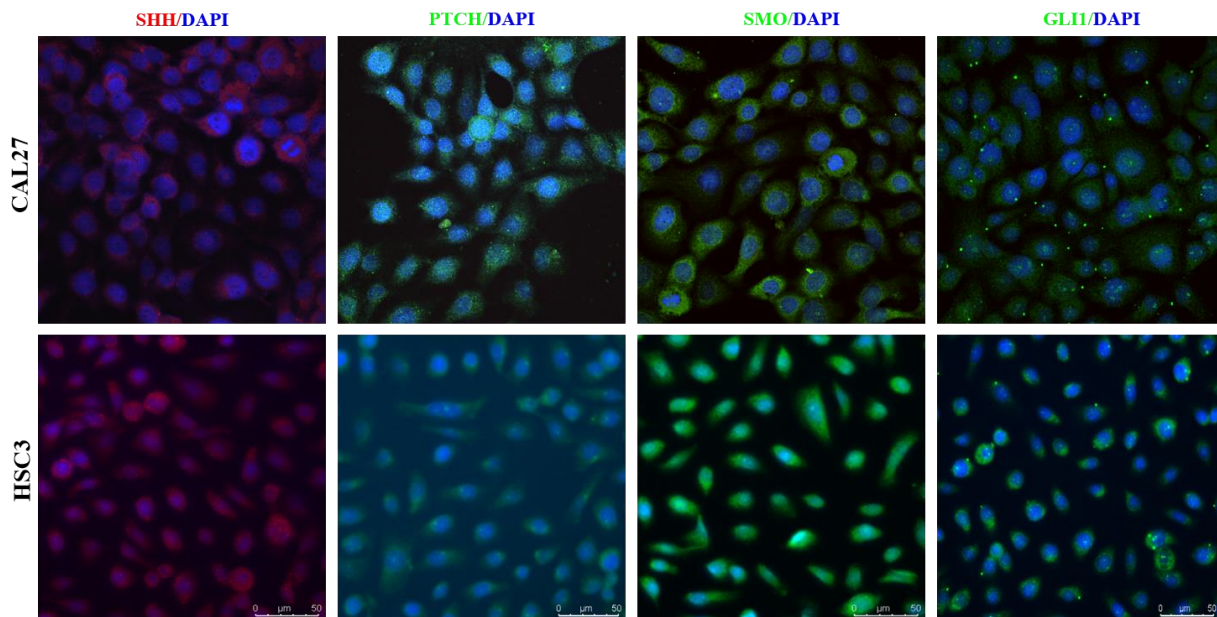


Figura 8. Expressão de proteínas da via HH em CAL27 e HSC3, por imunofluorescência.

Além das células tumorais, a imunofluorescência de componentes da via HH foi avaliada em NOF e CAF. Quando comparado ao CAF, NOF apresentou marcação mais fraca e citoplasmática de SHH, α -SMA e S100A4. Adicionalmente, a marcação nuclear do fator de transcrição GLI1 foi observada apenas em CAF (Figura 9).

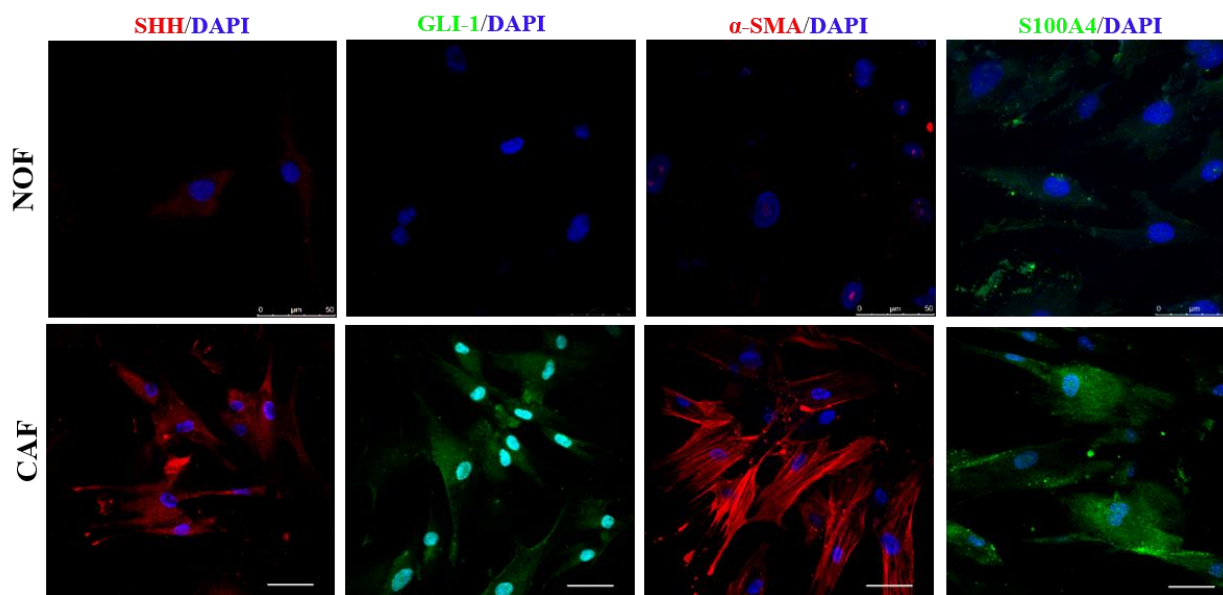


Figura 9. Expressão de proteínas da via HH em NOF e CAF, por imunofluorescência.

Além da expressão por qPCR e imunofluorescência, buscamos também avaliar a expressão de componentes da via HH por Western Blot. Pode-se observar, de acordo com a figura 10, que ambas as linhagens tumorais (CAL27 e HSC3) apresentaram expressão de SHH, PTCH1, SMO e GLI1, proteínas centrais da cascata sinalizadora HH.

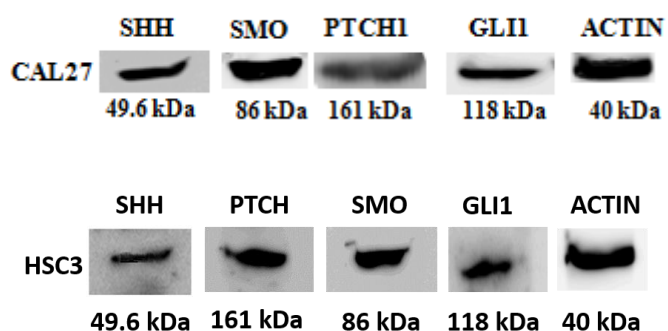


Figura 10. Expressão de proteínas da via HH em CAL27 e HSC3, por Western Blot.

De forma similar aos resultados observados por imunofluorescência, CAF apresentou maior expressão das proteínas da via HH (SHH e GLI1), bem como das proteínas α -SMA e S100A4 (Figura 11), quando comparado ao NOF.

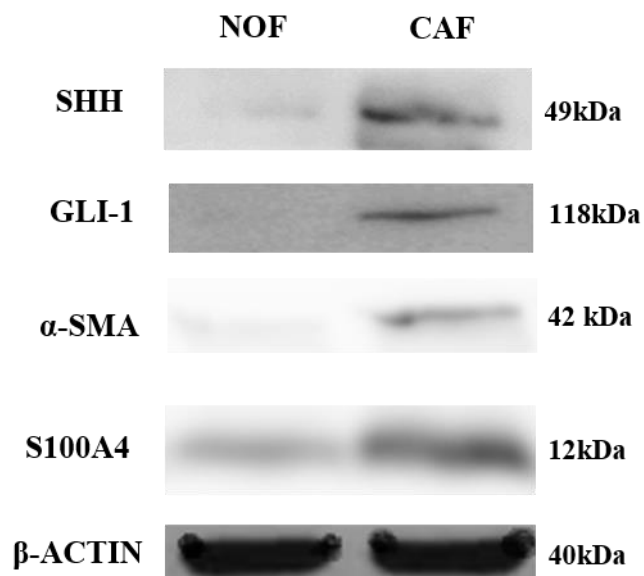


Figura 11. Expressão de proteínas da via HH em NOF e CAF, por Western Blot.

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

Sabendo-se que os CAFs podem atuar na sinalização parácrina e funcionar como produtores de ligantes HH para as células tumorais, buscamos avaliar se o SHH recombinante exógeno seria capaz de aumentar a atividade da via HH em células de CEB.

Inicialmente, escolhemos as células HSC3, as quais não apresentavam expressão do gene SHH, para avaliar o melhor tempo de resposta e ativação da cascata 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, pode-se observar que, desde a primeira hora de estímulo, houve um aumento significativo de expressão deste gene ($p < 0,05$), padrão que foi mantido até 12 horas de incubação com SHH exógeno (Figura 12).

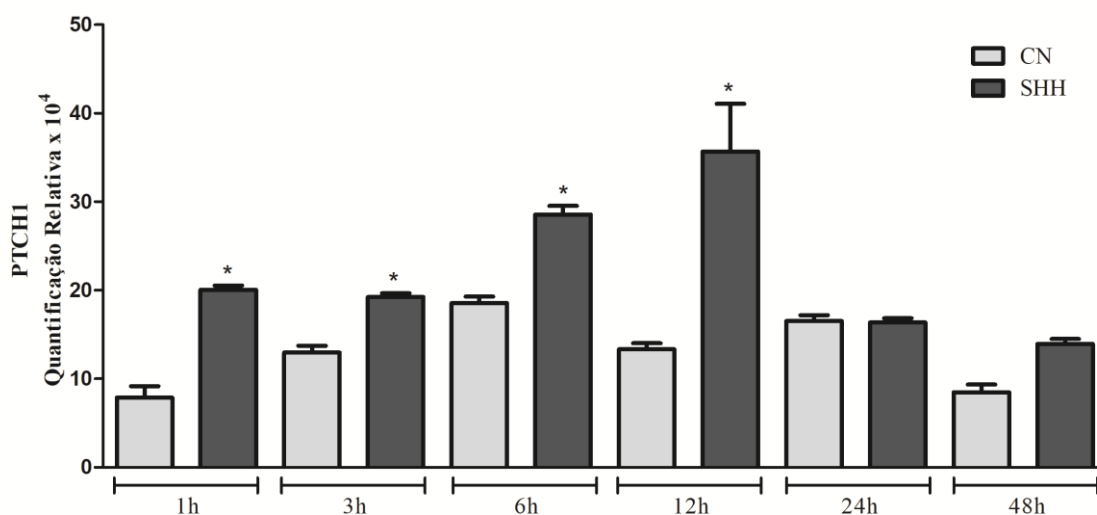


Figura 12. Expressão do gene PTCH1 em HSC3, antes e após estímulo com ligante SHH recombinante.

Os fatores de transcrição da via, GLI1 e GLI2, apresentaram um aumento significativo de expressão ($p < 0,05$) quando as células HSC3 foram estimuladas com SHH recombinante por 3h, 6h e 12h (Figuras 13 e 14). Adicionalmente, maiores níveis de GLI2 RNAm também foram observados com 1h.

