

A EXPRESSÃO DA FOSFOPROTEÍNA INDUZIDA POR ESTRESSE 1 (STIP1) CONTROLA A PROLIFERAÇÃO, MIGRAÇÃO E INVASÃO NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL

Palavras-Chave: STIP1, CÂNCER ORAL, PROLIFERAÇÃO

Autores:

BRUNO CESAR DA COSTA¹

Dr. FÁBIO HAACH TÉO¹

Prof. Dr. RICARDO D. COLETTA (orientador)¹

¹Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas

INTRODUÇÃO:

Nas últimas décadas, diversos biomarcadores com potencial prognóstico têm sido estudados no carcinoma de células escamosas oral (CCEO) (Almagunsh et al., 2017), mas até o momento nenhum apresentou evidências suficientes para sua inclusão na prática clínica (Coletta et al., 2020).

Em um estudo anterior (Korvala et al., 2017), nosso grupo identificou inúmeras proteínas associadas às células invasivas do CCEO, entre elas a fosfoproteína induzida por estresse 1 (STIP1), que demonstrou estar relacionada ao prognóstico dos pacientes (Barros, 2021). Embora a expressão desregulada de STIP1 tenha sido associada a fenótipos de malignização, à resistência terapêutica e ao prognóstico desfavorável para diversos tipos de tumores (Zhang et al., 2018; Krafft et al., 2020), o seu papel no câncer oral ainda não foi devidamente explorado. Com o intuito de ampliar nosso conhecimento sobre a função de STIP1 no câncer oral, o objetivo deste estudo foi avaliar o impacto dessa proteína na viabilidade, apoptose, proliferação, migração e invasão das células do CCEO.

METODOLOGIA:

Inicialmente, a expressão de STIP1 foi quantificada por RT-PCR quantitativo (RT-qPCR) em 1 linhagem de queratinócito normal (human gingival keratinocyte-HGK) e em 6 linhagens de CCEO (HSC3, SCC4, SCC9, SCC15, SCC25 e CAL27). As linhagens com maior nível de expressão (HSC3 e SCC9), após confirmação da superexpressão por ensaio de western blot, foram escolhidas para serem transduzidas com partículas lentivirais para neutralização de STIP1. As células foram transduzidas com construções carregando 2 sequências distintas de STIP1 (a construção #1 é

5'CGACCTTCATCAAGGGTTATA3' e a construção #2 é 5'AGGCCTCATCTCTCTATATTT3') ou com partículas controle da transdução (MISSION® pLKO.1-puro non-mammalian shRNA control transduction particles). Após seleção dos clones resistentes, a eficiência da neutralização foi confirmada por reações de RT-qPCR e western blot.

A viabilidade celular foi determinada com o ensaio colorimétrico de MTS (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega), seguindo as orientações do fabricante.

O ensaio de apoptose e necrose foi baseado na marcação para anexina-V ou 7-AAD, determinada pela leitura de 10.000 eventos em citometria de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences).

Para a análise da proliferação, primeiramente as células foram cultivadas por um período de até 4 dias, sendo o número de células determinado a cada 24 h com o ensaio colorimétrico de MTS. No ensaio de incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU), a incorporação de BrdU nas células em proliferação foi quantificada pelo ensaio de ELISA como descrito pelo fabricante [Kit Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric), Sigma-Aldrich]. E para a realização do ensaio de formação de colônias, as células foram cultivadas em baixa densidade por 10 dias para os clones das células HSC3 e por 14 dias para os clones SCC9, fixadas, coradas, fotografadas e contadas com o auxílio do programa ImageJ.

O ensaio de migração celular foi realizado no sistema Transwell®, sendo as células plaqueadas em insertos de 6,5 mm de diâmetro com membrana de policarbonato contendo poros de 8,0 µm (Corning), com meio completo contendo 10% de FBS na câmara inferior do sistema, como agente quimiotático, e o período de incubação foi de 24 h. As células que migraram através dos poros foram fixadas, coradas e transferidas para uma placa de 96 poços; a absorbância foi mensurada em leitor de ELISA.

