



ESTABELECIMENTO DE LINHAGEM CELULAR DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÍNGUA ORAL RESISTENTE À CISPLATINA: IMPACTO SOBRE O COMPORTAMENTO BIOLÓGICO.

Palavras-Chave: PROGNÓSTICO, CÂNCER ORAL, QUIMIORRESISTÊNCIA

Autores(as):

RAFAELA FERNANDA DE SOUZA¹

Dr. EVERTON FREITAS DE MORAIS (orientador)¹

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

¹Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas

INTRODUÇÃO:

O carcinoma de células escamosas (CCE) é um tipo de câncer de alta prevalência em cabeça e pescoço, sendo o processo neoplásico maligno de maior acometimento em cavidade oral. A taxa de sobrevivência em 5 anos é de aproximadamente 50%, reduzindo para menos de 30% em estágios avançados. A ressecção cirúrgica com margem de segurança é o padrão ouro para o tratamento do CCE oral. Entretanto, em casos diagnosticados em estágios avançados, comumente é realizado o tratamento multimodal com radio/quimioterapia adjuvante ao tratamento cirúrgico. O principal medicamento quimioterápico no tratamento do CCE oral é a cisplatina, mas a quimiorresistência celular inibe os efeitos do tratamento oncológico, tornando a célula neoplásica resistente ao tratamento oncológico e, conseqüentemente, está associado a um comportamento biológico agressivo e um pior prognóstico. A transição epitelial-mesenquimal (TEM) é um processo importante que pode estar associado à indução da quimiorresistência. O estudo busca estabelecer linhagens de CCE de língua oral resistentes à cisplatina (SCC-9R) e avaliar como a quimiorresistência altera os processos de invasão, migração, apoptose e proliferação das células neoplásicas, bem como avaliar a expressão dos marcadores da TEM, E-caderina e Vimentina, comparando

o comportamento das células resistentes com as não-resistentes. Compreender esses mecanismos é fundamental para o desenvolvimento de estratégias eficazes contra a resistência à cisplatina em pacientes com CCE oral.

METODOLOGIA:

O estudo utiliza células SCC-9 de carcinoma de células escamosas (CCE) oral para investigar a resistência à cisplatina. O método de indução de resistência consiste em tratamentos alternados com cisplatina, iniciando com um teste de viabilidade para identificar o IC50 da linhagem SCC-9 de carcinoma de células escamosas (CCE) oral. Posteriormente, realizou-se o processo de indução da quimiorresistência através de tratamentos com escala progressiva da dose, começando no IC2.5 e aumentando gradualmente até o IC50. Serão realizadas análises de qPCR e Western blot para avaliar a expressão dos genes E-caderina e Vimentina. O comportamento biológico das linhagens resistentes e sensíveis será analisado quanto à viabilidade, índice de proliferação com BrdU e potencial migratório e invasivo. Os experimentos serão repetidos três vezes e os resultados apresentados como média \pm desvio padrão. Análises estatísticas, como Kruskal-Wallis e teste T, serão aplicadas aos dados. O estudo visa compreender os mecanismos de resistência à cisplatina e a influência da transição epitelial-mesenquimal no CCE oral.

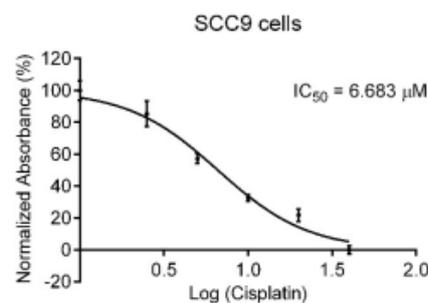


Figura 1. Determinação do IC50 para CCPD nas células SCC-9.

