

## **Avaliação do Efeito da Quimiorresistência à Cisplatina na Expressão de STIP1, HSP47 e HSF1 em Carcinoma de Células Escamosas Oral**

**Palavras-Chave: quimiorresistência; cisplatina; STIP1-HSP47-HSF1.**

**Autores:**

**Beatriz de Barros Simões, FOP-Unicamp**

**Prof. Dr. Ricardo Della Coletta (orientador), FOP-Unicamp**

**Prof. Dr. Everton Freitas de Moraes (coorientador), FOP-Unicamp**

---

### **INTRODUÇÃO:**

O carcinoma de células escamosas oral (CCEO) é um dos cânceres mais prevalentes em todo o mundo, com uma incidência global de aproximadamente 400 mil novos casos e 200 mil óbitos por ano (Sung et al., 2021). O tratamento do CCEO é baseado em cirurgia associada à radioterapia com ou sem quimioterapia e, mais recentemente, a imunoterapia e as terapias-alvo têm demonstrado resultados promissores (Kumar et al., 2021). Mesmo adotando tais formas de tratamento, o prognóstico dos pacientes ainda é desfavorável e a taxa de sobrevivência em 5 anos é de aproximadamente 40-50%, em estágios avançados essa taxa é reduzida para menos de 30% (Kowalski et al., 2020). A cisplatina é o agente quimioterápico mais utilizado no tratamento do CCEO e embora seja um fármaco importante para o tratamento, as células tumorais podem adquirir resistência à droga, o que intensifica o comportamento agressivo do tumor e piora o prognóstico do paciente (Atashi et al., 2021). Sendo assim, uma das prioridades da atualidade é identificar os mecanismos associados a esse processo bem como encontrar maneiras de preveni-lo ou revertê-lo. Os mecanismos relacionados a quimiorresistência são complexos, heterogêneos e parcialmente conhecidos e incluem mecanismos de redução da concentração de cisplatina dentro das células tumorais, por inativação via a ligação a glutatona e metalotioneínas, por rápida reparação do DNA ou por desencadear respostas adaptativas para neutralizar os efeitos tóxicos da droga, as quais são dependentes de interações com proteínas e RNAs não-codificantes (Ghosh, 2019). Este último pode ser mediado pela superexpressão das proteínas do estresse celular, que são capazes de neutralizar os efeitos citotóxicos das drogas à base de platina (Krawczyk et al., 2018). O objetivo deste estudo é verificar o impacto da resistência à cisplatina na expressão e produção de proteínas do estresse celular, incluindo STIP1, HSP47 e HSF1, em CCEO.

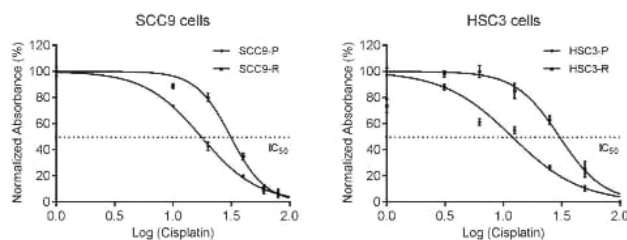
### **METODOLOGIA:**

Para alcançar o objetivo geral do estudo, linhagens celulares de CCEO (SCC9 e HSC3) resistentes à cisplatina foram estabelecidas baseando-se no método descrito por Barr et al. (2013), com modificações. As células quimiorresistentes foram então caracterizadas em relação ao patamar de resistência com o sistema da Promega® CellTiter-Glo 3D Cell Viability Assay e em relação à expressão de marcadores de transição epitelial-mesenquimal (TEM) por RT-qPCR, western blot e imunofluorescência (Ferreira do Carmo et al., 2020). Os marcadores de TEM incluídos foram E-caderina, vimentina, TWIST e SNAIL1. O comportamento celular em relação ao potencial de migração e invasão foi verificado por ensaios de transwell, com poros recobertos com miogel nos ensaios de invasão (Dourado et al., 2023). As análises da expressão e produção de STIP1, HSP47 e HSF1 nas linhagens parentais e quimiorresistentes foram realizadas por RT-qPCR e western blot, respectivamente.