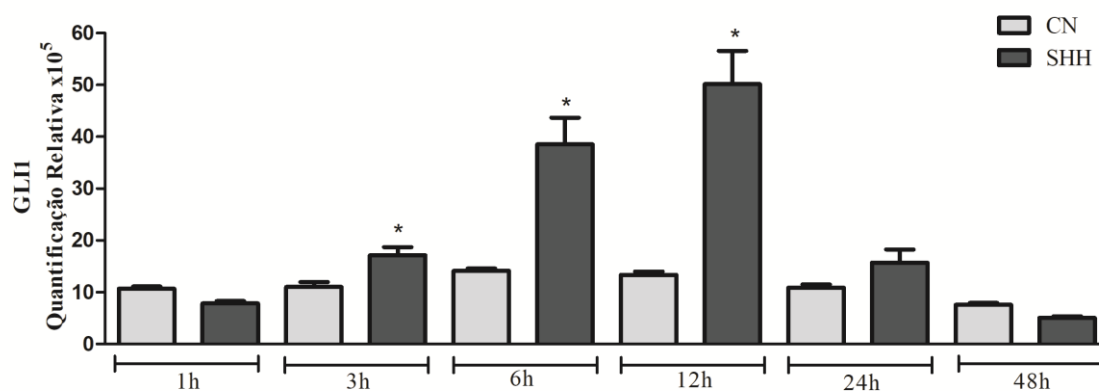


Figura 13. Expressão do gene GLI1 em HSC3, antes e após estímulo com ligante SHH recombinante.

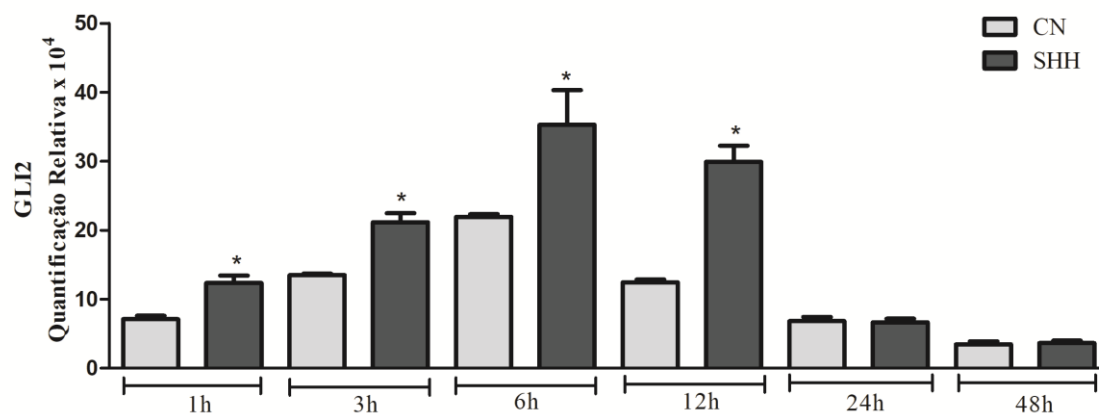


Figura 14. Expressão do gene GLI2 em HSC3, antes e após estímulo com ligante SHH recombinante.

A fim de avaliar se a proteína exógena SHH também era capaz de atuar sinergicamente e/ou de forma antagônica na expressão de genes da via HH, as células CAL27 foram incubadas com o ligante SHH recombinante, por 12h (tempo escolhido, em acordo com o experimento anterior de dose/resposta). Foi observado 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).

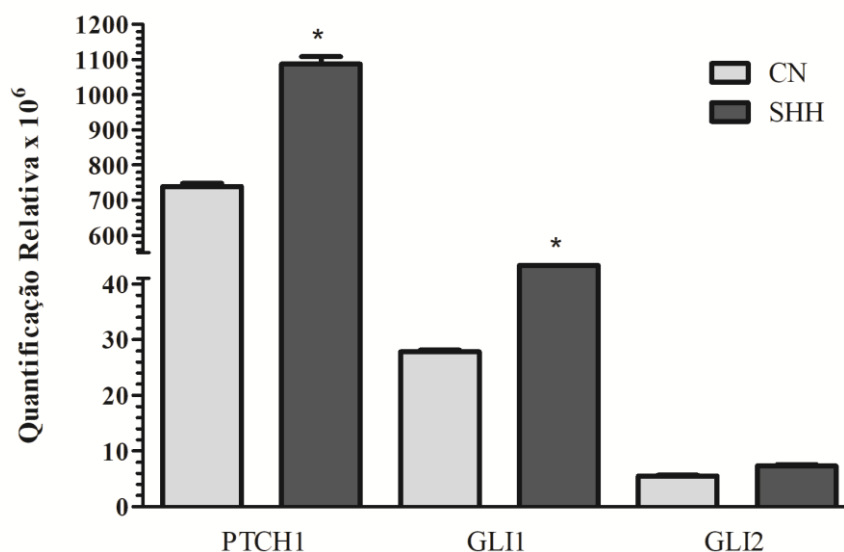


Figura 15. Expressão dos genes PTCH1, GLI1 e GLI2 em CAL27, antes e após estímulo com ligante SHH recombinante.

5.4 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÉDIA DO GANT61 PARA INIBIÇÃO DA VIA HH

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). O inibidor apresentou uma atividade citotóxica mais potente para CAF, por apresentarem valores de CI_{50} menores, quando comparado com o NOF. Adicionalmente, o valor de CI_{50} para a linhagem de células tumorais CAL27 foi maior que $50\mu\text{g/mL}$. Os valores de CI_{50} para o controle 5-FU se encontram na Tabela 5.

Tabela 5. Valores de CI_{50} de GANT61 em $\mu\text{g/mL}$ para NOF, CAF e CAL27.

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

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 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA VIA HH APÓS BLOQUEIO COM GANT61 EM CAF

Após incubação do CAF com o GANT61, foi avaliada a expressão de genes alvos da via (PTCH1, GLI1 e GLI2), a fim de observar o efeito deste inibidor nestas células. Pode-se observar que, o gene PTCH1, receptor da via HH, apresentou discreta diminuição da expressão após exposição ao GANT61 (Figura 16). No entanto, os fatores de transcrição da cascata sinalizadora (GLI1 e GLI2), apresentaram expressiva redução dos níveis de mRNA após incubação com GANT61, em CAF (Figura 16).

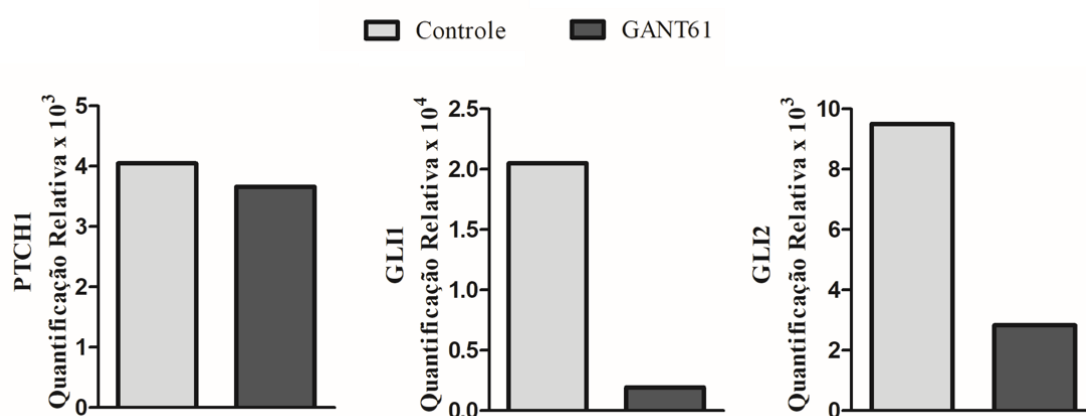


Figura 16. Expressão dos genes PTCH1, GLI1 e GLI2 em CAF, após incubação com GANT61.

5.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO MEIO CONDICIONADO POR CAF NA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À ATIVIDADE DA VIA HH E GENES ALVO ASSOCIADOS À PROLIFERAÇÃO CELULAR E ANGIOGÊNESE TUMORAL, ANTES E APÓS BLOQUEIO COM GANT61

Sabendo-se que, no microambiente tumoral, células estromais, como os CAFs, podem ser fontes de diversas moléculas capazes de influenciar na progressão da doença, avaliamos o efeito do meio condicionado por estas células na expressão de genes centrais da via HH (PTCH1, GLI1 e GLI2), bem como dos principais genes alvo desta cascata sinalizadora que estão envolvidos em processos pró-tumorais, como proliferação celular e angiogênese, em células de CEB (CAL27). Posteriormente, realizamos o bloqueio farmacológico de HH em CAF, com o GANT61 e analisamos o efeito deste meio condicionado nos genes supracitados.

5.6.1 PTCH1, GLI1 e GLI2

O meio condicionado por CAF foi capaz de aumentar a expressão do gene PTCH1 após 48 horas de incubação (Figura 17) e, mais discretamente, após 24 horas. Por outro lado, após 72 horas, observamos um aumento da expressão de PTCH1 com o estímulo do meio condicionado por NOF. Nota-se, ademais, que o bloqueio com GANT61 não foi capaz de impedir o aumento da expressão do receptor da via HH em 24 e 72 horas de incubação (Figura 17).

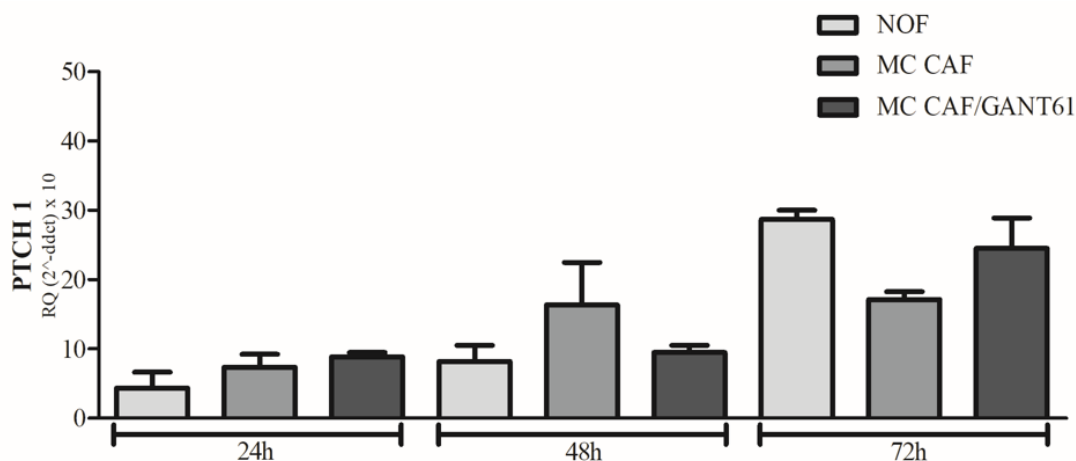


Figura 17. Expressão do gene PTCH1, em CAL27, após incubação com meio condicionado por NOF, CAF e CAF após bloqueio com GANT61.

Maior expressão gênica do fator de transcrição GLI1 foi observada após 24 e 48 horas de incubação com MC CAF, quando comparado com o MC NOF ($p < 0,05$). Ainda, após estes períodos de estímulo, o MC CAF/GANT61 impediu o aumento dos níveis de GLI1 ($p < 0,05$). No entanto, em 72 horas, não observamos diferença após exposição ao MC GANT61 (Figura 18).

