



Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO



Controle epigenético da via de Wnt/ β -catenina no acúmulo de células-tronco tumorais quimiorresistentes em carcinoma oral

Thaís Moré Milan

**Ribeirão Preto
2022**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Controle epigenético da via de Wnt/ β -catenina no acúmulo de células-tronco tumorais quimiorresistentes em carcinoma oral

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia

Orientada: Thaís Moré Milan

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Oliveira de Almeida

Ribeirão Preto

2022

MORÉ MILAN, T.	Controle epigenético da via de Wnt/β-catenina no acúmulo de células-tronco tumorais quimiorresistentes em carcinoma oral	Espaço de 2,5 cm reservado para etiqueta de localização da biblioteca	MESTRADO FCRPUSP 2022
-------------------	--	---	-----------------------------

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Moré Milan, Thaís

Controle epigenético da via de Wnt/ β -catenina no acúmulo de células tronco tumorais quimiorresistentes em carcinoma oral, 2022.

110 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências

Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração:

Imunologia e Fisiopatologia.

Orientador: Oliveira de Almeida, Luciana.

1. via de Wnt/ β -catenina. 2. células-tronco tumorais.
3. quimiorresistência. 4. controle epigenético 5. carcinoma oral

FOLHA DE APROVAÇÃO

Thaís Moré Milan

Controle epigenético da via de Wnt/ β -catenina no acúmulo de células-tronco tumorais quimiorresistentes em carcinoma oral.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Oliveira de Almeida

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico esse trabalho à minha mãe, Elizabeth Aparecida Moré Milan,
que esteve comigo todos os dias me apoiando e me dando forças.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por me permitir realizar essa grande etapa da minha vida.

Agradeço à minha família, minha mãe Elizabeth Aparecida Moré Milan, meu pai Armando Henrique Milan, minha avó Nildes Trovo Moré, por toda a base dada, pela paciência, pelos incentivos, ajuda, acreditarem no meu potencial e estarem presentes sempre quando precisei. Gostaria de agradecer meu avô Gumercindo Moré (*in memoriam*), e meu tio Edenilson André Moré (*in memoriam*) que mesmo longe se fazem perto em todos os momentos.

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Luciana Oliveira de Almeida por todos os ensinamentos na parte teórica e prática, desde a minha iniciação científica, contribuindo muito no meu crescimento profissional, pelas oportunidades e pela confiança.

À Profa. Dra. Andréia Machado Leopoldino pelas sugestões nas reuniões em grupo e pelo aprendizado.

Aos técnicos do laboratório de cultura de células, Roger Rodrigo Fernandes, Fabíola Singaretti Oliveira e Milla Sprone Tavares por me ajudarem quando precisei. Aos meus companheiros e amigos de laboratório, em especial à Ana Patrícia Espaladori Eskenazi, Gabriel da Silva, Lucas Dias de Oliveira e Rayana Longo Bighetti Trevisan por deixarem os dias mais leves e contribuírem com o meu projeto.

Agradeço aos meus amigos, Lucas Matheus Soares Pereira, com quem realizei meu primeiro artigo, à Luiza Beirigo e Isabella de Arruda Fantinati por me ouvirem sempre, e em especial à Rafaela Bignelo Doraci, pelo apoio diário, pelos conselhos, carinho, por me ajudar e sempre me incentivar nos momentos mais difíceis, obrigada!

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2020/02740-5, pelo apoio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES) -Código de Financiamento 001.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram diretamente ou indiretamente para o desenvolvimento desse projeto.

RESUMO

MORÉ MILAN, T. **Controle epigenético da via de Wnt/ β -catenina no acúmulo de células-tronco tumorais quimiorresistentes em carcinoma oral.** 2022. 110f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

O carcinoma oral é responsável por muitas mortes ao redor do mundo por originar recidivas e metástases devido as falhas na terapia. Os tratamentos convencionais destroem as células diferenciadas do tumor, porém a população de células-tronco tumorais é resistente e repova o tumor. A sinalização de Wnt/ β -catenina está envolvida na manutenção, sobrevivência, auto-renovação e diferenciação das células-tronco tumorais e sua sinalização pode ser regulada por modificações epigenéticas. O objetivo do projeto foi identificar alterações epigenéticas envolvidas no controle da via de sinalização de Wnt/ β -catenina e de seus alvos e investigar a participação da via no acúmulo de células-tronco tumorais e na quimiorresistência de linhagens celulares de carcinoma oral. Três linhagens de carcinoma oral selvagens (Cal27 WT; SCC9 WT; SCC25 WT) e resistentes à cisplatina (Cal27 CisR; SCC9 CisR; SCC25 CisR) e suas populações de células-tronco tumorais (CTT+) e não-tronco tumorais (CTT-) foram investigadas. Análises de qPCR foram realizadas para a avaliação da expressão gênica e *Western Blot* para avaliação dos níveis proteicos; a dose IC50 dos inibidores foi determinada por ensaio de viabilidade celular. Citometria de fluxo e formação de esferas identificaram as CTT+. Imunoprecipitação da cromatina foi realizada para identificar a regulação epigenética da via. O ensaio de xenoenxerto foi utilizado para investigar o potencial da via de Wnt/ β -catenina como alvo terapêutico. Nós observamos o aumento da expressão de genes reguladores da maquinaria epigenética, como *BRD7*, *EZH2*, *KDM4C* e *MLL1* e do gene *CTNNB1*, que codifica β -catenina, nas linhagens resistentes à cisplatina. Os genes *upstream* da via de Wnt/ β -catenina, como *APC* e *GSK3 β* , estavam diminuídos nas 3 linhagens quimiorresistentes, e os genes *downstream* *FGF18* e *MMP7* estavam aumentados. A população de CTT+ apresentou maior expressão de genes envolvidos na metilação de histonas. β -catenina e as histonas metiladas H3K27me3 e H3K9me2 também estavam aumentadas nas linhagens resistentes à cisplatina e nas CTT+. O inibidor de EZH2 (UNC1999) e os inibidores de β -catenina (ICG-001 e FH535) reduziram a população de CTT+ e diminuíram as proteínas β -catenina e EZH2 nas linhagens quimiorresistentes. H3K27me3 também foi diminuída após tratamento com os inibidores. O tratamento com UNC1999 aumentou a expressão dos genes *upstream* *APC* e *GSK3 β* , e os tratamentos com ICG-001, FH535 e UNC1999 foram efetivos na diminuição do gene *downstream* *MMP7* nas CTT+. FH535 demonstrou eficácia para diminuir a população de CTT+, especialmente quando combinado com cisplatina e UNC1999. Os inibidores de β -catenina em monoterapia ou combinados com cisplatina e UNC1999 diminuíram o fenótipo tronco (*stemness*) das CTT+. Houve redução do crescimento tumoral após a administração de FH535, FH535+cisplatina e UNC1999+FH535, e diminuição dos marcadores β -catenina, EZH2, H3K27me3 e dos marcadores de células-tronco tumorais OCT4 e SOX2 no tecido tumoral. Através da imunoprecipitação da cromatina nas linhagens quimiorresistentes e nas populações de CTT- e CTT+, nós identificamos que EZH2 interage fortemente com a região

promotora dos genes *APC*, *FGF18* e *VEGFA*, e de forma menos intensa com os promotores de *AXIN2*, *GSK3 β* e *MMP7*, aumentando a presença de H3K27me3, o que promove a repressão dos genes *APC*, *GSK3 β* e *VEGFA* que participam da via de Wnt/ β -catenina. Dessa forma, os resultados demonstram que β -catenina e EZH2 estão aumentados nas linhagens quimiorresistentes e na população de células-tronco tumorais, e a metilação de histonas participa de forma crítica, controlando a via de Wnt/ β -catenina, através da inibição dos genes reguladores *upstream APC* e *GSK3 β* , levando à translocação de β -catenina para o núcleo, onde se liga à fatores de transcrição e regula seus genes *downstream* como *MMP7*, participando da regulação das células-tronco tumorais. A administração de inibidores farmacológicos da via de Wnt/ β -catenina e de EZH2 pode ser uma estratégia eficaz para o tratamento do carcinoma oral e eliminação das células-tronco tumorais.

Palavras-chave: via de Wnt/ β -catenina, células-tronco tumorais, quimiorresistência, controle epigenético, carcinoma oral.

ABSTRACT

MORÉ MILAN, T. **Epigenetic control of Wnt/ β -catenin signaling pathway in the accumulation of chemoresistant cancer stem cells in oral carcinoma.** 2022. 110f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Oral carcinoma is responsible for many deaths around the world by causing recurrences and metastasis due failures in therapy. The conventional treatments destroy the differentiated cancer cells; however, the population of cancer stem cells are resistant and repopulates the tumor. The Wnt/ β -catenin signaling pathway is involved in the maintenance, survival, self-renewal, and differentiation of cancer stem cells, and its signaling can be regulated by epigenetic modifications. The aim of the project was to identify epigenetic modifications involved in the control of the Wnt/ β -catenin signaling pathway and its targets and investigate the participation of this pathway in the accumulation of cancer stem cells and in the chemoresistance of oral carcinoma cell lines. Three wild-type oral carcinoma cell lines (Cal27 WT; SCC9 WT; SCC25 WT) and resistant to cisplatin (Cal27 CisR; SCC9 CisR; SCC25 CisR) and their populations of cancer stem cells (CSC+) and non-cancer stem cells (CSC-) were investigated. Analysis of qPCR were performed to evaluate the gene expression, and western blot to evaluate protein levels; the IC50 dose of the inhibitors was determined through cellular viability assay. Flow cytometry and spheres formation assay identified the CSC+. Chromatin immunoprecipitation was performed to identify the epigenetic regulation of the pathway. The xenograft model was performed to investigate the potential of the Wnt/ β -catenin signaling pathway as therapeutical target. We observed an increase in the expression of genes that regulate the epigenetic machinery as *BRD7*, *EZH2*, *KDM4C*, *MLL1* and the gene *CTNNB1* that encode β -catenin, in the cell lines resistant to cisplatin. The upstream genes of the Wnt/ β -catenin signaling pathway *APC* and *GSK3 β* were decreased in the 3 chemoresistant cell lines, and the downstream genes *FGF18* and *MMP7* were increased. The CSC+ population demonstrated high expression of genes involved in the histones methylation. β -catenin and the methylated histones H3K27me3 and H3K9me2 were increased in the cell lines resistant to cisplatin and in the CSC+ as well. The EZH2 inhibitor (UNC1999) and the β -catenin inhibitors (ICG-001 and FH535) diminished the population of CSC+ and diminished the proteins β -catenin and EZH2 in the chemoresistant cell lines. H3K27me3 was diminished after the treatment with the inhibitors as well. The treatment with UNC1999 increased the expression of the upstream genes *APC* and *GSK3 β* , and the treatments with ICG-001, FH535 and UNC1999 were effective in the decrease of the downstream gene *MMP7* in the CSC+. FH535 demonstrated effectiveness diminishing the population of CSC+ specially when combined with cisplatin and UNC1999. The β -catenin inhibitors in monotherapy or combined to cisplatin and UNC1999 diminished the stemness of CSC+. The tumor growth was reduced after the administration of FH535, FH535+cisplatin and UNC1999+FH535, and β -catenin, EZH2, H3K27me3 and the cancer stem cells markers OCT4 and SOX2 decreased in the tumor tissue. Chromatin immunoprecipitation in the chemoresistant cell lines and in the populations of CSC- and CSC+ demonstrated that EZH2 strongly interacts with the promotor region of the genes *APC*, *FGF18* and *VEGFA* and in a less

intensive way with the promoters of *AXIN2*, *GSK3 β* and *MMP7*, increasing the presence of H3K27me3, which promotes the repression of the genes *APC*, *GSK3 β* and *VEGFA* that participates of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. In this way, the results demonstrate that β -catenin and EZH2 are increased in the chemoresistant cell lines and in the cancer stem cells population, and the histone methylation participates in a critical way, controlling the Wnt/ β -catenin signaling pathway, through the inhibition of the upstream regulators *APC* and *GSK3 β* , leading to the translocation of β -catenin to the nucleus, where it binds to transcription factors and regulate the downstream genes as *MMP7*, participating in the cancer stem cells regulation. The administration of the pharmacological inhibitors of the Wnt/ β -catenin signaling pathway and of EZH2, can be an effective strategy to the oral carcinoma treatment.

Keywords: Wnt/ β -catenin signaling pathway, cancer stem cells, chemoresistance, epigenetic control, oral carcinoma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquemática da via de Wnt/ β -catenina canônica.....	24
Figura 2. <i>Heat Map</i> dos 46 genes envolvidos na sinalização de Wnt/ β -catenina e regulação de metilação de histonas.....	40
Figura 3. Rede de interação proteínas-proteínas obtido pelo STRING.....	41
Figura 4. Processos Biológicos obtidos pelo <i>Gene Ontology</i>	42
Figura 5. Vias de Sinalização obtidos pelo KEGG.....	43
Figura 6. Análise da expressão de genes envolvidos na via de Wnt/ β -catenina e na regulação epigenética nas linhagens quimiorresistentes. A. Expressão gênica de BRD7. B. Expressão gênica de CHD8. C. Expressão gênica de CTNNB1. D. Expressão gênica de EHMT2. E. Expressão gênica de EZH2. F. Expressão gênica de KDM4C. G. Expressão gênica de KDM5B. H. Expressão gênica de LEF1. I. Expressão gênica de MLL1. J. Expressão gênica de SETD1A. K. Expressão gênica de TCF4. L. Expressão gênica de WNT3A.....	45,46,47,48
Figura 7. Análise da expressão gênica dos genes <i>upstream</i> da via de Wnt/ β -Catenina para as linhagens quimiorresistentes. A. Expressão gênica de APC. B. Expressão gênica de AXIN2. C. Expressão gênica de GSK3 β	49,50
Figura 8. Análise da expressão gênica dos genes <i>downstream</i> da via de Wnt/ β -Catenina para as linhagens quimiorresistentes. A. Expressão gênica de FGF18. B. Expressão gênica de MMP7. C. Expressão gênica de VEGFA.....	50,51
Figura 9. Isolamento das populações CTT+ e CTT- das linhagens quimiorresistentes Cal27 CisR, SCC9 CisR e SCC25 CisR por citometria de fluxo.....	52
Figura 10. Expressão gênica da população de CTT+ para as linhagens Cal27 CisR, SCC9 CisR e SCC25 CisR.....	53
Figura 11. Análise da expressão proteica de metilação de histonas e componentes de Wnt/ β -catenina por <i>Western Blotting</i> nas linhagens selvagens e resistentes à cisplatina. A. Fração Nuclear. B. Fração da cromatina.....	55,56
Figura 12. Análise da expressão proteica da lisina demetilase KDM1a por <i>Western Blotting</i> nas linhagens selvagens e resistentes à cisplatina.....	56

Figura 13. Análise da expressão proteica de metilação de histonas e componentes de Wnt/ β -catenina por <i>Western Blotting</i> para as células-tronco tumorais e células diferenciadas do tumor. A. Avaliação das amostras totais para β -catenina e EZH2. B. Avaliação do lisado nuclear para β -catenina. C. Avaliação das amostras totais para H3K9me2, H3K27me3 e H3K36me3. D. Avaliação das amostras totais para KDM1A.....	57,58
Figura 14. Determinação do IC50 dos inibidores ICG-001 e FH535 para a linhagem Cal27 CisR (CTT- e CTT+).....	60
Figura 15. Determinação do IC50 dos inibidores ICG-001 e FH535 para a linhagem SCC9 CisR (CTT- e CTT+).....	61
Figura 16. Determinação do IC50 dos inibidores ICG-001 e FH535 para a linhagem SCC25 CisR (CTT- e CTT+).....	61,62
Figura 17. Determinação do IC50 para o inibidor UNC1999 para as linhagens Cal27, SCC9 e SCC25 (CTT- e CTT+) A. Cal27 CisR. B. SCC9 CisR. C. SCC25 CisR.....	63
Figura 18. Análise da expressão proteica para Cal27 CisR, SCC9 CisR e SCC25 CisR com inibidores. A. Expressão de β -catenina e EZH2 para a linhagem Cal27 CisR. B. Expressão de β -catenina e EZH2 para a linhagem SCC9 CisR. C. Expressão de β -catenina e EZH2 para a linhagem SCC25 CisR.....	65
Figura 19. Análise da expressão de genes <i>upstream</i> da via de Wnt/ β -catenina nas linhagens Cal27, SCC9 e SCC25 tratadas com UNC1999. A. Expressão gênica de APC. B. Expressão gênica de AXIN2 C. Expressão gênica de GSK3 β	67
Figura 20. Análise da expressão de genes <i>downstream</i> da via de Wnt/ β -catenina nas linhagens Cal27, SCC9 e SCC25 tratadas com ICG-001, FH535 e UNC1999. A. Expressão gênica de FGF18. B. Expressão gênica de MMP7 C. Expressão gênica de LEF1.....	68
Figura 21. Análise da expressão proteica para Cal27 CisR, SCC9 CisR e SCC25 CisR com inibidores. A. Expressão de H3K9me2, H3K27me3, H3K36me3 e KDM1A para a linhagem Cal27 CisR. B. Expressão de H3K9me2, H3K27me3, H3K36me3 e KDM1A para a linhagem SCC9 CisR. C. Expressão de H3K9me2, H3K27me3, H3K36me3 e KDM1A para a linhagem SCC25 CisR.....	70,71,72
Figura 22. Tratamento combinado para as populações CTT+ através do ensaio de formação de esferas. A. Ensaio para a linhagem Cal27 CisR. B. Ensaio para a linhagem SCC9 CisR. C. Ensaio para a linhagem SCC25 CisR.....	73,74

Figura 23. Análise da população de células tronco tumorais através da marcação de ALDH+/CD44+ pelo ensaio de citometria de fluxo. A. Análise para linhagem Cal27 CTT+. B. Análise para linhagem SCC9 CTT+. C. Análise para linhagem SCC25 CTT+.....76,77,78

Figura 24. Ensaio *In vivo* com a linhagem Cal27 CisR para avaliação de uma terapia combinada. A. Gráfico do volume tumoral. B. Gráfico do peso tumoral. C. Imagem dos tumores.....79,80

Figura 25. Análise dos tecidos tumorais retirados dos camundongos Nude Balbc tratados com UNC1999, FH535, FH535+Cisplatina e UNC1999+FH535. A. Análise dos tecidos tumorais com H.E. B. Análise dos tecidos tumorais com imunomarcação de β -catenina e EZH2. C. Análise dos tecidos tumorais com imunomarcação de H3K27me3 e KDM6B. D. Análise dos tecidos tumorais com imunomarcação de OCT4 e SOX2. E. Quantificação de β -catenina nuclear.....82,83,84,85,86

Figura 26. Avaliação da imunoprecipitação de EZH2 e H3K27me3 nas regiões promotoras de genes *upstream* e *downstream* da via de Wnt/ β -catenina nas linhagens Cal27, SCC9 e SCC25 quimiorresistentes e suas populações CTT- e CTT+. A. Imagem qualitativa da imunoprecipitação da cromatina (ChIP). B. Gráfico quantitativo da imunoprecipitação de EZH2. C. Gráfico quantitativo da imunoprecipitação de H3K27me3.....89,90,91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores IC50 dos inibidores ICG-001, FH535 e UNC1999 para lise de proteínas.....	29
Tabela 2 – Anticorpos utilizados pela técnica de <i>Western Blotting</i>	29
Tabela 3 – Representação da sequência dos iniciadores utilizados.....	31,32
Tabela 4 – Estratégias de tratamento e doses utilizadas no ensaio de formação de esferas para a subpopulação de CTT+ das linhagens Cal27, SCC9 e SCC25 resistentes à cisplatina.....	32,33
Tabela 5 - Sequência dos primers utilizados para a técnica de Imunoprecipitação da Cromatina (ChIP).....	35
Tabela 6 - Estratégia de tratamento em monoterapia e tratamento combinado para o modelo de xenoenxerto <i>in vivo</i>	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALDH1	Aldeído Desidrogenase 1
APC	Polipose adenomatosa coli
ATAC-seq	<i>Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing</i>
AXIN2	Inibidor de Axis 2
BCL9	<i>B-cell lymphoma 9</i>
BCL9L	<i>B-cell CLL/lymphoma 9</i>
β-catenina	Beta-catenina
β-actina	Beta-actina
B2M	Beta-2-microglobulina
BRD7	<i>Bromodomain Containing 7</i>
CaMK2	Proteínas quinase II dependente de cálcio calmodulina
cDNA	Dna complementar
ChIP	Imunoprecipitação da Cromatina
CHD8	Proteína de ligação ao cromodomain-helicase-DNA 8
CisR	Resistente à Cisplatina
CSNK1	<i>Casein kinase I isoform epsilon</i>
CTNNB1	<i>Catenin Beta 1</i>
CTT+	Células-tronco tumorais
CTT-	Células não-tronco tumorais ou células diferenciadas do tumor
DEAB	N,N-diethylaminobenzaldehyde (inibidor de aldeído desidrogenase)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMEM/F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico

DVL2	<i>Dishevelled 2</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EHMT2	Histona-lisina N-metiltransferase 2,
EZH2	<i>Enhancer of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit</i>
FGF18	Fator de crescimento 18 de fibroblastos
FGF20	Fator de crescimento 20 de fibroblastos
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GSK3β	<i>Glycogen synthase kinase-3 beta</i>
H3K4me3	Trimetilação da histona H3 lisina 4
H3K9me2	Dimetilação da histona H3 lisina 9
H3K27me3	Trimetilação da histona H3 lisina 27
H3K36me3	Trimetilação da histona 3 lisina 36
HNSCC	<i>Head and neck squamous cell carcinoma</i>
IC50	Concentração inibitória (50%)
JNK	<i>Jun</i> quinase
KDM1A	Lisina demetilase 1A
KDM4C	Lisina demetilase 4C
KDM5B	Lisina demetilase 5B
KDM6B	Lisina demetilase 6B
KDMs	Lisinas demetilases
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
Kg	Quilograma
KMT2A (MLL1)	Histona-lisina N-metiltransferase 2A
KMTs	Lisinas metiltransferases
LEF1	Fator 1 de ligação do intensificador linfóide

LiCl	Cloreto de Lítio
LRP5/LRP6	<i>Low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6</i>
mg	Miligrama
nM	Nanomolar
MMP7	Metaloproteinase-7 da matriz
PRC2	<i>Polycomb repressive complex 2</i>
PYGO	<i>Pygopus</i>
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RNA-seq	Sequenciamento de ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SETD2	SET Domain Containing 2, Histone Lysine Methyltransferase
TCF4	Fator de transcrição 4
VEGFA	Fator de crescimento endotelial vascular A
WNT	<i>Wingless-related integration site</i>
WT	<i>Wild type</i>
µg	Micrograma
µM	Micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 CARCINOMA ORAL	21
1.2 CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS	21
1.3. SINALIZAÇÃO DE WNT/ β -CATENINA E CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS.....	22
2 OBJETIVOS	27
2.1 GERAL	27
2.2 ESPECÍFICOS.....	27
3 METODOLOGIA.....	28
3.1 CULTIVO CELULAR E FÁRMACOS.....	28
3.2 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS E WESTERN BLOTTING	28
3.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	30
3.4 PCR EM TEMPO REAL	30
3.5 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE ESFERAS	32
3.6 CITOMETRIA DE FLUXO	33
3.7 IMUNOPRECIPITAÇÃO DA CROMATINA (ChIP)	34
3.8 MODELO IN VIVO - XENOENXERTO	35
3.9 IMUNOHISTOQUÍMICA.....	37
3. 10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
4 RESULTADOS	39
4.1 SELEÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO-ALVO DO PROJETO.....	39
4.2 EXPRESSÃO GÊNICA DOS COMPONENTES DA VIA DE WNT/ β -CATENINA NAS LINHAGENS QUIMIORRESISTENTES E NA POPULAÇÃO DE CTT	43
4.3 ANÁLISE DE EXPRESSÃO PROTEICA DE MODIFICAÇÕES EPIGENÉTICAS EM HISTONAS E COMPONENTES DA VIA DE WNT/ β -CATENINA.....	54
4.4 DETERMINAÇÃO DAS DOSES DOS INIBIDORES DE β -CATENINA - FH535 E ICG-001	59
4.5 DETERMINAÇÃO DAS DOSES DO INIBIDOR DE EZH2 - UNC1999	62
4.6 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DOS INIBIDORES SOBRE A REGULAÇÃO DE β -CATENINA E METILAÇÃO DE HISTONAS.....	64
4.7 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DOS INIBIDORES SOBRE A REDUÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS	72

4.8 ADMINISTRAÇÃO DE MONOTERAPIA E TERAPIA COMBINADA DOS INIBIDORES FARMACOLÓGICOS FH535, UNC1999 E O QUIMIOTERÁPICO CISPLATINA EM MODELO IN VIVO DE XENOENXERTO	78
4.9 ANÁLISE DO CONTROLE DIRETO DE EZH2 SOBRE A VIA DE WNT/ β -CATENINA ..	86
5 DISCUSSÃO	92
6 CONCLUSÃO.....	1011
7 REFERÊNCIAS	1022

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARCINOMA ORAL

O carcinoma de células escamosas é o principal grupo que compõe os cânceres de cabeça e pescoço (HNSCC). Estes têm uma incidência de 600.000 novos casos por ano em todo o mundo, sendo responsáveis por cerca de 1-2% de todas as mortes por câncer (FERLAY et al., 2015). Os cânceres de cabeça e pescoço surgem na mucosa de vários órgãos que apresentam revestimento epitelial escamoso, como a nasofaringe, a garganta e a boca (carcinoma oral) (XIE et al., 2021). O desenvolvimento do carcinoma oral está fortemente associado à fatores de risco ambientais e de estilo de vida, como obesidade, má nutrição, alto consumo de tabaco e álcool (TORRE et al., 2015; VIGNESWARAN; WILLIAMS, 2014).

Atualmente, os tratamentos para o carcinoma oral incluem cirurgia com radioterapia adjuvante e quimioterapia (CHEN; WANG, 2019). A quimioterapia envolve o uso de agentes análogos da platina, da taxina, ou da pirimidina (PFISTER et al., 2011), sendo que a cisplatina (cis-diamminedichloroplatina [CDDP]), é considerada o tratamento de primeira linha para esse tipo de câncer (HUNG et al., 2017). Porém, apesar dos avanços na quimioterapia e na radioterapia, em 30 anos, as taxas de sobrevida de 5 anos ainda não melhoraram, devido à recorrências, metástases e resistência à agentes quimioterápicos (SUN et al., 2022).

Embora a quimioterapia seja eficaz em eliminar células diferenciadas da massa tumoral, uma subpopulação de células, chamadas células-tronco tumorais (CTT), são resistentes e sobrevivem a essas terapias (NÖR et al., 2014; OKAMOTO et al., 2009; ZHANG et al., 2010). Além de que, várias evidências sugerem que a quimioterapia enriquece essa população de CTT (NÖR et al., 2014; REERS et al., 2014).

1.2 CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS

O modelo estocástico do câncer sugere que cada célula da massa tumoral tem o potencial de formar células tumorais, porém, o modelo de células-tronco tumorais (modelo hierárquico) do câncer sugere que apenas uma subpopulação de células da massa tumoral, as CTT, tem capacidade de originar um tumor (GUNDUZ

et al., 2019). As CTT foram identificadas em diversos tumores, como carcinoma colorretal (TODARO et al., 2010), mama (BROOKS; BURNES; WICHA, 2015), próstata (RYBAK; BRISTOW; KAPOOR, 2015), glioblastoma (DIRKS, 2006) e cabeça e pescoço (ALMEIDA et al., 2016).

As CTT são uma subpopulação de células pluripotentes no tumor e apresentam características como, auto-renovação, diferenciação, migração e metástase. No carcinoma oral, as CTT participam de processos vitais como iniciação, progressão tumoral e invasão, além de serem responsáveis pela resistência a quimioterapia e à radioterapia (SHAHOUMI, 2021).

Devido às propriedades como divisão assimétrica e auto-renovação, as CTT conseguem manter o controle dinâmico de seu número, bem como diferenciarem-se nas células que compõem a massa tumoral, contribuindo para o fenótipo heterogêneo do tumor (TANG, 2012). Sabendo-se que o aparecimento de recidivas e metástases têm sido relacionados com a ação das CTT, que resistem às terapias convencionais, é evidente que identificar e erradicar essa população de células-tronco tumorais é algo desafiador, mas promissor, podendo acabar totalmente com o câncer (CHEN; HUANG; CHEN, 2013).

A sinalização molecular que rege a homeostase das células-tronco é altamente regulada e muitas destas vias estão anormalmente ativadas nas CTT, culminando na perda do controle da auto-renovação e proliferação, e no aumento da sobrevivência e diferenciação das CTT. As três principais vias de sinalização que sustentam a sobrevivência, proliferação e equilíbrio entre diferenciação e auto-renovação das CTT são Notch, Hedgehog e Wnt (BIGHETTI-TREVISAN et al., 2019). Dentre essas vias, a via de Wnt é frequentemente encontrada desregulada nas CTT. Mutações em componentes da via de sinalização de Wnt, como APC, AXIN, β -catenina e ligantes de Wnt, foram observadas primeiramente em cânceres colorretais, mas também foram vistas em vários outros tumores sólidos (MARTIN-OROZCO et al., 2019).