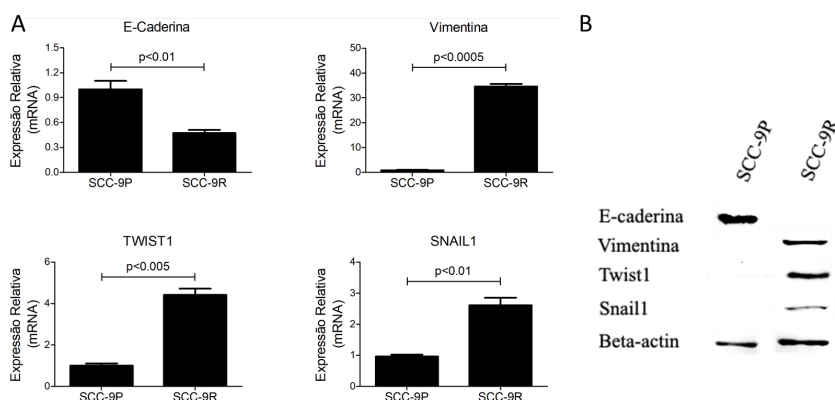
### **RESULTADOS E DISCUSSÃO:**

Após o tratamento das células para a aquisição da quimiorresistência, curvas de viabilidade celular para calcular o IC50 foram realizadas. Com base nos nossos achados, as células SCC-9 resistentes (SCC-9R) necessitaram de uma dose 2,8x maior de cisplatina para alcançarem o IC50 em comparação das células parentais (SCC-9P), enquanto que as células HSC-3 resistentes (HSC-3R) necessitam de uma dose 3,55x maior que as células HSC-3 parentais (HSC-3P) para alcançarem o IC50. (Fig. 1). A quimiorresistência foi acompanhada pela aquisição de um fenótipo de TEM. Nas células SCC-9R, em comparação com a linhagem parental, houve redução na expressão de E-caderina,

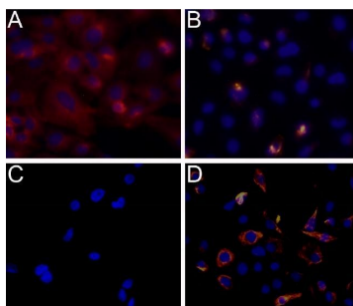
bem como elevação na expressão de vimentina e dos fatores de transcrição indutores da TEM SNAIL1 e TWIST1 (Fig. 2A). As células também foram submetidas a ensaios de western blot para estes mesmos marcadores, que confirmaram a redução na expressão de E-caderina e aumento no conteúdo proteico dos outros marcadores, incluindo vimentina, TWIST1 e SNAIL1 (Fig.2B). Ainda durante a caracterização das células SCC-9R, reações de imunofluorescência para E-caderina e vimentina foram realizadas. Como pode ser observado nas imagens apresentadas na Fig. 3, as células resistentes apresentam claro formato fusiforme, bem como ganho na expressão de vimentina e perda de expressão de E-caderina.



**Figura 1.** Determinação do IC50 para as células submetidas à aquisição da quimiorresistência. Após tratamento com doses crescentes de cisplatina, SCC-9R e HSC-3R requereram doses superiores às das células parentais para alcançar o nível do IC50.

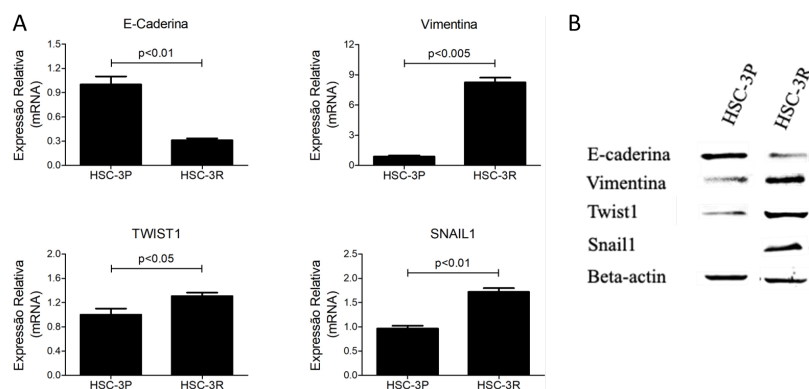


**Figura 2.** Análise dos marcadores da TEM nas células SCC-9P e SCC-9R. (A) Após isolamento do RNA total e síntese de cDNA, as amostras foram submetidas à reação de qPCR para avaliar a expressão dos marcadores específicos da TEM. (B) Reações de western blot confirmaram que as células SCC-9R apresentam redução drástica na expressão de E-caderina e aumento nas expressões dos marcadores mesenquimais vimentina, TWIST1 e SNAIL1.