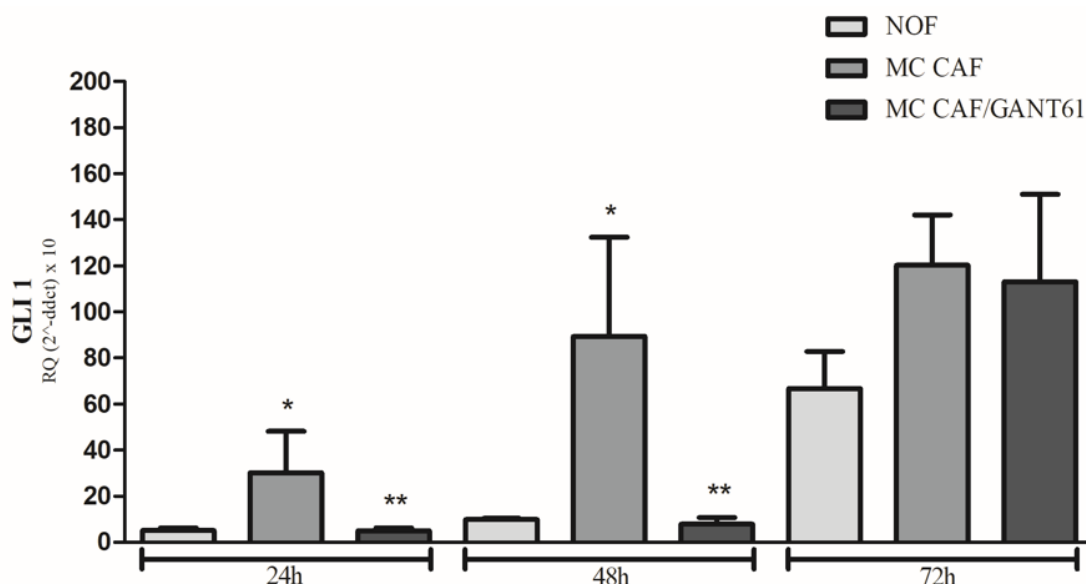


Figura 18. Expressão do gene GLI1, em CAL27, após incubação com meio condicionado por NOF, CAF e CAF após bloqueio com GANT61.

Em relação ao fator de transcrição GLI2, o MC CAF induziu uma maior expressão deste gene, quando comparado ao MC NOF, após 24 e 48 horas. No entanto, apenas em 24 horas o MC CAF GANT61 impediu o aumento dos níveis de GLI2. Após 72 horas, o estímulo com MC NOF proporcionou a maior expressão de GLI2, seguido de MC CAF GANT61, sendo essa diferença significativa em relação ao MC CAF (Figura 19).

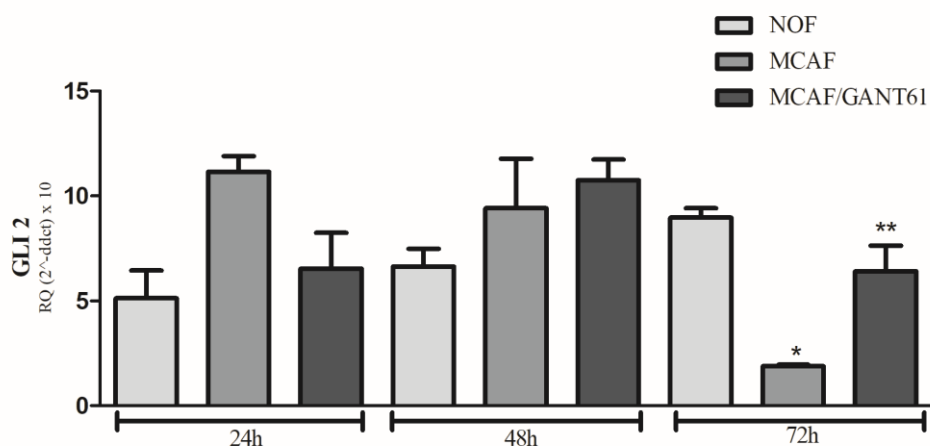


Figura 19. Expressão do gene GLI2, em CAL27, após incubação com meio condicionado por NOF, CAF e CAF após bloqueio com GANT61.

5.6.2 MYC e Ciclina D1

Dentre os genes alvo da via HH que estão relacionados à proliferação celular, encontram-se MYC e ciclina D1, ambos com papéis fundamentais na regulação do ciclo celular. Após 24 horas, o MC CAF foi capaz de aumentar a expressão de MYC de forma significativa, quando comparado ao MC NOF ($p < 0,05$) (Figura 20). Neste tempo de estímulo, o bloqueio com GANT61 foi capaz de impedir o aumento da expressão de MYC em mais de 75% ($p < 0,05$). Embora este também tenha sido um padrão observado após 72 horas, as diferenças não foram significativas. Ainda, no tempo de 48 horas, os níveis de expressão do gene MYC foram similares após os diferentes estímulos (Figura 20).

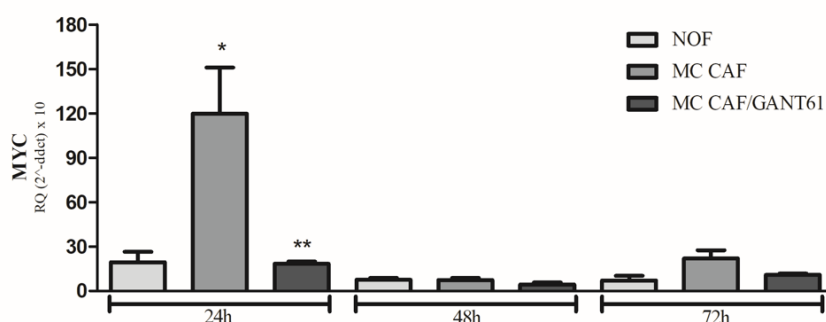


Figura 20. Expressão do gene MYC, em CAL27, após incubação com meio condicionado por NOF, CAF e CAF após bloqueio com GANT61.

Da mesma forma que MYC, a superexpressão do gene da ciclina D1 (CCND1) resulta na perda do controle do ciclo celular e, conseqüentemente, numa maior proliferação, o que pode estar associado ao desenvolvimento e progressão tumoral. Neste sentido, o MC CAF aumentou a expressão deste gene em 24 e 48 horas de forma significativa, quando comparado ao MC NOF ($p < 0,05$) (Figura 21). Após estímulo com MCGANT61, os níveis de mRNA de CCND1 não apresentaram aumento ($p < 0,05$). Após 72 horas, ainda é possível observar um discreto aumento da expressão de CCND1 após estímulo com MC CAF, o que não ocorre após exposição ao MC CAF GANT61 (Figura 21).

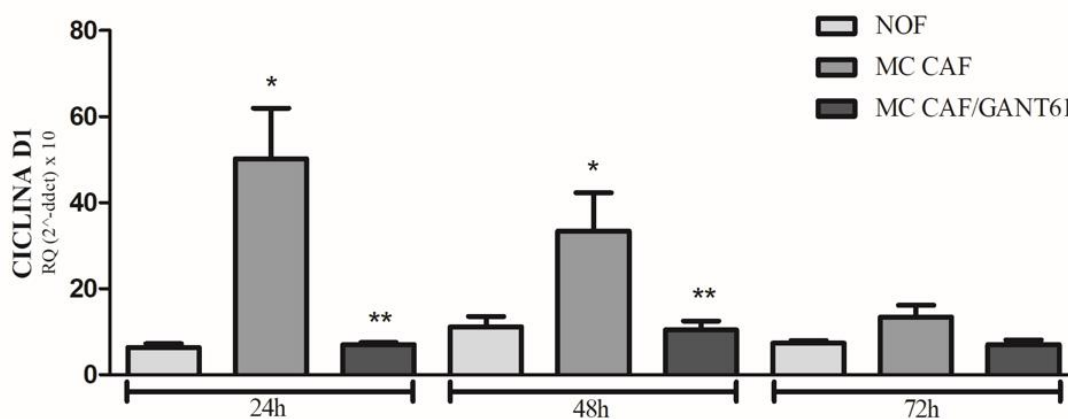


Figura 21. Expressão do gene CCND1, em CAL27, após incubação com meio condicionado por NOF, CAF e CAF após bloqueio com GANT61.

5.6.3 HIF-1 e VEGF-A

O fator de transcrição HIF-1 está superexpresso em diversos tipos de câncer, desempenhando um importante papel na iniciação do processo angiogênico. Esta molécula induz a transcrição de diversos genes, incluindo o VEGF-A, gene alvo da via HH que participa da proliferação e migração de células endoteliais, bem como do aumento da permeabilidade vascular. Em todos os tempos, especialmente 24 e 72 horas, o MC CAF aumentou a expressão do gene HIF-1, quando comparado com o MC NOF. Neste períodos de incubação, também foi mais evidente que o MC CAF GANT61 impediu o aumento dos níveis de HIF-1 (Figura 22).

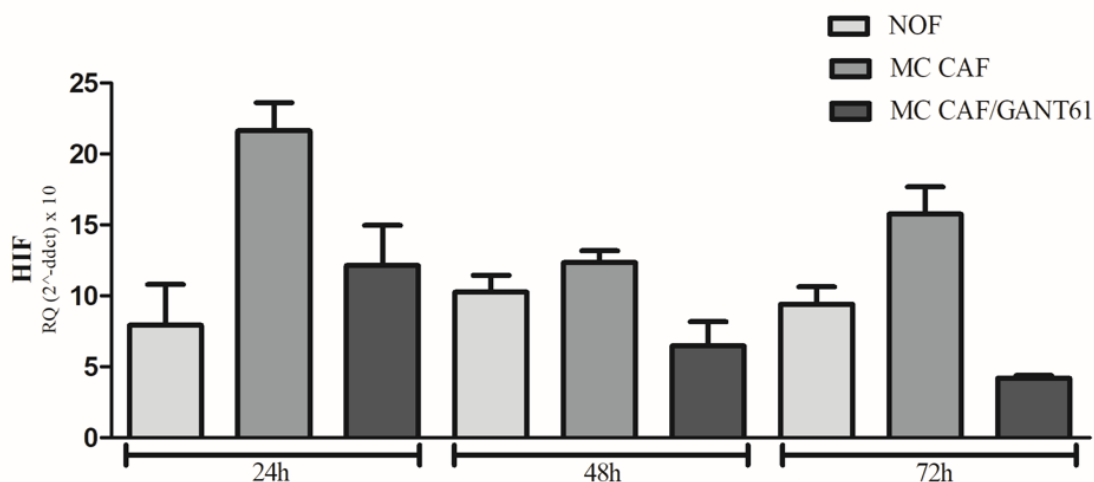


Figura 22. Expressão do gene HIF-1, em CAL27, após incubação com meio condicionado por NOF, CAF e CAF após bloqueio com GANT61.

Uma das principais moléculas envolvidas na angiogênese tumoral, o gene VEGF-A apresentou maior expressão após 72 horas de incubação com meio condicionado por CAF, quando comparado ao MC NOF ($p < 0,05$). Adicionalmente, após este período de estímulo, o bloqueio com GANT61 em CAF foi capaz de impedir o aumento da expressão de VEGF-A ($p < 0,05$) (Figura 23).