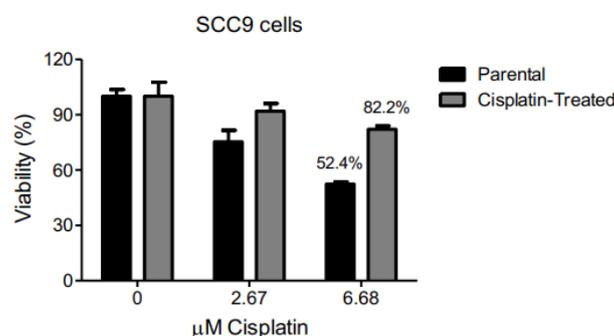


Figura 2. Viabilidade celular na ausência (grupos controle) e presença de cisplatina nas dosagens 2.67 µM (IC20) e 6.68 µM (IC50) em 24 h nas linhagens SCC-9 parental e SCC9R (em processo de indução da quimiorresistência).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A transição epitelial-mesenquimal (TEM) converte células epiteliais em células mesenquimais através da regulação negativa de marcadores epiteliais, como a E-caderina, promovendo a perda de polaridade e adesão intercelular, e regulação positiva de marcadores mesenquimais, como a vimentina, objetivando aumentar a motilidade. O processo de quimiorresistência desenvolvido no presente estudo elevou significativamente a expressão da Vimentina e inibiu a expressão E-caderina, confirmando o papel da TEM no processo de quimiorresistência. A morfologia celular da linhagem SCC-9 também sofreu mudanças gradualmente após o processo de indução da quimiorresistência. A linhagem, inicialmente de aspecto morfológico arredondada e fortemente aderidas, adquiriram aspecto fusiforme e evidenciaram uma menor conexão célula-célula. Essas alterações na morfologia celular sugeriram a conversão do fenótipo epitelial para mesenquimal por meio da ativação do processo EMT, que foi identificado pela perda gradativa de E-caderina e acúmulo de Vimentina. Foi levantada a hipótese de que as células neoplásicas quimiorresistentes são submetidas a TEM como método de escape da resposta imunológica e para facilitar o processo de migração e invasão, assim, invadir o tecido circundante e colonizar locais remotos via metástase por vasos sanguíneos ou vias linfáticas. Nosso estudo analisou a capacidade de migração e invasão em células SCC-9 parentais e SCC-9R, onde foi evidenciado uma maior capacidade de migração e invasão celular em linhagens SCC-9R. Nosso estudo observou que a quimiorresistência foi associada a um aumento significativo na capacidade de migração e invasão nas duas linhagens celulares analisadas em nossa amostra, assim como evidenciou uma queda no índice proliferativo na linhagem SCC-9. Portanto, o presente estudo confirma que a TEM acionada pelo TWIST1 atua como um modular de agressividade em linhagens de CCELO.

CONCLUSÕES:

Nosso estudo analisou a capacidade de migração e invasão em células SCC-9 parentais e SCC-9R, onde foi evidenciado uma maior capacidade de migração e invasão celular em linhagens SCC-9R. Nosso estudo observou que a quimiorresistência foi associada a um aumento significativo na capacidade de migração e invasão nas duas linhagens celulares analisadas em nossa amostra, assim como evidenciou uma queda no índice proliferativo na linhagem SCC-9. Portanto, o presente estudo confirma que a TEM acionada pelo TWIST1 atua como um modular de agressividade em linhagens de CCELO.

BIBLIOGRAFIA

Almeida LY, Moreira FDS, Santos GASD, Cuadra Zelaya FJM, Ortiz CA, Agostini M, Mariano FS, Bastos DC, Daher URN, Kowalski LP, Coletta RD, Graner E. FASN inhibition sensitizes metastatic OSCC cells to cisplatin and paclitaxel by downregulating cyclin B1. *Oral Dis.* 2021 Sep 12. doi: 10.1111/odi.14017.

Amaral MVS, DE Sousa Portilho AJ, DA Silva EL, et al. Establishment of Drug-resistant Cell Lines as a Model in Experimental Oncology: A Review. *Anticancer Res.* 2019;39(12):6443-6455. doi:10.21873/anticancer.13858.

Barr MP, Gray SG, Hoffmann AC, Hilger RA, Thomale J, O'Flaherty JD, Fennell DA, Richard D, O'Leary JJ, O'Byrne KJ. Generation and characterisation of cisplatin-resistant non-small cell lung cancer cell lines displaying a stem-like signature. *PLoS One.* 2013;8(1):e54193. doi: 10.1371/journal.pone.0054193.

Bray, L. J., Hutmacher, D. W., & Bock, N. (2019). Addressing patient specificity in the engineering of tumor models. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 217. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00217>.

Canino C, Cioce M. Isolation of Chemoresistant Cell Subpopulations. *Methods Mol Biol.* 2016;1379:139-150. doi:10.1007/978-1-4939-3191-0_13.