1.3. SINALIZAÇÃO DE WNT/ β -CATENINA E CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS

A família Wnt humana é composta por 19 glicoproteínas ricas em diferentes cisteínas que atuam como ligantes para mais de 15 receptores ou co-receptores, elas compreendem moléculas de sinalização intracelular, incluindo proteínas secretórias

que atuam na gênese celular, crescimento, diferenciação e formação de órgãos (YANG et al., 2019). Como um dos alvos moleculares mais bem estabelecidos da terapia contra o câncer, a via de sinalização Wnt/ β -catenina tem sido fortemente conectada à iniciação e progressão de muitos tipos de cânceres (KANDOTH et al., 2013; STEINHART et al., 2017).

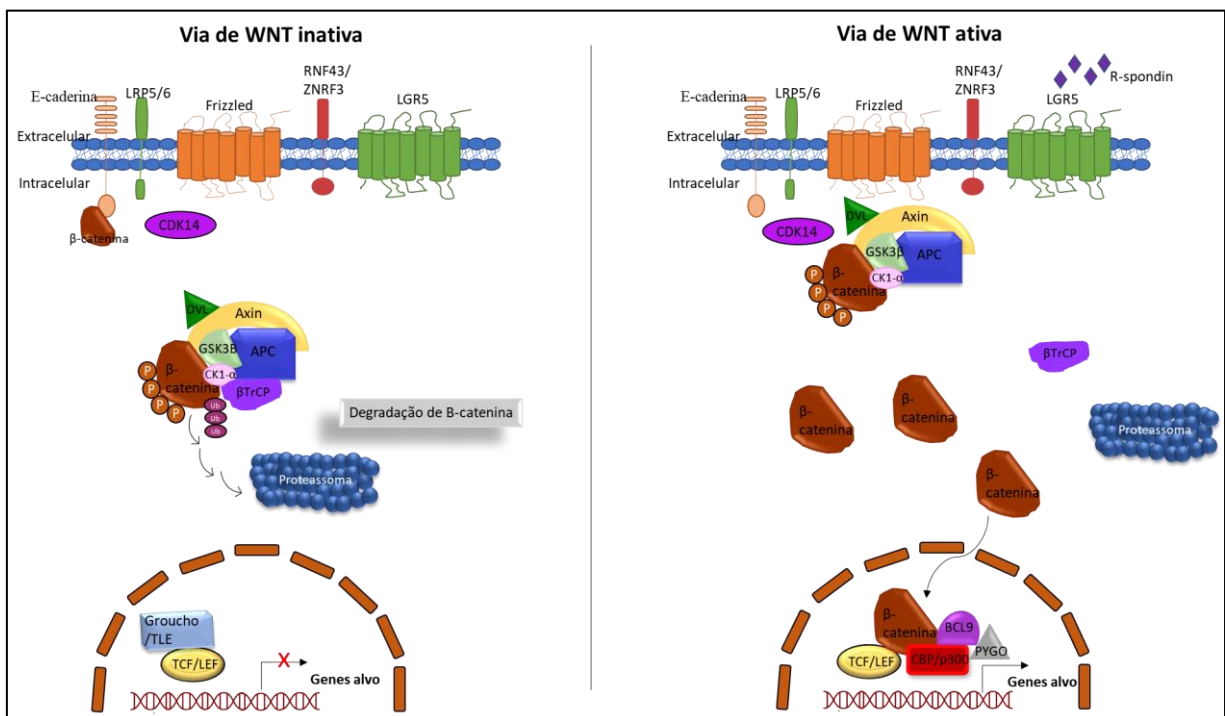
Existem diferentes vias de sinalização de Wnt interligadas entre si que foram classificadas como canônica (β -catenina dependente) e não canônica. Em geral, a via de Wnt canônica é responsável pela auto-renovação, proliferação ou diferenciação das células-tronco, enquanto a via não-canônica participa da manutenção das células-tronco, movimento celular, e inibição da via canônica (DUCHARTRE; KIM; KAHN, 2016). Dessa forma, ambas as vias, canônica e não-canônica podem estar envolvidas na formação e acúmulo das CTT. Além disso, a sinalização de Wnt tem sido envolvida não só no desenvolvimento do tumor, mas também na capacidade das células tumorais em escapar de diferentes tipos de estresse celular, tais como tratamentos medicamentosos e a resposta imune do hospedeiro (MARTIN-OROZCO et al., 2019).

A via canônica de Wnt, pode ser ativada através da ligação de proteínas Wnt (como as Wnt1, Wnt3A e Wnt10B) com receptores de membrana da família *Frizzled* e do complexo co-receptor LRP5/LRP6. Quando estimulado, *Frizzled* pode ativar a proteína *Disheveled* no citoplasma; em seguida ocorre a ativação de seu fator *downstream*, a proteína de ligação (GBP) ao GSK3. GBP ativado pode identificar e inibir a fosforilação de GSK3 β , que impede que β -catenina seja fosforilada. β -catenina é então acumulada no citoplasma, e está livre para ser translocada para o núcleo. Consequentemente, β -catenina intranuclear se liga aos fatores de transcrição LEF e TCF (*lymphoid enhancer factor/T cell factor*), às proteínas *Legless* (BCL9 e BCL9L), e à PYGO, para formar o complexo TCF/LEF- β -catenina-Legless-PYGO. Finalmente, esse complexo pode iniciar a transcrição dos genes-alvos *downstream*, incluindo o fator de crescimento de fibroblasto 20 (*FGF20*), *ciclina D1*, oncogene *C-Myc*, e proteína secretada WNT-indutível- 1 (*WISP-1*) (YANG et al., 2019) (Figura 1).

A sinalização não canônica de Wnt envolve pelo menos duas vias distintas; a via de polaridade planar das células e a via de sinalização de cálcio, ambas independentes de β -catenina (KOMIYA; HABAS, 2008). A via de polaridade celular (PCP) é ativada pela ligação de Wnt4, Wnt5a ou Wnt11 à *Frizzled* e co-receptores *Frizzled* como RYK e ROR2, que irão ativar as GTPases Rho e Rac, levando à modificações no citoesqueleto, desencadeando a ativação transcricional de genes-

alvo responsáveis pela adesão celular e migração (KAHN, 2018; KOMIYA; HABAS, 2008). Já a ativação da via de cálcio é iniciada pela ligação de Wnt à *Frizzled*, RYK ou ROR (receptores alternativos), que atuam na migração e inibição da via de Wnt canônica através do gerenciamento do fluxo de cálcio intracelular e ativação das proteínas quinase II dependente de cálcio calmodulina (CaMK2), Jun quinase (JNK) e proteína quinase C (PKC) (KAHN, 2018; KOHN; MOON, 2005).

Figura 1 – Esquematização da via de Wnt/ β -catenina canônica



Fonte: Adaptado de Alamoud (2018).

Evidências sugerem que o desenvolvimento do carcinoma oral é dependente da ativação de Wnt/ β -catenina, que está associada à mudanças epigenéticas que mantém a estrutura da cromatina aberta, induzindo a ativação de genes que levam ao acúmulo de CTT (WEND et al., 2013). Além disso, as próprias CTT do carcinoma oral apresentam ativação aberrante de Wnt/ β -catenina, reforçando sua importância na manutenção e acúmulo das CTT (LEE et al., 2014; WEND et al., 2013).

A dinâmica da cromatina é comandada por modificações em caudas de histonas presentes no core do nucleossomo. A acetilação de lisinas localizadas nas caudas de histonas está associada com a ativação da transcrição, porém, a metilação de lisinas pode estar envolvida tanto na ativação como na repressão gênica. Por

exemplo, a tri-metilação da lisina 4 da histona H3 (H3K4me3) está associada com a cromatina ativa, enquanto a tri-metilação das lisinas 9 e 27 (H3K9me3 e H3K27me3) está associada com a repressão da transcrição (GOLDBERG; ALLIS; BERNSTEIN, 2007). Várias proteínas envolvidas em modificações da cromatina são recrutadas pela proteína β -catenina para controlar a expressão de seus genes-alvo, como a proteína histona acetiltransferase CBP (p300). β -catenina também interage com MLL, uma histona metiltransferase que promove a tri-metilação de H3K4 (SIERRA et al., 2006). MLL está associada com a ativação de genes que conferem propriedades de células-tronco em tumores hematológicos (WEND et al., 2013). H3K4me3, por sua vez, é importante para a expressão de genes-alvo da via de Wnt/ β -catenina por facilitar a associação dos co-ativadores PYGO2 e BCL9 com a cromatina (LI et al., 2017b, p. 3).

Outras modificações epigenéticas também estão associadas com a manutenção e acúmulo das CTT e atuam em conjunto com a sinalização de Wnt/ β -catenina. KDM4C, uma lisina demetilase, participa da redução da heterocromatina e perda da repressão da transcrição gênica através da demetilação de H3K9me3. A ativação da via de Wnt/ β -catenina promove o aumento da expressão de KDM4C em glioblastomas (CHEN et al., 2020). KDM1A (LSD1) também pertence à classe das lisinas demetilases e participa da demetilação das histonas H3K4 me1/2 e H3K9me1/2 localizadas em genes associados com a manutenção da pluripotência e auto-renovação das CTT, como a ativação de β -catenina (HUANG et al., 2017). Em contrapartida, a histona metiltransferase SETD2 é responsável por promover a tri-metilação da histona H3K36 que está associada com a ativação da expressão gênica. SETD2 é frequentemente mutada ou deletada em diversos tumores. Em carcinoma colorretal, a inativação de SETD2 promove o acúmulo da proteína DVL2, o que aumenta a sinalização de Wnt/ β -catenina, afetando os processos de auto-renovação e diferenciação das CTT e aumentando a agressividade tumoral (YUAN et al., 2017).

O silenciamento epigenético mediado pelo *Enhancer of Zeste Homolog 2* (EZH2) contribui para a ativação constitutiva da via de sinalização Wnt/ β -catenina e consequentemente para a proliferação de células de carcinoma hepatocelular (CHENG et al., 2011). O EZH2 é uma subunidade catalítica do complexo repressivo *polycomb 2* (PRC2) que pode alterar a expressão gênica através da trimetilação da lisina 27 da histona H3 (H3K27me3) (DUAN; DU; GUO, 2020). A função oncogênica de EZH2 é devida à sua capacidade de reprimir a expressão de vários genes

supressores tumorais através do silenciamento epigenético mediado pela trimetilação de H3K27 (MA et al., 2019).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

O objetivo deste projeto foi identificar alterações epigenéticas que possam estar contribuindo para a ativação da via de sinalização de Wnt/ β -catenina e para a regulação de seus alvos *downstream* e investigar o papel desta via no acúmulo de células-tronco tumorais quimiorresistentes em linhagens celulares de carcinoma oral.

2.2 ESPECÍFICOS

1- Analisar mudanças na expressão de genes da via de sinalização Wnt/ β -catenina em linhagens quimiorresistentes de carcinoma oral em comparação às linhagens selvagens; e em populações de CTT e não CTT;

2- Avaliar o acúmulo de proteínas da via de Wnt/ β -catenina em linhagens selvagens e quimiorresistentes; e em populações de CTT e não CTT;

3- Identificar modificações epigenéticas em histonas e o acúmulo de seus reguladores; e sua associação com a ativação da via de Wnt/ β -catenina nas linhagens quimiorresistentes e na população de CTT;

4- Promover a inibição farmacológica da via de Wnt/ β -catenina, utilizando os inibidores de β -catenina ICG-001 e FH535 (isoladamente) e investigar seu efeito sobre as CTT e na reversão da quimiorresistência à cisplatina;

5- Avaliar a eficiência *in vivo* de uma potencial terapia combinada associando-se inibidores da via de Wnt/ β -catenina e o quimioterápico cisplatina na redução do volume tumoral e da população de CTT utilizando-se o modelo de xenoinxerto.

3 METODOLOGIA

3.1 CULTIVO CELULAR E FÁRMACOS

As linhagens celulares resistentes à cisplatina Cal27 CisR, SCC9 CisR e SCC25 CisR foram previamente estabelecidas pelo nosso grupo de pesquisa conforme descrito em Lima de Oliveira *et al.* (2022), (LIMA DE OLIVEIRA *et al.*, 2022).

As células foram cultivadas em meio DMEM (Cal27) ou DMEM/F12 (SCC9 e SCC25) suplementado com 10% de soro bovino fetal e coquetel de antibióticos e antimicóticos e mantidas em incubadora à temperatura controlada de 37°C, contendo 5% de CO₂. Os fármacos cisplatina, FH535, ICG-001 e UNC1999 foram adquiridos da empresa *Cayman Chemical (USA)*, e a determinação das doses dos fármacos a serem empregadas foi realizada através do ensaio de viabilidade celular, pelo IC₅₀, determinando a dose necessária para matar 50% da população celular. Quando houve tratamento, os grupos foram separados em: controle (veículo), UNC1999, FH535, ICG-001, cisplatina, e as combinações FH535+cisplatina, ICG-001+cisplatina, UNC1999+cisplatina, UNC1999+ICG-001 e UNC1999+FH535.

3.2 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS E WESTERN BLOTTING

Para a extração das proteínas totais, aproximadamente 2×10^5 células foram plaqueadas em placa de 6 poços. Quando as células estavam em 80% de confluência, essas foram lisadas com tampão RIPA+ (*ThermoFisher Scientific – Rockford, USA*) e inibidor de protease.

Para a extração das frações proteicas, 2×10^6 células foram utilizadas para o fracionamento das porções nucleares e da cromatina, utilizando os tampões NEB e CEB respectivamente, conforme o protocolo do kit *Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells (ThermoFisher Scientific)*. Quando houve tratamentos, esses, foram realizados por 16 horas e as doses utilizadas foram referentes ao IC₅₀ obtido para cada linhagem celular (Tabela 1). A quantificação das proteínas foi realizada com o kit *Pierce BCA protein assay kit (ThermoFisherScientific)* conforme instruções do fabricante, e utilizados 30µg de cada proteína.

O lisado foi submetido à SDS-PAGE. As proteínas foram transferidas para a membrana de PVDF (*Millipore, Billerica, MA, USA*) que foi bloqueada com TBS-T a 5% de leite ou BSA, incubada com o anticorpo primário *overnight* e anticorpos

secundários conjugados com horseradish peroxidase. As proteínas foram observadas por reação quimioluminescente (*ECL SuperSignal - Pierce, USA*). Os anticorpos primários utilizados estão listados na tabela 2. O experimento foi realizado em triplicata.

Tabela 1 – Valores IC50 dos inibidores ICG-001, FH535 e UNC1999 para lise de proteínas

Linhagem	Composto (dose IC50)		
	ICG-001	FH535	UNC1999
Cal27 CisR CTT+	15µM	100µM	5nM
SCC9 CisR CTT+	21,15 µM	62,37 µM	7,5nM
SCC25 CisR CTT+	23,59 µM	130µM	12,5nM

Fonte: Autor

Tabela 2 – Anticorpos utilizados pela técnica de *Western Blotting*

Anticorpos	Concentrações
anti-β-catenina total	1:1000 (Cell Signaling)
anti-EZH2	1:1000 (Cell Signaling)
anti-GAPDH	1:8000 (Cell Signaling)
anti-H3K9me2	1:1000 (Cell Signaling)
anti-H3K27me3	1:1000 (Cell Signaling)
anti-H3K36me3	1:2000 (Sigma-Aldrich)
anti-KDM1A	1:50 (Developmental Studies Hybridoma Bank)

Fonte: Autor

3.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

O ensaio foi realizado utilizando o reagente *Alamar Blue* (*ThermoFisher Scientific, Rockford, USA*), de cor azul não fluorescente, que é reduzido à resorufina (7-hidroxi-10-oxidofenoxazin-10-ium-3-ona), de cor rosa fluorescente. A mudança do estado oxidado para o reduzido permite a leitura colorimétrica e/ou fluorimétrica, ou qualitativa através da mudança da cor do reagente. E a sua absorvância espectrofotométrica é obtida nos comprimentos de onda de 570 e 600nm ou 540 e 630nm (RAMPERSAD, 2012).

As células foram semeadas em placas de 96 poços, com a densidade pré-definida de 3×10^3 células e cada condição foi feita em quadruplicata e foram avaliadas 10 concentrações diferentes para cada fármaco.

A curva para o inibidor ICG-001 foi realizada com as concentrações: 0; 0,5; 1; 2; 3; 6; 12; 24; 36 e 48 μM . Para o inibidor FH535 a curva foi realizada com as concentrações: 0; 5; 15; 30; 40; 50; 75; 90; 110 e 130 μM . Já para o inibidor de EZH2 (UNC1999) foi utilizada uma curva com as seguintes concentrações: 0; 0,5; 1; 5; 10; 20; 40; 60; 80 e 100 nM. As células permaneceram em tratamento por 24 horas.

Os resultados foram estabelecidos através da média de três experimentos independentes utilizando o equipamento *Epoch 2 Microplate Spectrophotometer* (*BioTek Instruments Inc, Winooski – USA*).

3.4 PCR EM TEMPO REAL

A extração de RNA foi realizada utilizando-se o reagente *SV Total RNA isolation System* (*Promega, Woods Hollow Road Madison, Fitchburg, USA*) conforme instruções do fabricante. A síntese de cDNA seguiu o protocolo da *GoScript™ Reverse Transcription System* (*Promega, Woods Hollow Road Madison, Fitchburg, USA*). A expressão dos genes de interesse foi quantificada utilizando-se o sistema *SybrGreen* com o kit *GoTaq qPCR Master Mix* (*Promega, Woods Hollow Road Madison, Fitchburg, USA*), através da fórmula $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$. As sequências de *primers* para os genes de interesse foram construídas com o auxílio do software *GeneRunner* versão 6.5.52 Beta (*Hastings Software Inc. Hastings, NY, USA* (<http://www.generunner.net>)). A sequências de *primers* para os genes analisados estão apresentadas na tabela 3. Os genes β -actina, GAPDH e B2M foram utilizados como

constitutivos para a normalização das reações. O experimento foi realizado em triplicata.

Tabela 3 – Representação da sequência dos iniciadores utilizados

Gene	Sequência Forward	Sequência Reverse	Fragmento (pb)
APC	GTCCTGTTCTAT GGTTCA	CAGCAAGAAGCAAT GACCTC	111
AXIN2	TATCGTGTGGGCA GTAAGAAAC	GGGTTCCACGGGG GTCATCT	129
β -actina	GCCTCGCTGTCCA CCTTCCA	AGAAAGGGTGTAAC GCAACTAAG	124
B2M	CACCCCCACTGAA AAAGATGAG	TAAAAAGCAAGCAA GCAGAAT	163
BRD7	TGACCAGGCGGCT TGTGAAC	CCTGGCTCTCCTAC AATGGG	110
CHD8	CCAGAGGAGGAA GGCGAGAAGAAAC	GCTTGCTCTTGCCC TTTGTTT	120
CTNNB1	GTATGAGTGGGAA CAGGGATTT	GTCTCAGGGAACAT AGCAG	117
EHTM2	ACGAGGAGTGAAT GGTGTGGG	CAACTCCTCAAACC CTCGCT	160
EZH2	CTTTTCATGCAAC ACCCAAC	TTGGTGGGGTCTTT ATCCGC	150
FGF18	CAAGGGCAAGGA GACGGAAT	GCCGTGTAGTTGTT CTCCAG	126
GAPDH	GACTTCAACAGCG ACACCCACTC	GTCCACCACCCTGT TGCTGTAG	126
GSK3 β	CAGTGGTGAGAAG AAAGATG	ACATAAATCACAGG GAGCGTC	126
KDM4C	GGAGTCTAAAGGA GCCATCG	GCCCTGTGACCATC TGCTGAAT	132
KDM5B	GAGCACTGGGAC GACAAAGCC	CTTTCAGAGCCGCA CCATTG	135
KMT2A (MLL1)	AGCAGCCTCCACC ACCAGAA	CATTCTCCTGCTTAT TGACCG	135

LEF1	CCCATCCCGAGAA CATCAAATA	CTGATGGGATGTGT GACGGGTGT	130
MMP7	CAACCTATGGAAA TGGAGAT	ATGAATGAATGAAT GGATGTT	139
SETD1A	GACATCAAAGGAC AACAAACG	GCACCCGAGCCTTG GAACTT	125
TCF4	CCAGGTTTGCCAT CTTCAGTCTA	TAGGGAAAGTGCTG GTTGCT	111
VEGFA	ACTTTCTGCTGTC TTGGGTGC	TTCGTGATGATTCTG CCCTCCT	114
WNT3A	ATGGCCCCACTCG GATACT	AATACTGTGGCCCA ACAGCC	97

Fonte: Autor

3.5 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE ESFERAS

Aproximadamente 5×10^2 células foram semeadas em *ultra-low attachment 96-well plates* (Corning, New York, USA) e permaneceram em cultura por 5 dias. Quando houve tratamento com fármacos, os mesmos foram realizados no momento do plaqueamento e permaneceram até o final do experimento. Os tratamentos estão sumarizados na tabela 4. Cada condição foi realizada em triplicata e as esferas formadas foram contadas em microscópio de luz *Nikon Eclipse Ti* (NIKON - Melville, NY). O experimento foi realizado em triplicata.

Tabela 4 – Estratégias de tratamento e doses utilizadas no ensaio de formação de esferas para a subpopulação de CTT+ das linhagens Cal27, SCC9 e SCC25 resistentes à cisplatina.

Linhagem	Cal27 CisR CTT+	SCC9 CisR CTT+	SCC25 CisR CTT+
Inibidor			
Cisplatina	5µM	5µM	5µM
ICG-001	15µM	21,15 µM	23,59 µM

FH535	100µM	62,37 µM	130µM
UNC1999	5nM	7,5nM	12,5nM
ICG-001+Cisplatina	15µM+5µM	21,15µM+5µM	23,59µM+5µM
FH535+Cisplatina	100µM+5µM	62,37µM+5µM	130µM+5µM
UNC1999+Cisplatina	5nM+5µM	7,5nM+5µM	12,5nM+5µM
ICG-001+UNC1999	15µM+5nM	21,15µM+7,5nM	23,59µM+12,5nM
FH535+UNC1999	100µM+5nM	62,37µM+7,5nM	130µM+12,5nM

Fonte: Autor

3.6 CITOMETRIA DE FLUXO

A população de células-tronco tumorais foi quantificada pela atividade enzimática de ALDH1, utilizando-se o kit *Aldefluor* (*StemCell Technologies, Durham, NC, USA*), combinada à expressão do anticorpo CD44-APC (*BD Biosciences, Franklin Lakes, USA*). Aproximadamente 2×10^6 células foram utilizadas para cada condição. Quando houve tratamento com fármacos, esses, foram realizados por 24 horas, nas mesmas condições utilizadas para o ensaio de esferas (Tabela 4). Inicialmente, as células foram incubadas com a enzima ALDH1 sozinha ou em combinação com seu inibidor DEAB por 45 minutos à 37°C protegido da luz (conforme instruções do fabricante). Após lavagens com PBS (*phosphate buffered saline*) para remover o excesso da enzima, as células foram incubadas com o anticorpo anti-CD44-APC à concentração de 1:200 em tampão *Aldefluor*, por 25 minutos à 4°C sob agitação constante. Após lavagens com PBS para remover o excesso do anticorpo, as células foram ressuspensas em tampão *Aldefluor* e analisadas no citômetro de fluxo *BD FACSCanto™ I* (*BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA*), no laboratório

multiusuário de Imagens de Alta Resolução e Estudos Celulares (LIAREC) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP) As amostras foram preparadas em triplicata e foram realizados dois experimentos independentes (GUIMARÃES et al., 2016).

As populações de células-tronco tumorais e não-tronco tumorais foram isoladas pela atividade enzimática de ALDH1, utilizando-se o kit *Aldefluor* (StemCell Technologies, Durham, NC, USA), conforme descrito acima, por *Sorting*, no equipamento *BD FACSAria™ Fusion*, no laboratório de Citometria de Fluxo da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto. Foram utilizadas 8×10^6 células para cada linhagem, as quais foram coletadas em meio de cultura estéril, e colocadas em cultura imediatamente após o experimento.

3.7 IMUNOPRECIPITAÇÃO DA CROMATINA (ChIP)

Para o *crosslink*, foi adicionado 1% de formaldeído à placa de cultura de 100mm (aproximadamente 1×10^7 células) e as células foram lisadas e centrifugadas. O pellet foi ressuspendido em tampão de lise SDS (SDS 10%, EDTA 0,5M, Tris-HCl 1M pH 8,0). O sobrenadante foi diluído em tampão de diluição com inibidores de proteases (*ThermoFisher Scientific*) e incubados com *dynabeads™ Protein G immunoprecipitation kit* (*ThermoFisher Scientific*). As *beads* foram lavadas 3 vezes com PBS/BSA. No dia seguinte, foram adicionados os anticorpos primários (anti-EZH2 (1:1000 - *Cell Signaling*) e anti-H3K27me3 (1:1000 - *Cell Signaling*) que permaneceram *overnight* à 4°C. As *beads* foram lavadas por 5 vezes com tampão de lavagem LiCl (Tris 100mM pH 7,5; LiCl 500mM; NP40 1%; Desoxicolato de sódio 1%), 1 vez com tampão TE (Tris 10mM pH 7,5 e EDTA 0,1mM) e ressuspendidas em tampão de eluição IP (SDS 1%; NaHCO₃ 0,1M) em temperatura ambiente. O *crosslink* foi revertido aquecendo-se as amostras a 65°C por 1 hora, seguido de centrifugação à 14.000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi incubado à 65°C, e no dia seguinte foi realizada a extração de DNA com o *MinElute PCR purification kit* (*Qiagen*) conforme instruções do fabricante. A análise dos resultados foi realizada por PCR convencional, utilizando o kit *DreamTaq™ PCR Master Mix (2X)* (*ThermoFisher Scientific*) utilizando-se as sequências de iniciadores que foram desenhadas para os genes de interesse (*APC*, *AXIN2*, *GSK3β*, *FGF18*, *MMP7* e *VEGFA*). As sequências dos primers estão apresentadas na Tabela 5. As bandas foram visualizadas por meio de gel de

poliacrilamida 7% corado com *SybrTM Gold nucleic acid gel stain* (Invitrogen - ThermoFisher Scientific). A normalização da imunoprecipitação foi realizada em relação a porcentagem de Input.

Tabela 5 – Sequência dos primers utilizados para a técnica de Imunoprecipitação da Cromatina (ChIP)

Gene	Sequência Forward	Sequência Reverse	Temperatura de Anelamento	Fragmento (pb)
<i>APC</i>	TCCACTGTTTC ATCCTCTTAG	CCTTGGCTACCCT TGGACCTAT	55°C	198
<i>AXIN2</i>	TGGGATTCTTG GCACAGGCAGT	GACTCCCAGATTC AGCACGCAAAC	54°C	297
<i>FGF18</i>	CTTGGTGGTAG CCGTGTGTT	AGTTTCCCAGCCA CCCTCTTG	58°C	209
<i>GSK3β</i>	ACTGAAATGGT CTCTGGCTCC	AAAGTCCCAAGAG AGAGCAT	57°C	256
<i>MMP7</i>	TTTACTATGCC CACGAAGAAT	AGGGTAGTTTGG GTGCTTTCTT	55°C	297
<i>VEGFA</i>	GTGTGAAGTGA CCTGGGAGC	ATTCGGCGGCTTC ACTACTC	56°C	251

Fonte: Autor

3.8 MODELO IN VIVO - XENOENXERTO

Os animais utilizados foram Nude BALBc e cada grupo foi composto por 5 animais. Aproximadamente 1×10^6 células foram injetadas usando agulhas com calibre 0,25mm, em volume igual a 100µL na região subcutânea do dorso (lados esquerdo e direito) dos animais. Os animais foram anestesiados com quetamina e xilasina (doses: 70mg/Kg e 10mg/Kg, respectivamente) para injeção das células tumorais. Os animais foram submetidos aos tratamentos com UNC1999; FH535; FH535+cisplatina e com UNC1999+FH535 administrados via injeção intraperitoneal

Após 18 dias da injeção das células, quando o crescimento do tumor se tornou perceptível, o tratamento se iniciou com a administração dos inibidores em monoterapia durante 2 dias consecutivos, seguido por cinco ciclos dos tratamentos em combinação com intervalos de 3 dias. Os tumores foram medidos e pesados a

cada 2 dias. Os dois primeiros dias de tratamento tiveram o intuito de sensibilizar o tumor, portanto, foram utilizadas dosagens mais altas dos inibidores: UNC1999 (5mg/kg) e FH535 (15mg/kg). A partir do 3º dia de tratamento, se iniciou os tratamentos em combinação com cisplatina (2mg/kg) para o 4º grupo - (FH535+cisplatina) e com FH535 (12mg/kg) para o 5º grupo – (UNC1999+FH535) sendo que o tratamento com UNC1999 teve sua concentração alterada para 3mg/kg (Tabela 6). Os animais foram examinados diariamente após contenção (sem anestesia) e as dimensões dos tumores no dorso foram medidas com o auxílio de um paquímetro a cada 2 dias. Os animais foram monitorados até o tumor atingir o tamanho de 2 cm³ ou ocorrer ulceração do tumor. Após 29 dias do início dos tratamentos, os animais foram sacrificados e os tumores retirados, medidos, pesados e processados para posterior análise histológica. O volume dos tumores foi expresso em mm³ e calculado de acordo com a fórmula (comprimento x largura²)/2 (JENSEN et al., 2008). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP), registrado sob o n.19.1.1070.60.6.