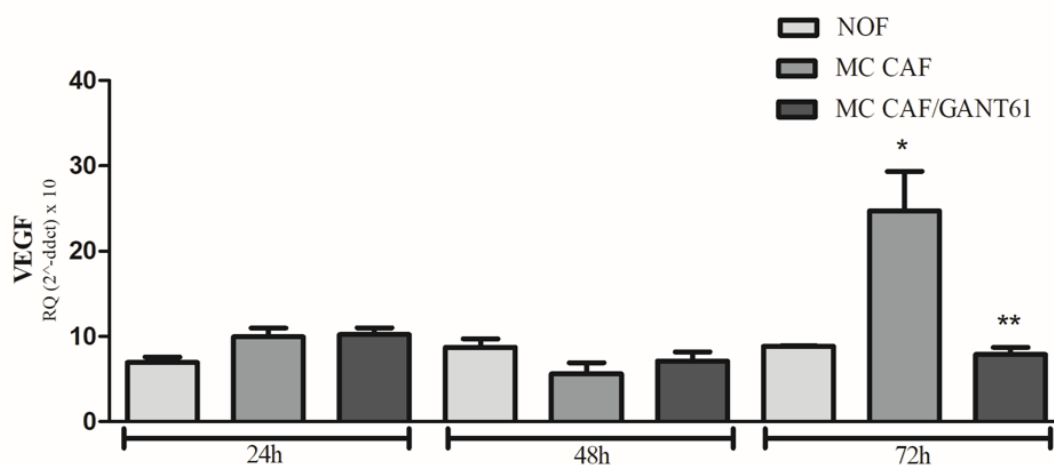


Figura 23. Expressão do gene VEGF-A, em CAL27, após incubação com meio condicionado por NOF, CAF e CAF após bloqueio com GANT61.

5.7 EXPRESSÃO GÊNICA DE CAL27 (HH, PROLIFERAÇÃO CELULAR E ANGIOGÊNESE) ANTES E APÓS INCUBAÇÃO COM GANT61

Conforme demonstrado nos ensaios anteriores, a célula CAL27 possui a via HH ativada e também responde ao estímulo exógeno mediado por SHH. Sendo assim, sabendo-se da atividade HH neste tipo celular, avaliamos se o tratamento das células CAL27 com GANT61, em concentração calculada para CAF, teria efeito residual em células tumorais, na expressão de genes relacionados à via HH e genes alvo envolvidos em proliferação celular e angiogênese.

O receptor PTCH1 e o fator de transcrição GLI1 não apresentaram aumento na expressão ($p < 0,05$) após incubação com GANT61. No entanto, o fator de transcrição GLI2 apresentou um comportamento diferente, sendo que os níveis de mRNA foram maiores após exposição ao GANT61, especialmente em 24 e 48 horas ($p < 0,05$). Com relação aos genes relacionados à proliferação celular, não observamos aumento na expressão de MYC quando a célula tumoral foi exposta ao GANT61, em todos os tempos. Da mesma forma, os níveis de transcritos do gene da ciclina D1 foram menores após incubação com o inibidor da via HH, em 24 ($p < 0,05$) e 48 horas, não sendo observada diferença após 72 horas. Por fim, os genes relacionados à angiogênese, HIF-1 e VEGF-A, apresentaram comportamento similar. Após 24 e 48 horas, o GANT61 impediu o aumento da expressão destes genes, especialmente o HIF-1. Adicionalmente, após 72 horas, foi observada menor expressão apenas do gene VEGF-A (Figura 24).

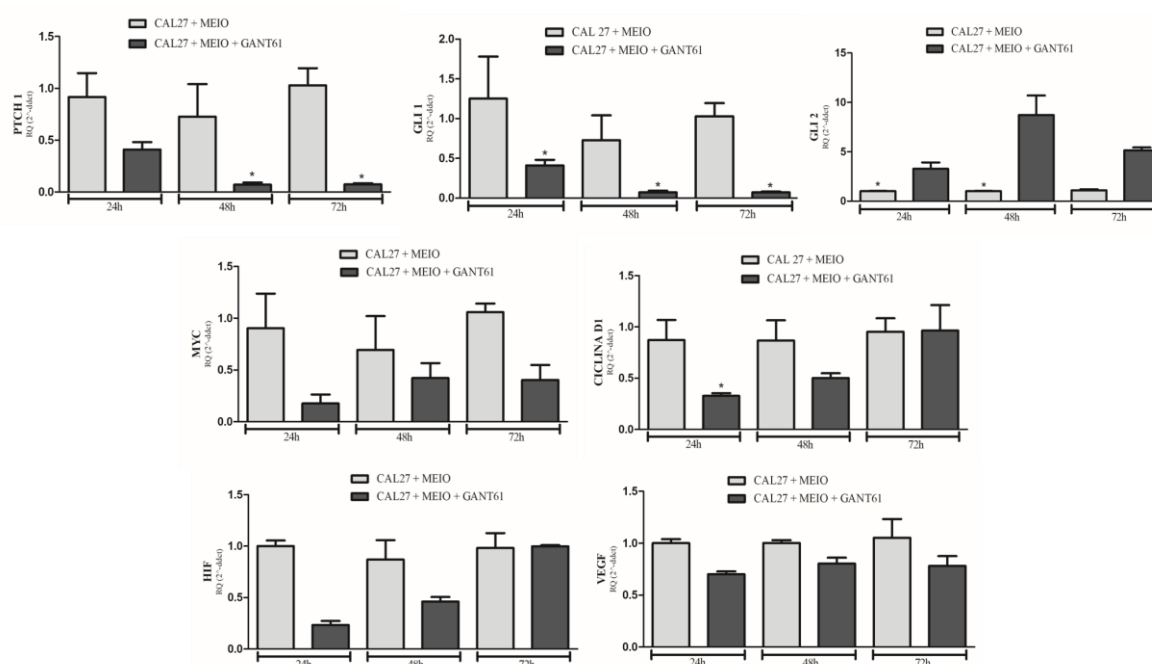


Figura 24. Expressão gênica em CAL27, após incubação com meio ou meio + GANT61.

5.8 ANÁLISE DO CICLO CELULAR DE CAL27

Neste ensaio, observamos uma tendência de redução de células na fase sub-G1 (apoptose) para os grupos MC CAF e MC CAF GANT61, além de um discreto aumento da população de células nas fases G0-G1 quando as células CAL27 foram estimuladas apenas com MC CAF. Em relação as fases S e G2/M, houve uma tendência de aumento da população de células em todos os grupos, exceto nas células mantidas em *starvation*.

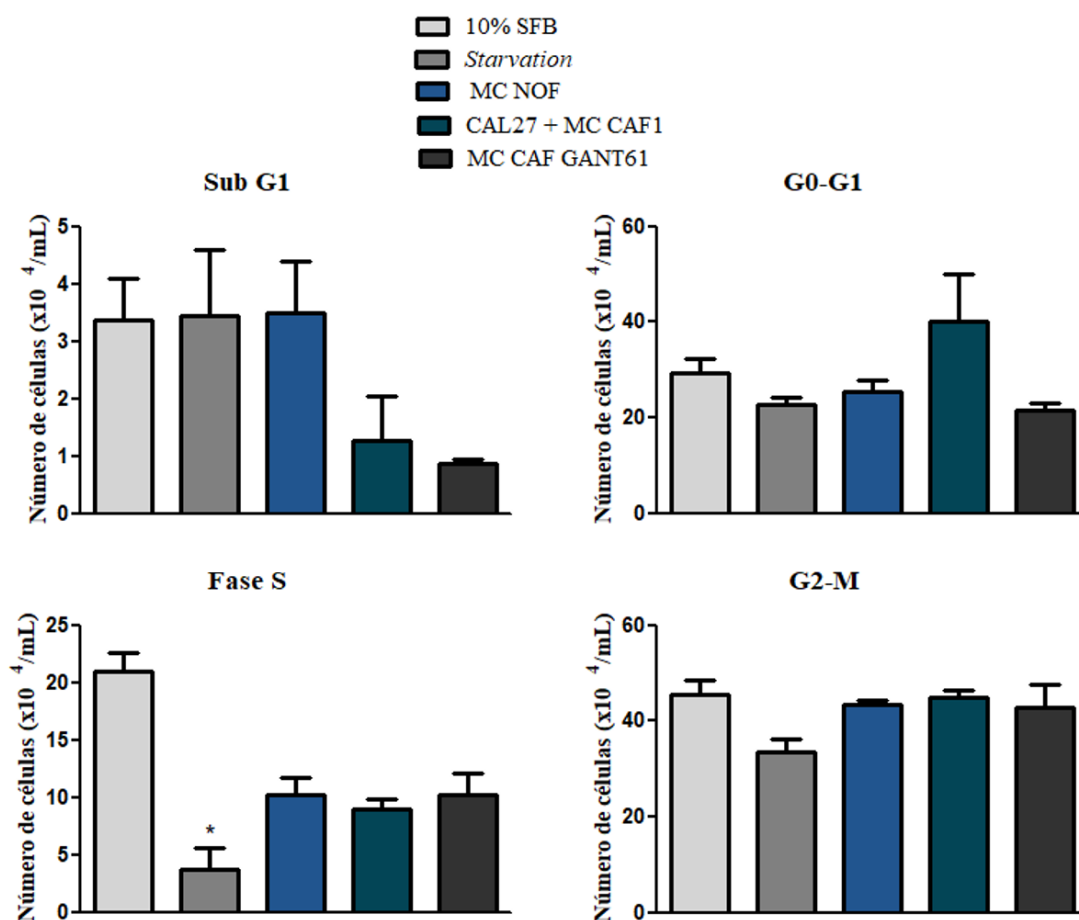


Figura 25. Efeito de diferentes estímulos (10% SFB, *starvation*, MC NOF, MC CAF antes e após tratamento com GANT61) no ciclo celular de CAL27.

5.9 ENSAIO DE ANGIOGÊNESE

Neste trabalho, a angiogênese foi avaliada através do ensaio de formação de tubos, sendo consideradas características como quantidade e tamanho dos vasos formados, número de ramificações e total de comunicações (Figura 26).

Foi possível observar que o meio condicionado por NOF e CAF induziu a formação de vasos maiores, quando comparado ao controle positivo. Adicionalmente, a porcentagem de área coberta pelos vasos neoformados foi maior sob estímulo do MC CAF. Em relação aos pontos de ramificação, o MC NOF e MC CAF induziram um perfil semelhante, sendo este maior que o controle positivo. Um maior número de loops presentes nos vasos foi observado com o estímulo do MC NOF, enquanto que o MC CAF promoveu um maior número de redes de comunicação/conexão entre os vasos, especialmente quando comparado ao MC NOF ($p < 0,05$) (Figura 27). Após exposição ao MC CAF tratado com GANT61, quando comparado ao MC CAF, observamos menor tamanho dos vasos ($p < 0,05$), menor quantidade de pontos de ramificação e de redes de comunicação, bem como menor quantidade de loops nos vasos formados ($p < 0,05$).