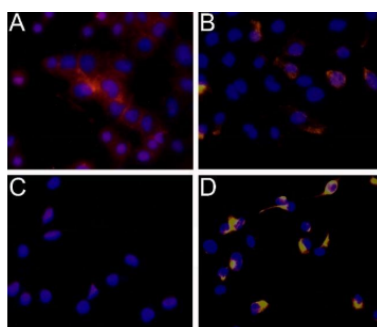


**Figura 3.** Reação de imunofluorescência para E-caderina e vimentina nas células SCC-9P e SCC-9R. Em A e B células SCC-9P e em C e D células SCC-9R. A marcação para E-caderina é ilustrada em A e C e para vimentina em B e D. (x200, ocular 10x e objetiva 20x)

Os mesmos procedimentos (RT-qPCR, western blot e imunofluorescência) foram realizados nas linhagens HSC-3P e HSC-3R. O comportamento de aquisição de um perfil de TEM foi parecido, porém com alguns sinais menos intensos comparado às células SCC-9. O formato fusiforme, bem evidente nas células SCC-9R, não foi detectado claramente nas células HSC-3R, mesmo com aumento na expressão dos marcadores de células mesenquimais. Contudo, a proliferação dessas células foi afetada mais intensamente, sendo que as células HSC-3R proliferam mais lentamente que as células parentais (Fig. 4 e 5).

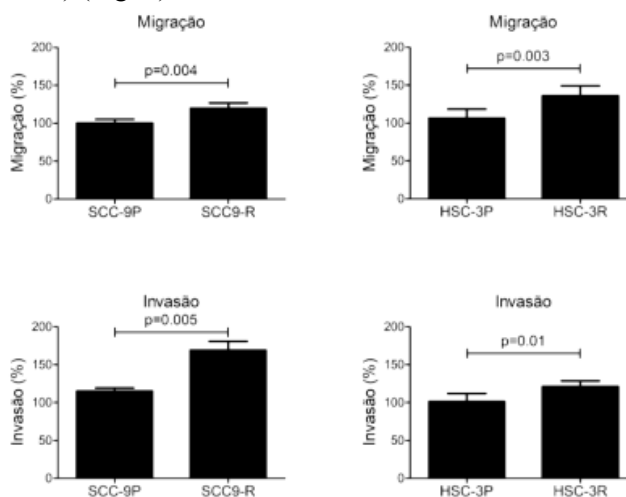


**Figura 4.** Análise da expressão dos marcadores da TEM nas células HSC-3P e HSC-3R. (A) Após isolamento do RNA total e a síntese de cDNA, as amostras foram submetidas a reação de qPCR para avaliar a expressão dos marcadores específicos da TEM. (B) Avaliação dos marcadores da TEM nas células HSC-3P e HSC-3R por western blot. Como revelado pelas reações de western blot, as células HSC-3R reduzem drasticamente a expressão de E-caderina, ao passo que aumentam as expressões dos marcadores mesenquimais vimentina, TWIST1 e SNAIL1.



**Figura 5.** Reação de imunofluorescência para E-caderina e vimentina nas células HSC-3P e HSC-3R. Em A e B células HSC-3P e em C e D células HSC-3R. A marcação para E-caderina é ilustrada em A e C e para vimentina em B e D. (x200, ocular 10x e objetiva 20x)