Já o ensaio de invasão foi realizado utilizando-se o sistema Transwell/Miogel. Neste caso, os insertos com membrana de policarbonato receberam uma fina camada de Miogel (Salo et al., 2015), também com meio completo contendo 10% de FBS como fator quimiotático na câmara inferior do sistema, e o período de incubação foi de 48 ou 72 h. O processamento seguiu as mesmas etapas do ensaio de migração.

Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos, pelo menos, 3 vezes e expressos como média ± desvio padrão. Na dependência da distribuição dos dados, nós usamos o teste de ANOVA complementado com o teste de múltiplas comparações de Tukey ou o teste de Kurskal-Wallis associado com teste de Dunn. O nível de significância empregado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Como ilustra a Fig. 1, as expressões de STIP1 foram maiores nas células de CCEO que na linhagem HGK, com destaque para as linhagens HSC3 e SCC9. O ensaio de western blot confirmou a superexpressão de STIP1 nas células HSC3 e SCC9 em comparação com a linhagem de queratinócitos normais HGK (Fig. 2).

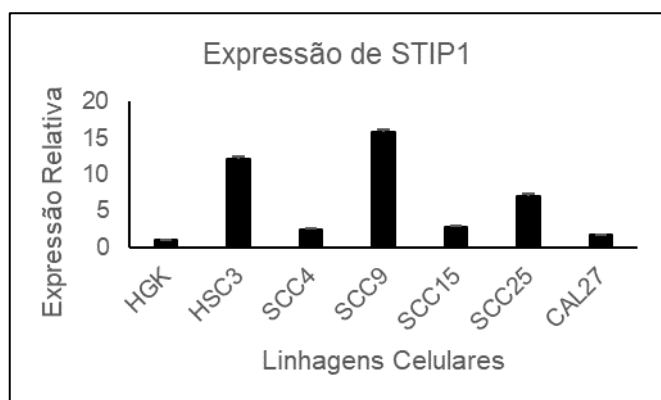


Figura 1 - Análise da expressão de STIP1 nas linhagens de queratinócitos normais (HGK) e de CCEO (HSC3, SCC4, SCC9, SCC15, SCC25 e CAL27).

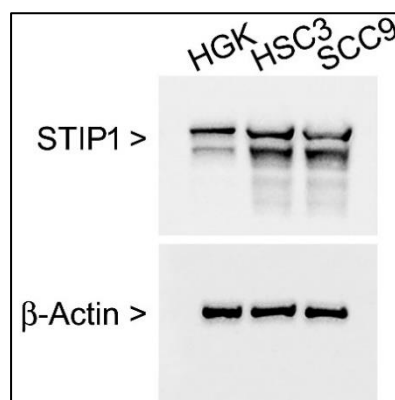


Figura 2 - Ensaio de western blot para STIP1.

Os níveis de mRNA (Fig. 3) e proteína (Fig. 4) foram eficientemente reduzidos nas linhagens celulares transduzidas com as sequências específicas contra STIP1.

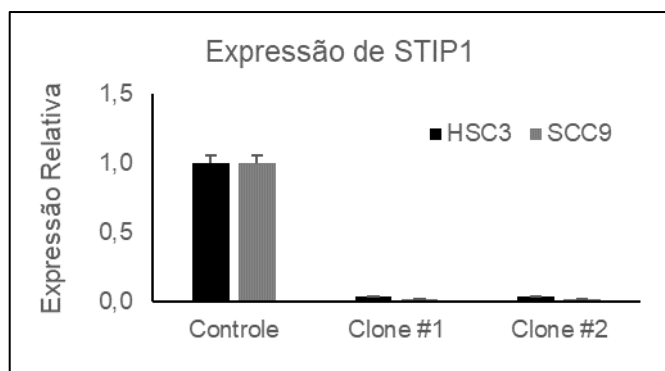


Figura 3 - Análise da expressão de STIP1 nas linhagens celulares transduzidas com as partículas lentivirais. Os clones #1 e #2 para as linhagens de células HSC3 e SCC9 demonstraram níveis drasticamente menores de STIP1 em comparação com as células controle.