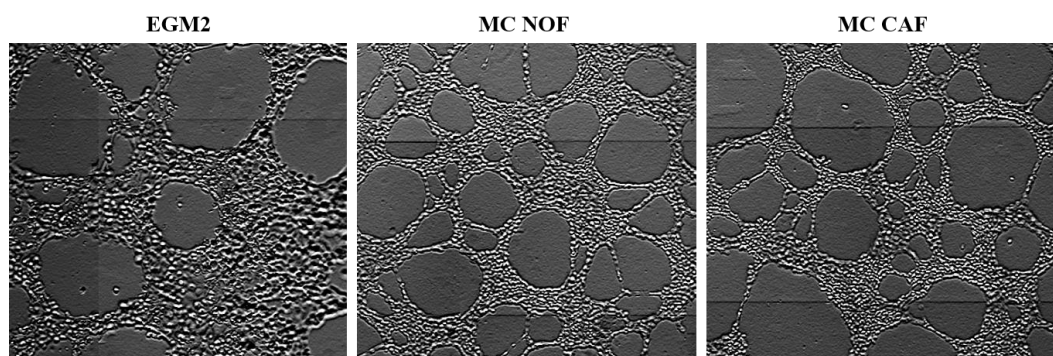


Figura 26. Características dos vasos formados com os diferentes estímulos.

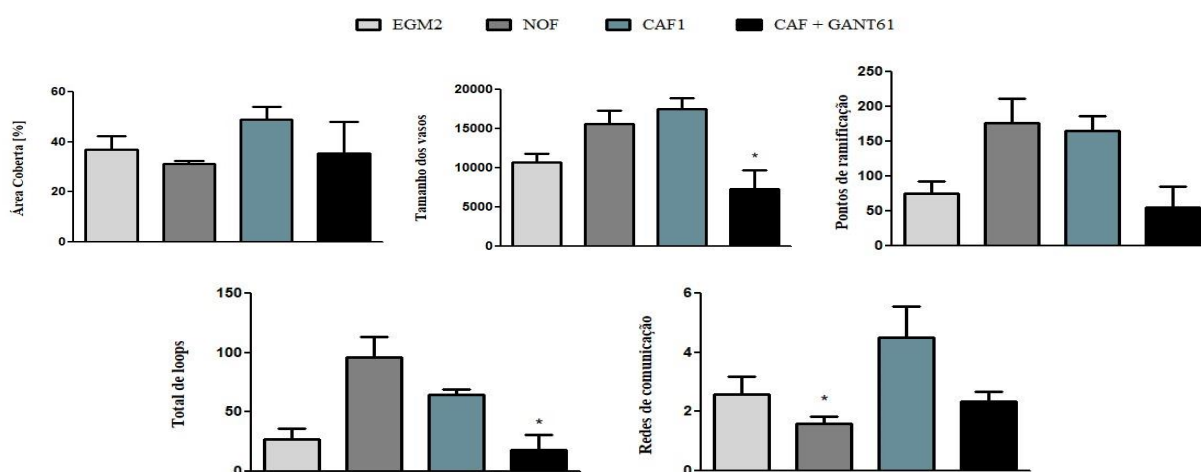


Figura 27. Quantificação das características avaliadas nos vasos formados.

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho, avaliamos a participação dos CAFs na ativação da via HH, proliferação celular e angiogênese em CEB. Desde 2009, nosso grupo tem investigado a participação da via HH em eventos pró-tumorigênicos que ocorrem no câncer de boca (CAVICCHIOLI BUIM, GURGEL *et al.*, 2011; SALES *et al.*, 2016; DIAS *et al.*, 2016; VALVERDE *et al.*, 2016), bem como a atividade em lesões pré-malignas (DIAS *et al.*, 2016) e no estroma tumoral (VALVERDE *et al.*, 2016).

Em estudos anteriores de nosso grupo, demonstramos que a via HH desempenha um importante papel na angiogênese em CEB (VALVERDE *et al.*, 2016; SALES *et al.*, 2016). Por exemplo, a proteína GLI1 foi identificada no núcleo das células endoteliais, enquanto que os ligantes SHH e IHH foram observados no citoplasma, o que corrobora com a ativação da cascata sinalizadora nessas células (VALVERDE *et al.*, 2016). Adicionalmente, foi observada uma correlação entre a expressão de SHH e VEGF-A em CEB humano (SALES *et al.*, 2016).

Neste trabalho, identificamos, em CEB humano, uma associação positiva entre as proteínas α -SMA e S100A4, marcadores de CAFs, com as proteínas CD105 e MCM3, marcadores de angiogênese tumoral e proliferação celular, respectivamente. No câncer, os CAFs podem influenciar eventos como a proliferação celular e a angiogênese, facilitando a progressão da doença. Através da secreção de VEGF-A, FGF2, SDF-1 e outros fatores, essas células estimulam a formação de novos vasos (MEZAWA; ORIMO, 2016), processo essencial para o crescimento do tumor, uma vez que permite a chegada de nutrientes, bem como a remoção de detritos celulares (NISHIDA *et al.*, 2006; VIALARD; LARRIVÉE, 2017). De forma similar, os CAFs secretam fatores de crescimento, citocinas em exossomos que promovem a proliferação em células tumorais (KELLERMANN *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2015; YAN *et al.*, 2019).

Os resultados do presente trabalho ratificam que as células de CEB possuem todo o aparato molecular da via HH e, a expressão dos genes GLI1 e PTCH1, corroboram para a ativação desta cascata em linhagens de CEB (CAL27, SCC4, SCC9 e HSC3), bem como em culturas primárias de CAFs, obtidas de tumores de língua. Classicamente, o aumento da expressão destes genes é um indicador de que a via HH está ativada, bem como de que existe uma regulação negativa (PTCH1) e positiva (GLI1) da sinalização HH, com mecanismos de *feedback* negativo e positivo (SKODA

et al., 2018; XIN *et al.*, 2018). Ainda, os nossos resultados demonstraram a presença nuclear de GLI1 nas linhagens de CEB e na cultura de CAFs, o que ratifica a participação da via HH, uma vez que a translocação desta proteína ocorre apenas após a ativação da cascata sinalizadora (HASSOUNAH; BUNCH; MCDERMOTT, 2012; SKODA *et al.*, 2018; FATTAHI; LANGROUDI; AKHAVAN-NIAKI, 2018). Com relação às células tumorais, nossos achados corroboram com o estudo de Yan *et al.* (2011), o qual também avaliou a expressão gênica de componentes da via HH em linhagens de CEB (CAL27, SCC4 e SCC9). Por outro lado, até o momento, não identificamos outro trabalho que tenha analisado transcritos da via HH em CAFs, no contexto do câncer de boca.

Apesar de não ter sido identificado transcritos do gene SHH nas células estudadas (exceto em CAL27 e SCC4), foi observada a presença da proteína SHH, tanto no citoplasma de células de CEB, como nos CAFs. Cabe considerar que o gene SHH, por codificar um morfógeno, é de baixa expressão em tecidos adultos (ROGERS; SCHIER, 2011; WILS; BIJLSMA, 2018) e, em muitos casos, os transcritos só podem ser detectados através de PCR digital (HINDSON *et al.*, 2013). Esse resultado está em acordo com os dados disponíveis no baco de dados *The Protein Atlas* (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000164690-SHH/pathology>), no qual os CEBs analisados também não possuíam transcritos deste gene. Além da localização nuclear de GLI1, a identificação da proteína SHH no citoplasma das células neoplásicas sugere a ativação da via HH em CEB, uma vez que os ligantes são internalizados ao interagir com receptor PTCH1 (WILS; BIJLSMA, 2018).

Conforme descrito anteriormente, neste trabalho, CAFs foram positivos para a proteína SHH e GLI1, o que indica a participação destas células, abundantes no estroma tumoral, como possível fonte de ligante, mas também responsiva a via HH. Esses dados, em conjunto, corroboram para uma ativação autócrina e parácrina da via HH em CEB, como é visto em hepatocarcinomas, (CHAN *et al.*, 2012; JENG *et al.*, 2019) e câncer de mama (O'TOOLE *et al.*, 2011; RIOBO-DEL GALDO; MONTERO; WERTHEIMER, 2019). Nesse sentido, o papel desta cascata sinalizadora pode se estender além do parênquima e envolver o microambiente tumoral (TAKABATAKE *et al.*, 2019).

Sabendo-se que o CEB é uma doença com alta morbidade e mortalidade, elucidar os mecanismos biológicos envolvidos na patogênese tumoral é essencial para as estratégias de descoberta de novas drogas com potencial anticâncer para tratamento desta doença. Considerando-se o papel da via de sinalização HH para iniciação, desenvolvimento e progressão tumoral, seus componentes centrais têm sido considerados como promissores alvos terapêuticos (COHEN, 2012; MCMILLAN; MATSUI, 2012; AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013; CONI; INFANTE; GULINO, 2013; OREN; SMITH, 2017; SKODA *et al.*, 2018; GIRARDI *et al.*, 2019) e alguns ensaios pré-clínico e clínicos já estão em andamento para testar os efeitos anti-tumorais dos inibidores de componentes da via HH, em outros tipos de câncer (U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, 2018), mas não em CEBs. Estudo prévio do nosso grupo de pesquisas (FREITAS, R.D., PGPAT, 2018) demonstrou que a inibição farmacológica da via HH em células de CEB, com os inibidores de SMO (vismodegib e itraconazol), foi capaz de reduzir a expressão dos genes PTCH1, SMO e GLI1 e a viabilidade celular, bem como alterar a morfologia, induzir apoptose e aumentar a fragmentação do DNA, em células CAL27.

Sabendo-se que os CAFs podem funcionar como produtores de ligantes HH para as células tumorais (ABE; TANAKA, 2016; WEI *et al.*, 2017), buscamos avaliar se o SHH recombinante (estímulo exógeno) seria capaz de aumentar a expressão gênica de componentes centrais da via e, dessa forma, ativar genes alvo, os quais estão envolvidos em diversos mecanismos que favorecerem a progressão tumoral (MERCHANT; SAQUI-SALCES, 2014; FATTAHI; LANGROUDI; AKHAVAN-NIAKI, 2018).

Para isso, as células HCS3 (sem expressão gênica de SHH) e CAL27 (com expressão gênica de SHH) foram incubadas com a proteína SHH recombinante e foi observado que, em 6 e 12 horas de estímulo, os níveis de expressão de genes da via HH, especialmente PTCH1 e GLI1, aumentaram de forma significativa. Em linhagens de câncer de pulmão, Bermudez *et al.* (2013) não encontraram diferenças na expressão gênica de PTCH1 e GLI1 após estímulo com SHH recombinante, bem como não houve alterações na morfologia, proliferação e sobrevivência celular. Diante disso, os autores indicaram que as células malignas só respondem ao SHH recombinante quando não existe uma saturação de SHH endógeno, e que as células tumorais ativam, através da via HH, células do estroma tumoral, como os fibroblatos, os quais, por sua vez, aumentam a

proliferação celular e invasão tumoral. Nesse sentido, a sinalização HH parece mediar um *crosstalk* entre as células malignas e estromais (BERMUDEZ *et al.*, 2013).

