



POTENCIAL ANTI-TUMORAL DE UM INIBIDOR DE GLI EM CARCINOMA ESCAMOCELULAR ORAL

Clarissa Araújo Gurgel Rocha, Leonardo de Oliveira Siquara da Rocha, Paulo Lucas Cerqueira Coelho, Raphael Luís Rocha Nogueira, Rosane Borges Dias

INTRODUÇÃO

O carcinoma escamocelular oral (CEO) é o tipo histológico mais comum das neoplasias malignas da cavidade oral. Apesar dos avanços no diagnóstico e tratamento, os impactos na sobrevivência e qualidade de vida dos pacientes ainda são insatisfatórios. Por isso, a busca do conhecimento sobre a patogênese, alvos terapêuticos e grupos farmacológicos são importantes para o controle do câncer. Neste contexto, a participação de vias de sinalização embrionária na patogênese das neoplasias vem ganhando destaque na literatura, tal como a via Hedgehog (HH) (TAKABATAKE et al., 2019).

A atividade da via HH envolve três principais ligantes Sonic Hedgehog (SHH), Desert Hedgehog (DHH) e Indian Hedgehog (IHH) e dois receptores Patched1 (PTCH1) e Smoothened (SMO). A ativação clássica da via HH ocorre quando existe a interação entre o ligante HH e o receptor PTCH1, liberando a proteína SMO para iniciar cascatas intracelulares, que irão culminar na ativação de fatores de transcrição da família *Glioma-associated oncogene* (GLI), especialmente o gene GLI-1 (ARMAS-LÓPEZ et al., 2017).

Resultados prévios do nosso grupo demonstram que a via HH está ativada em CEO (CAVICCHIOLI BUIM et al., 2011) e em lesões potencialmente malignas da cavidade oral (DIAS et al., 2016), portanto esta cascata sinalizadora pode ser um alvo interessante como estratégia terapêutica deste tumor.

Através de uma triagem para identificar inibidores de transcrição mediada por GLI, identificamos que o composto "S" (não identificado neste projeto, pela viabilidade patentária para nova aplicação terapêutica), reduz a viabilidade das células tumorais através do bloqueio de GLI. Diante do exposto, o objetivo deste estudo é avaliar os efeitos do composto "S" sobre o ciclo celular e expressão das proteínas da via HH em linhagem metastática de CEO (HSC3).

METODOLOGIA

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

A expressão gênica dos componentes da via HH (SHH, PTCH1, SMO, SUFU, GLI1, GLI2 e GLI3) foi realizada em linhagens de CEO (CAL 27, SCC4, SCC9 e HSC3). Posteriormente, a citotoxicidade do composto-teste foi realizada através do ensaio do Alamar Blue para determinação da sua CI_{50} . A linhagem HSC3 foi a mais sensível ao composto "S" (CI_{50} : 7,40 $\mu\text{g/mL}$), sendo a escolhida para a realização deste estudo. As células foram cultivadas em garrafas para cultura em meio DMEM (Gibco®, Life Technologies) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina e estreptomicina. Posteriormente, as células foram plaqueadas (na concentração $0,7 \times 10^5$ células/mL), tratadas com DMSO 0,2% (controle negativo), 5-Fluorouracil 4 $\mu\text{g/mL}$ (controle positivo), e composto "S" em diferentes concentrações (7,4 e 3,7 $\mu\text{g/mL}$) por 24 horas (para realização do Western Blot e Imunofluorescência) e 72 horas (Análise do ciclo celular por Citometria de Fluxo).

A avaliação da expressão das proteínas PTCH1, SHH, e GLI-1 foi realizada por meio do WB. O extrato de proteico (30 μg) foi fracionado e transferido para uma membrana de nitrocelulose. Foi feita incubação dos anticorpos primários PTCH1 e SHH (Novus Biologicals, 1:500 e 1:100 respectivamente), Gli-1 (Santa Cruz Biotechnology, 1:100) e ACTIN (Sigma-Aldrich, 1:500), seguido da incubação dos anticorpos secundários anti-mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology, 1:10.000) e anti-rabbit IgG (GE Healthcare, 1:10.000). Por meio da técnica de IF também foi avaliada a expressão da proteína GLI-1. Na solução de bloqueio foi feita diluição do anticorpo primário para incubação *overnight* (GLI-1, Santa Cruz Biotechnology, 1:500) e o secundário foi incubado por 1 hora (Anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor® 488, Thermo Fisher, 1:800). As lâminas foram cobertas com lamínulas contendo 4',6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI, Thermo Fisher). Para análise do ciclo celular, o conteúdo de DNA nuclear da célula foi determinado por citometria de fluxo utilizando uma solução contendo iodeto de propídio como agente fluorógeno. A diferença entre os grupos foi avaliada pelo teste ANOVA (análise de variância) seguida do teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