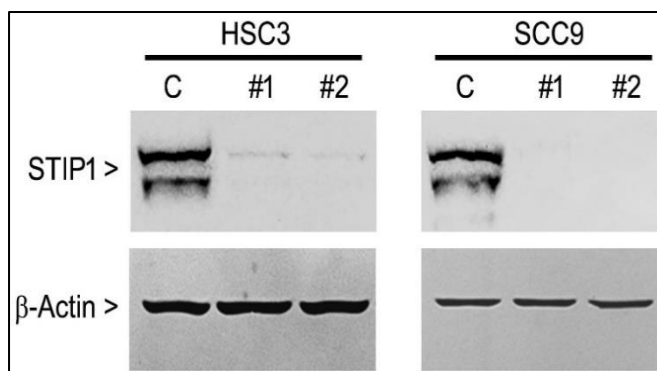


Figura 4 - Análise dos níveis de STIP1 por western blot nos clones controle e específicos. Os níveis de STIP1 foram inibidos nos clones #1 e #2.

Com o ensaio de MTS, foi possível observar que a redução dos níveis de expressão de STIP1 não interferiu na viabilidade celular. A neutralização de STIP1 também não alterou as taxas de apoptose e necrose das células.

Quanto à proliferação, para as células HSC3, foi possível notar uma diferença estatisticamente significativa após 72 e 96 horas de cultivo, quando comparados os índices de proliferação dos clones #1 e #2 com as células controle. As células HSC3 com níveis de expressão de STIP1 reduzidos demonstraram um potencial proliferativo menor que as células controle. Por sua vez, para as células SCC9, foram observadas diferenças significativas já em 48 horas. Os clones #1 e #2 de SCC9 proliferaram menos que as células controle no período entre 48 h e 96 h.

Nos ensaios de incorporação de BrdU (Fig. 5) e formação de colônias, os resultados foram corroborativos com os dados obtidos na análise da curva de proliferação ao demonstrarem que as células com neutralização estável de STIP1 apresentaram um potencial proliferativo significativamente menor quando comparadas às células controle.

O ensaio de migração demonstrou significativa redução no potencial migratório das células HSC3 e SCC9 que tiveram os níveis de STIP1 reduzidos.

Além disso, a regulação negativa de STIP1 foi acompanhada por um potencial de invasão significativamente menor das células HSC3 e SCC9, com a análise quantitativa demonstrando claramente um maior potencial invasivo das células controle em relação aos clones com expressão reduzida de STIP1 (Fig. 6).

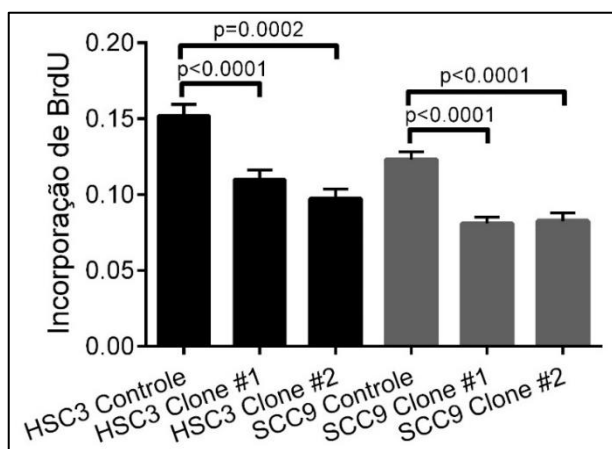


Figura 5 - Ensaio de incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU). A neutralização de STIP1 reduziu significativamente as taxas de proliferação das células HSC3 e SCC9.