Tabela 6 – Estratégia de tratamento em monoterapia e tratamento combinado para o modelo de xenoinxerto *in vivo*.

Ciclos	Grupo/Tratamento	Dosagem
1º	2 – UNC1999 3- FH535 4 – FH535 5 – UNC1999	UNC1999 – 5mg/kg FH535 – 15mg/kg
2º	2 – UNC1999 3- FH535 4 – FH535 5 – UNC1999	UNC1999 – 5mg/kg FH535 – 15mg/kg
3º ao 7º	2 – UNC1999 3 – FH535 4 – FH535 + Cisplatina 5 – UNC1999 + FH535	UNC1999 – 3mg/kg FH535 – 12mg/kg Cisplatina – 2mg/kg

3.9 IMUNOHISTOQUÍMICA

Os tecidos tumorais foram processados e os cortes histológicos foram preparados no Laboratório Multiusuário de Histotécnica (LMH) no Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP).

Os cortes histológicos foram desparafinizados em estufa à 65°C. Para a coloração com H.E (Hematoxilina e Eosina), as lâminas foram incubadas em xileno por 1 hora, seguido de hidratação com lavagens em etanol (100%, 95% e 70%) e água deionizada. As lâminas foram mergulhadas em solução de eosina por 5 minutos, e hematoxilina por aproximadamente 1 minuto. Posteriormente foi realizada a desidratação das lâminas com etanol (70%, 95% e 100%), e xileno (respectivamente). As lâminas foram montadas utilizando *Eukitt Quick-hardening mounting medium* (Sigma Aldrich).

Para a imuno-histoquímica, as lâminas foram desparafinizadas e hidratadas conforme descrito acima. Em seguida, as lâminas foram incubadas em tampão citrato pH 6.0. Posteriormente foi realizado o bloqueio das peroxidases endógenas com solução de metanol e peróxido de hidrogênio, e adicionado nos tecidos solução de bloqueio (*VECTASTAIN Universal Quick kit - Vector Laboratories*) por 1 hora. Os anticorpos primários β -catenina (1:200), EZH2 (1:50), H3K27me3 (1:200), OCT4 (1:50), SOX2 (1:50) e KDM6B (1:10) foram incubados overnight.

No dia seguinte, foi adicionado o anticorpo secundário *Biotinylated Pan-pacific Universal Antibody* (*VECTASTAIN Universal Quick kit - Vector Laboratories*) por 30 minutos. As lâminas foram secas e adicionado *Streptavidin/Peroxidase Complex* (*VECTASTAIN Universal Quick kit*) nos tecidos por 5 minutos, e adicionado uma solução contendo *Impact DAB reagent 1* e *Impact DAB diluent* (*ImmPACT DAB - Vector Laboratories*) por 2 minutos no tecido.

Em seguida foi realizada a coloração com hematoxilina, e desidratação das lâminas com etanol e xileno. As lâminas foram montadas utilizando *Eukitt Quick-hardening mounting medium* (Sigma Aldrich) e foram tiradas 5 fotos de cada condição no LAB 3D BIO – Laboratório Multiusuário para Análises de Imagens Tridimensionais de Tecidos Biológicos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP) pelo microscópio trinocular para campo claro e fluorescência *Leica DMLB* com câmera

DC300F acoplada, utilizando o programa *Leica Application Suite 4.1.0*, no aumento de 20X.

3. 10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

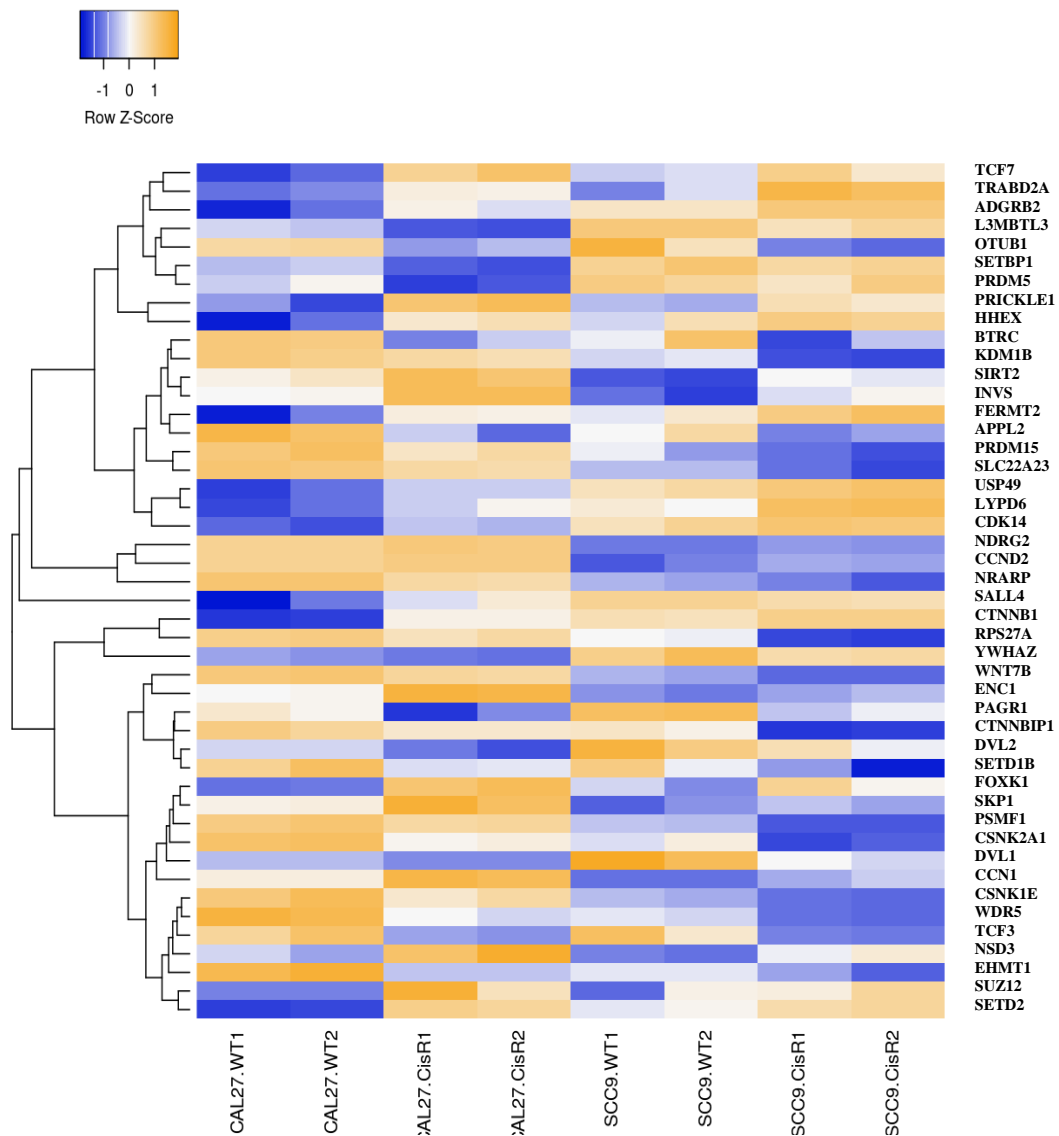
As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software *GraphPad Prism (GraphPad Software, version 5.0)*. O valor de IC50 para os inibidores ICG-001, FH535 e UNC1999 foi determinado utilizando a regressão não linear de log (inibidor) vs resposta normalizada. Nos ensaios de qPCR, para a comparação entre dois grupos foi realizado o teste *T de Student*; e para a comparação entre 3 ou mais grupos, foi utilizado *one-way ANOVA* com pós-teste de *Dunnett's Multiple Comparison Test*. Para os ensaios de citometria de fluxo e ensaio de esferas, também foram utilizados *one-way ANOVA* com pós-teste de *Dunnett's Multiple Comparison Test*. Já para a análise do crescimento tumoral por xenoenxerto, foi utilizado *two-way ANOVA* com pós-teste de *Bonferroni's multiple comparisons test*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

4.1 SELEÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO-ALVO DO PROJETO

Resultados anteriores do nosso grupo, onde foram realizadas análises de ATAC-seq (*Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing*) para as linhagens Cal27 e SCC9 selvagens e CisR, indicaram um perfil de cromatina mais fechada nas linhagens CisR em comparação com as linhagens selvagens, sugerindo uma regulação da maquinaria epigenética, da qual acetilação e metilação de histonas participam ativamente (FU et al., 2019). Uma exceção foram regiões específicas dos cromossomos 3 (genes *CTNNB1* e *KMT3A*), 5 (gene *TCF7*) e 6 (gene *EHMT2*), que apresentaram um perfil de cromatina mais aberta. Análises de *Gene Ontology* também indicaram perfis de cromatina diferencialmente acessíveis para genes envolvidos nas vias de sinalização de Wnt e metilação das histonas H3 e H4. As linhagens Cal27 e SCC9 selvagens e CisR também foram previamente analisadas pela técnica de RNA-seq, onde foram identificados 46 genes diferencialmente expressos que estão diretamente envolvidos com a via de Wnt/ β -catenina, e com a metilação de histonas. (Figura 2). Genes como *CTNNB1*, *TCF7* e *SETD2* foram observados aumentados nas duas linhagens quimiorresistentes analisadas.

Figura 2 – *Heat Map* dos 46 genes envolvidos na sinalização de Wnt/ β -catenina e regulação de metilação de histonas

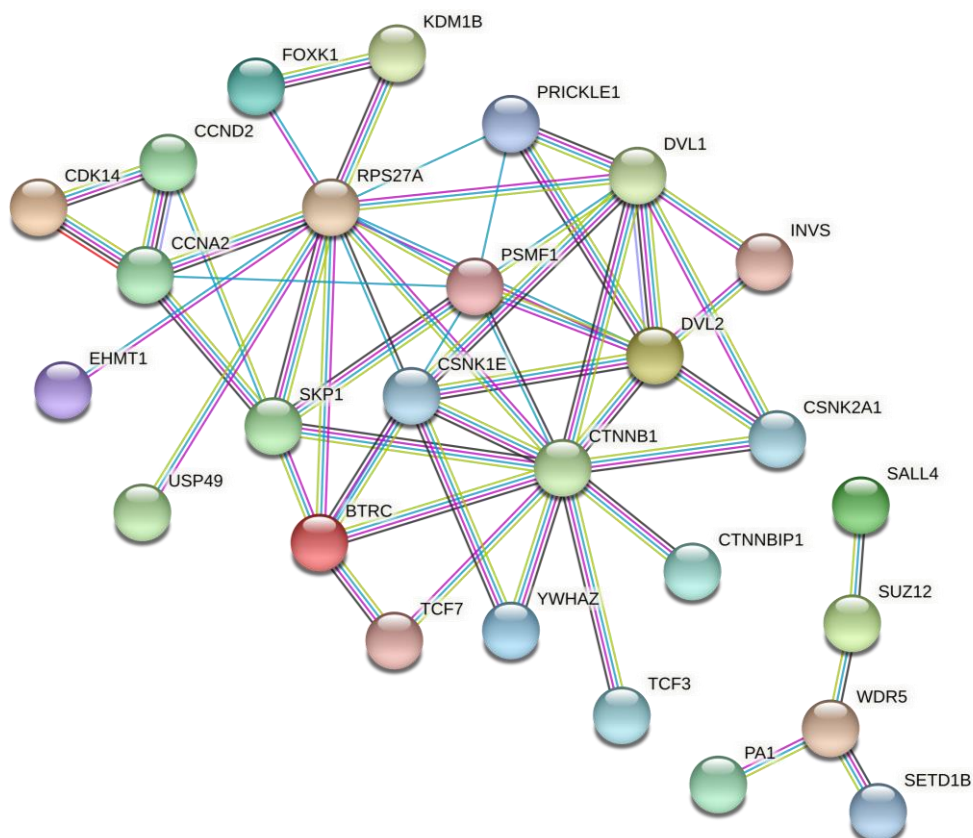


Fonte: Autor

Para explorar esses dados, nós analisamos possíveis interações entre os 46 genes observados diferencialmente expressos. Para isso, foi utilizado o banco de dados STRING (<https://string-db.org/>), que realiza a coleta e a integração de todas as fontes públicas disponíveis com informações sobre interações proteína-proteína e às completam com previsões computacionais. Outro recurso que o STRING traz, é a análise de enriquecimento, a qual implementa sistemas de classificação, como o *Gene Ontology* e KEGG (SZKLARCZYK et al., 2019). Os 46 genes encontrados em comum nas linhagens Cal27 e SCC9, foram analisados no STRING utilizando-se o parâmetro

“múltiplas proteínas” e selecionando o organismo *Homo sapiens*. Algumas configurações foram alteradas para que apenas os resultados mais significativos fossem apresentados, como o tipo de interação selecionado para full network (indicando interação funcional e física para as proteínas analisadas) e o score de interação mínima exigida, para 0.900 (maior nível de confiança) e assim foi obtida uma nova rede com 27 proteínas (Figura 3), sendo que o valor estatístico do enriquecimento da interação proteína-proteína foi de $1.84e-15$. Nós podemos observar que o gene *CTNNB1*, que codifica a proteína β -catenina, tem papel central na via de interações, associando-se diretamente com 12 proteínas que pertencem à sinalização de Wnt/ β -catenina, e indiretamente com as histonas metiltransferase *EHMT1* e demetilase *KDM1B*.

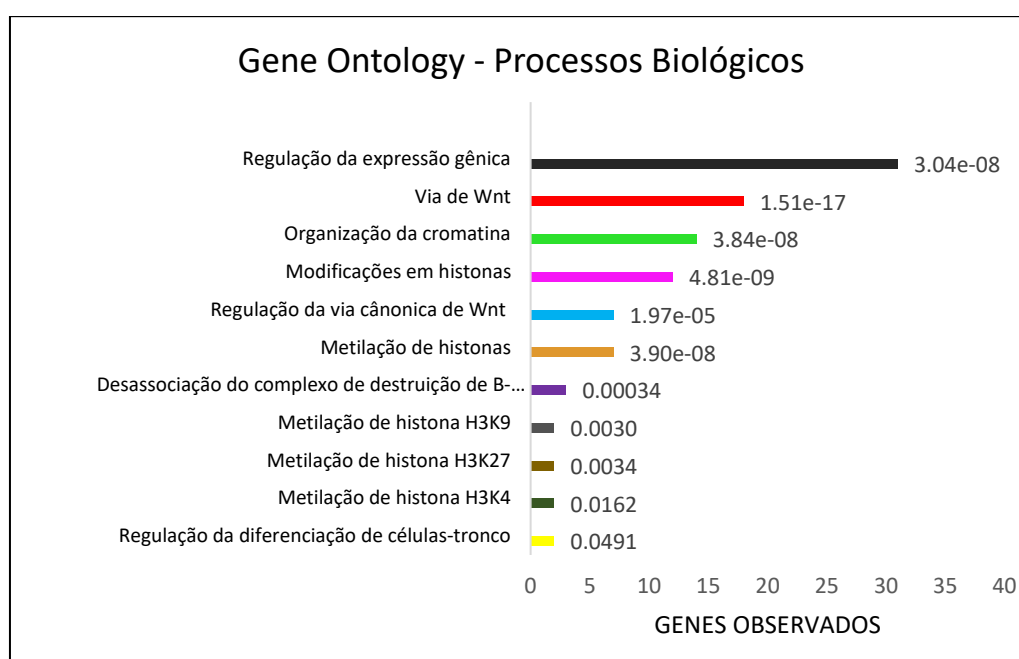
Figura 3 – Rede de interação proteínas-proteínas obtido pelo STRING



Fonte: Autor

Através de análises de processos biológicos pelo *Gene Ontology*, foram observados 268 processos biológicos nos quais as proteínas analisadas estavam envolvidas. Os 11 processos mais diretamente relacionados com este projeto e com maiores níveis de significância estão dispostos na figura 4. Podemos observar que Regulação da expressão gênica, Via de Wnt, Organização da cromatina, Modificações em histonas e Metilação de Histonas estão entre os processos com o maior número de genes envolvidos e maiores níveis de significância.

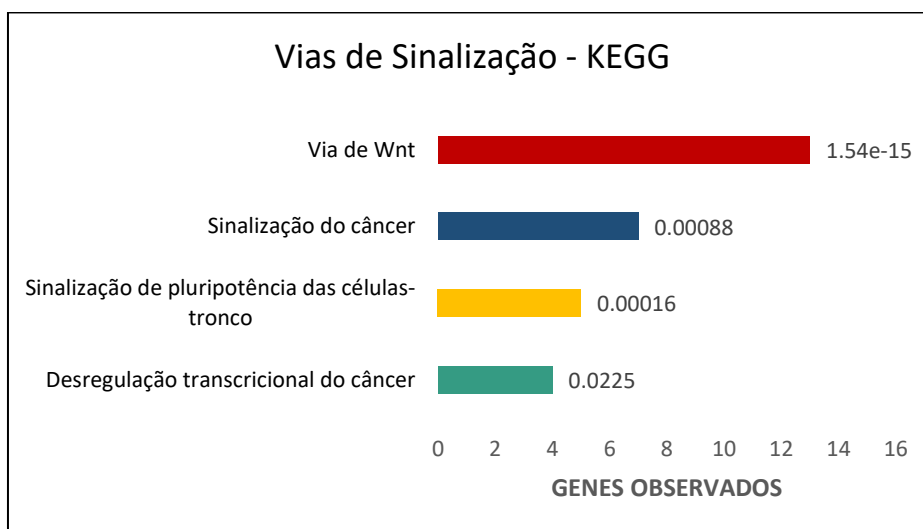
Figura 4 - Processos Biológicos obtidos pelo *Gene Ontology*



Fonte: Autor

Análises de vias de sinalização pelo KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) indicaram que os genes analisados estão envolvidos em 30 vias, das quais 4 estão diretamente relacionadas com os objetos de estudo deste projeto (Figura 5).

Figura 5 – Vias de Sinalização obtidos pelo KEGG



Fonte: Autor

4.2 EXPRESSÃO GÊNICA DOS COMPONENTES DA VIA DE WNT/ β -CATENINA NAS LINHAGENS QUIMIORRESISTENTES E NA POPULAÇÃO DE CTT

Como dito anteriormente, a via de Wnt/ β -catenina está relacionada com o desenvolvimento do carcinoma de cabeça e pescoço e com mudanças epigenéticas que ativam genes culminando no acúmulo de CTT (WEND et al., 2013). Por esse motivo, nós analisamos a expressão de genes envolvidos com a via de Wnt/ β -catenina (*CTNNB1*, *LEF-1*, *TCF4* e *WNT3A*) e genes envolvidos na regulação da maquinaria epigenética (*BRD7*, *CHD8*, *EHMT2*, *EZH2*, *KDM4C*, *KDM5B*, *MLL1* e *SETD1A*) nas linhagens Cal27, SCC9 e SCC25 selvagens e CisR, e em suas respectivas populações de células diferenciadas (CTT-) e células-tronco tumorais (CTT+) quimiorresistentes.

A Figura 6A demonstra um aumento da expressão do gene *BRD7* para as linhagens Cal27 CisR e SCC25 CisR ($p < 0,05$) em comparação com suas selvagens, e diminuição para SCC9 CisR ($p < 0,01$). A expressão do gene *CHD8* foi diminuída para as 3 linhagens quimiorresistentes quando comparadas às suas selvagens, observada na Figura 6B. Na figura 6C, *CTNNB1*, o gene que codifica β -catenina, apresentou sua expressão aumentada para as linhagens Cal27 CisR ($p < 0,05$) e SCC9 CisR, ($p < 0,05$) enquanto apresentou diminuição da SCC25 CisR, comparadas às selvagens.

Analisando o gene *EHMT2*, observado na figura 6D, esse, demonstrou sua expressão aumentada apenas para Cal27 CisR, com diminuição para as linhagens quimiorresistentes SCC9 e SCC25 CisR.

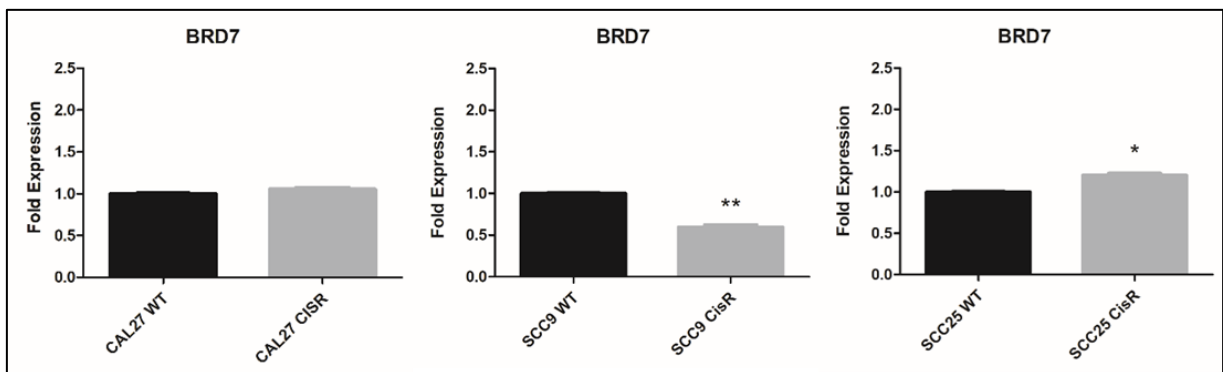
O gene *EZH2*, apresentou aumento de sua expressão para as linhagens Cal27 CisR e SCC9 CisR, com diminuição para SCC25 CisR (Figura 6E). O gene *KDM4C* apresentou resultados semelhantes ao gene *EZH2*, com aumento para Cal27 CisR e SCC9 CisR ($p < 0,01$) e diminuição para SCC25 CisR ($p < 0,05$) quando comparados à selvagem (Figura 6F).

Na figura 6G, *KDM5B* foi aumentado apenas para SCC9 CisR, com diminuição de sua expressão para Cal27 CisR e SCC25 CisR em relação às selvagens. Analisando o gene *LEF1*, apenas a linhagem Cal27 CisR demonstrou aumento de sua expressão, já as linhagens SCC9 CisR ($p < 0,01$) e SCC25 CisR ($p < 0,05$) apresentaram diminuição (Figura 6H). O gene *MLL1* foi aumentado para as linhagens Cal27 CisR e SCC25 CisR, e apresentou diminuição para a linhagem SCC9 CisR ($p < 0,05$) em relação às selvagens (Figura 6I).

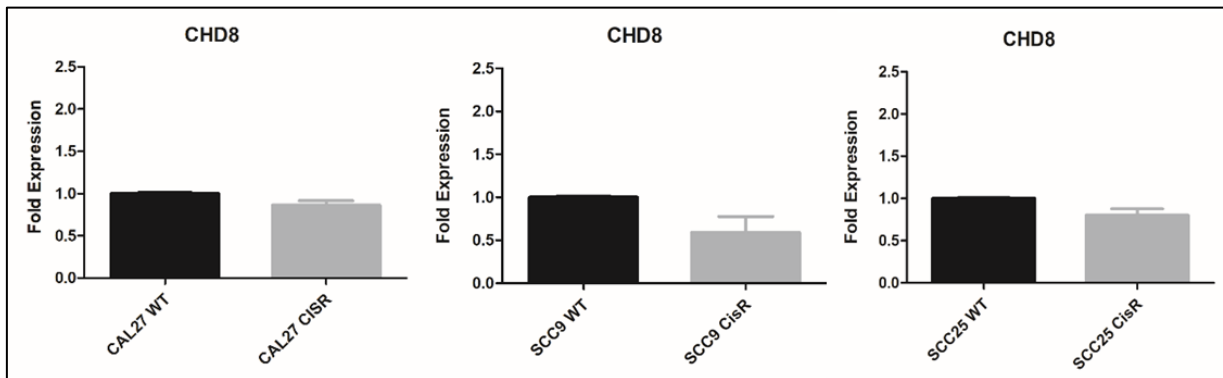
O gene *SETD1A* (Figura 6J), apresentou diminuição de expressão para as 3 linhagens quimiorresistentes Cal27 CisR, SCC9 CisR ($p < 0,01$) e SCC25 CisR em comparação com às selvagens. Na Figura 6K, o gene *TCF4* também demonstrou diminuição da expressão para as 3 linhagens quimiorresistentes em relação às selvagens, assim como o gene *WNT3A* (Figura 6L), para a Cal27 CisR ($p < 0,05$), SCC9 CisR e SCC25 CisR ($p < 0,01$).

Figura 6 – Análise da expressão de genes envolvidos na via de Wnt/ β -catenina e na regulação epigenética nas linhagens quimiorresistentes. A. Expressão gênica de BRD7. B. Expressão gênica de CHD8. C. Expressão gênica de CTNNB1. D. Expressão gênica de EHMT2. E. Expressão gênica de EZH2. F. Expressão gênica de KDM4C. G. Expressão gênica de KDM5B. H. Expressão gênica de LEF1. I. Expressão gênica de MLL1. J. Expressão gênica de SETD1A. K. Expressão gênica de TCF4. L. Expressão gênica de WNT3A

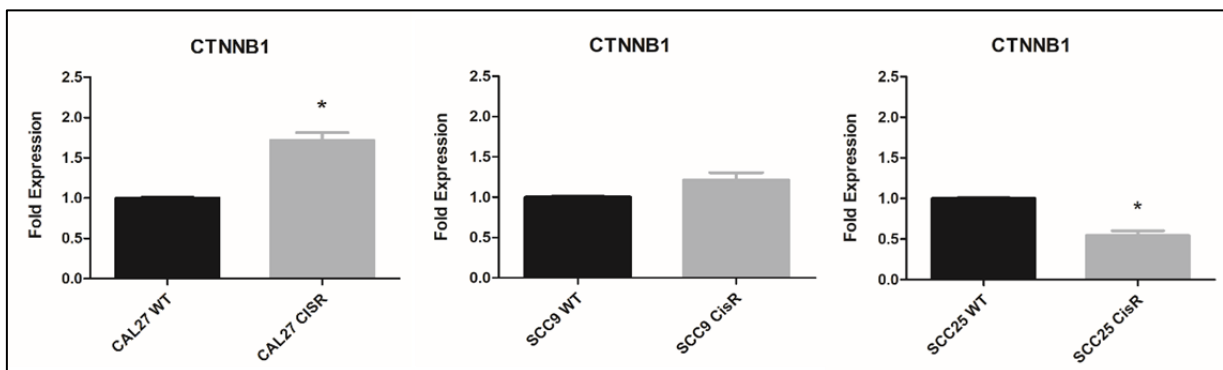
A.



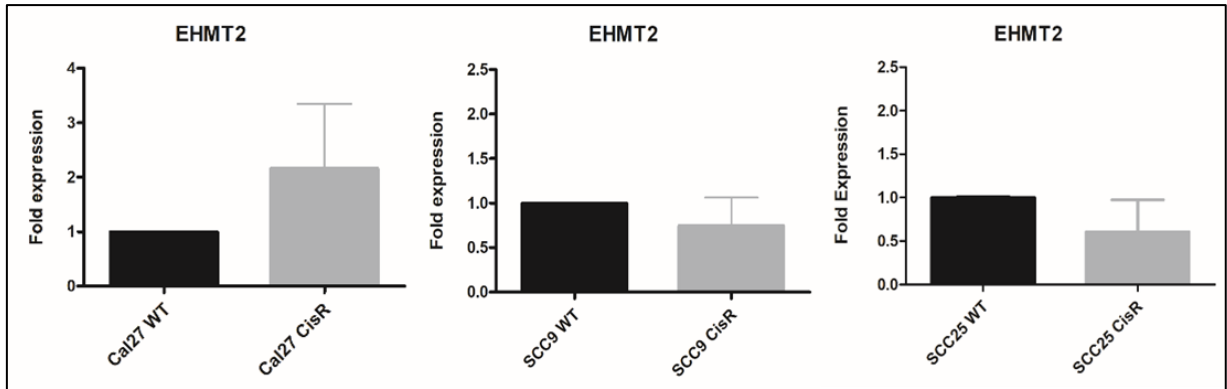
B.



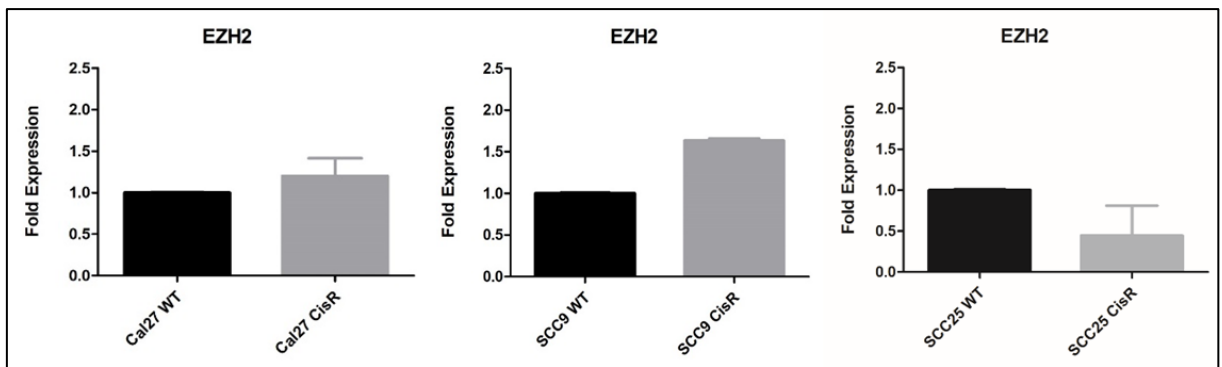
C.