Sabendo-se que: i- os CAFs são as células estromais mais numerosas e que colaboram para um comportamento pró-tumoral, como a proliferação e angiogênese e ii- CAFs possuem a via HH ativada e contribuem para a sinalização parácrina, neste trabalho, avaliamos o efeito da inibição farmacológica de GLI1 em CAFs e como este tratamento, neste tipo celular, afetaria a expressão de genes relacionados a proliferação e angiogênese, em célula tumoral CAL27. Adicionalmente, avaliamos o efeito deste composto, diretamente nas células tumorais, na mesma concentração indicada pelo estudo de CI50, em CAFs. Assim, as células tumorais CAL27 foram estimuladas com o meio condicionado por FACs, em diferentes tempos (24h, 48h, 72h), antes e após o bloqueio destes com GANT61.

Dentre as estratégias de bloqueio, a inibição *downstream* da via HH (através dos fatores de transcrição GLI) se destaca, uma vez que ainda pode interferir em outras cascatas de sinalização envolvidas no câncer, como MAPK, PI3K, TGF β . A molécula GANT61 é o inibidor de GLI mais estudado e conhecido, a qual pode se ligar às regiões de dedo de zinco 2 e 3 de GLI1 e GLI2 (GONNISSEN *et al.*, 2015; GIRARDI *et al.*, 2019). Nesse sentido, o modo de ação do GANT61 se dá através da ligação ao fator de transcrição GLI1, em estreita proximidade, mas ainda independente da região de ligação desta molécula ao DNA (AGYEMAN *et al.*, 2014; GONNISSEN, *et al.*, 2015). A inibição do fator de transcrição GLI1 e, conseqüentemente, a não transdução do sinal HH, interfere em diversos eventos pró-tumorais, como viabilidade e proliferação celular, apoptose, transição epitélio-mesênquima, células tronco tumorais, autofagia e resposta imune (GONNISSEN *et al.*, 2015; GIRARDI *et al.*, 2019). Dentre os nossos resultados, observamos que o GANT61 apresentou uma atividade citotóxica promissora em relação ao CAF e, para o NOF e CAL27, este composto não promoveu morte celular relevante. Cabe ressaltar que, conforme avaliado para a CAL27, este composto foi capaz de atenuar a expressão de genes relacionados a proliferação e angiogênese, mesmo quando utilizado em concentração calculada para CAF. Em relação aos efeitos da inibição farmacológica de GLI1 em CAFs nos genes HH, o meio condicionado por CAFs foi capaz de aumentar a expressão de PTCH1 em 24 e 48 horas, mas o bloqueio com GANT61 não teve efeito nos níveis dos transcritos de mRNA, em 24 e 72 horas de incubação. Considerando-se que PTCH1 também é gene alvo da via, este resultado pode

corresponder ao mecanismo de feedback no qual esta molécula é envolvida (COHEN, 2012; MCMILLAN; MATSUI, 2012; MERCHANT; SAQUI-SALCES, 2014; SKODA *et al.*, 2018; XIN *et al.*, 2018).

Por outro lado, o MC CAF promoveu uma maior expressão de GLI1, corroborando para a hipótese de ativação parácrina mediada por fibroblastos e, quando estes fibroblastos foram tratados com GANT61, o meio condicionado destas células reduziu de forma significativa os níveis deste gene, demonstrando o potencial de modulação da via HH em CAL27, mediada por CAFs. Somente após 72h de tratamento, este efeito não foi observado. Em adição, para o GLI2, o estímulo com MC GANT61 reduziu a expressão deste gene apenas nas primeiras 24 horas. Ainda, após 72 horas, a expressão de GLI2 foi significativamente maior após exposição ao MC CAF GANT61, o que, em conjunto com os resultados de GLI1, pode indicar um efeito relacionado a menor biodisponibilidade do composto.

Conforme relatado previamente, os efeitos pró-tumorais mediados por CAFs já estão bem estabelecidos na literatura (LI *et al.*, 2015; YAN *et al.*, 2019; HUANG; HUANG; LI, 2019) e, há evidências de que a sinalização HH seja importante para a manutenção do fenótipo CAF (TAKEBE *et al.*, 2013; VALENTI *et al.*, 2017). Conforme demonstrado, a proteína GLI1 foi encontrada no núcleo do CAF e, sabe-se que, esta proteína atua como um fator de transcrição para vários genes alvos relacionados ao desenvolvimento e a progressão tumoral como, por exemplo, MYC, ciclina D1, VEGF e HIF-1 (MERCHANT; SAQUI-SALCES, 2014; FATTAHI; LANGROUDI; AKHAVAN-NIAKI, 2018; NIYAZ; KHAN; MUDASSAR, 2019).

Em nível de expressão gênica, observamos que, após 24 horas, o meio condicionado por CAF aumentou a expressão de MYC de forma significativa e, o tratamento das células tumorais com o MC CAF GANT61 impediu o aumento da expressão deste gene de forma importante. Com relação ao gene da ciclina D1, foi possível observar este comportamento em todos os tempos avaliados. Uma vez que MYC e CCND1 são genes alvo da via HH (MERCHANT; SAQUI-SALCES, 2014; GONNISSEN *et al.*, 2015; FATTAHI; LANGROUDI; AKHAVAN-NIAKI, 2018), o efeito observado após estímulo pode ser, também, devido a uma ativação desta cascata sinalizadora e, conseqüentemente, transcrição dos seus genes alvo. Nossos resultados corroboram com alguns estudos que demonstraram que o meio condicionado por CAFs

estimula a proliferação das células tumorais, em CEB (KELLERMANN *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2015) e pode promover fenótipos mais agressivos em linhagens de células de câncer de mama, com estímulo da transição epitélio-mesênquima, migração e invasão tumoral (YU *et al.*, 2014).

Em adição, observamos uma maior população de células na fase G0-G1, no grupo tratados com MC CAF, além de uma menor população de células em apoptose (fase sub G1). Apesar da superexpressão dos genes CCND1 e MYC estar relacionada com proliferação e sobrevivência celular e suportarem estes resultados, o ensaio de ciclo celular utilizado será repetido, uma vez que apenas a análise de conteúdo de DNA não foi suficiente para fornecer dados da cinética celular.

Já é bem estabelecido o papel dos CAFs no processo angiogênico em diferentes tipos de câncer (TANG *et al.*, 2016; HUANG; HUANG; LI, 2019), incluindo CEB (LIN *et al.*, 2016). Neste trabalho, o MC CAF estimulou uma maior expressão de HIF-1 em CAL27, em todos os tempos e, para o VEGF-A, em 72h. Para ambos genes, não observamos aumento na expressão após incubação com MC CAF GANT61, corroborando para a participação da via HH na angiogênese, em CEB. Além disso, no ensaio *in vitro* utilizando células EA.hy926, independente do tipo de fibroblasto (NOF ou CAF), os fatores secretados por estas células exercem um efeito na indução da angiogênese, promovendo a formação de um maior de vasos de maior diâmetro. Por sua vez, o MC CAF induziu a formação de maior quantidade de redes de comunicação, o que pode indicar a formação de vasos mais complexos, característica comum à angiogênese tumoral (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011; VIALARD; LARRIVÉE, 2017). Todos esses resultados, em conjunto, corroboram para a ação pró-angiogênica dos CAFs, bem como indica que a angiogênese é um evento complexo, mediado por células estromais, e tumorais, por exemplo (VIALARD; LARRIVÉE, 2017). Apesar do efeito do GANT61 no processo de angiogênese não ser completamente elucidado (GONNISSEN, *et al.*, 2015), observamos, neste trabalho, que essa molécula atenua algumas características na formação de novos vasos, como, por exemplo, diâmetro dos tubos e quantidade de loops presentes. Conforme descrito anteriormente, os resultados deste trabalho apontam para uma sinalização autócrina e parácrina da via HH em CEB, como já foi descrito em outros tipos de câncer (O'TOOLE *et al.*, 2011; CHAN *et al.*, 2012, SAHEBJAM; SIU; RAZAK, 2012; JENG *et al.*, 2019; RIOBO-DEL GALDO; MONTERO; WERTHEIMER, 2019), inclusive em CEB

(TAKABATAKE *et al.*, 2019). Apesar disso, não detectamos uma atividade citotóxica promissora em células de CEB (CI_{50} de CAL27 > 50/Indeterminado) mas, sabendo-se que o tratamento quimioterápico atinge, indiscriminadamente, todos os componentes do microambiente tumoral, as células tumorais CAL27 foram tratadas na mesma concentração calculada para CAF e os mesmos genes HH, de proliferação e angiogênese foram avaliados.

O GANT61 foi capaz de reduzir de forma significativa a expressão de componentes centrais da via, como o receptor PTCH1 e o fator de transcrição GLI1, conforme já demonstrado previamente (BENVENUTO *et al.*, 2016; KUREBAYASHI, *et al.*, 2017), corroborando para um efeito citostático deste composto. No entanto, o fator de transcrição GLI2 apresentou um efeito reverso, sendo que os maiores níveis foram observados após exposição ao GANT61. Para inibição de GLI1, o GANT61 se liga ao fator de transcrição entre as proteínas de dedos de zinco 2 e 3, além de ter sítios de ligação nos aminoácidos E119 e E167. Como a maioria dos aminoácidos parece ser conservado em GLI1 e GLI2, o GANT61 também pode ter efeito inibitório na transcrição mediada por GLI2 (AGYEMAN *et al.*, 2014; GONNISSEN, *et al.*, 2015). No entanto, a ação e efeitos da molécula GANT61 parecem ser mais específicos para o fator de transcrição GLI1. Benvenuto *et al.* (2016) não observou diferença nos níveis de GLI2 após tratamento com GANT61 em células de câncer de mama, enquanto que a expressão de GLI1 diminuiu de forma significativa em diferentes linhagens. Adicionalmente, esse efeito de GLI2 foi observado em células tumorais, sendo que este fator de transcrição parece estar mais relacionado à mecanismos envolvendo células mesenquimais (KRAMANN *et al.*, 2015).

Com relação aos genes relacionados à proliferação celular e angiogênese, observamos uma redução da expressão quando a célula tumoral foi exposta ao GANT61, especialmente nos tempos iniciais. Menores níveis de MYC e CCND1 após exposição ao GANT61 também já foram demonstrados previamente, em neuroblastoma (WICKSTRÖM *et al.*, 2013). A molécula GANT61 parece ser promissora e interferir em eventos clássicos do desenvolvimento do câncer, conforme descrito anteriormente. No entanto, a influência deste inibidor de GLI1 em outros mecanismos importantes, como a angiogênese, ainda não foi avaliado (GONNISSEN, *et al.*, 2015). Ainda, uma vez que importantes vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento e progressão tumoral (PI3K, MAPK e TGF β) estão estreitamente relacionadas com a cascata HH,

através da ativação dos fatores de transcrição GLI, o bloqueio dessa molécula contribui, de forma indireta, para a inibição de efeitos desencadeados com a ativação destas vias (GONNISSEN, *et al.*, 2015; DIDIASOVA; SCHAEFER; WYGRECKA, 2018).

Diante do exposto, nossos resultados corroboram para uma possível ativação HH parácrina (célula tumoral – CAFs), parácrina reversa (CAFs – célula tumoral) e ativação estromal (CAFs – célula endotelial) em CEB. Além disso, as moléculas secretadas por CAFs parecem contribuir para a ativação da via HH, proliferação celular e angiogênese, em CEB.