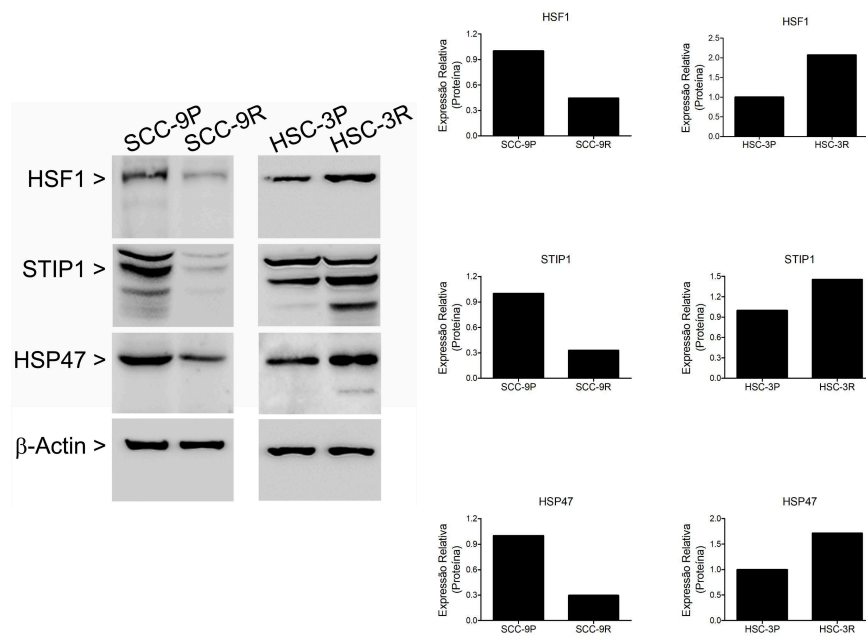
Os desfechos relevantes para as células que adquirem um perfil de TEM são os ganhos na capacidade de migração e invasão. Sendo assim, nós realizamos ensaios com transwell para comparar o potencial de migração e invasão entre as células parentais e resistentes à cisplatina. As células resistentes (SCC-9R e HSC-3R), como esperado, adquiriram potencial significativamente maior de migração e invasão (em miogel) comparado com as células parentais (SCC-9P e HSC-3P) (Fig. 6).



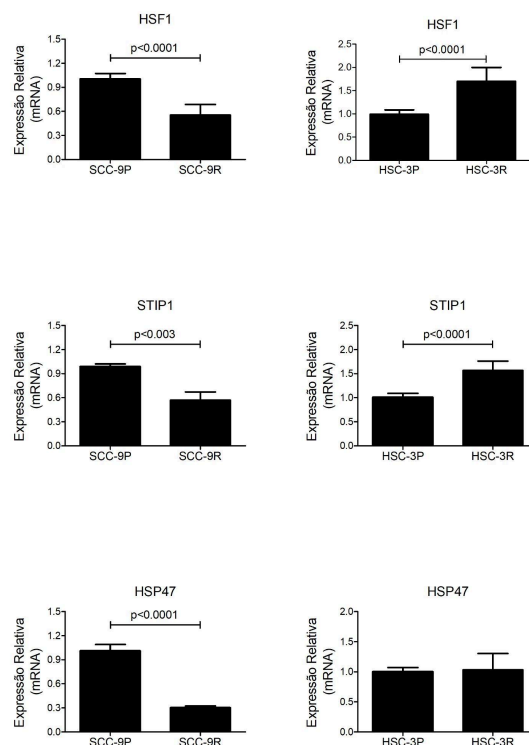
**Figura 6.** Ensaios de migração vertical e invasão foram realizados com transwells, com poros da membrana cobertos por miogel nos experimentos de invasão, conforme descrito em materiais e métodos no projeto. Os experimentos demonstraram que a capacidade de migração e invasão das células resistentes à cisplatina foi significativamente maior que os controles parentais.

Para avaliar os níveis de expressão e produção de STIP1, HSP47 e HSF1 nas linhagens parentais e

quimiorresistentes, ensaios western blot foram realizados para a determinação da produção das proteínas, tendo como parâmetro de comparação as células parentais. A linhagem SCC-9R apresenta drástica diminuição da produção das três proteínas, principalmente HSF1 e STIP1. Ao passo que a linhagem HSC-3R demonstra aumento da produção dos marcadores (Fig. 7). Para determinarmos a expressão dos marcadores, ensaios RT-qPCR foram realizados. Ambas linhagens mantiveram os padrões observados anteriormente. A linhagem SCC-9R demonstra claro padrão de diminuição na expressão de STIP1, HSF1 e HSP47. Em contrapartida, na linhagem HSC-3R a situação foi inversa, onde há um aumento na expressão dos três marcadores (Fig. 8).