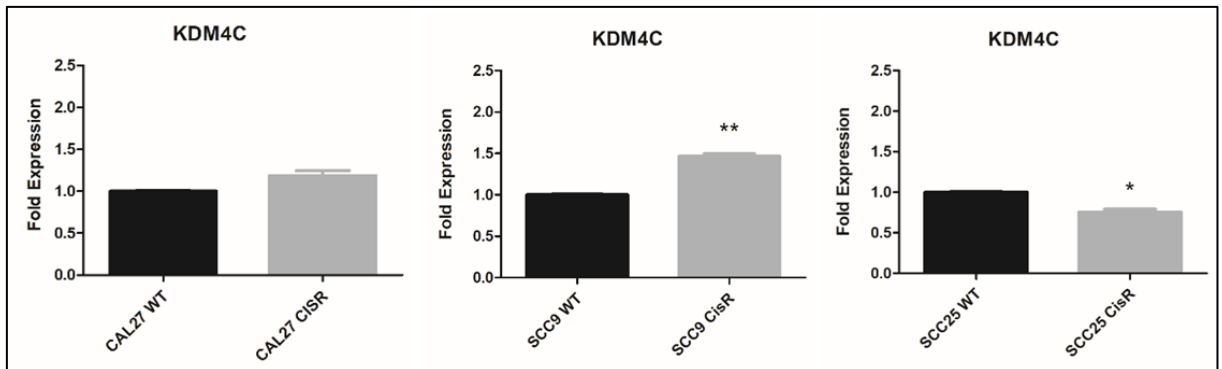
D.



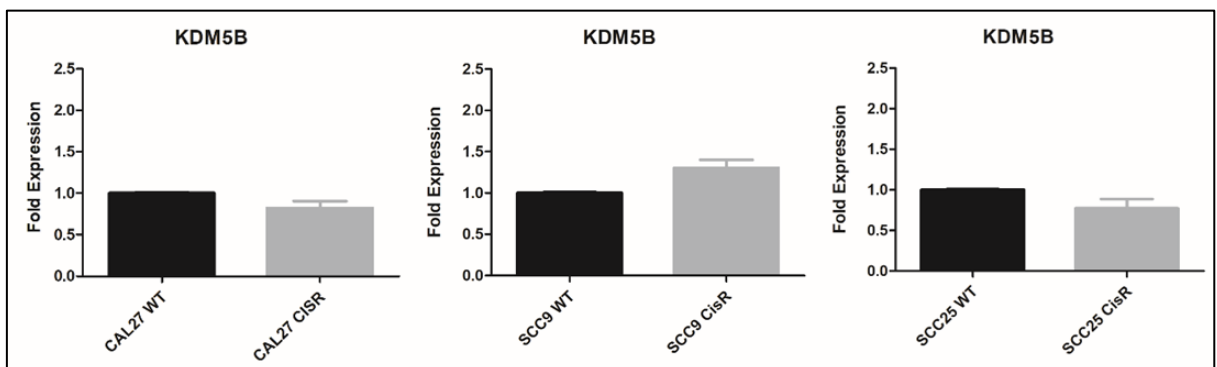
E.



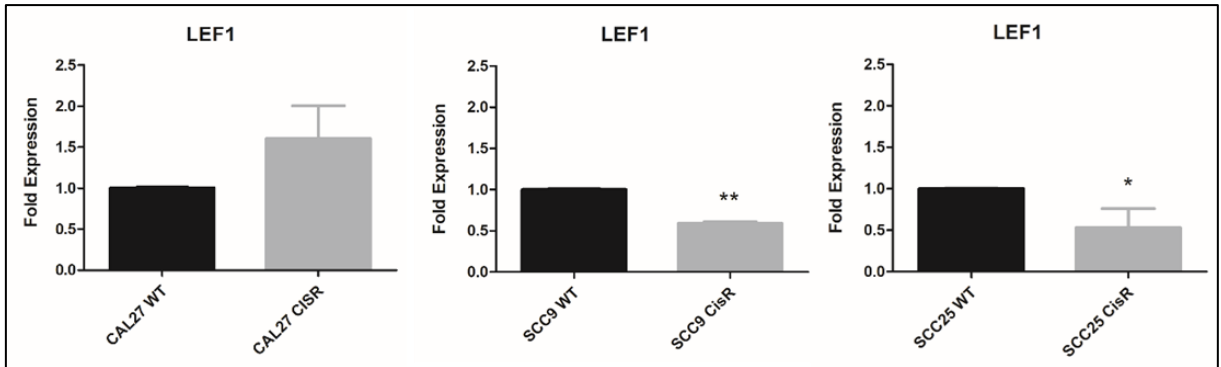
F.



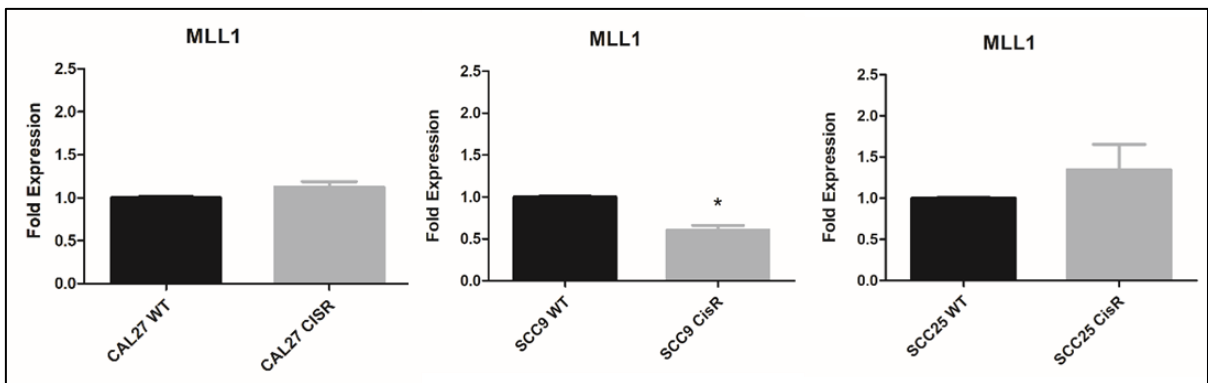
G.



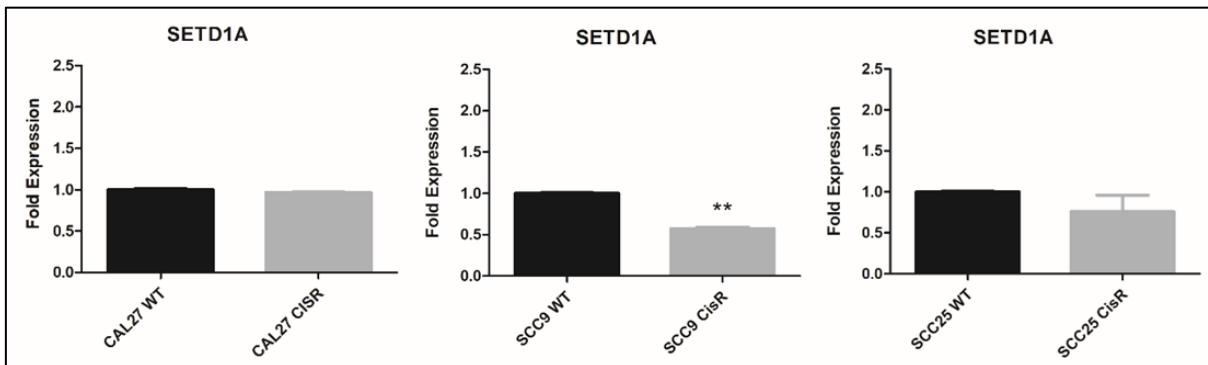
H.



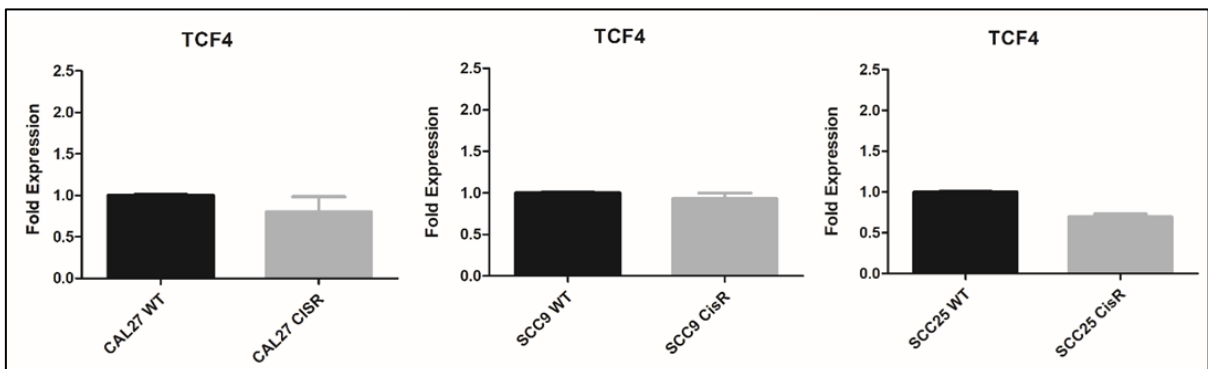
I.



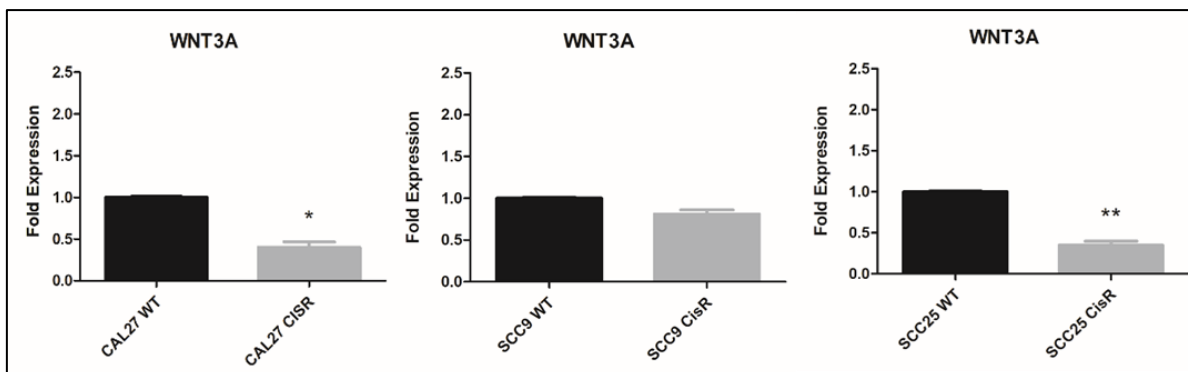
J.



K.



L.



Fonte: Autor

Em seguida, foi avaliada a expressão dos genes *upstream* *GSK3 β* , *AXIN2* e *APC*; e genes *downstream* *FGF18*, *MMP7* e *VEGFA*, da via de Wnt/ β -catenina (HU et al., 2009; LIU et al., 2022; TEIMOORI-TOOLABI; AZADMANESH; ZEINALI, 2010), nas linhagens selvagens e resistentes à cisplatina.

GSK3 β , o inibidor de axis (*AXIN*), *APC* (*adenomatous polyposis coli*) e *CSNK1* (*casein kinase-1*) fazem parte do complexo de destruição de β -catenina. Quando esse complexo está ativo, β -catenina citoplasmática sofre degradação por proteassoma (JAIN et al., 2017; PALUSZCZAK, 2020a). Por outro lado, Matrix metalloproteinase-7 (*MMP-7*), é altamente expressa em vários tipos de tecidos malignos, incluindo câncer colorretal e endometrial, e é regulada positivamente por β -catenina (HE et al., 2012). O fator de crescimento de fibroblastos 18 (*FGF18*) também é acumulado em muitos tipos de tumor, e sua transcrição pode ser aumentada por β -catenina, pois, os sítios de ligação de TCF/LEF se ligam a região promotora de *FGF18* (SONG et al., 2018b). No microambiente tumoral, o fator de crescimento endotelial (*VEGF*) é um dos principais estímulos pró-angiogênicos produzidos, e quando β -catenina se transloca para o núcleo se ligando ao TCF, é capaz de promover a transcrição de *VEGFA* (LIN et al., 2017, p. 3).

Na figura 7, está representada a expressão dos genes *upstream* da via de Wnt/ β -catenina (*APC*, *AXIN2* e *GSK3 β*) e na figura 8 dos genes *downstream* (*FGF18*, *MMP7* e *VEGFA*) da via.

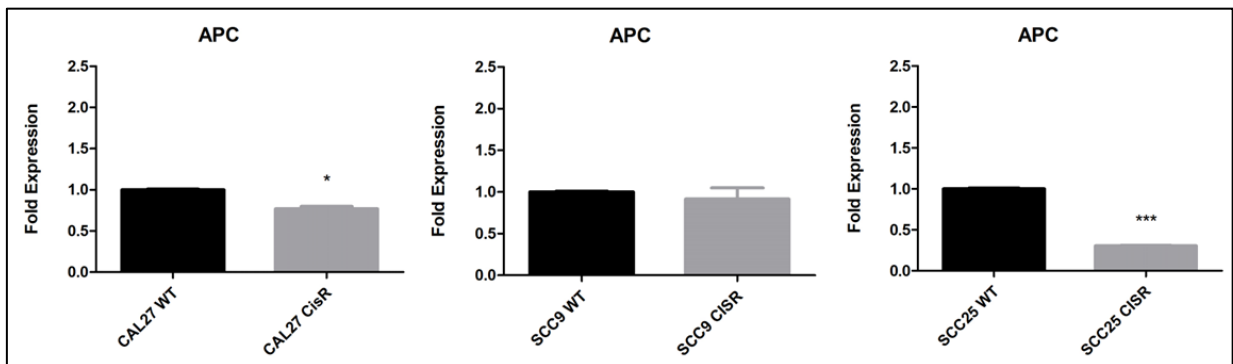
É possível observar que para o gene *APC*, as três linhagens quimiorresistentes Cal27 CisR ($p < 0,05$), SCC9 CisR e SCC25 CisR ($p < 0,001$), apresentaram diminuição da expressão gênica, comparadas às selvagens (Figura 7A). O gene *AXIN2*, apresentou maior expressão para as linhagens quimiorresistentes

Cal27 CisR ($p < 0,01$) e SCC9 CisR, no entanto, apresentou diminuição de sua expressão para a SCC25 CisR ($p < 0,01$), em relação às selvagens (Figura 7B). Na Figura 7C, o gene *GSK3 β* apresentou resultados semelhantes ao gene APC, em que as 3 linhagens, Cal27 CisR ($p < 0,05$), SCC9 CisR ($p < 0,01$) e SCC25 CisR ($p < 0,01$) apresentaram diminuição da expressão gênica, quando comparadas às selvagens.

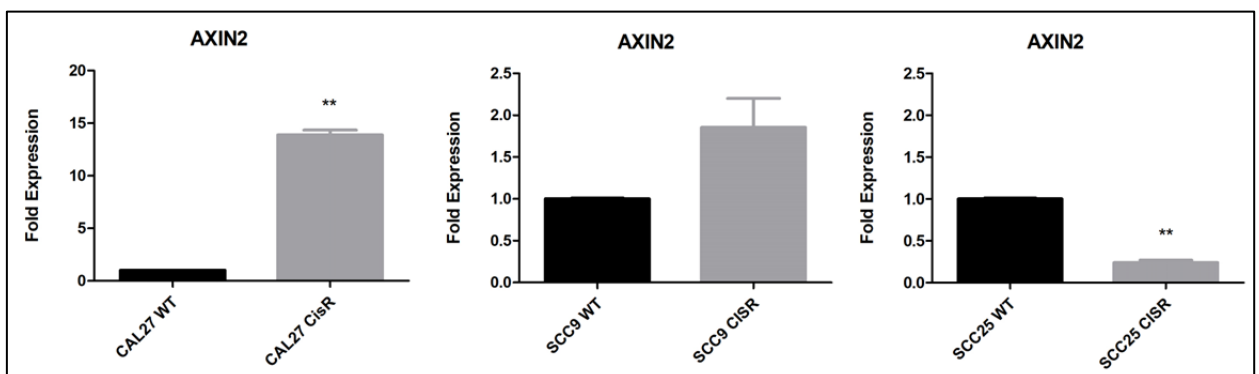
Analisando a figura 8A, o gene *FGF18* apresentou aumento de expressão para as linhagens Cal27 CisR ($p < 0,05$) e SCC9 CisR, porém, o inverso ocorreu para a linhagem SCC25 CisR. Interessantemente, o gene *MMP7* apresentou resultados semelhantes, com aumento expressivo para a linhagem Cal27 CisR ($p < 0,001$) e SCC9 CisR ($p < 0,05$) e diminuição para a SCC25 CisR, em comparação às selvagens (Figura 8B). Já o gene *VEGFA*, demonstrou diminuição de sua expressão gênica para as 3 linhagens quimiorresistentes analisadas Cal27 CisR ($p < 0,05$), SCC9 CisR ($p < 0,01$) e SCC25 CisR ($p < 0,01$) em relação às selvagens (Figura 8C).

Figura 7 – Análise da expressão gênica dos genes *upstream* da via de Wnt/ β -Catenina para as linhagens quimiorresistentes. A. Expressão gênica de APC. B. Expressão gênica de AXIN2. C. Expressão gênica de GSK3 β

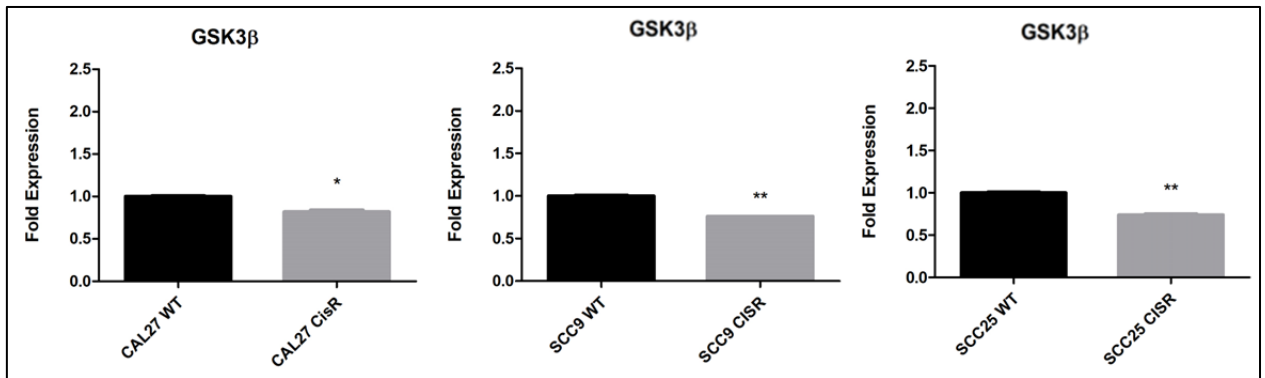
A.



B.



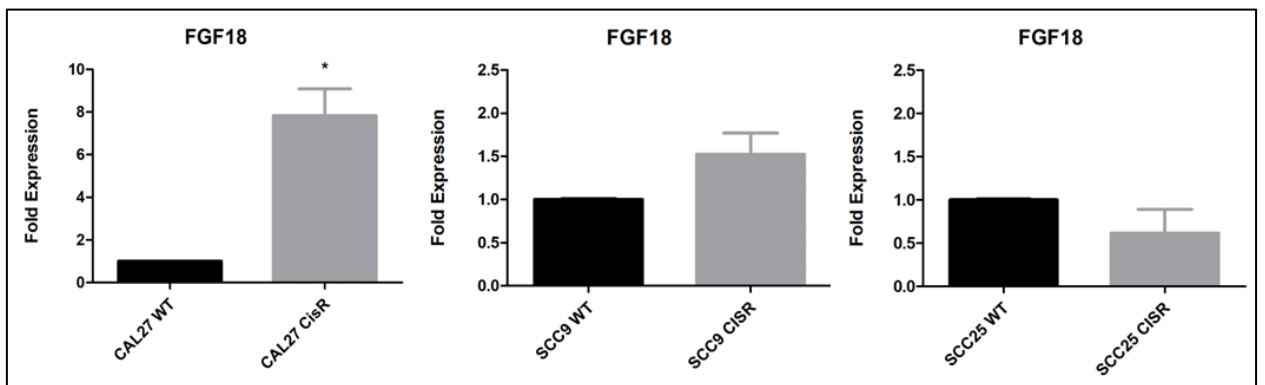
C.



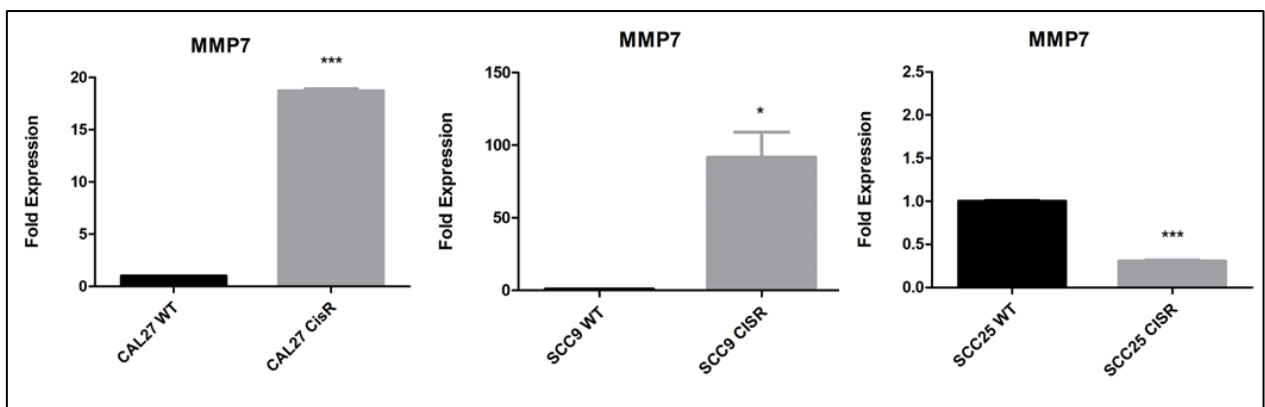
Fonte: Autor

Figura 8 – Análise da expressão gênica dos genes downstream da via de Wnt/ β -Catenina para as linhagens quimiorresistentes. A. Expressão gênica de *FGF18*. B. Expressão gênica de *MMP7*. C. Expressão gênica de *VEGFA*

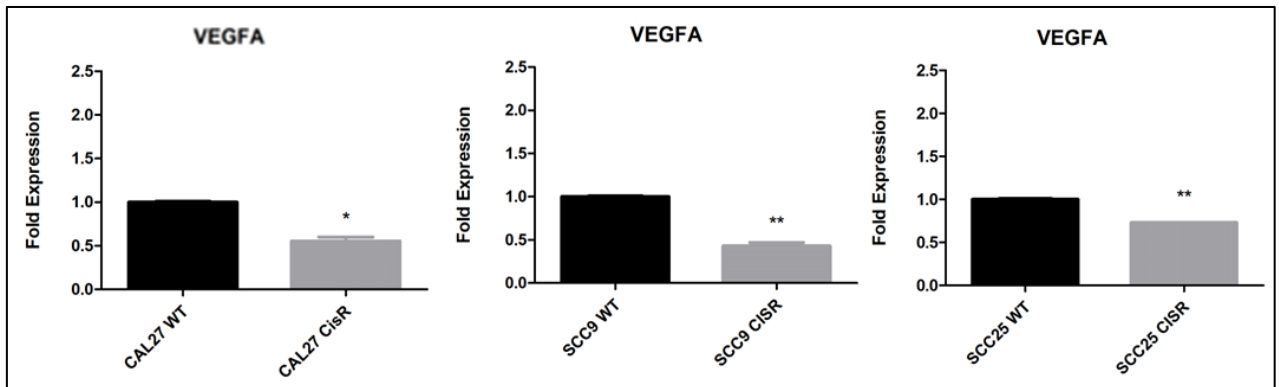
A.



B.



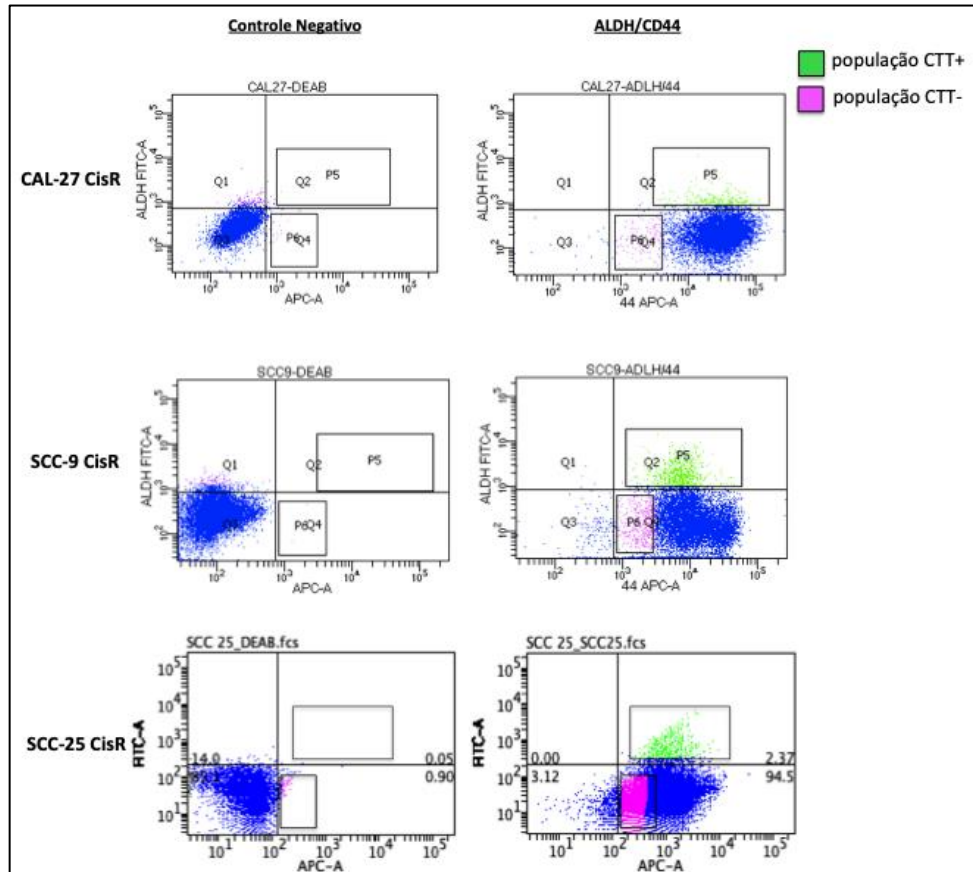
C.



Fonte: Autor

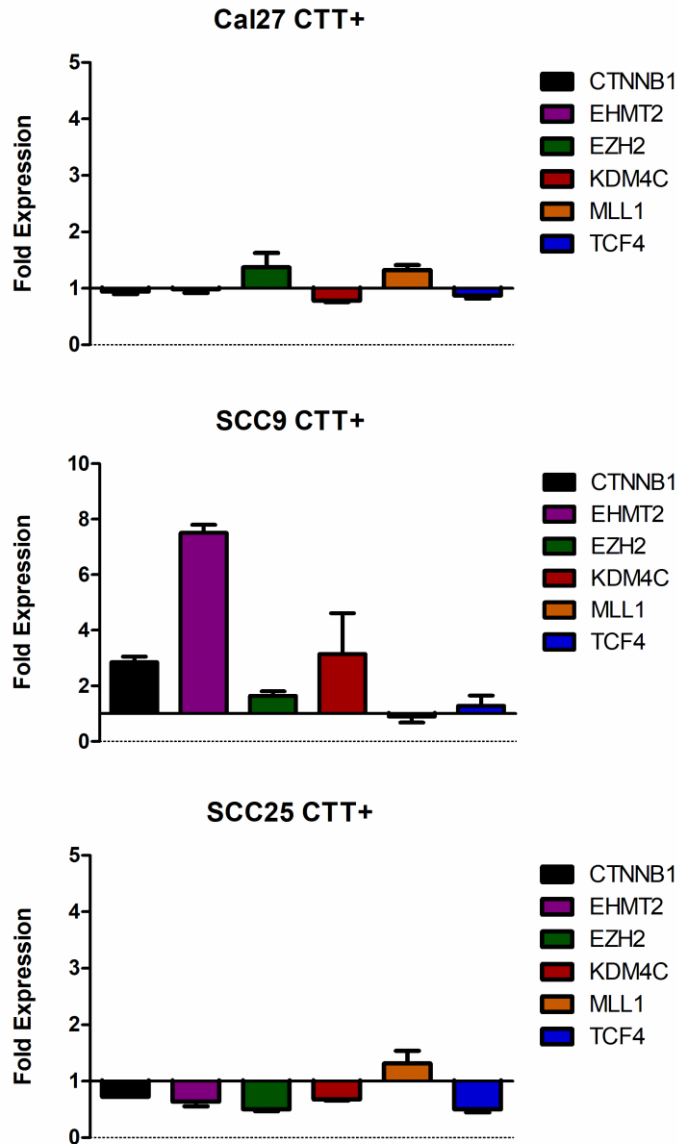
Para a análise da expressão gênica das células-tronco tumorais (CTT+) em comparação às células diferenciadas (CTT-), as populações CTT+ e CTT- foram isoladas por citometria de fluxo (*cell sorting*) utilizando-se como marcadores positivos para as células-tronco tumorais a atividade enzimática de ALDH e a proteína de superfície CD44 e o RNA mensageiro foi extraído. As populações definidas como CTT+ e CTT- estão representadas na figura 9. Foram selecionados para análise os genes *CTNNB1*, *EHMT2*, *EZH2*, *KDM4C*, *MLL1* e *TCF4*, pois eles foram observados aumentados em, pelo menos, duas linhagens quimiorresistentes (Figura 10).