7 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados demonstraram que a população de CAFs está relacionada a densidade vascular e proliferação, em CEB. Além disso, células de CEB respondem a estímulos de ligante SHH exógeno; CAFs, por sua vez, representam uma possível fonte de SHH e, o meio condicionado por estas células aumentou a expressão de genes HH, incluindo os alvos CCND1, MYC, HIF-1 e VEGFA, corroborando para uma ativação parácrina da via HH.

Apesar de CAFs terem apresentado uma maior sensibilidade ao GANT61, a redução da expressão de PTCH1, GLI1, CCND1, MYC, HIF-1 e VEGF-A em células CAL27, demonstrou um efeito anti-tumoral deste composto, em células malignas. Os resultados relacionados ao bloqueio de GLI1 em CAF e o meio condicionado resultante, corroboram para a hipótese de CAFs contribuem para a expressão de genes relacionados a proliferação e angiogênese, através da via HH. CAFs e CAL27 responderam a HH através de GLI1 e, portanto, este fator de transcrição representa um potencial alvo terapêutico.

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 Internat.**, v. 2016, p. 1:11, nov. 2016.

ADRIEN, J. *et al.* Why are head and neck squamous cell carcinoma diagnosed so late? Influence of health care disparities and socio-economic factors. **Oral Oncol.**, v.50, n. 2, p. 90–97, 2014.

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, jun. 2014.

AHMED, S.A.; GOGAL, R.M JR.; 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 Meth.**, v. 170, n. 2, p. 211-224, apr. 1994.

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, nov. 2013.

BAGAN, J; SARRION, G; JIMENEZ, Y. Oral cancer: clinical features. **Oral Oncol.**, v. 46, n. 6, p. 414-417, jun.2010.

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, jul. 2016.

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.

BRASIL. Ministério da Saúde. INCA: Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>. Acesso em: 05 fev. 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, nov. 2018.

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.

BRANDS, M.T. *et al.* Follow-up after curative treatment for oral squamous cell carcinoma. A critical appraisal of the guidelines and a review of the literature. **Eur J Surg. Oncol.**, v.44, n.5, p.559-565, 2018.

BRIERLEY, J.D.; GOSPODAROWICZ, M.K; WITTEKIND, C. **TNM Classification of Malignant Tumours**. 8.ed. John Wiley & Sons, UICC, 2017.

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

CHAN, I.S. *et al.* Paracrine Hedgehog signaling drives metabolic changes in hepatocellular carcinoma. **Cancer research**, v. 72, n. 24, p. 6344–50, 15 dez. 2012.

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

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

CONI, S.; INFANTE, P.; GULINO, A. Control of stem cells and cancer stem cells by Hedgehog signaling: pharmacologic clues from pathway dissection. **Biochemical pharmacology**, v.85, n.5, p. 623–8, 1 mar. 2013.

COHEN, D.J. Targeting the hedgehog pathway: role in cancer and clinical implications of its inhibition. **Hematology/oncology clinics of North America**, v.26, n.3, p.565–88, jun. 2012.

DIAS, R. B. *et al.* Enhanced Expression of Hedgehog Pathway Proteins in Oral Epithelial Dysplasia. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology: AIMM**, v. 24, n. 8, p. 595–602, 2016.

DIDIASOVA, M.; SCHAEFER, L.; WYGRECKA, M. Targeting GLI Transcription Factors in Cancer. **Molecules**.v.23, n.5, Apr 2018

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.443-53, May.2018.

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.

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, Feb. 2017.

FATTAHI, S.; LANGROUDI, M.P.; 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.

FERRUZZI, P. *et al.* In vitro and in vivo characterization of a novel Hedgehog signaling antagonist in human glioblastoma cell lines. **Int J Cancer**. v.131, n.2, p. E33-44, Jul 2012.

FREITAS, R.D. Potencial terapêutico dos inibidores de Smoothed em Carcinoma Escamocelular Oral. 2018. 58 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) - Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2018.

FRONIE, A.F. *et al.* Squamous cell carcinoma of the oral cavity: clinical and pathological aspects. **Rom J Morphol Embryol**, v.54, n.2, p.343–348, 2013.

GASCARD, P; TLSTY T.D. Carcinoma-associated fibroblasts: orchestrating the composition of malignancy. **Genes Dev.**, v.30, n.9. p. 1002-19, mai. 2016.

GIRARDI D. *et al.* Targeting the Hedgehog Pathway in Cancer: Current Evidence and Future Perspectives. **Cells**. v.8, n.2, Feb 2019.

GONNISSEN, A.; ISEBAERT, S.; HAUSTERMANS, K. Targeting the Hedgehog signaling pathway in cancer: beyond Smoothed. **Oncotarget**. v.6, n.16, p. 13899-913, Jun 2015.

GORLIN, R.J. Nevoid basal cell carcinoma syndrome. **Dermatology Clinic**, v.13, n.1, p.113-125, 1995.

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

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 Gonçalo Moniz, Salvador, Fundação Oswaldo Cruz, 2018.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v.144, n.5, p. 646–674, 2011.

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

HASHIBE, M. *et al.* Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the INHANCE consortium. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v.18, n.2, 2011.

HASSOUNAH, N.B.; BUNCH, T.A.; MCDERMOTT, K.M. Molecular Pathways : The Role of Primary Cilia in Cancer Progression and Therapeutics with a Focus on Hedgehog Signaling. **Clin Cancer Res**, p.2429–2435, 2012.

HINDSON, C. M. *et al.* Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. **Nature Methods**, v. 10, p. 1003–1005, 2013.

HONAMI, T. *et al.* Sonic hedgehog signaling promotes growth of oral squamous cell carcinoma cells associated with bone destruction. **Oral oncology**, v.48, n.1, p.49–55, jan. 2012.

HUANG, B.; HUANG, M.; LI, Q. Cancer-Associated Fibroblasts Promote Angiogenesis of Hepatocellular Carcinoma by VEGF-Mediated EZH2/VASH1 Pathway. **Technol Cancer Res Treat**. v.18, 2019.

HWANG, J. *et al.* The effects of sonic hedgehog signaling pathway components on non-small-cell lung cancer progression and clinical outcome. **World Journal of Surgical Oncology**, p.1–10, 2014.

INGHAM, P.W.; MCMAHON, A.P. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. **Genes & development**, v.15, n.23, p. 3059–87, 1 dez. 2001.

JENG, K.S. *et al.* Sonic Hedgehog signaling pathway as a potential target to inhibit the progression of hepatocellular carcinoma. **Oncol Lett**. v.18, n.5, 4377-84, Nov 2019.

KRAMANN, R. *et al.* Pharmacological GLI2 inhibition prevents myofibroblast cell-cycle progression and reduces kidney fibrosis. **J Clin Invest**. v.125, n.8, p.2935-51, Aug 2015.

KELLERMANN, M.G. *et al.* Myofibroblasts in the stroma of oral squamous cell carcinoma are associated with poor prognosis. **Histopathology**, v.51, n.6, p.849-53, Dec.2007.

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.509-17, May.2008.

KUREBAYASHI, J. *et al.* Anti-cancer stem cell activity of a hedgehog inhibitor GANT61 in estrogen receptor-positive breast cancer cells. **Cancer Sci.** v. 108, n.5, p.918-30, May 2017.

LEE, J. J. *et al.* Stromal response to Hedgehog signaling restrains pancreatic cancer progression. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, n. 111, v. 30, p. 3091-100, jul. 2014.

LEOVIC, D. *et al.* Hh-Gli SIGNALING PATHWAY ACTIVITY IN ORAL AND OROPHARYNGEAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA. **Head & Neck**, v.34, n.1, p.104–112, 2012.

LI, H. *et al.* Cancer-associated fibroblasts provide a suitable microenvironment for tumor development and progression in oral tongue squamous cancer. **J Transl Med.** v. 21, n.13, p.198, Jun 2015.

LIU, T.; CHUA, B.; BATSTONE, M. Postoperative Radiotherapy for Oral Squamous Cell Carcinoma With Histologic Risk Factors: Are We Over-Treating? **J Oral Maxillofac Surg.** Jan. 2018 [Epub ahead of print].

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

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

MCMILLAN, R.; MATSUI, W. Molecular pathways: the hedgehog signaling pathway in cancer. **Clinical cancer research**, v.18, n.18, p.4883–8, 15 set. 2012.

MERCHANT, J.L.; SAQUI-SALCES, M. Inhibition of Hedgehog signaling in the gastrointestinal tract: targeting the cancer microenvironment. **Cancer treatment reviews**, v.40, n.1, p.12–21, mar. 2014.

MEZAWA, Y; ORIMO, A. The roles of tumor- and metastasis-promoting carcinoma-associated fibroblasts in human carcinomas. **Cell Tissue Res.**, v. 365, n. 3, p. 675-89, set. 2016.

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, set. 2017.

NISHIDA, N. *et al.* Angiogenesis in Cancer. **Vasc Health Risk Manag**, v.2, n.3, p.213-19, Sep.2006.

NIYAZ, M.; KHAN, M.S.; MUDASSAR, S. Hedgehog Signaling: An Achilles' Heel in Cancer. **Transl Oncol.** v.12, n.10, p.1334-44, Oct 2019.

NÜSSLEIN-VOLHARD, C.; WIESCHAUS, E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. **Nature**, v.287, n.5785, p.795-801, Oct.1980.

OREN, O.; SMITH, B.D. Eliminating Cancer Stem Cells by Targeting Embryonic Signaling Pathways. **Stem Cell Rev**, v.13, n.1, p.17-23, Feb. 2017.

O'TOOLE, S. A. *et al.* Hedgehog overexpression is associated with stromal interactions and predicts for poor outcome in breast cancer. **Cancer research**, v.71, n.11, p.4002–14, 1 jun. 2011.

OTSUKA, A. *et al.* Hedgehog signaling in basal cell carcinoma. **J Dermatol Sci**, v.78, n.2, p.95-100, May.2015.

PIETRAS, K.; OSTMAN, A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. **Exp Cell Res.** v. 316, n.8, p.1324-31, mai. 2010.

POTTER, J. D. Morphogens, morphostats, microarchitecture and malignancy. **Nature reviews. Cancer**, v. 7, n. 6, p. 464–74, jun. 2007.

RIOBO-DEL GALDO, N.A.; LARA, MONTERO Á.; WERTHEIMER, E.V. Role of Hedgehog Signaling in Breast Cancer: Pathogenesis and Therapeutics. **Cells.** v.8, n.4, Apr 25 2019.

RIVERA, C. Essentials of oral cancer. **Int J Clin Exp Pathol**, v.8, n.9, p.11884-94, Sep.2015.

RODRIGUES, P.C. *et al.* Clinicopathological prognostic factors of oral tongue squamous cell carcinoma: a retrospective study of 202 cases. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v.43, n.7, p.795–801, jul. 2014.

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, Feb.2015.

ROGERS, K. W.; SCHIER, A. F. Morphogen gradients: from generation to interpretation. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 27, p. 377–407, 2011.

SAHEBJAM, S.; SIU, L.L.; RAZAK, A.A. The utility of hedgehog signaling pathway inhibition for cancer. **The oncologist**, v.17, n.8, p.1090–9, jan. 2012.

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.481-5, Aug.2016.