Cheng Y, Li S, Gao L, Zhi K, Ren W. The Molecular Basis and Therapeutic Aspects of Cisplatin Resistance in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Front Oncol.* 2021 Oct 22;11:761379. doi: 10.3389/fonc.2021.761379.

de Moraes EF, de Farias Moraes HG, de Moura Santos E, et al. TWIST1 regulates proliferation, migration, and invasion and is a prognostic marker for oral tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2023;52(2):127-135. doi:10.1111/jop.13377.

Du B, Shim JS. Targeting Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) to Overcome Drug Resistance in Cancer. *Molecules.* 2016 Jul 22;21(7):965.

Lima de Oliveira J, Moré Milan T, Longo Bighetti-Trevisan R, Fernandes RR, Machado Leopoldino A, Oliveira de Almeida L. Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: A route to acquired cisplatin resistance through epigenetics in HNSCC [published online ahead of print, 2022 Apr 11]. *Oral Dis.* 2022;10.1111/odi.14209. doi:10.1111/odi.14209.

Eljabo N, Nikolic N, Carkic J, et al. Genetic and epigenetic alterations in the tumour, tumour margins, and normal buccal mucosa of patients with oral cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2018;47(8):976-982. doi:10.1016/j.ijom.2018.01.020.

Emran TB, Shahriar A, Mahmud AR, et al. Multidrug Resistance in Cancer: Understanding Molecular Mechanisms, Immunoprevention and Therapeutic Approaches. *Front Oncol.* 2022;12:891652. Published 2022 Jun 23. doi:10.3389/fonc.2022.891652.

Fisher R, Puzstai L, Swanton C. Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. *Br J Cancer*. 2013;108(3):479-485. doi:10.1038/bjc.2012.581.

Georgaki M, Theofilou VI, Pettas E, et al. Understanding the complex pathogenesis of oral cancer: A comprehensive review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2021;132(5):566-579. doi:10.1016/j.oooo.2021.04.004.

Ghantous Y, Nashef A, Abu-Elnaaj I. Epigenetic Alterations Associated with the Overall Survival and Recurrence Free Survival among Oral Squamous Cell Carcinoma Patients. *J Clin Med*. 2020 Apr 7;9(4):1035. doi: 10.3390/jcm9041035. PMID: 32272578; PMCID: PMC7231254.

Housman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, Sarkar S. Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers (Basel)*. 2014 Sep 5;6(3):1769-92. doi: 10.3390/cancers6031769. PMID: 25198391; PMCID: PMC4190567.

Neville, B. W., and D. D. Damm. *Patologia Oral & Maxilofacial*. Elsevier: 4. Edição. 2016.

Salo T, Sutinen M, Hoque Apu E, Sundquist E, Cervigne NK, de Oliveira CE, Akram Shang HG, Yu HL, Ma XN, Xu X. Multidrug resistance and tumor-initiating capacity of oral cancer stem cells. *J BUON*. 2016;21(2):461-465.

Shirmanova MV, Druzhkova IN, Lukina MM, et al. Chemotherapy with cisplatin: insights into intracellular pH and metabolic landscape of cancer cells in vitro and in vivo. *Sci Rep*. 2017;7(1):8911. Published 2017 Aug 21. doi:10.1038/s41598-017-09426-4.

Song KA, Faber AC. Epithelial-to-mesenchymal transition and drug resistance: transitioning away from death. *J Thorac Dis*. 2019 Jun;11(6):E82-E85. doi: 10.21037/jtd.2019.06.11.

SU, Ohlmeier S, Suomi F, Eklund L, Juusela P, Åström P, Bitu CC, et al. A novel human leiomyoma tissue derived matrix for cell culture studies. *BMC Cancer*. BioMed Central; 2015; 15: 981. doi: 10.1186/s12885-015-1944-z.

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660.

Tagliabue M, De Berardinis R, Belloni P, Gandini S, Scaglione D, Maffini F, Mirabella RA, Riccio S, Gioacchino G, Bruschini R, Chu F, Ansarin M. Oral tongue carcinoma: prognostic changes according to the updated 2020 version of the AJCC/UICC TNM staging system. *Acta Otorhinolaryngol Ital*. 2022 Apr;42(2):140-149. doi: 10.14639/0392-100X-N2055.

Zahreddine H, Borden K: Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. *Front Pharm* 4: 28, 2013. PMID: 23504227. DOI: 10.3389/fphar.2013.00028.