Figura 9 – Isolamento das populações CTT+ e CTT- das linhagens quimiorresistentes Cal27 CisR, SCC9 CisR e SCC25 CisR por citometria de fluxo



Fonte: Autor

Figura 10 - Expressão gênica da população de CTT+ para as linhagens Cal27 CisR, SCC9 CisR e SCC25 CisR



Fonte: Autor

Os resultados demonstraram que para a linhagem Cal27 CisR, a população de CTT+ apresentou maior expressão para *EZH2* e *MLL1*, enquanto *CTNNB1*, *EHMT2*, *KDM4C* e *TCF4* apresentaram expressão reduzida. Para a linhagem SCC9 CisR, a população de CTT+ apresentou maior expressão para *CTNNB1*, *EHMT2*, *EZH2*, *KDM4C* e *TCF4*, sendo que apenas *MLL1* apresentou redução de expressão. A linhagem SCC25 CisR apresentou expressão aumentada para população de CTT+

apenas para *MLL1*, enquanto *CTNNB1*, *TCF4*, *KDM4C*, *EZH2* e *EHMT2* apresentaram expressão diminuída.

4.3 ANÁLISE DE EXPRESSÃO PROTEICA DE MODIFICAÇÕES EPIGENÉTICAS EM HISTONAS E COMPONENTES DA VIA DE WNT/ β -CATENINA

A epigenética do câncer explica a ampla variedade de mudanças hereditárias na expressão gênica, as quais não acontecem por alterações nas sequências de DNA. Um exemplo é a modificação em histonas que são chave dos mecanismos epigenéticos que iniciam a progressão tumoral e levam à metástases. A metilação em histonas acontece nos resíduos de lisina ou arginina, e promove tanto a ativação quanto a repressão da expressão gênica, sendo regulada por lisinas metiltransferases (KMTs) e lisinas demetilases (KDMs) (PARK; HAN, 2019). Geralmente, a metilação da lisina 36 na histona H3 (H3K36), está relacionada com a ativação transcricional, enquanto a di e tri-metilação na lisina 9 da histona H3 (H3K9) e na lisina 27 da histona H3 (H3K27) estão relacionadas à repressão gênica (PARK; HAN, 2019). Sendo que, *EZH2* causa a tri-metilação da lisina 27 (H3K27me3) e *EHMT2* a di-metilação da lisina 9 (H3K9me2) (DUAN; DU; GUO, 2020).

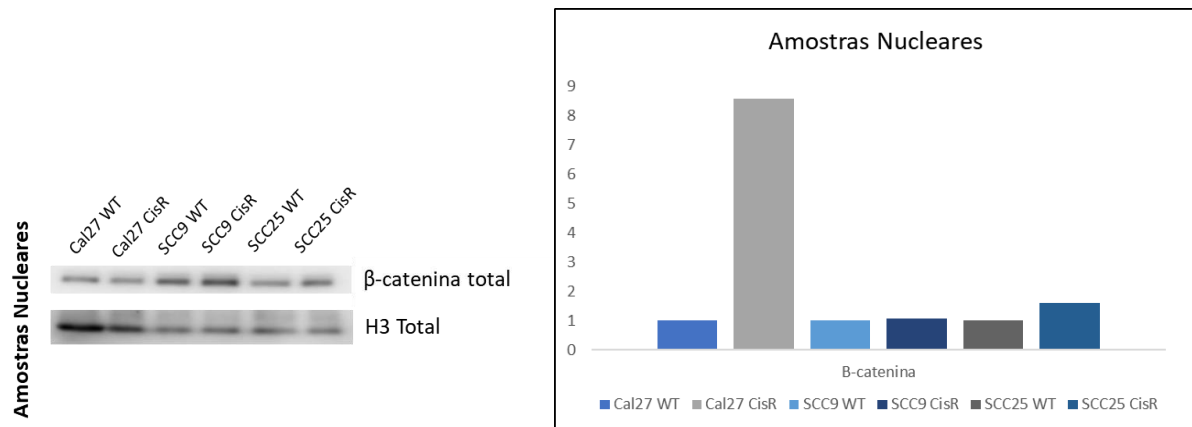
Para as análises de proteína, as amostras Cal27, SCC9 e SCC25 (WT e CisR) foram submetidas ao fracionamento celular (*Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells, ThermoFisher Scientific*), obtendo as frações nucleares e da cromatina. As proteínas avaliadas foram β -catenina, *EZH2*, H3K9me2, H3k27me3 e H3k36me3. A proteína histona H3 foi utilizada como constitutiva. Na Figura 11A, onde foram analisadas as proteínas presentes na fração nuclear, mas que não compõem a cromatina, nós observamos aumento nos níveis de β -catenina para as três linhagens quimiorresistentes analisadas. Os resultados representados na Figura 11B, que indicam a distribuição das proteínas na fração da cromatina, demonstraram um aumento de *EZH2* em todas as linhagens quimiorresistentes quando comparadas às selvagens. Também foi observado maior acúmulo da histona H3K27me3, nas linhagens Cal27 CisR e SCC25 CisR em comparação com as selvagens, e uma diminuição para a linhagem SCC9. Já H3K36me3, foi mais presente para as linhagens Cal27 CisR e SCC9 CisR, apresentando uma diminuição para SCC25 CisR em comparação com suas selvagens. A histona H3K9me2 não apresentou diferenças para as linhagens Cal27 e SCC25, demonstrando uma diminuição da linhagem SCC9

CisR em comparação com a SCC9 selvagem. KDM1A, que causa a mono e di-metilação de H3K4 e H3K9 (HUANG et al., 2017) apresentou níveis aumentados em lisados proteicos totais para a linhagem SCC9 CisR quando comparada à selvagem, e diminuídos para Cal27 CisR e SCC25 CisR (Figura 12).

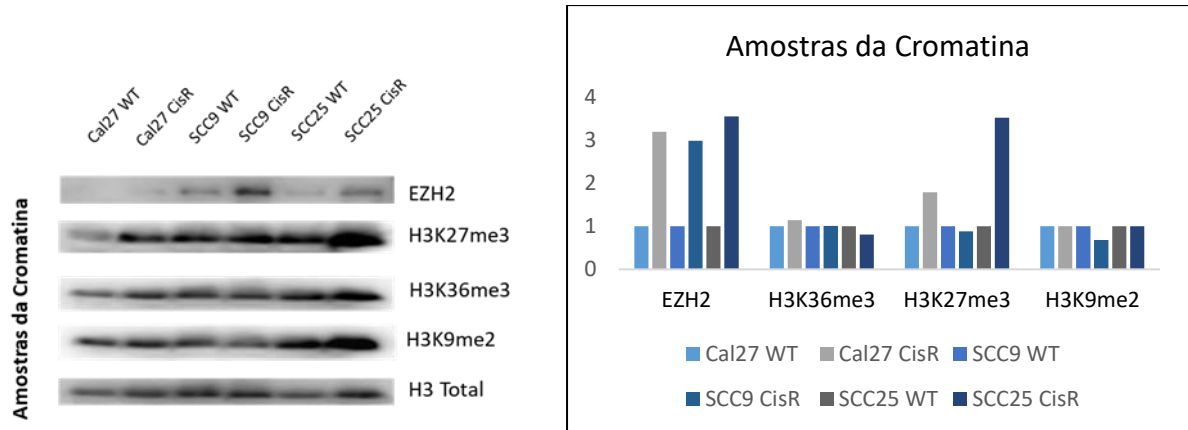
Esses resultados sugerem uma repressão transcricional mediada pela metilação de H3K27me3 nas linhagens CisR, promovida pela ativação da histona metiltransferase EZH2. Além disso, há um aumento da proteína β -catenina em sua forma ativa no núcleo das células quimiorresistentes, indicando que EZH2 pode estar inibindo a expressão de repressores *upstream* de β -catenina, como APC e GSK3 β , deixando β -catenina livre para translocar-se para o núcleo e exercer seu papel de fator de transcrição, ativando genes envolvidos na autorrenovação e proliferação das CTT.

Figura 11 – Análise da expressão proteica de metilação de histonas e componentes de Wnt/ β -catenina por *Western Blotting* nas linhagens selvagens e resistentes à cisplatina. A. Fração Nuclear. B. Fração da cromatina

A.

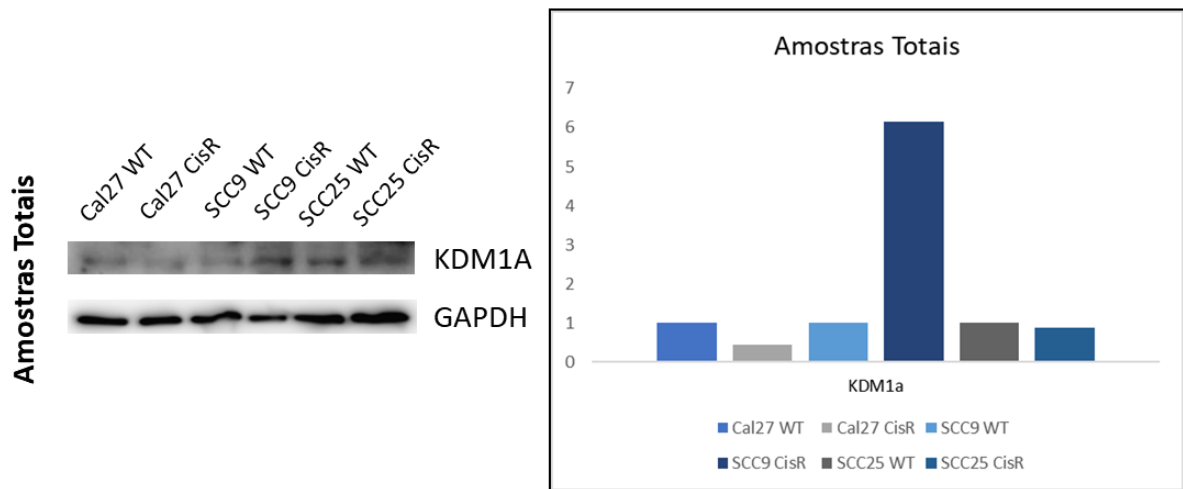


B.



Fonte: Autor

Figura 12 - Análise da expressão proteica da lisina demetilase KDM1a por *Western Blotting* nas linhagens selvagens e resistentes à cisplatina



Fonte: Autor

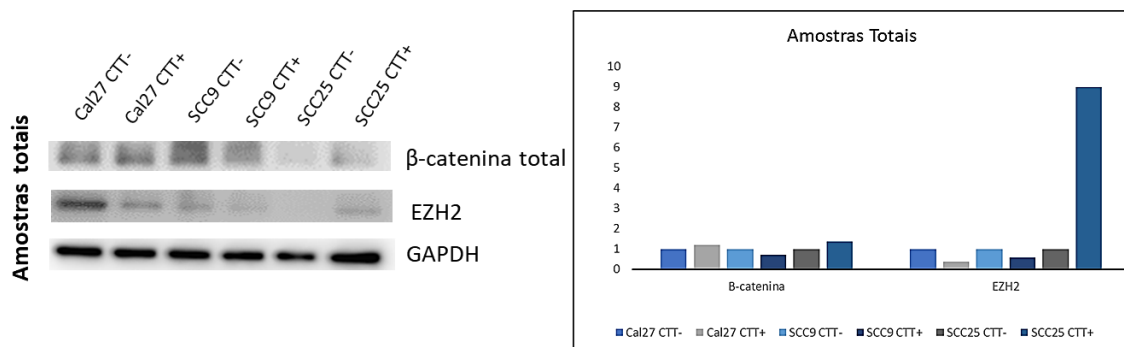
Para investigar diferenças no acúmulo de proteínas entre as células-tronco tumorais (CTT+) e não-tronco tumorais (CTT-), nós realizamos *Western Blotting* após o isolamento das populações por citometria de fluxo, e, β -catenina, EZH2, as histonas metiladas (H3K9me2, H3K27me3 e H3K36me3) e a histona demetilase KDM1A, foram analisadas em lisados de proteínas totais. β -catenina também foi analisada na fração nuclear. Na Figura 13A foi observado que β -catenina total foi aumentada para Cal27 CTT+ e SCC25 CTT+ em comparação às CTT-, sendo que o inverso ocorreu para SCC9. EZH2 apresentou maior distribuição na população não-tronco para Cal27 e

SCC9, já para SCC25 o inverso ocorreu, a qual apresentou mais EZH2 na população de células-tronco tumorais. Já a distribuição de β -catenina total no lisado nuclear, demonstrou aumento apenas para Cal27 CTT+, com diminuição para SCC9 CTT+ e SCC25 CTT+ comparada às CTT- (Figura 13B).

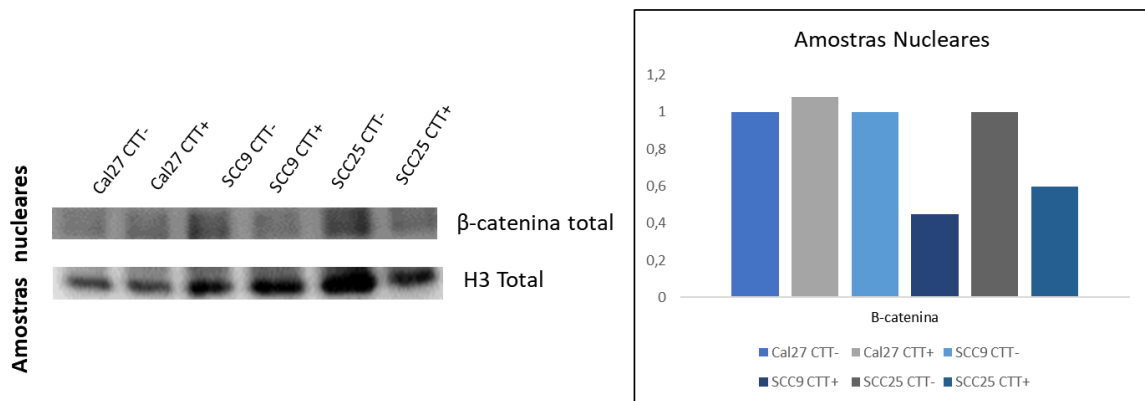
Na Figura 13C, foi observado aumento de H3K9me2 para a população de células-tronco tumorais nas linhagens Cal27 e SCC9 em comparação com a população não-tronco, enquanto houve um aumento das CTT- para a linhagem SCC25 quando comparadas as CTT+. Para H3K27me3 e H3K36me3 o maior acúmulo se deu para Cal27 CTT+ e o inverso ocorreu para SCC9 e SCC25, na qual as proteínas estavam presentes em maior concentração nas CTT-. Avaliando a lisina demetilase KDM1A, foi observado um acúmulo apenas para a população Cal27 CTT+, em que as populações SCC9 CTT+ e SCC25 CTT+ foram diminuídas (Figura 13D).

Figura 13 - Análise da expressão proteica de metilação de histonas e componentes de Wnt/ β -catenina por *Western Blotting* para as células-tronco tumorais e células diferenciadas do tumor. A. Avaliação das amostras totais para β -catenina e EZH2. B. Avaliação do lisado nuclear para β -catenina. C. Avaliação das amostras totais para H3K9me2, H3K27me3 e H3K36me3. D. Avaliação das amostras totais para KDM1A

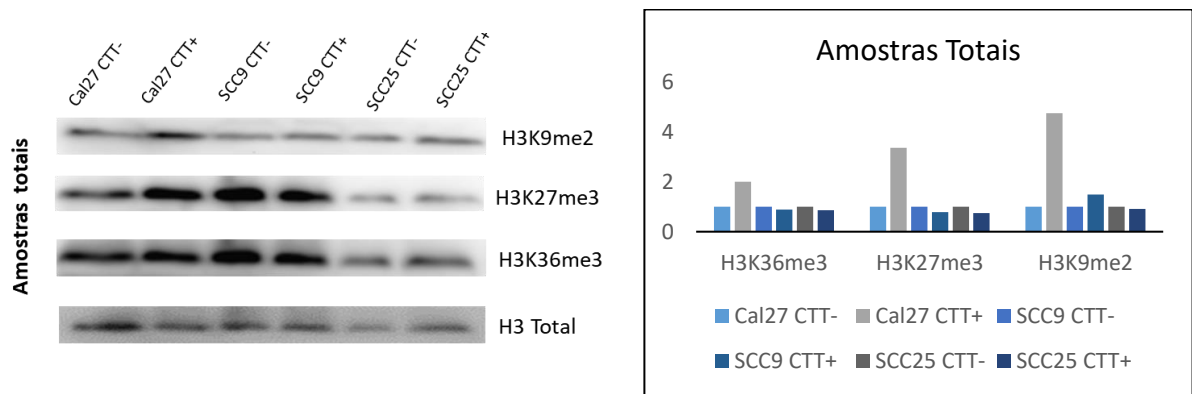
A.



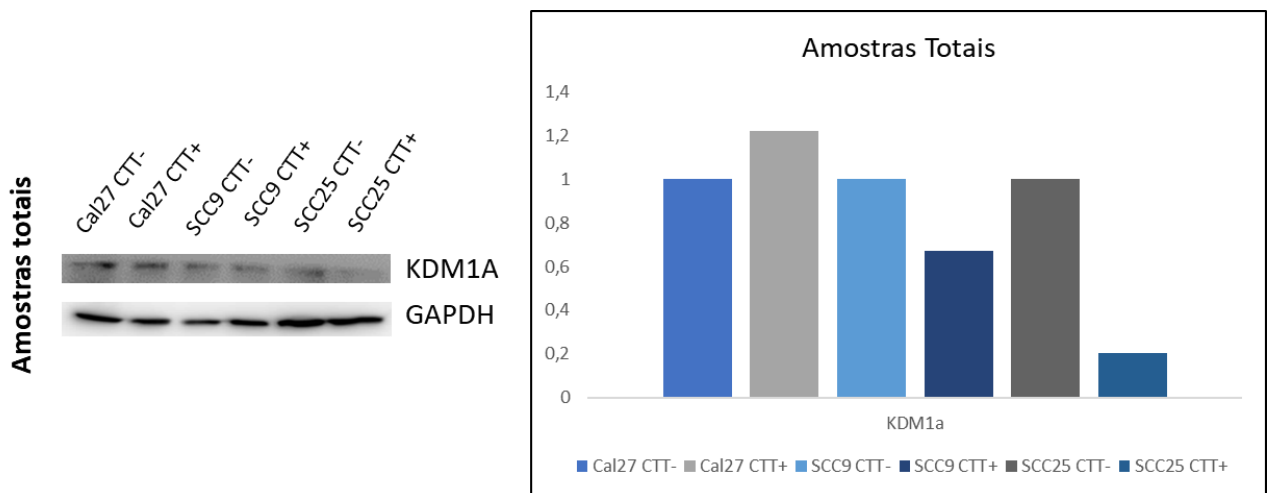
B.



C.



D.



Fonte: Autor

4.4 DETERMINAÇÃO DAS DOSES DOS INIBIDORES DE β -CATENINA - FH535 E ICG-001

FH535 é uma pequena molécula dupla inibidora de receptores ativados por *Peroxisome proliferator-Activated Receptors* (PPARs) e do complexo β -catenina/TCF/LEF por inibir o recrutamento de β -catenina. FH535 inibe o crescimento de células tumorais de mama, pulmão, cólon, pâncreas e hepatocelular (CHEN et al., 2017, p. 535). Uma outra pequena molécula chamada de ICG-001 inibe a atividade da via canônica de Wnt impedindo a interação de β -catenina com CBP. O tratamento com ICG-001 sensibiliza células de glioma à radioterapia e reduz o crescimento de células tumorais em vários tipos de cânceres, como o de pâncreas e o de cólon (WIESE et al., 2017).

Para a determinação do IC₅₀ dos inibidores FH535 e ICG-001, o ensaio de viabilidade celular foi realizado nas populações de CTT+ e CTT- das linhagens quimiorresistentes. Os inibidores foram avaliados nas duas populações pois, o nosso objetivo era ter como alvo a redução das células-tronco tumorais sem afetar de forma muito significativa a população de células tumorais diferenciadas.

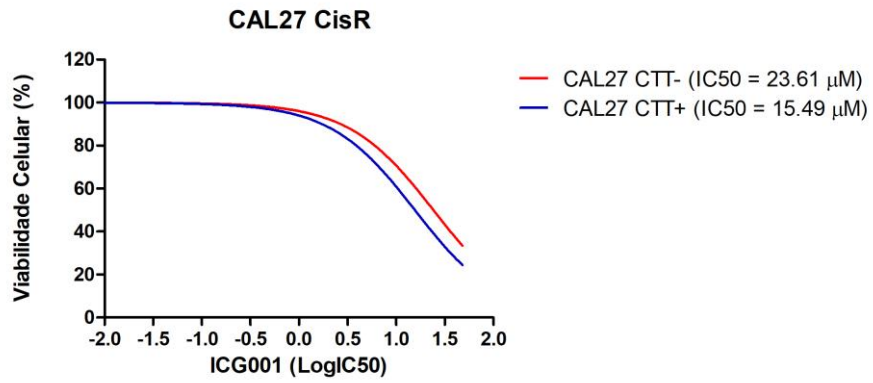
Nós observamos que para a linhagem Cal27, a população de CTT+ foi mais sensível aos dois inibidores, do que a população de CTT- (Figura 14). Sendo que para o inibidor ICG-001, os valores de IC₅₀ foram de 23.61 μ M e 15.49 μ M para as CTT- e CTT+ respectivamente (Figura 14A). Para o inibidor FH535, os valores de IC₅₀ foram de 136.1 μ M e 110.07 μ M, para CTT- e CTT+, respectivamente (Figura 14B).

Para a linhagem SCC9, a população de CTT+ também foi mais sensível aos dois inibidores do que a população de CTT- (Figura 15). Apresentando os valores de IC₅₀ do inibidor ICG-001 de 34.10 μ M e 21.15 μ M para as populações de CTT- e CTT+ respectivamente (Figura 13A). Os valores de IC₅₀ para o inibidor FH535 foram de 109.58 μ M e 62.37 μ M para as CTT- e CTT+ (Figura 15B).

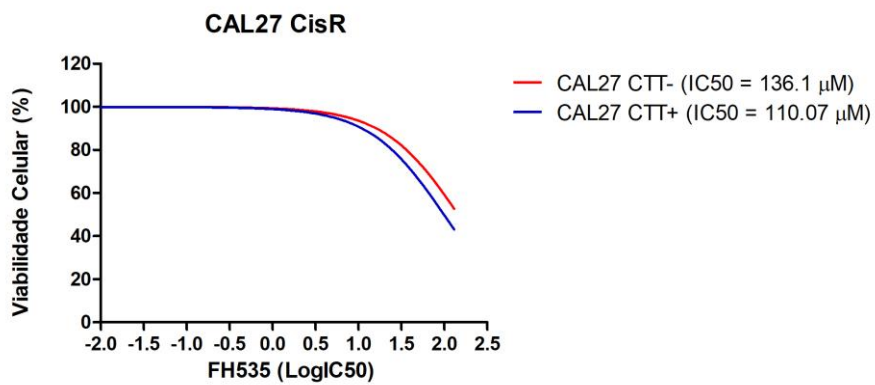
Já para a linhagem SCC25, a população de CTT+ também foi mais sensível para o inibidor ICG-001, comparando-se com a CTT-, porém para o inibidor FH535, as CTT- foram mais sensíveis do que as CTT+ (Figura 16). Os valores de IC₅₀ observados para o ICG-001 foram de 26.39 μ M e 23.59 μ M para CTT- e CTT+ respectivamente (Figura 16A). Já para o FH535, as doses avaliadas foram de 80.48 μ M e 149.9 μ M para CTT- e CTT+ (Figura 16B).

Figura 14 – Determinação do IC50 dos inibidores ICG-001 e FH535 para a linhagem Cal27 CisR (CTT- e CTT+)

A.



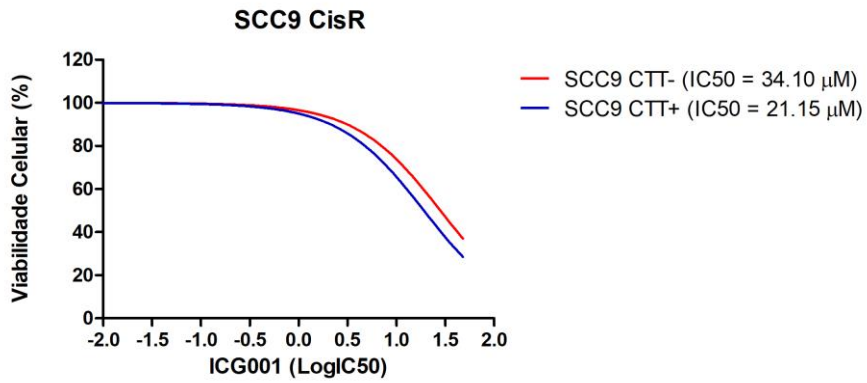
B.



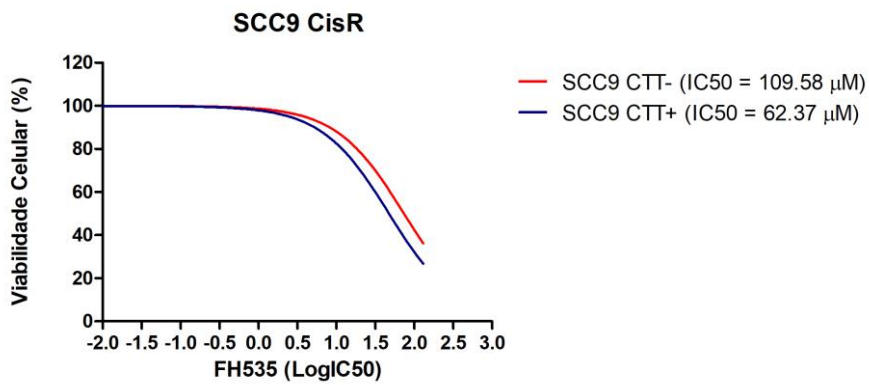
Fonte: Autor

Figura 15 - Determinação do IC50 dos inibidores ICG-001 e FH535 para a linhagem SCC9 CisR (CTT- e CTT+)

A.



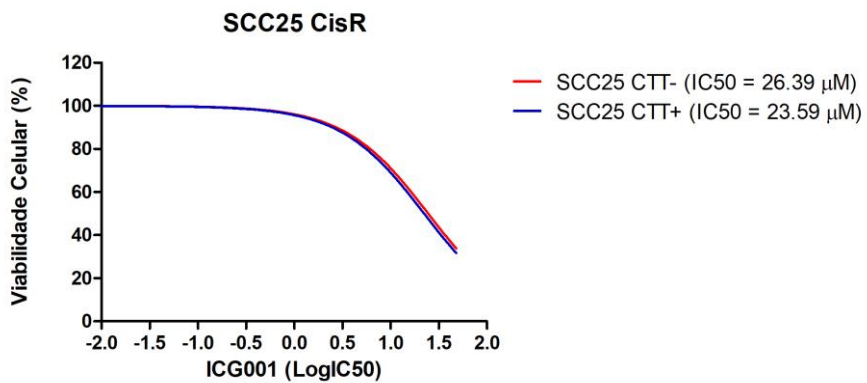
B.