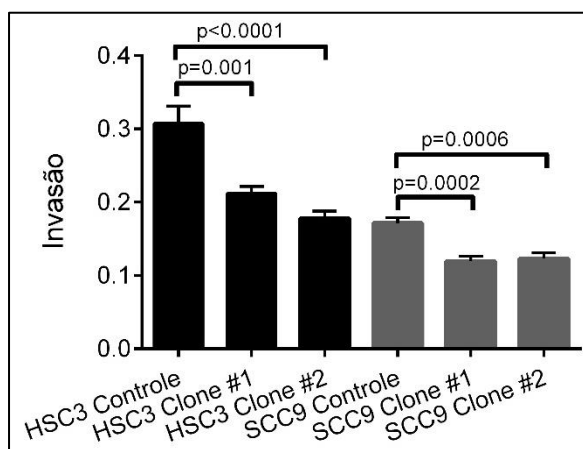


Figura 6 - Ensaio de invasão. A regulação negativa de STIP1 reduziu de modo significativo a invasão das células HSC3 e SCC9 quando comparadas aos controles.

Vários estudos recentes vêm notando uma forte associação entre a expressão desregulada de STIP1 e menores taxas de sobrevida, metástases linfonodais precoces e estágios avançados de câncer em diversos órgãos, o que a indica, portanto, como um biomarcador prognóstico promissor (Zhang et al., 2018). A redução nos níveis de expressão de STIP1 por meio de técnicas de silenciamento gênico reduziu a proliferação celular, a migração e a invasão e induziu a apoptose em linhagens celulares de câncer de mama (Lin et al., 2021), osteossarcoma (Wang et al., 2020), melanoma (Sun et al., 2019), câncer de ovário (Cho et al., 2014) e câncer pancreático (Walsh et al., 2011; Jing et al., 2019). Tais alterações ocorrem por meio da modulação dos mecanismos de transição epitélio-mesênquima, da expressão de metaloproteinases e da regulação de vias de sinalização como FAK/AKT/MMP (Jing et al., 2019), JAK2/STAT3 (Sun et al., 2019; Lin et al., 2021; Chao et al., 2022) e Wnt/ β -catenina (Huang et al., 2018). Da mesma forma, nossos resultados também indicam que a superexpressão dessa proteína resulta em aumento das taxas de proliferação, migração e invasão das células tumorais das linhagens HSC3 e SCC9 de CCEO. Entretanto, efeitos na viabilidade celular ou nos índices de apoptose e necrose não foram observados.

CONCLUSÕES:

A superexpressão de STIP1 resulta em aumento das taxas de proliferação, invasão e migração das células tumorais das linhagens HSC3 e SCC9 de CCEO. Tendo em vista que, até hoje, nenhum dos biomarcadores de CCEO sugeridos na literatura atendem aos critérios para aplicação clínica, espera-se que este estudo possa contribuir para consolidar a importância de STIP1 no controle de eventos associados à progressão do CCEO, consolidando o seu potencial como um marcador para aferir o prognóstico e/ou alvo terapêutico para o câncer oral.