SAGGI, S. *et al.* Clinicopathologic Characteristics and Survival Outcomes in Floor of Mouth Squamous Cell Carcinoma: A Population-Based Study. **Otolaryngol Head Neck Surg**, Feb. 2018 [Epub ahead of print].

SEKULIC, A. *et al.* Efficacy and Safety of Vismodegib in Advanced Basal-Cell Carcinoma. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 23, p. 2171–2179, 2012.

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.

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, Feb.2018.

SOBRAL, L.M. Isolation and characterization of myofibroblast cell lines from oral squamous cell carcinoma. **Oncol Rep**, v.25, n.4, p.1013-20, Apr. 2011.

TAHARA, M. *et al.* Phase II trial of combination treatment with paclitaxel, carboplatin and cetuximab (PCE) as first-line treatment in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (CSPOR-HN02). **Ann Oncol**, v.29, n.4, p.1004-9, Apr.2018.

TAKABATAKE K. *et al.* The Role of Sonic Hedgehog Signaling in the Tumor Microenvironment of Oral Squamous Cell Carcinoma. **Int J Mol Sci**. v.20, n.22, Nov 2019 Nov.

TAKEBE, N. *et al.* Review of Cancer – Associated Fibroblasts and Therapies that Interfere with Their Activity. **Tumor Microenvironment and Therapy**, p.19-36, 2013.

TANG, D. *et al.* Cancer-associated fibroblasts promote angiogenesis in gastric cancer through galectin-1 expression. **Tumor Biology**, v. 37, n. 2, p. 1889-1899, 2016.

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

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.2134-47, 2017.

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

VIALARD, C.; LARRIVÉE, B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. **Angiogenesis**. v.20, n.4, p.409-26, Nov 2017.

WHO. Chapter 4: Tumours of the Oral Cavity and Oropharynx. **World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours**, p. 163–208, 2005.

WHO. Chapter 4: Tumours of the oral cavity and mobile tongue. **World Health Organization Classification of Head and Neck Tumors**, p. 105–131, 2017.

WEI, R. *et al.* Human CAFs promote lymphangiogenesis in ovarian cancer via the Hh-VEGF-C signaling axis. **Oncotarget**, v.8, n.40, p.67315-67328, Jun.2017.

WICKSTRÖM, M. *et al.* Targeting the hedgehog signal transduction pathway at the level of GLI inhibits neuroblastoma cell growth in vitro and in vivo. **Int J Cancer**. v.132, n.7, p.1516-24, Apr 2013.

WILS, L.J.;BIJLSMA, M.F. Epigenetic regulation of the Hedgehog and Wnt pathways in cancer. **Crit Rev Oncol Hematol**, v.121, p.23-44, Jan.2018.

XIN, M. *et al.* Strategies to target the Hedgehog signaling pathway for cancer therapy. **Med Res Rev**, 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.504-9, 2011.

YAN, L. *et al.* Cancer-associated fibroblasts-derived exosomes-mediated transfer of LINC00355 regulates bladder cancer cell proliferation and invasion. **Cell Biochem Funct.**, Nov 2019.

YESENSKY, J.A. *et al.* Role of dental hardware in oral cavity squamous cell carcinoma in the low-risk nonsmoker nondrinker population. **Head Neck**, v.40, n.4, p.784-792, Apr.2018.

YU, Y. *et al.* Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF- β signalling. **Br J Cancer**, v.110, n.3, p.724-32, Feb.2014.

ZHANG, Q.; PENG, C. Cancer-associated fibroblasts regulate the biological behavior of cancer cells and stroma in gastric cancer. **Oncol Lett**, v.15, n.1, p.691-698, Jan. 2018.

APÊNDICE

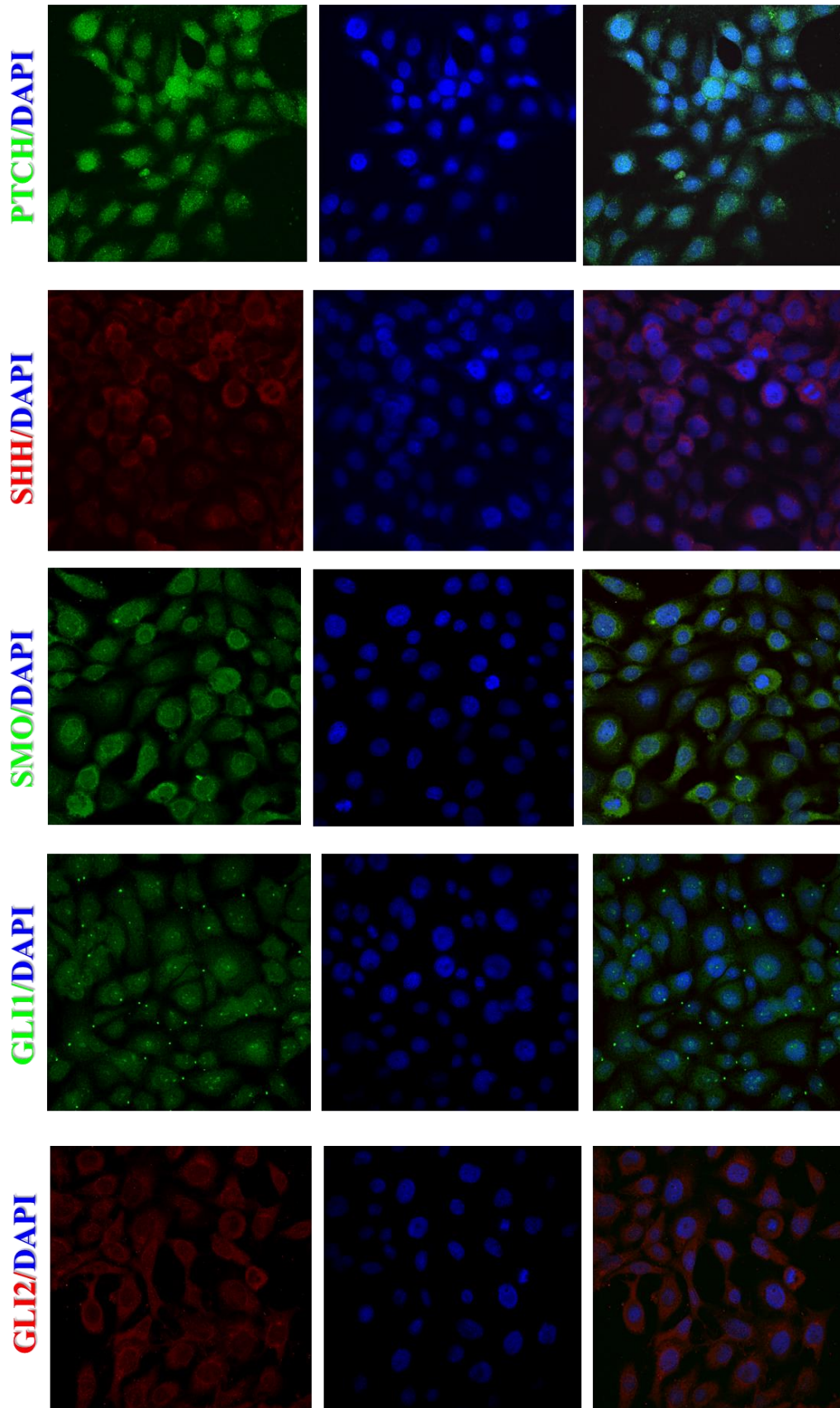
CAL 27

Figura 1. Expressão de componentes da via HH por imunofluorescência, em CAL27.

HSC3

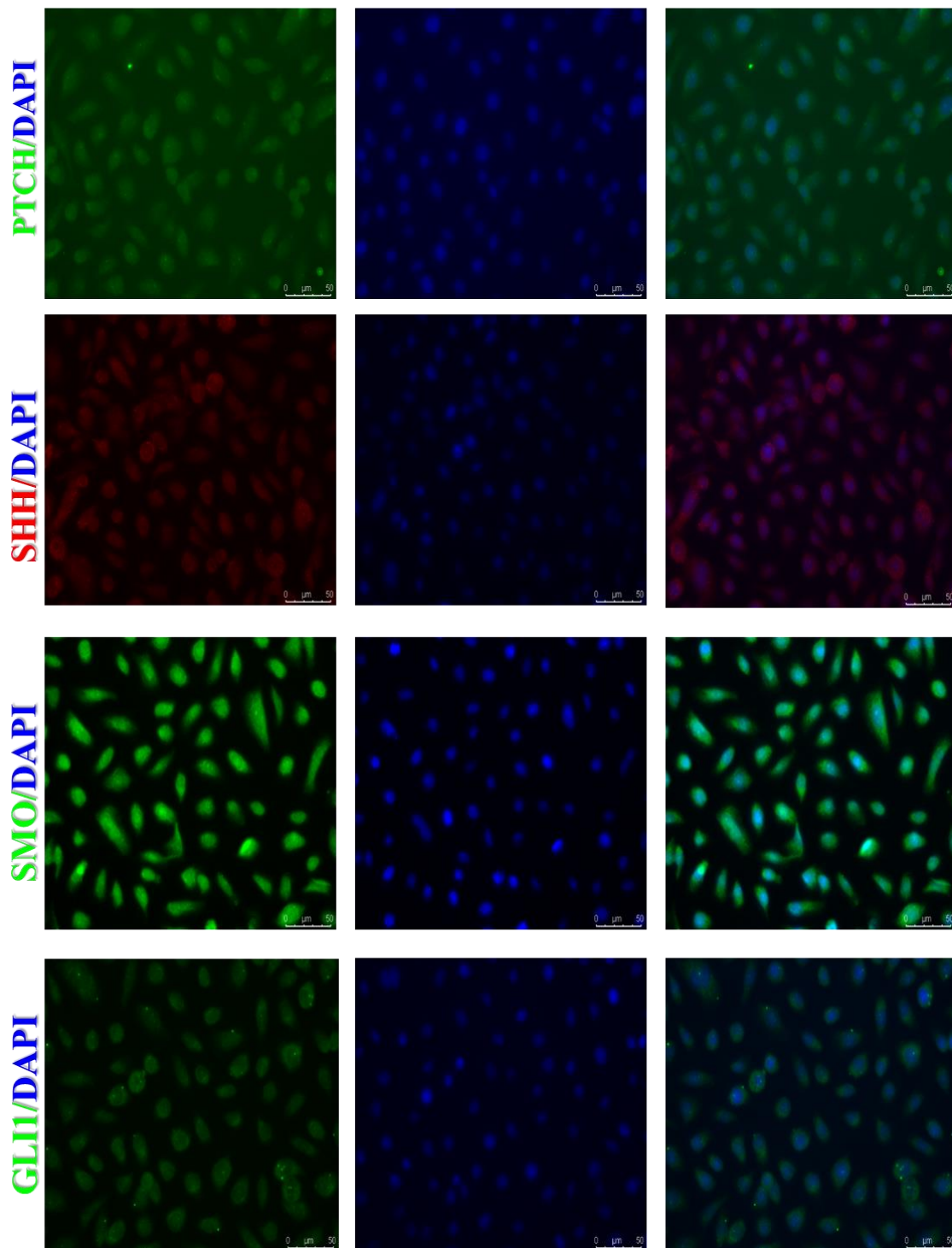


Figura 2. Expressão de componentes da via HH por imunofluorescência, em HSC3.