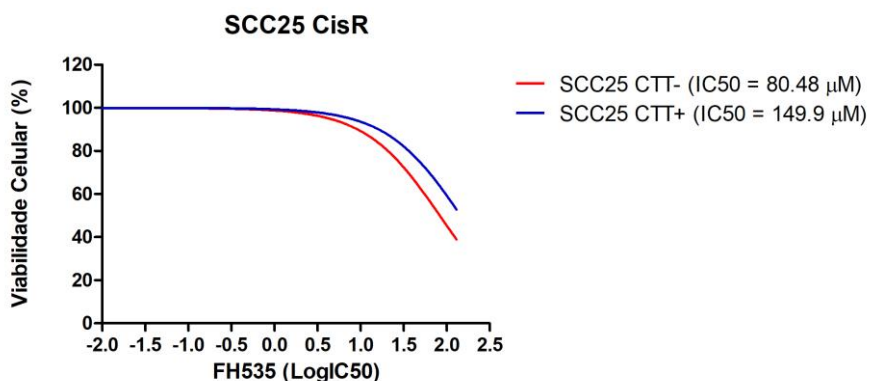
Fonte: Autor

Figura 16 - Determinação do IC50 dos inibidores ICG-001 e FH535 para a linhagem SCC25 CisR (CTT- e CTT+)

A.



B.



Fonte: Autor

4.5 DETERMINAÇÃO DAS DOSES DO INIBIDOR DE EZH2 - UNC1999

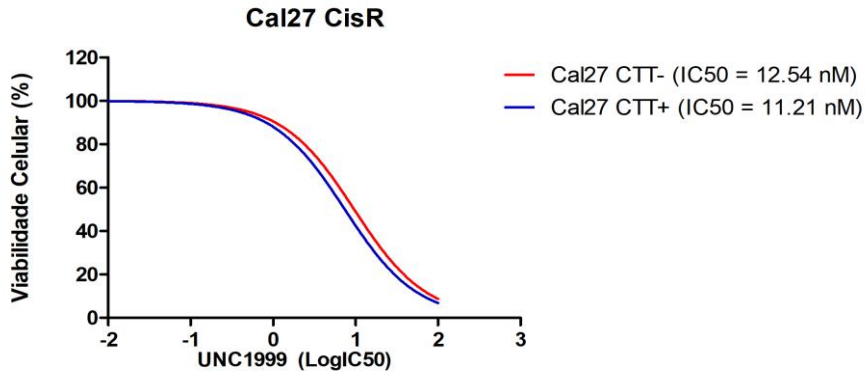
EZH2 superexpresso é capaz de aumentar os níveis de H3K27me3, culminando no silenciamento da expressão de inibidores de Wnt, e assim levando a ativação da via de Wnt/ β -catenina (SONG et al., 2018a). Portanto, para verificar se isso ocorre nas nossas linhagens de carcinoma oral, foi utilizado UNC1999, o qual é um inibidor de EZH2 competitivo de S-adenosil-I-metionina, que têm demonstrado eficácia em diferentes tipos de câncer (XU et al., 2015). Como nós queremos investigar o papel da via de sinalização de Wnt/ β -catenina e da metilação de histonas no acúmulo de CTT, nós determinamos se a inibição farmacológica de EZH2 é capaz de interferir com a população de CTT.

Inicialmente, foi realizado um ensaio de viabilidade celular para determinação do IC50 do inibidor UNC1999 para as populações CTT- e CTT+ das linhagens Cal27, SCC9 e SCC25, e nós observamos que, para todas as linhagens (Cal27, SCC9 e SCC25), a população de CTT+ foi mais sensível ao inibidor UNC1999, do que a população de CTT- (Figura 17). Para a linhagem Cal27, os valores de IC50 para a população CTT- e CTT+ foram de 12.54 μ M e 11.21 μ M respectivamente (Figura 17A). Para a linhagem SCC9, os valores de IC50 foram de 21.11 μ M e 18.48 μ M para as populações de CTT- e CTT+ respectivamente (Figura 17B). Já para a linhagem SCC25 os valores obtidos de IC50 para as populações CTT- e CTT+ foram de 32.94 μ M e 17.02 μ M respectivamente (Figura 17C).

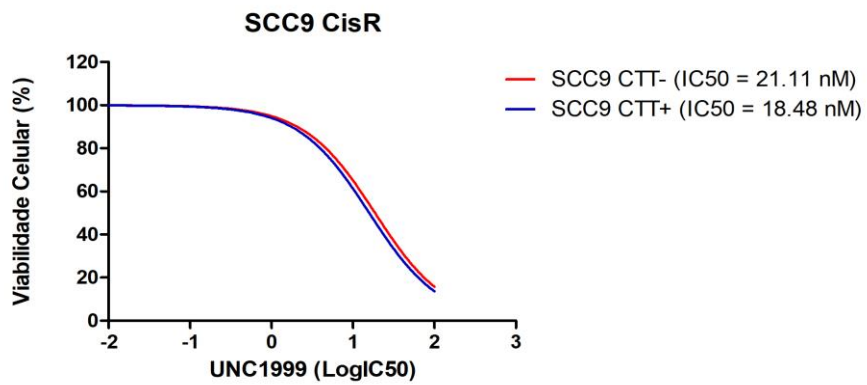
Figura 17 – Determinação do IC50 para o inibidor UNC1999 para as linhagens Cal27, SCC9 e SCC25 (CTT- e CTT+) A. Cal27 CisR. B. SCC9 CisR. C. SCC25

CisR

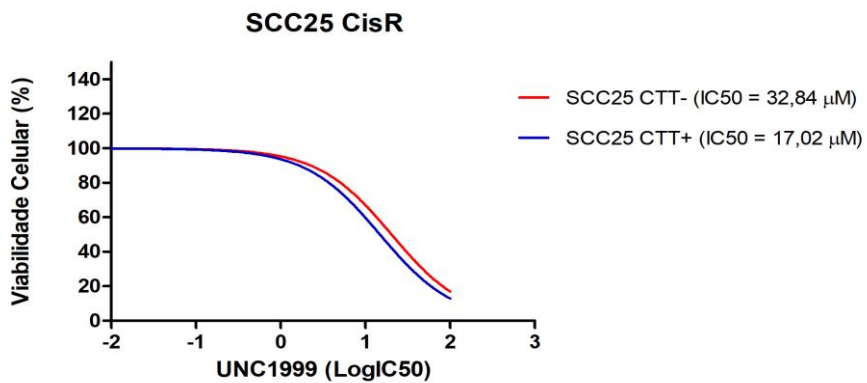
A.



B.



C.



Fonte: Autor

4.6 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DOS INIBIDORES SOBRE A REGULAÇÃO DE β -CATENINA E METILAÇÃO DE HISTONAS

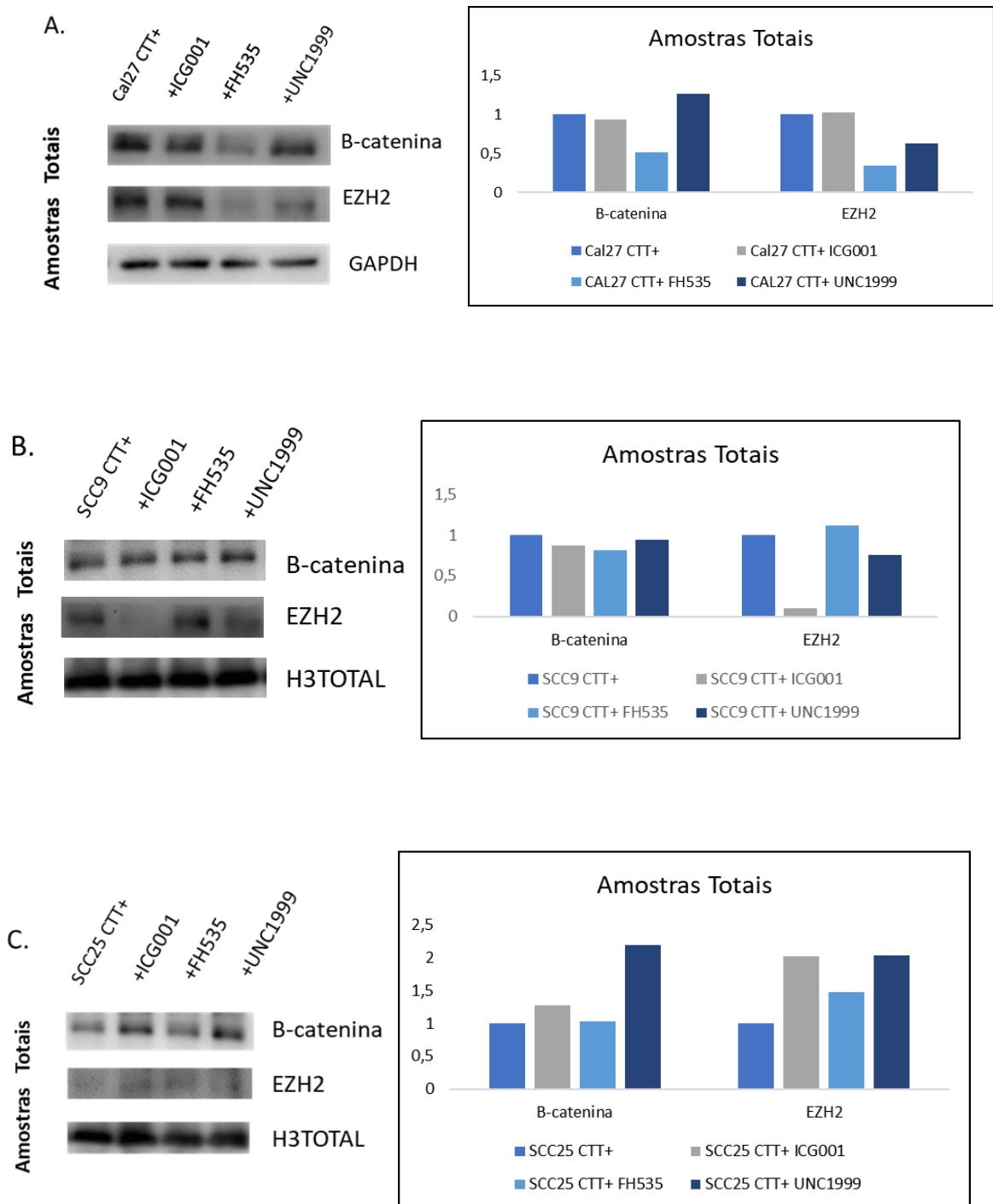
A eficiência dos compostos ICG-001, FH535 e UNC1999 na inibição de suas proteínas-alvo foi avaliada por *Western Blotting*. A lise de proteínas totais foi realizada para a população de CTT+ tratada com suas doses IC50.

Avaliando a linhagem Cal27 (Figura 18A) o tratamento com ICG-001 promoveu uma pequena diminuição nos níveis de β -catenina. Já para o tratamento com FH535, uma diminuição acentuada foi observada tanto para β -catenina, quanto para EZH2. Este foi um resultado interessante, pois FH535 é um inibidor específico de β -catenina. A administração do inibidor de EZH2 UNC1999 promoveu a diminuição da concentração proteica de EZH2 quando comparada à população de CTT+ sem tratamento.

Para a linhagem SCC9, quando as CTT+ foram tratadas com ICG-001, uma diminuição foi observada para β -catenina e para EZH2. O tratamento com FH535 foi efetivo para diminuir a expressão de β -catenina. Já o tratamento com UNC1999 demonstrou diminuir a expressão tanto de β -catenina, quanto de EZH2 (Figura 18B)

Para a linhagem SCC25, foi observado que os tratamentos da população CTT+ com os inibidores ICG-001, FH535 e UNC1999 levaram ao aumento tanto de β -catenina quanto de EZH2 (Figura 18C). Sugerindo que essa linhagem não respondeu a nenhuma das drogas administradas, se mostrando resistente aos tratamentos.

Figura 18 – Análise da expressão proteica para Cal27 CisR, SCC9 CisR e SCC25 CisR com inibidores. A. Expressão de β -catenina e EZH2 para a linhagem Cal27 CisR. B. Expressão de β -catenina e EZH2 para a linhagem SCC9 CisR. C. Expressão de β -catenina e EZH2 para a linhagem SCC25 CisR



Fonte: Autor

Como verificamos que os tratamentos com os inibidores da via de Wnt/ β -catenina (ICG-001 e FH535) e o inibidor de EZH2 (UNC1999) apresentaram efeito na redução das proteínas com marcação de β -catenina e EZH2, foi decidido avaliar a expressão dos genes *upstream* (*APC*, *AXIN2*, *GSK3 β*) e *downstream* (*FGF18* e *MMP7*), além do fator de transcrição *LEF1*, na população de CTT+ tratadas, para as linhagens Cal27, SCC9 e SCC25 CisR por PCR em tempo real.

Para os genes *upstream* foi avaliado o tratamento apenas com UNC1999 (Figura 19), enquanto para os genes *downstream*, foi avaliado o tratamento com ICG-001, FH535 e UNC1999 (Figura 20). Para o gene *LEF1*, o tratamento com FH535 foi avaliado (Figura 20).

Na Figura 19 é observado que o tratamento com UNC1999 aumentou a expressão do gene *upstream APC* para as 3 linhagens Cal27 ($p < 0,01$), SCC9 ($p < 0,01$) e SCC25 ($p < 0,01$) da população CTT+. Interessantemente, o mesmo resultado foi obtido para o gene *GSK3 β* , com aumento de sua expressão para Cal27, SCC9 e SCC25 ($p < 0,01$) nas CTT+ tratadas com UNC1999, sugerindo que a inibição de EZH2 aumenta a expressão dos componentes do complexo de destruição, levando à degradação de β -catenina. O gene *AXIN2*, também apresentou sua expressão aumentada quando as CTT+ da linhagem Cal27 e SCC25 foram tratadas com UNC1999, porém, demonstrou diminuição para a SCC9 CTT+ tratada com UNC1999 ($p < 0,001$).

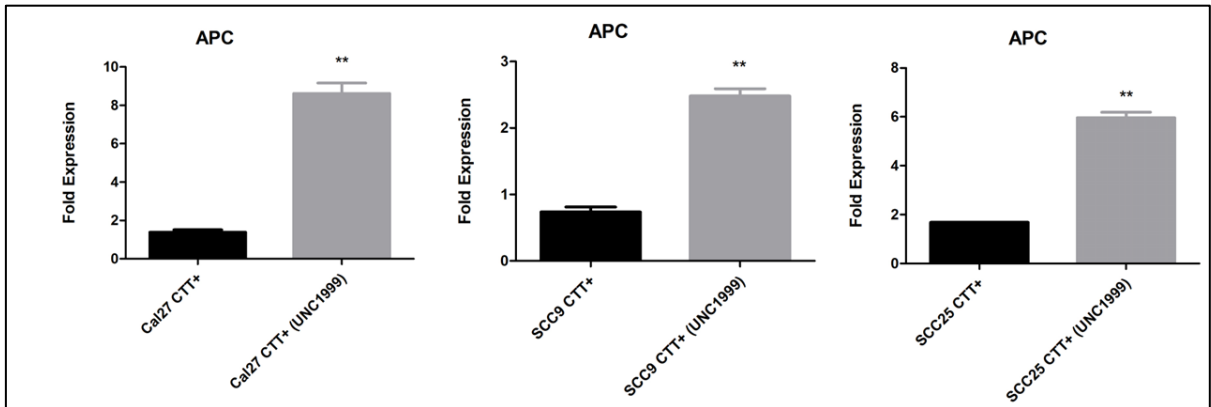
Para os genes *downstream* (Figura 20), *MMP7* foi diminuído de maneira acentuada em todos os tratamentos propostos (ICG-001, FH535 e UNC1999) ($p < 0,01$), quando comparados ao controle, nas populações CTT+ das linhagens Cal27 e SCC9. Para a linhagem SCC25, os tratamentos com ICG-001 ($p < 0,001$), FH535 ($p < 0,001$) e UNC1999 ($p < 0,05$) também demonstraram grande eficácia na diminuição da expressão de *MMP7*.

O gene *FGF18* demonstrou um aumento quando as CTT+ foram tratadas com ICG-001 ($p < 0,05$), FH535 e UNC1999, para a linhagem Cal27. Na linhagem SCC9, *FGF18* também foi aumentado após tratamentos com ICG-001 ($p < 0,05$), FH535 ($p < 0,05$), e UNC1999 ($p < 0,01$) para a população CTT+. O aumento da expressão de *FGF18* se manteve para a população CTT+ da linhagem SCC25, tratadas com ICG-001 ($p < 0,05$), FH535 ($p < 0,05$) e UNC1999.

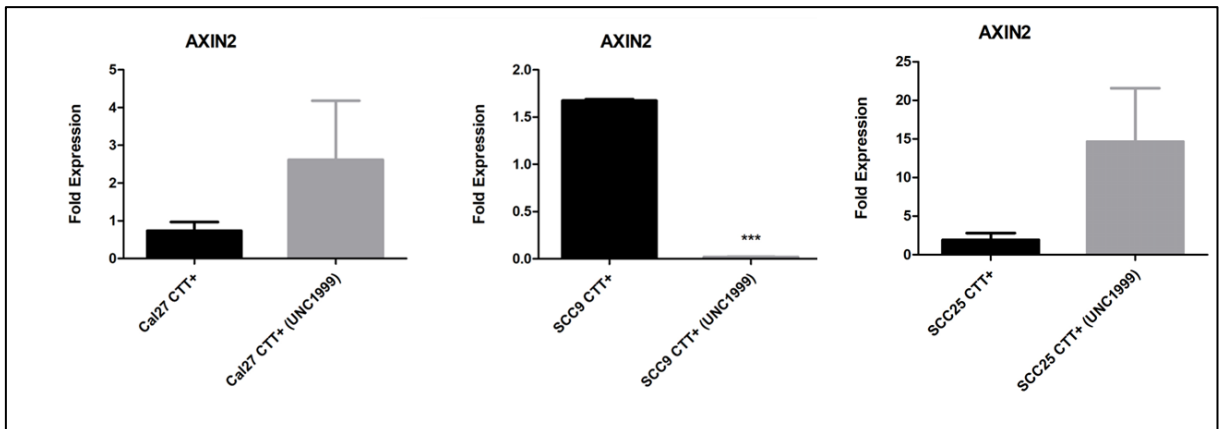
O gene *LEF1* apresentou expressão aumentada para a Cal27 ($p < 0,05$), SCC9 ($p < 0,01$) e SCC25 ($p < 0,05$) tratadas com FH535 na população CTT+.

Figura 19 – Análise da expressão de genes *upstream* da via de Wnt/ β -catenina nas linhagens Cal27, SCC9 e SCC25 tratadas com UNC1999. A. Expressão gênica de APC. B. Expressão gênica de AXIN2 C. Expressão gênica de GSK3 β

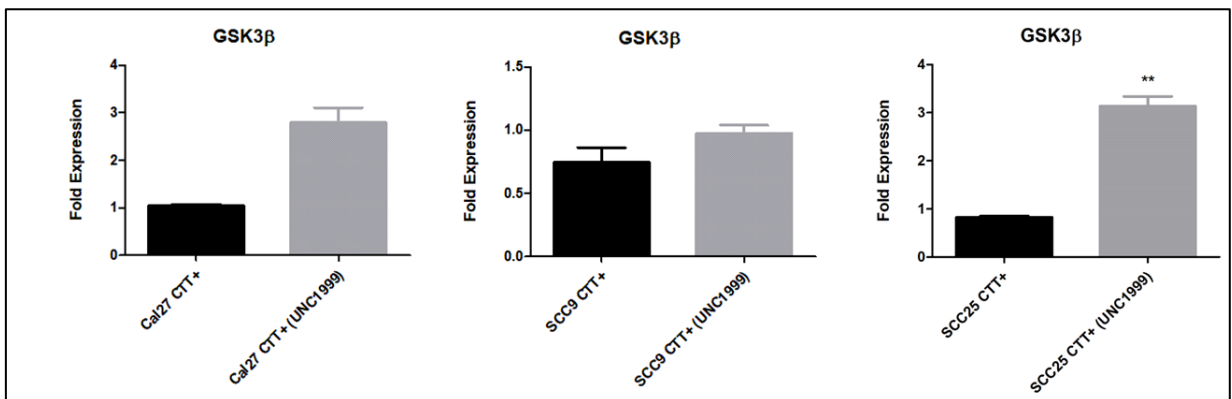
A.



B.



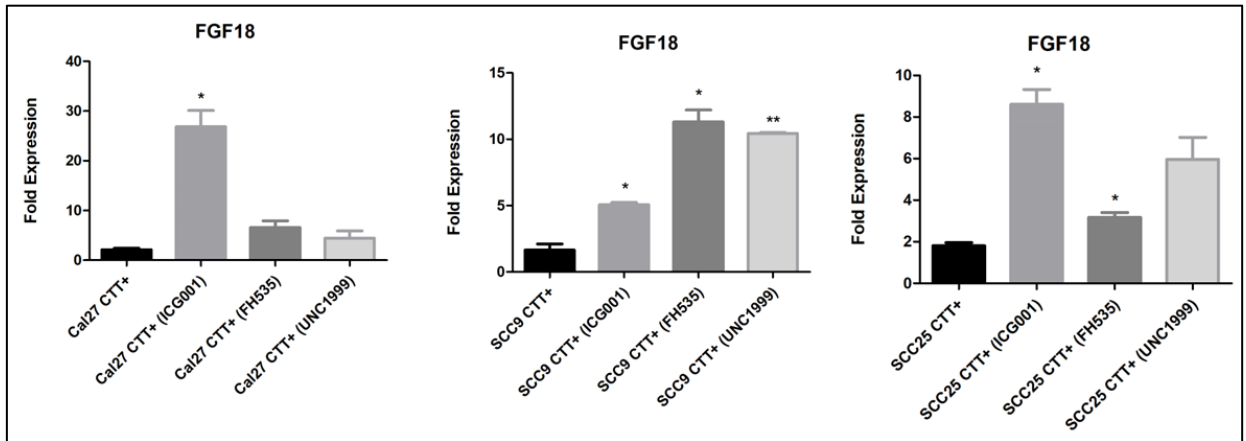
C.



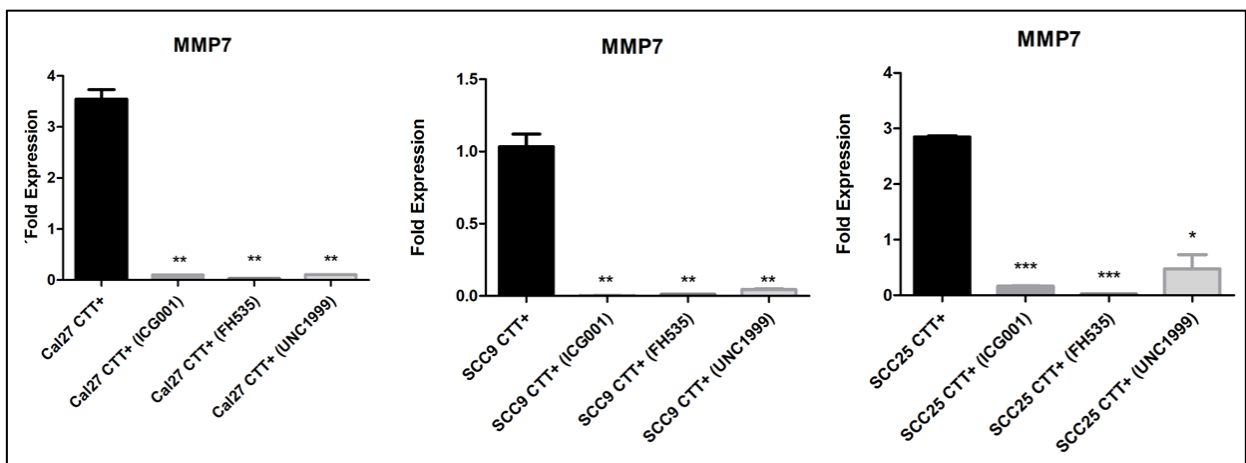
Fonte: Autor

Figura 20 – Análise da expressão de genes *downstream* da via de Wnt/ β -catenina nas linhagens Cal27, SCC9 e SCC25 tratadas com ICG-001, FH535 e UNC1999. A. Expressão gênica de FGF18. B. Expressão gênica de MMP7 C. Expressão gênica de LEF1

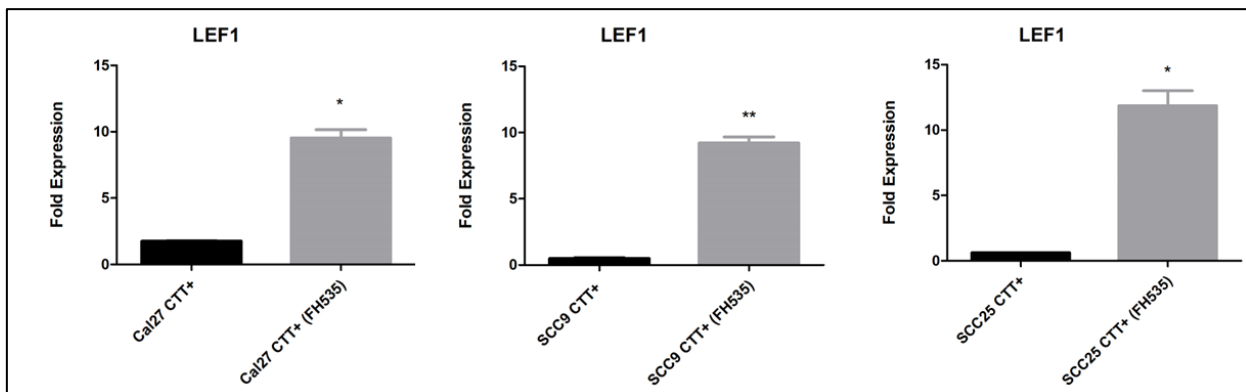
A.



B.



C.



Fonte: Autor

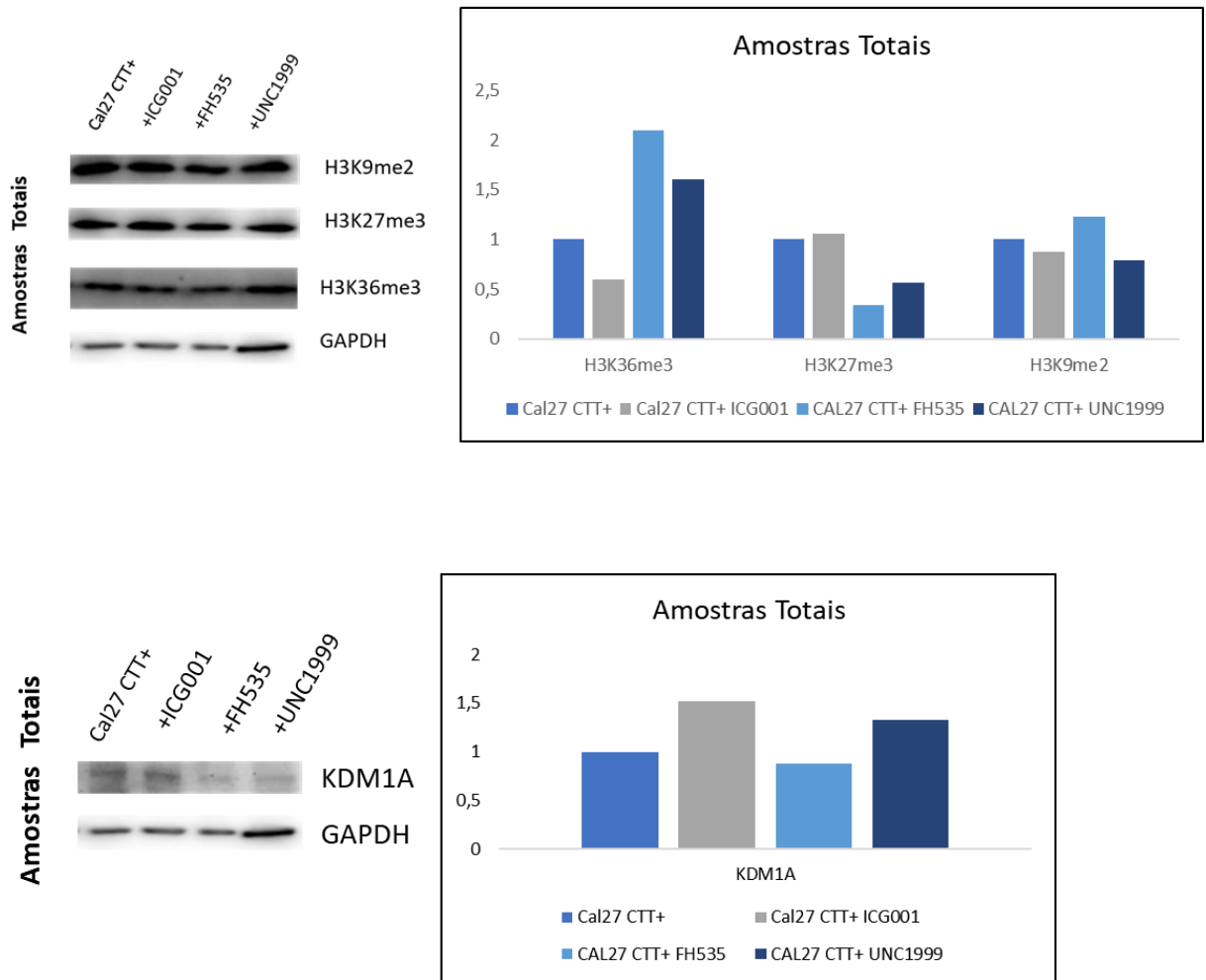
Para investigarmos se a inibição farmacológica de β -catenina e EZH2 poderia influenciar a regulação epigenética da metilação de histonas, as proteínas H3K9me2, H3K27me3, H3K36me3 e KDM1A também foram avaliadas. Para a linhagem Cal27 CisR, houve uma diminuição de H3K9me2 quando as CTT+ foram tratadas com ICG-001 e UNC1999, em contrapartida, o tratamento com FH535 aumentou a histona H3K9me2. Para a H3K27me3, uma diminuição acentuada foi observada quando houve tratamento com FH535 e UNC1999, enquanto o tratamento com ICG-001 demonstrou um pequeno aumento de H3K27me3. Os níveis de H3K36me3 foram diminuídos quando as CTT+ foram tratadas com ICG-001, já os tratamentos com FH535 e UNC1999 promoveram o aumento de H3K36me3. A proteína KDM1A foi diminuída apenas com FH535, apresentando um aumento após os tratamentos com ICG-001 e UNC1999 (Figura 21A).