BIBLIOGRAFIA

- Almangush A, Heikkinen I, Mäkitie AA, Coletta RD, Läärä E, Leivo I, Salo T. Prognostic biomarkers for oral tongue squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer*. 2017 Sep;117(6):856-66.
- Barros ISG. Análise do potencial prognóstico da fosfoproteína induzida por estresse 1 (STIP1) no carcinoma de células escamosas oral [trabalho de conclusão de curso - graduação]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas; 2021.
- Chao A, Liao MJ, Chen SH, Lee YS, Tsai CN, Lin CY, Tsai CL. JAK2-Mediated Phosphorylation of Stress-Induced Phosphoprotein-1 (STIP1) in Human Cells. *Int J Mol Sci*. 2022 Feb 22;23(5):2420.
- Cho H, Kim S, Shin HY, Chung EJ, Kitano H, Hyon Park J, Park L, Chung JY, Hewitt SM, Kim JH. Expression of stress-induced phosphoprotein1 (STIP1) is associated with tumor progression and poor prognosis in epithelial ovarian cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2014 Apr;53(4):277-88.
- Coletta RD, Yeudall WA, Salo T. Grand Challenges in Oral Cancers. *Front. Oral. Health*. 2020 June;1:3.
- Huang L, Zhai E, Cai S, Lin Y, Liao J, Jin H, Peng S, Xu L, Chen M, Zeng Z. Stress-inducible protein-1 promotes metastasis of gastric cancer via Wnt/ β -catenin signaling pathway. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018 Jan 15;37(1):6.
- Jing Y, Liang W, Liu J, Zhang L, Wei J, Zhu Y, Yang J, Ji K, Zhang Y, Huang Z. Stress-induced phosphoprotein 1 promotes pancreatic cancer progression through activation of the FAK/AKT/MMP signaling axis. *Pathol Res Pract*. 2019 Nov;215(11):152564.
- Korvala J, Jee K, Porkola E, Almangush A, Mosakhani N, Bitu C, Cervigne NK, Zandonadi FS, Meirelles GV, Leme AFP, Coletta RD, Leivo I, Salo T. MicroRNA and protein profiles in invasive versus non-invasive oral tongue squamous cell carcinoma cells in vitro. *Exp Cell Res*. 2017 Jan 1;350(1):9-18.
- Krafft U, Tschirdewahn S, Hess J, Harke NN, Hadaschik BA, Nyirády P, Szendrői A, Szücs M, Módos O, Olah C, Székely E, Reis H, Szarvas T. STIP1 Tissue Expression Is Associated with Survival in Chemotherapy-Treated Bladder Cancer Patients. *Pathol Oncol Res*. 2020 Apr;26(2):1243-1249.
- Lin L, Wen J, Lin B, Xia E, Zheng C, Ye L, Wang Y, Wang O, Chen Y. Stress-induced phosphoprotein 1 facilitates breast cancer cell progression and indicates poor prognosis for breast cancer patients. *Hum Cell*. 2021 May;34(3):901-917.
- Salo T, Sutinen M, Hoque Apu E, Sundquist E, Cervigne NK, de Oliveira CE, Akram SU, Ohlmeier S, Suomi F, Eklund L, Juusela P, Åström P, Bitu CC, Santala M, Savolainen K, Korvala J, Paes Leme AF, Coletta RD. A novel human leiomyoma tissue derived matrix for cell culture studies. *BMC Cancer*. 2015 Dec 16;15:981.
- Sun X, Cao N, Mu L, Cao W. Stress induced phosphoprotein 1 promotes tumor growth and metastasis of melanoma via modulating JAK2/STAT3 pathway. *Biomed Pharmacother*. 2019 Aug;116:108962.
- Walsh N, Larkin A, Swan N, Conlon K, Dowling P, McDermott R, Clynes M. RNAi knockdown of Hop (Hsp70/Hsp90 organising protein) decreases invasion via MMP-2 down regulation. *Cancer Lett*. 2011 Jul 28;306(2):180-9.
- Wang JH, Gong C, Guo FJ, Zhou X, Zhang MS, Qiu H, Chao TF, Liu Y, Qin L, Xiong HH. Knockdown of STIP1 inhibits the invasion of CD133 positive cancer stem like cells of the osteosarcoma MG63 cell line via the PI3K/Akt and ERK1/2 pathways. *Int J Mol Med*. 2020 Dec;46(6):2251-9.
- Zhang S, Shao J, Su F. Prognostic significance of STIP1 expression in human cancer: A meta-analysis. *Clin Chim Acta*. 2018 Nov;486:168-176.