**Figura 7.** Análise da produção das proteínas relacionadas ao estresse celular STIP1, HSP47 e HSF1. (A) As amostras foram submetidas a ensaios de western blot utilizando anticorpos específicos. (B) Quantificação densitométrica das bandas demonstradas em A. Observa-se que as células SCC-9R reduzem drasticamente a produção de HSF1, STIP1 e HSP47, ao passo que as células HSC-3R demonstram aumento na produção de HSF1, STIP1 e HSP47.



**Figura 8.** Análise da expressão das proteínas relacionadas ao estresse celular STIP1, HSP47 e HSF1. Como revelado, as células SCC-9R reduzem drasticamente a expressão de HSF1, STIP1 e HSP47, ao passo que as células HSC-3R aumentam as expressões de HSF1 e STIP1.

### **CONCLUSÕES:**

Os resultados obtidos confirmam a relação entre a aquisição de resistência à cisplatina e a transformação das linhagens celulares SCC-9 e HSC-3 para um perfil mesenquimal via ativação de fatores de transcrição (TWIST1 e SNAIL1) relacionados a TEM. A quimiorresistência tem como consequência a expressão elevada de vimentina, redução na expressão de E-caderina e aumento no potencial de migração e invasão das células. Por meio dos experimentos realizados, podemos afirmar que é evidente a relação entre a quimiorresistência adquirida pelas células e a superexpressão das proteínas STIP1, HSP47 e HSF1 na linhagem HSC-3R, em comparação com as células parentais (HSC-3P). Este fato confirma a hipótese de que os níveis elevados de proteínas do estresse nas células de CCEO contribuem para uma resposta inadequada ao tratamento, limitando a aplicação e eficácia da cisplatina, intensificando o comportamento agressivo do tumor e piorando o prognóstico do paciente. No entanto, uma resposta diferente foi observada nas células SCC-9, indicando que a aquisição da resistência à cisplatina não é associada a essas proteínas do estresse celular nessa linhagem. Portanto, frente ao grande desafio enfrentado na atualidade no que diz respeito ao tratamento dos pacientes com CCEO, o viés de pesquisa da quimiorresistência à cisplatina, com enfoque na superexpressão das proteínas do estresse celular, deve continuar sendo explorado para que os resultados obtidos sejam aplicados na tentativa esperançosa de melhorar o prognóstico dos pacientes bem como a resposta ao tratamento do carcinoma de células escamosas oral.

### **BIBLIOGRAFIA:**

**Atashi F, Vahed N, Emamverdizadeh P, et al.** Drug resistance against 5-fluorouracil and cisplatin in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. Summer 2021; 15(3):219-225.

**Barr MP, Gray SG, Hoffmann AC, et al.** Generation and characterisation of cisplatin-resistant non-small cell lung cancer cell lines displaying a stem-like signature. *PLoS One*. 2013;8(1):e54193.

**Dourado MR, Elseragy A, da Costa BC, et al.** Stress induced phosphoprotein 1 overexpression controls proliferation, migration and invasion and is associated with poor survival in oral squamous cell carcinoma. *Front Oncol*. 2023 Jan 11;12:1085917.

**Ferreira do Carmo A, Dourado MR, Ervolino de Oliveira C, et al.** Stanniocalcin 2 contributes to aggressiveness and is a prognostic marker for oral squamous cell carcinoma. *Exp Cell Res*. 2020 Aug 15;393(2):112092.

**Ghosh S.** Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorg Chem*. 2019 Jul;88:102925.

**Kowalski LP, Coletta RD, Salo T, et al.** Head and neck cancer: Emerging concepts in biomarker discovery and opportunities for clinical translation. *Clin Transl Med*. 2020 Nov;10(7):e209.

**Krawczyk Z, Gogler-Pigłowska A, Sojka DR, Scieglinska D.** The Role of Heat Shock Proteins in Cisplatin Resistance. *Anticancer Agents Med Chem*. 2018; 18(15):2093-2109.

**Kumar S, Noronha V, Patil V, et al.** Advances in pharmacotherapy for head and neck cancer. *Expert Opin Pharmacother*. 2021 Oct;22(15):2007-2018.

**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.