Para a linhagem SCC9 (Figura 21B), avaliando as proteínas H3K9me2 e H3K27me3, foi observado um aumento dessas histonas metiladas quando houve tratamento com ICG-001, FH535 e UNC1999. Para H3K36me3, houve a diminuição após o tratamento com UNC1999, enquanto os tratamentos com ICG-001 e FH535 levaram a um aumento da proteína. Também observamos que o tratamento com ICG-001, FH535 e principalmente com UNC1999 levaram a um aumento de KDM1A.

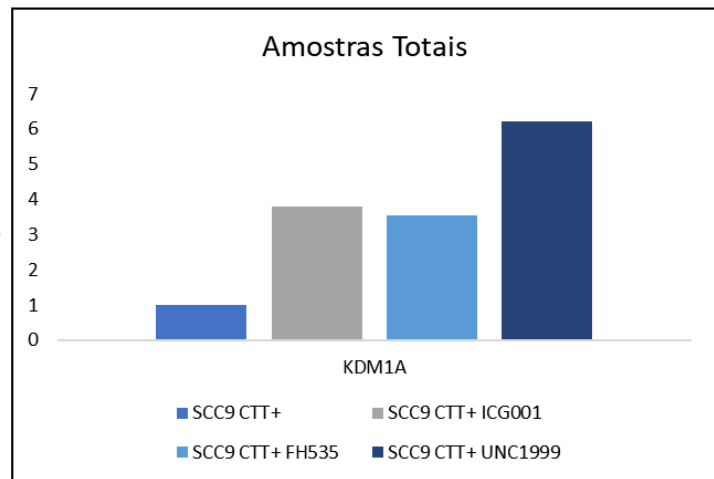
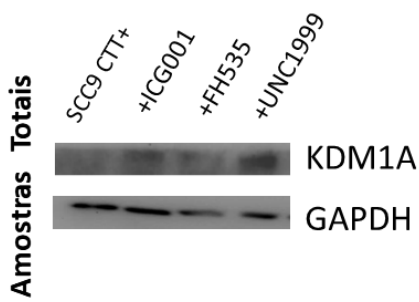
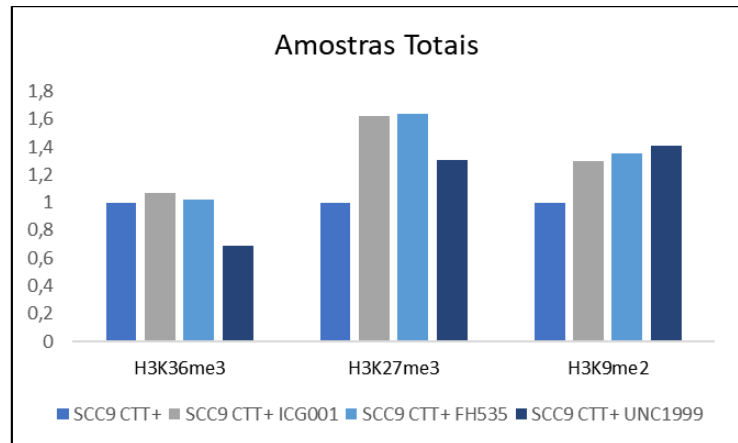
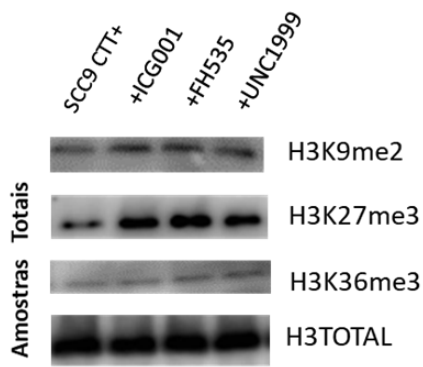
Para a linhagem SCC25 (Figura 21C), foi observado um aumento da histona H3K9me2 quando a população CTT+ foi tratada com ICG-001, FH535 e principalmente com UNC1999. Para a H3K27me3, não houve diferenças após o tratamento com ICG-001, porém os tratamentos com FH535 e UNC1999 diminuíram os níveis de H3K27me3. Já para H3K36me3, uma diminuição da proteína foi observada após o tratamento com ICG-001, enquanto os tratamentos com FH535 e UNC1999 levaram a um aumento da proteína quando comparadas com a população CTT+ sem tratamento. Foi observado também um aumento de KDM1A quando as CTT+ foram tratadas com ICG-001 e UNC1999, enquanto o tratamento com FH535 demonstrou diminuição dos níveis de KDM1A.

Figura 21 – Análise da expressão proteica para Cal27 CisR, SCC9 CisR e SCC25 CisR com inibidores. A. Expressão de H3K9me2, H3K27me3, H3K36me3 e KDM1A para a linhagem Cal27 CisR. B. Expressão de H3K9me2, H3K27me3, H3K36me3 e KDM1A para a linhagem SCC9 CisR. C. Expressão de H3K9me2, H3K27me3, H3K36me3 e KDM1A para a linhagem SCC25 CisR

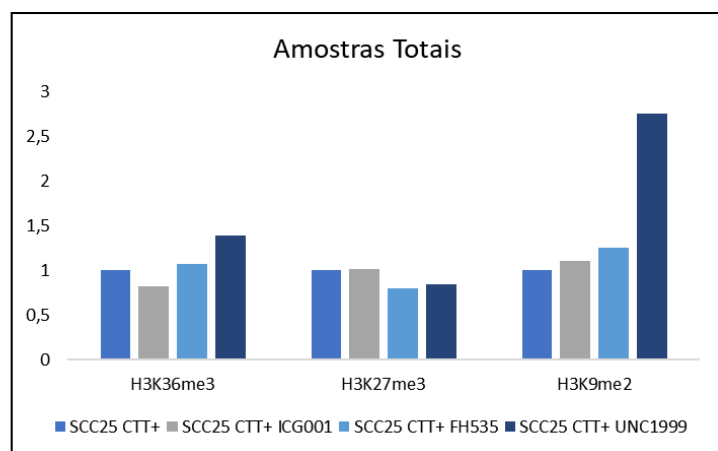
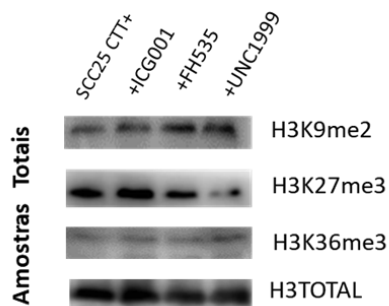
A.

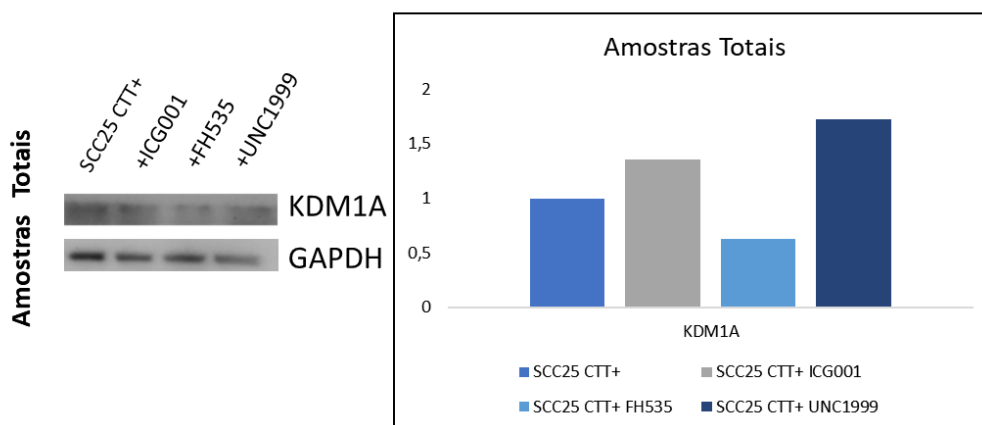


B.



C.





Fonte: Autor

4.7 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DOS INIBIDORES SOBRE A REDUÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS

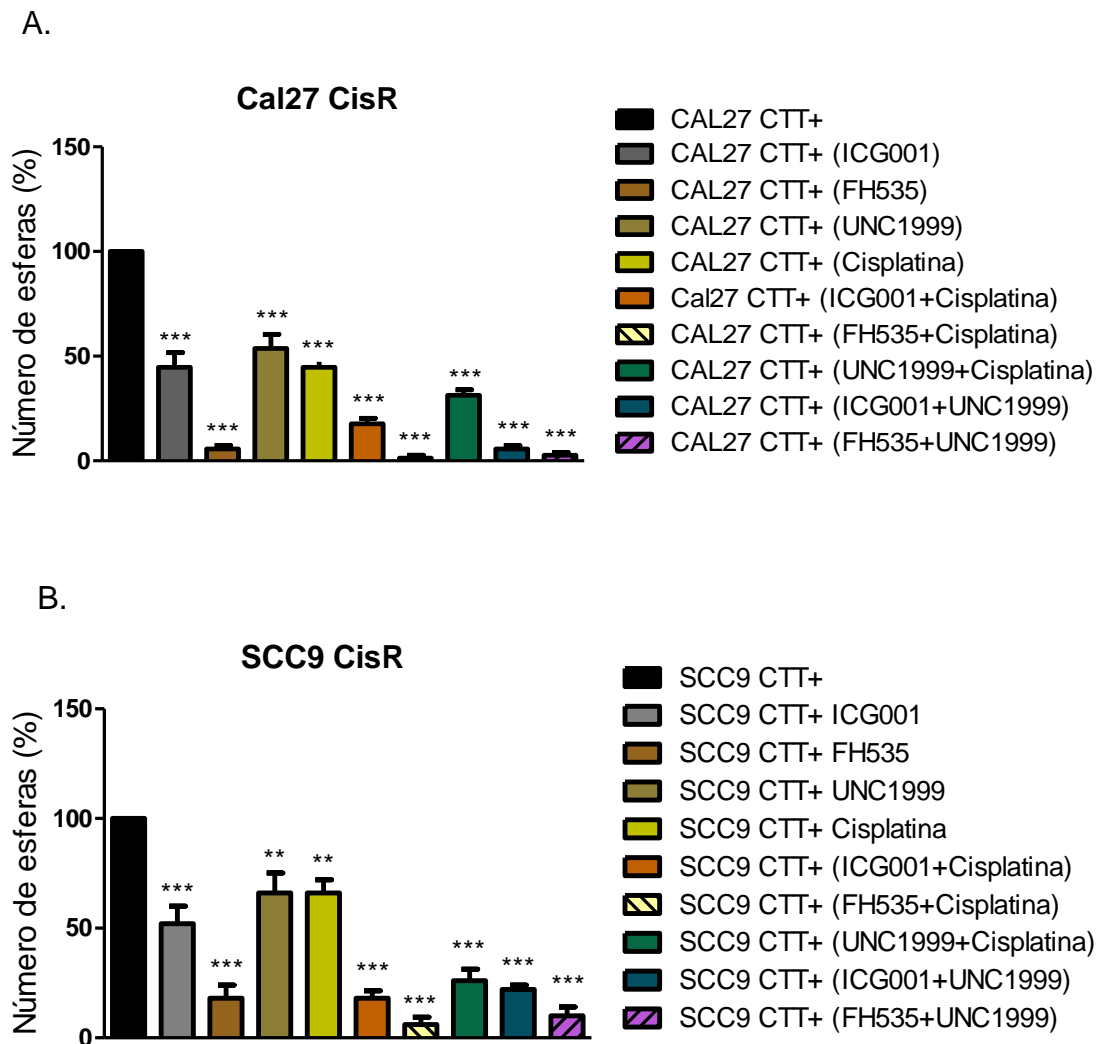
Para verificarmos a eficácia de uma potencial terapia combinada em reduzir a população de células-tronco tumorais quimiorresistentes, nós realizamos o ensaio de formação de esferas avaliando o tratamento em monoterapia com ICG-001, FH535 e UNC1999 e em combinações com cisplatina, além do tratamento combinado de UNC1999+FH535. As células-tronco tumorais (CTT) têm a capacidade de crescerem em placas de baixa adesão, formando esferas tridimensionais multicelulares, um método muito utilizado para a identificação de CTT e também para a avaliação do uso potencial de várias drogas (BAHMAD et al., 2018).

Avaliando a linhagem Cal27, todas as condições, quando comparadas com a controle (Cal27 CTT+) foram eficientes para reduzir as células-tronco ($p < 0,001$). Porém, os melhores resultados se deram com a administração do inibidor FH535 como monoterapia, com os tratamentos combinados ICG-001+UNC1999 e FH535+UNC1999, mas principalmente quando FH535 foi administrado em combinação com a cisplatina (Figura 22A).

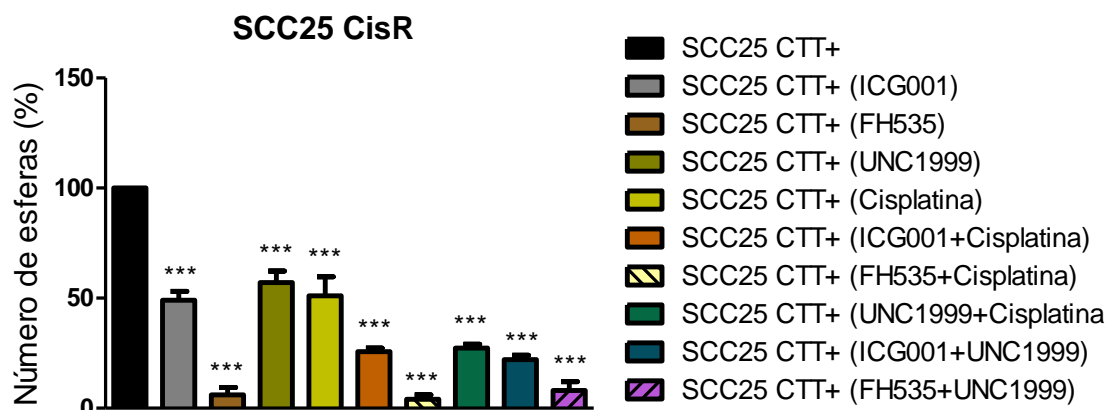
Na figura 22B, foi observado que, para a linhagem SCC9 CisR, todas as condições foram eficazes para diminuir a população de células-tronco. No entanto, os tratamentos com UNC1999 e cisplatina isoladamente foram capazes de reduzir as células-tronco moderadamente ($p < 0,01$), enquanto todas as outras condições foram

bastante eficientes para diminuir as células-tronco ($p < 0,001$). Os melhores resultados foram observados com os tratamentos combinados envolvendo FH535+cisplatina e FH535+UNC1999 ($p < 0,001$). Avaliando a linhagem SCC25, todos os tratamentos apresentaram grande eficácia na redução das células-tronco ($p < 0,001$), apresentando as melhores condições para a administração apenas de FH535, e as combinações entre FH535+cisplatina e FH535+UNC1999 (Figura 22C).

Figura 22 – Tratamento combinado para as populações CTT+ através do ensaio de formação de esferas. A. Ensaio para a linhagem Cal27 CisR. B. Ensaio para a linhagem SCC9 CisR. C. Ensaio para a linhagem SCC25 CisR



C.



Fonte: Autor

O potencial tronco (*stemness*) das células-tronco tumorais de carcinoma oral pode ser quantificado pela presença de ALDH e CD44. A expressão aumentada de ALDH é conhecida por estar relacionada com tumores em estágios e tamanhos avançados, enquanto a presença da glicoproteína de superfície CD44, é um marcador de células-tronco em vários tipos de tumores (JAKOB et al., 2021). Dessa forma, para avaliar os efeitos dos inibidores ICG-001, FH535 e UNC1999, com ou sem combinação de cisplatina no fenótipo das CTT+, nós realizamos o ensaio de citometria de fluxo utilizando os marcadores ALDH e CD44. Os tratamentos foram realizados nas mesmas concentrações usadas para o ensaio de esferas, por um período de 16 horas.

Na figura 23A, nós observamos que para a linhagem Cal27, o tratamento com cisplatina aumentou significativamente ($p < 0,001$) a população de ALDH^{High}/CD44^{High}. O tratamento com ICG-001 apresentou um efeito sutil na diminuição da população ALDH^{High}/CD44^{High}, enquanto o tratamento com FH535 apresentou uma diminuição acentuada de células ALDH^{High}/CD44^{High} ($p < 0,001$). Também houve diminuição de células ALDH^{High}/CD44^{High} após o tratamento com UNC1999 ($p < 0,05$).

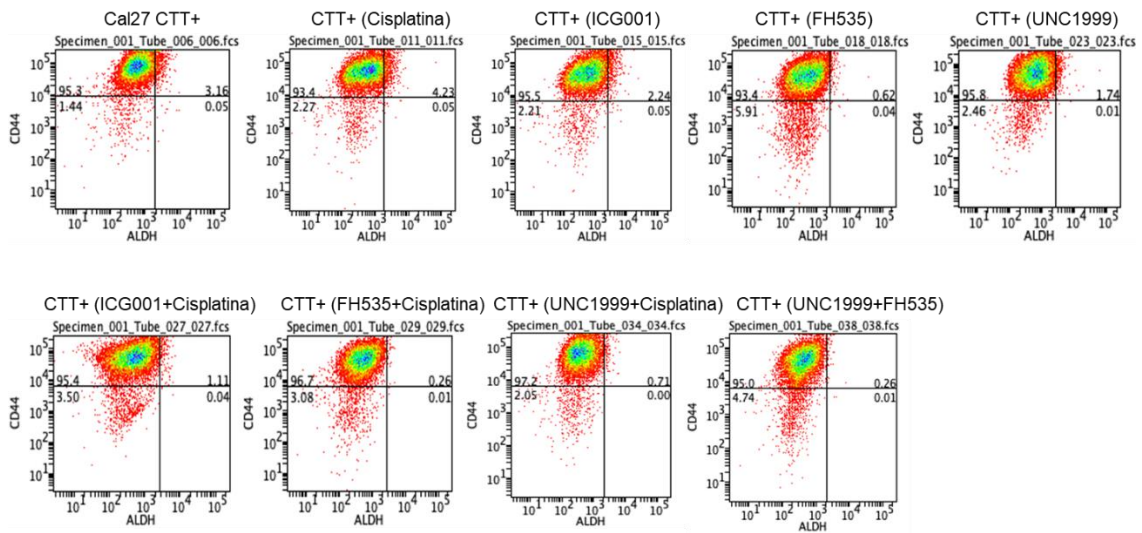
Quando as CTT+ foram tratadas com os inibidores em combinação com a cisplatina, todas as condições diminuíram de forma acentuada a população de células ALDH^{High}/CD44^{High} ($p < 0,001$). O tratamento combinado de UNC1999+FH535 também demonstrou grande eficácia para a diminuição de células ALDH^{High}/CD44^{High} ($p < 0,001$). Porém, os melhores resultados se deram com a administração de FH535 em monoterapia, e as combinações envolvendo FH535+cisplatina e UNC1999+FH535.

Avaliando a linhagem SCC9 (Figura 23B), nós observamos que o tratamento com cisplatina diminuiu a população de células ALDH^{High}/CD44^{High} ($p < 0,001$). Os tratamentos em monoterapia com ICG-001 e UNC1999 apresentaram um efeito sutil na diminuição da população ALDH^{High}/CD44^{High} quando comparadas ao controle, enquanto o tratamento com FH535 foi eficaz na diminuição da população de ALDH^{High}/CD44^{High} ($p < 0,001$). Quando as células foram tratadas com ICG-001+cisplatina, houve um aumento de ALDH^{High}/CD44^{High} ($p < 0,001$), e o tratamento associando FH535+cisplatina, diminuiu a população ($p < 0,05$). O tratamento com UNC1999+cisplatina ($p < 0,001$) e UNC1999+FH535 ($p < 0,001$), foram eficientes na diminuição da expressão de ALDH^{High}/CD44^{High}. Os melhores tratamentos se deram com a monoterapia de FH535 e as combinações envolvendo UNC1999+cisplatina e UNC1999+FH535.

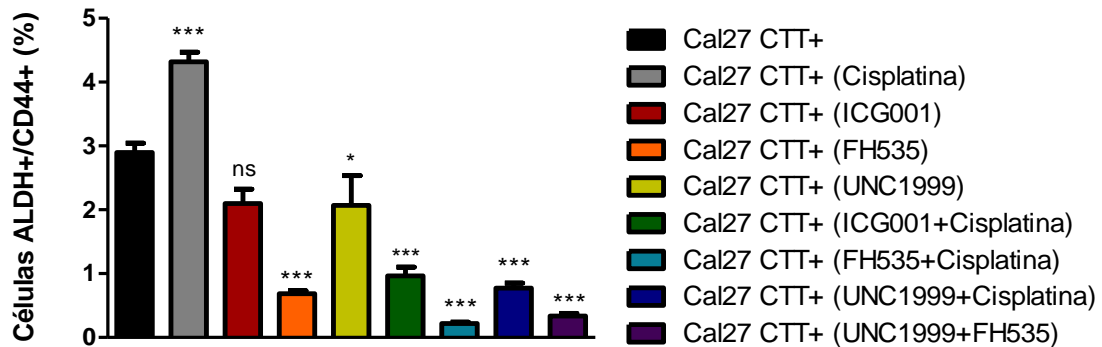
Para a linhagem SCC25 (Figura 23C) o tratamento com cisplatina e UNC1999 em monoterapia apresentaram um efeito sutil na diminuição da população ALDH^{High}/CD44^{High}. Os tratamentos com ICG-001 e FH535 em monoterapia levaram a um aumento de ALDH^{High}/CD44^{High} ($p < 0,001$), enquanto os tratamentos combinados envolvendo ICG-001+cisplatina ($p < 0,001$), FH535+cisplatina ($p < 0,001$) e UNC1999+cisplatina ($p < 0,001$) demonstraram eficácia na diminuição da população de ALDH^{High}/CD44^{High}. O tratamento combinado com UNC1999+FH535 demonstrou um aumento de ALDH^{High}/CD44^{High} ($p < 0,05$). Os melhores resultados se deram com as combinações de ICG-001+cisplatina, FH535+cisplatina e UNC1999+cisplatina.

Figura 23 – Análise da população de células tronco tumorais através da marcação de ALDH+/CD44+ pelo ensaio de citometria de fluxo. A. Análise para linhagem Cal27 CTT+. B. Análise para linhagem SCC9 CTT+. C. Análise para linhagem SCC25 CTT+

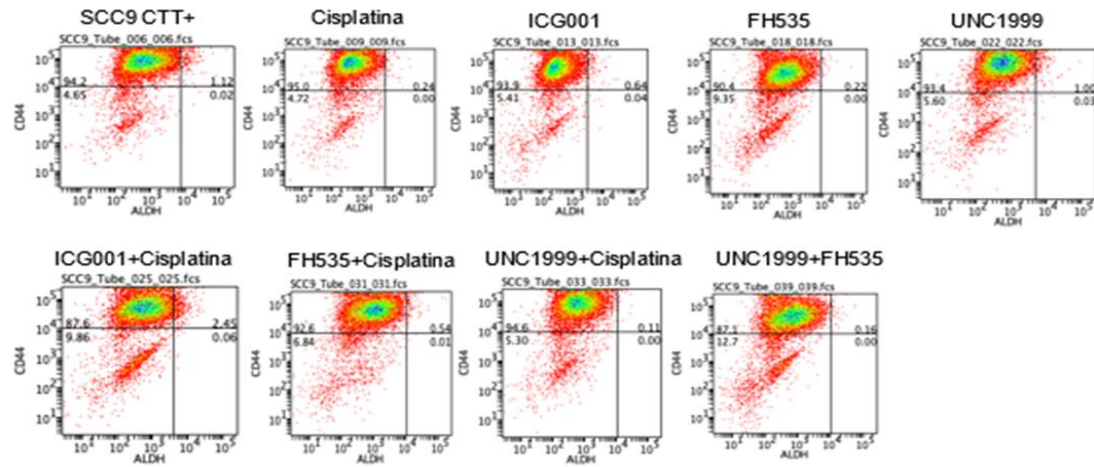
A.



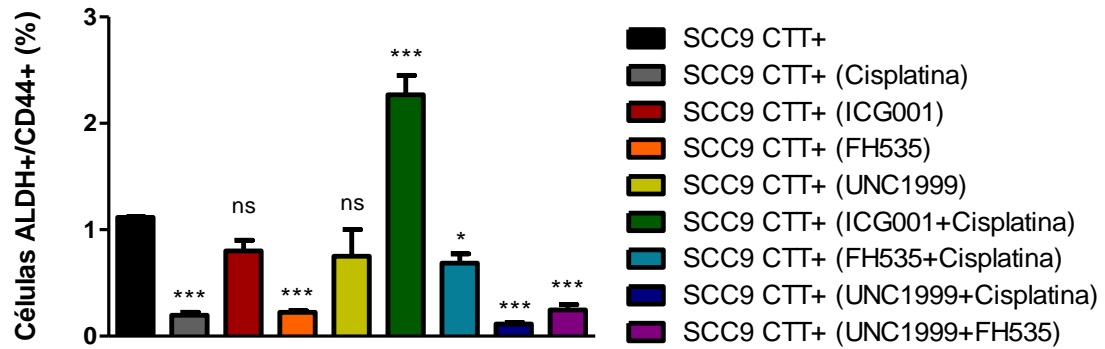
Cal27 CisR



B.

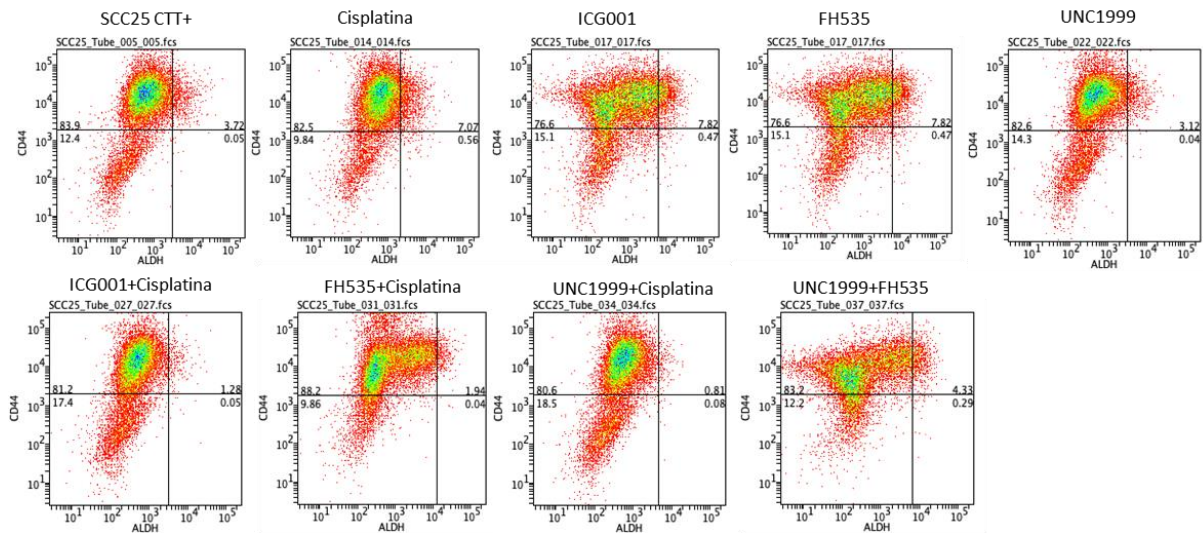


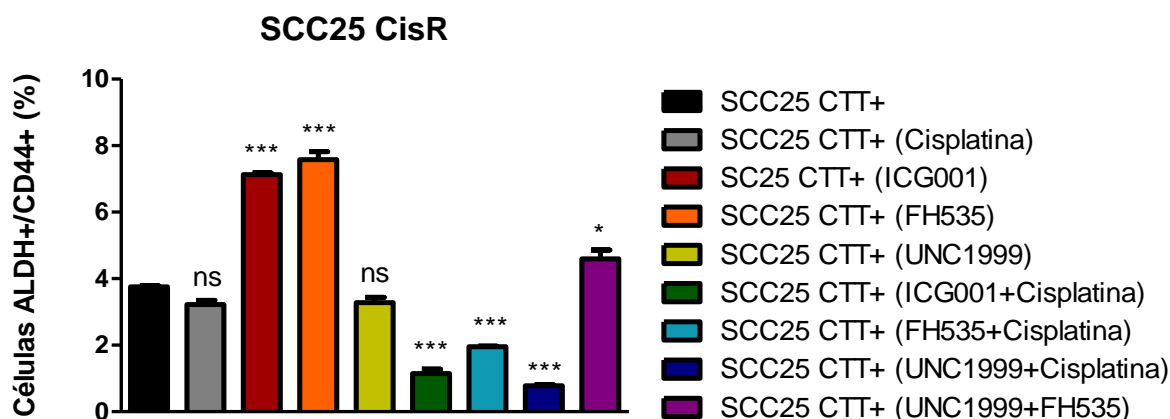
SCC9 CisR



Fonte: Autor

C.