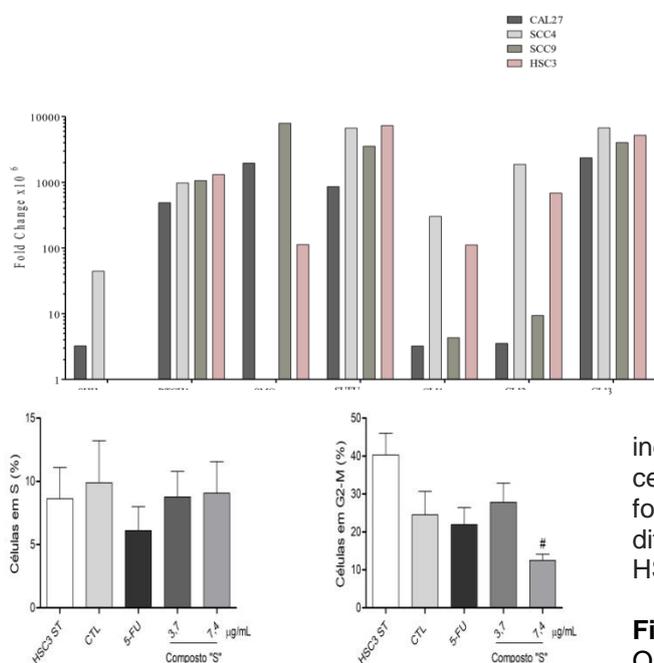


Figura 1. Perfil de expressão gênica dos componentes da via HH em diferentes linhagens de CEO.

Os níveis de mRNA dos fatores de transcrição da família GLI (GLI1, GLI2 e GLI3) foram mais expressos nas linhagens HSC3 e SCC4.

Figura 2. Efeito do inibidor de GLI (Composto "S") sobre o ciclo celular e fragmentação do DNA internucleossomal em células HSC3 após 72h de tratamento.

Os dados são representativos de três experimentos independentes realizados em duplicata. Os debris celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra. Nota: * e # indicam diferença em relação ao controle negativo (DMSO) e HSC3 sem tratamento (HSC3-ST), respectivamente.

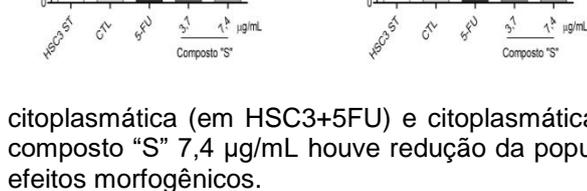
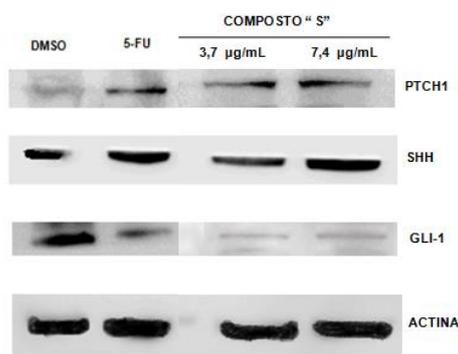
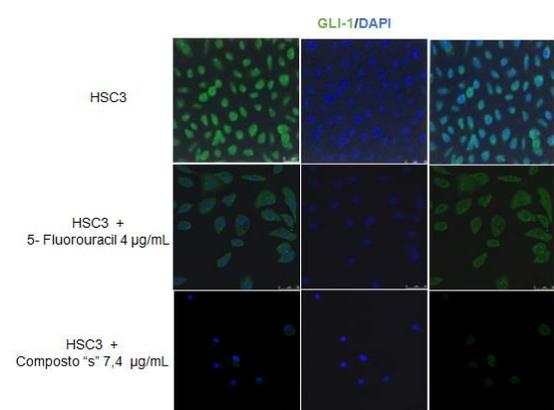


Figura 3. Expressão de GLI-1 por Imunofluorescência. Observa-se imunoposição de GLI-1 (verde) citoplasmática e nuclear (em HSC3), apenas citoplasmática (em HSC3+5FU) e citoplasmática fraca (em HSC3+composto "S"). Em HSC3 tratado com o composto "S" 7,4 µg/mL houve redução da população celular, sugerindo que este composto também exerce efeitos morfogênicos.

Figura 4. Expressão das proteínas da via HH por Western Blot.

Observa-se expressão normal de PTCH1 e SHH, associado a uma fraca expressão de GLI-1 no tratamento com o composto "S" em diferentes concentrações. Nota: A actina foi utilizada como controle da reação.



CONSIDERAÇÕES FINAIS

A inibição farmacológica da via HH através do composto "S" promoveu uma redução significativa das fases G₀-G₁ e G₂-M e um aumento significativo da fragmentação do DNA internucleossomal. Além disso, o tratamento com o composto "S" foi capaz de reduzir a expressão da proteína GLI-1, indicando redução da cascata sinalizadora da via HH.



REFERÊNCIAS

- ARMAS-LÓPEZ, L. et al. **The Hedgehog-Gli pathway in embryonic development and cancer: implications for pulmonary oncology therapy.** Nova Iorque: Oncotarget, 2017.
- CAVICCHIOLI BUIM, M. et al. **Activation of Sonic Hedgehog Signaling in Oral Squamous Cell Carcinomas: A Preliminary Study.** São Paulo: Elsevier, 2011.
- DIAS, R.B. et al. **Enhanced Expression of Hedgehog Pathway Proteins in Oral Epithelial Dysplasia.** Filadélfia: Wolters Kluwer Health, 2016.
- TAKABATAKE, K. et al. **The Role of Sonic Hedgehog Signaling in the Tumor Microenvironment of Oral Squamous Cell Carcinoma.** Basel: MDPI, 2019.