Fonte: Autor

4.8 ADMINISTRAÇÃO DE MONOTERAPIA E TERAPIA COMBINADA DOS INIBIDORES FARMACOLÓGICOS FH535, UNC1999 E O QUIMIOTERÁPICO CISPLATINA EM MODELO *IN VIVO* DE XENOENXERTO

Para comprovar os nossos resultados obtidos *in vitro*, nós avaliamos a eficácia da inibição de β -catenina e EZH2 em um ensaio envolvendo o modelo animal de xenoenxerto tumoral, podendo dessa forma, analisar com maior aprimoramento o processo de tumorigênese (LEE et al., 2018).

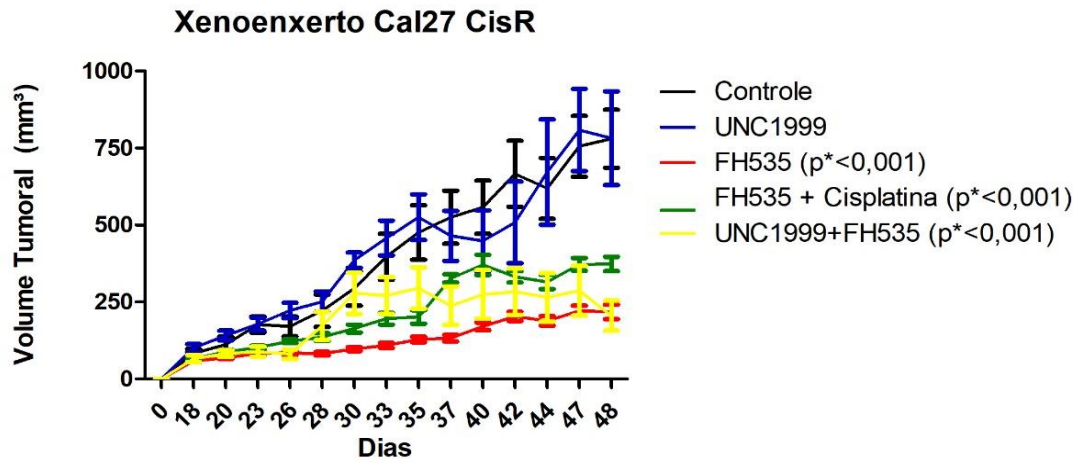
Através do acompanhamento do crescimento tumoral, foi observado que os melhores tratamentos para a diminuição do volume do tumor se deram com a administração do inibidor FH535 em monoterapia e a combinação de UNC1999+FH535 ($p < 0,001$). O tratamento com FH535+cisplatina também diminuiu o volume tumoral de maneira significativa ($p < 0,001$). Enquanto o tratamento com UNC1999 não demonstrou diferenças significativas quando comparado ao grupo controle (Figura 24A,C).

Avaliando o peso dos tumores, o grupo tratado com UNC1999 obteve um valor maior que o grupo controle. Os tratamentos com FH535; FH535+cisplatina e UNC1999+cisplatina demonstraram menor peso tumoral quando comparados ao controle, sendo que os grupos com FH535 e UNC1999+FH535 demonstraram uma diminuição mais acentuada ($p < 0,001$) (Figura 24B).

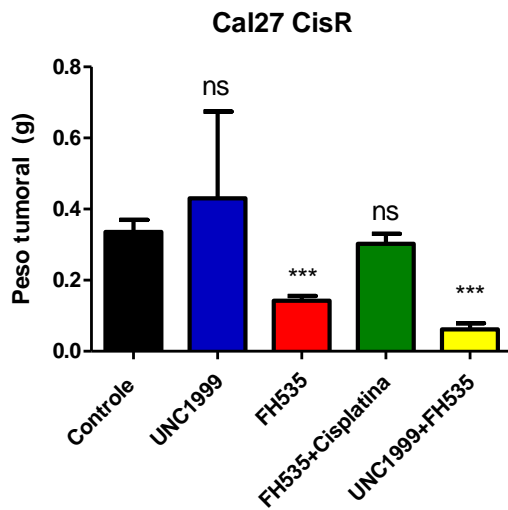
Figura 24 - Ensaio *In vivo* com a linhagem Cal27 CisR para avaliação de uma terapia combinada. A. Gráfico do volume tumoral. B. Gráfico do peso tumoral.

C. Imagem dos tumores

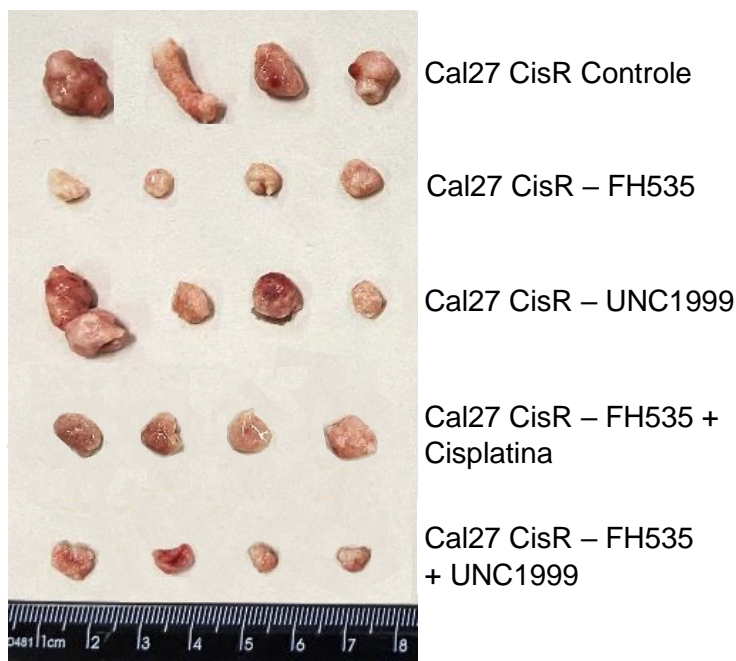
A.



B.



C.



Fonte: Autor

Para a análise histopatológica, o tecido tumoral foi corado com hematoxilina e eosina (H.E), e foram realizadas análises de imuno-histoquímica para identificar as proteínas β -catenina, EZH2, H3K27me3, KDM6B, uma histona demetilase que promove a remoção do grupo tri-metil da lisina H3K27, e está envolvida em muitos processos como o câncer (CAO et al., 2021), além de OCT4 e SOX2, que são fatores transcricionais envolvidos na manutenção da pluripotência e auto-renovação de células-tronco tumorais (KIM et al., 2015).

Analisando o tecido tumoral corado com H.E (Figura 25A), foram observadas células epiteliais em proliferação neoplásica. O grupo controle (sem tratamento) apresentou características de maior malignidade, pela presença de células maiores, com morfologia mesenquimal e perda de diferenciação celular, elevado número de mitoses atípicas presentes no tecido, além da presença de displasias com disqueratose e núcleo hiper cromático. Enquanto os tumores tratados apresentaram células com maior grau diferenciação, em que se observa células com morfologia semelhantes à queratinócitos, com núcleo picnótico, e menor número de mitoses atípicas, além de apresentarem displasias discretas.

Analisando a Figura 25B e E, foi observado que no tecido tumoral controle, β -catenina estava presente no núcleo, e quando houve tratamento com UNC1999 e FH535+cisplatina, esses, foram eficazes na diminuição de β -catenina nuclear. Os tratamentos com FH535 em monoterapia e a combinação de UNC1999+FH535 diminuíram sutilmente a presença de β -catenina nuclear, não apresentando diferenças.

Avaliando EZH2 (Figura 25B) no tecido tumoral controle, foi observado marcação nuclear e citoplasmática, enquanto o tratamento com UNC1999, demonstrou eficácia na diminuição da marcação de EZH2, tanto nuclear quanto citoplasmática. O tratamento com FH535 não demonstrou diferenças aparentes, apresentando marcação nuclear e citoplasmática. Os tratamentos combinados com FH535+cisplatina e UNC1999+FH535 demonstraram diminuição da marcação nuclear e citoplasmática de EZH2.

Na Figura 25C, a histona H3K27me3 foi avaliada. A sua presença no tecido tumoral controle foi marcada no núcleo, com grande acúmulo. Quando houve tratamento com UNC1999 a marcação nuclear de H3K27me3 foi bastante diminuída. O tratamento com FH535, FH535+cisplatina e UNC1999+FH535 também foram eficazes na diminuição da marcação nuclear.

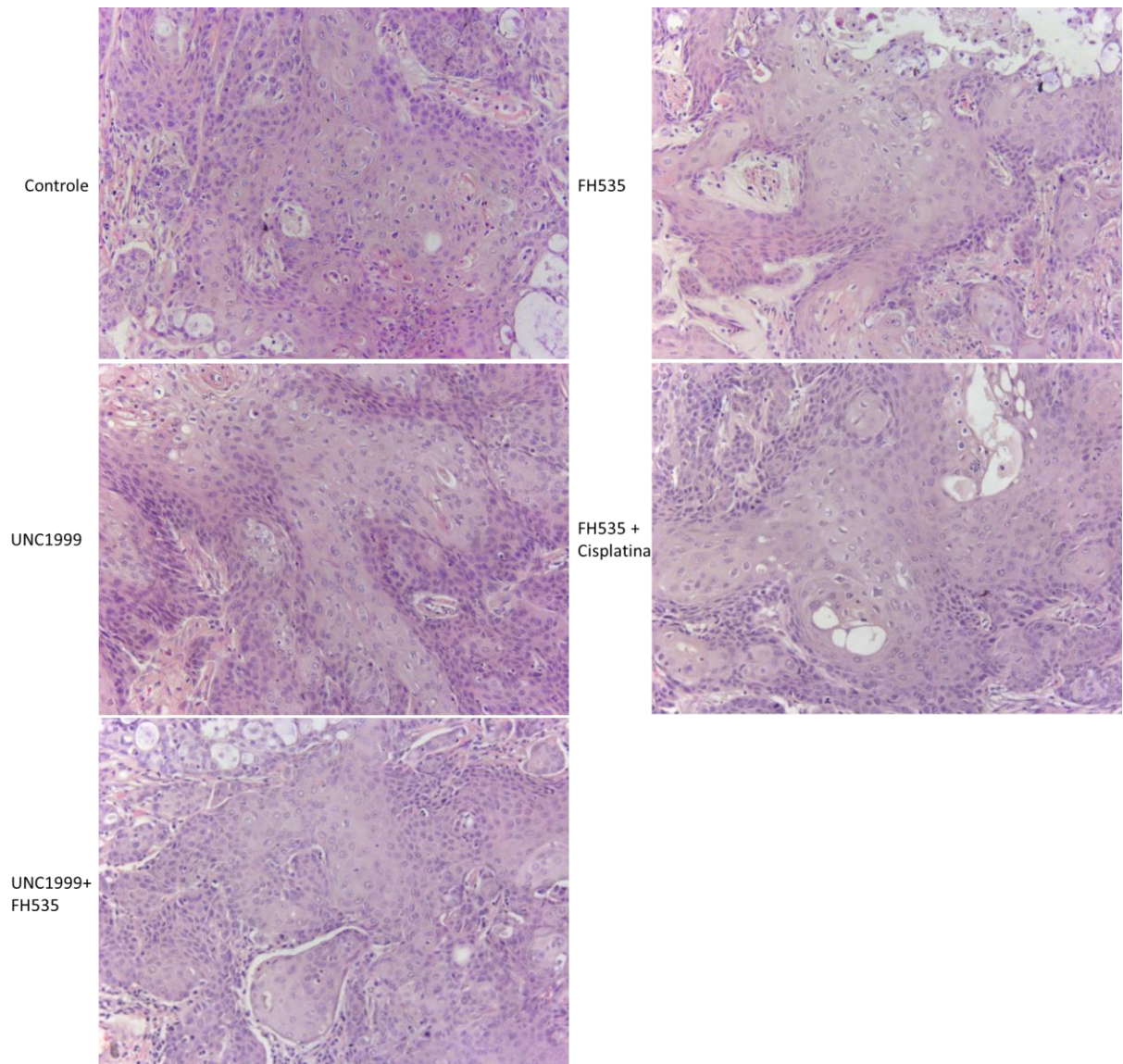
Em relação à proteínas KDM6B (Figura 25C), o tecido tumoral controle apresentou KDM6B no citoplasma e no núcleo. O tratamento com UNC1999, FH535+cisplatina e UNC1999+Cisplatina demonstraram diminuição da marcação citoplasmática e nuclear. Já o tratamento com FH535 levou à um aumento da marcação de KDM6B.

Para avaliar o acúmulo das células-tronco tumorais nós analisamos as proteínas OCT4 e SOX2 (Figura 25D). Em relação a OCT4, o tecido tumoral controle apresentou uma marcação em algumas regiões pontuais do tumor, sugerindo a distribuição das células-tronco tumorais em nichos. Porém os tratamentos com UNC1999, FH535+cisplatina e UNC1999+FH535 apresentaram redução de OCT4. Tumores tratados com UNC1999 e FH535+cisplatina foram negativos para OCT4. No entanto, o tratamento com FH535 como monoterapia não demonstrou diferenças.

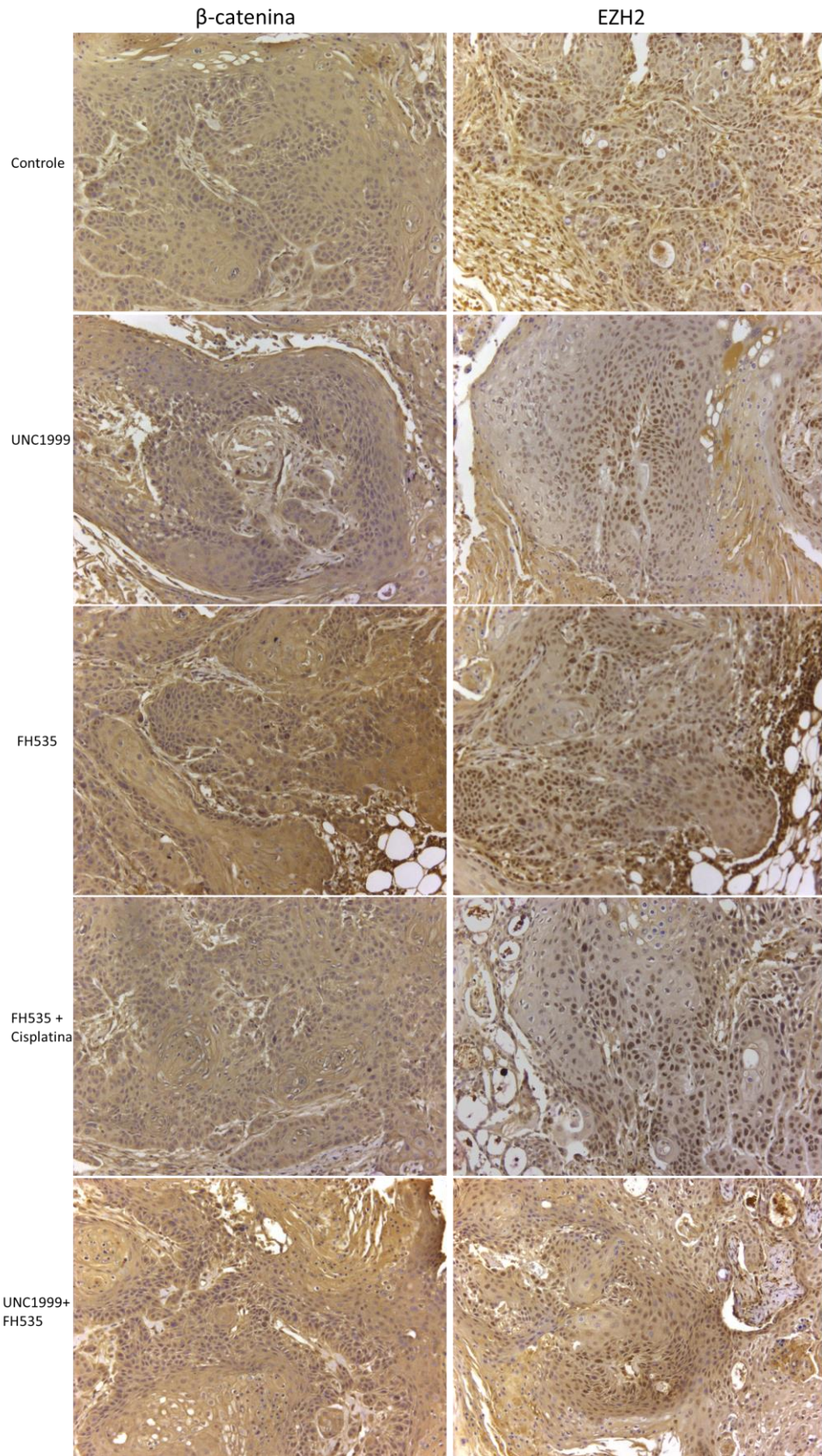
Avaliando SOX2 (Figura 25D), foi observado uma grande marcação nuclear para o tecido tumoral controle. Interessantemente, todos os tratamentos foram eficazes na diminuição da marcação de SOX2, e o tratamento com UNC1999+FH535 foi o mais eficaz.

Figura 25 – Análise dos tecidos tumorais retirados dos camundongos Nude Balbc tratados com UNC1999, FH535, FH535+Cisplatina e UNC1999+FH535. A. Análise dos tecidos tumorais com H.E. B. Análise dos tecidos tumorais com imunomarcção de β -catenina e EZH2. C. Análise dos tecidos tumorais com imunomarcção de H3K27me3 e KDM6B. D. Análise dos tecidos tumorais com imunomarcção de OCT4 e SOX2. E. Quantificação de β -catenina nuclear

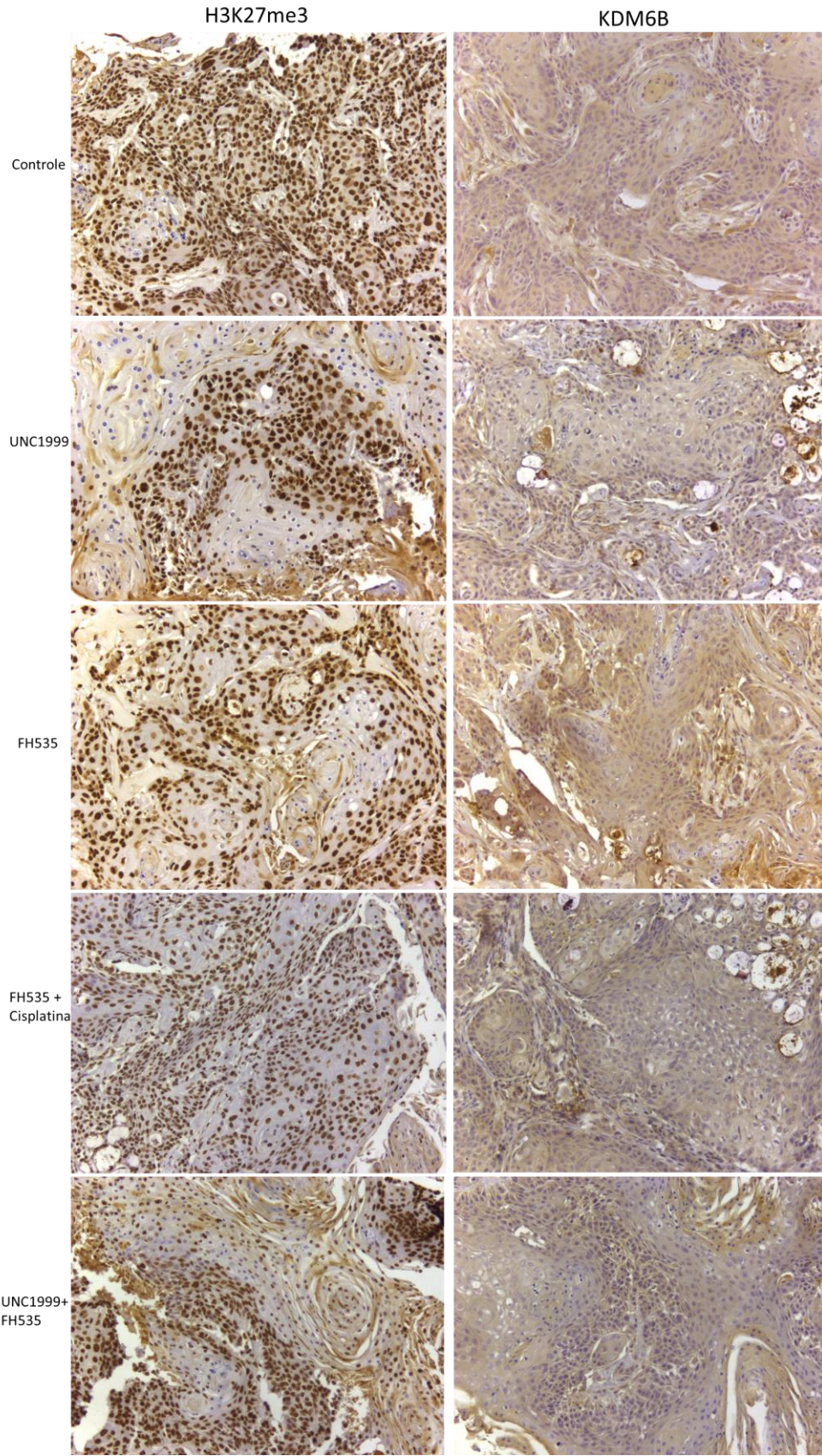
A.



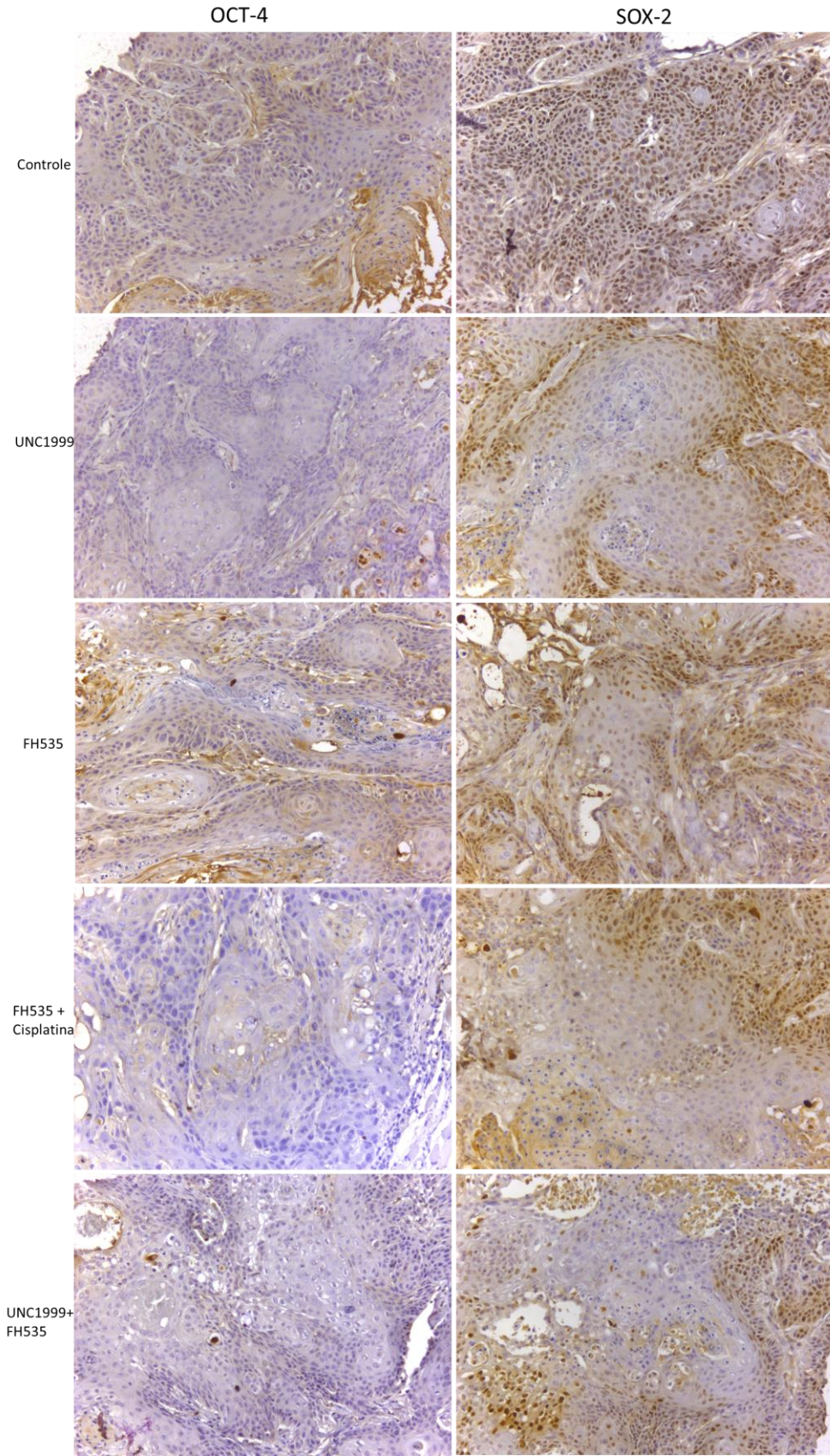
B.



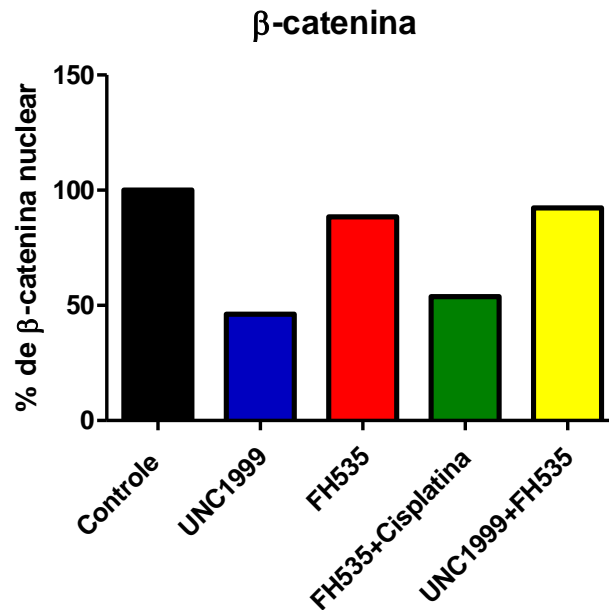
C.



D.



E.



Fonte: Autor

4.9 ANÁLISE DO CONTROLE DIRETO DE EZH2 SOBRE A VIA DE WNT/ β -CATENINA

Uma técnica muito utilizada para estudar interações entre DNA-proteína é a imunoprecipitação da cromatina (ChIP). Muitos processos biológicos e papéis cruciais são relacionados com a interação entre DNA e proteínas, como a transcrição e replicação gênica. Dentro dessas interações de DNA e proteínas, modificações na cromatina e histonas também são encontradas. Como a dinâmica da cromatina e as modificações em histonas são importantes na regulação da transcrição gênica, essa, é a principal técnica de escolha para verificar e identificar modificações de histonas e fatores de transcrição em locais específicos do DNA (RODRÍGUEZ-UBREVA; BALLESTAR, 2014; WIEHLE; BREILING, 2016).

Para verificar se EZH2 e H3K27me3 estão regulando a via de Wnt/ β -catenina, nós realizamos a imunoprecipitação da cromatina com as linhagens Cal27, SCC9 e SCC25 CisR, CisR (CTT-) e CisR (CTT+), imunoprecipitando EZH2 e H3K27me3, e avaliando as regiões promotoras dos genes *upstream* (*APC*, *AXIN2* e *GSK3 β*), e *downstream* (*FGF18*, *MMP7* e *VEGFA*) da via de Wnt/ β -catenina (Figura 26A).

Na Figura 26B nós observamos a imunoprecipitação de EZH2, avaliando as regiões promotoras dos genes *upstream* e *downstream*.

Na linhagem Cal27 CisR, e em suas subpopulações de CTT- e CTT+ foi visto a ligação de EZH2 na região promotora de *APC*, sendo que, a população CTT+ aparentou ter menor ligação. As linhagens SCC9 CisR e SCC9 CTT- também apresentaram presença de EZH2 na região promotora de *APC*, e a população CTT+ também apresentou pouca ligação. Para a linhagem SCC25, as 3 linhagens (CisR, CTT- e CTT+) apresentaram uma forte da ligação de EZH2 na região promotora de *APC*, sugerindo que EZH2 parece estar reprimindo diretamente a expressão de *APC* através da regulação da cromatina na região promotora do gene.

Na linhagem Cal27 CisR e na população CTT+, não houve ligação de EZH2 na região promotora de *AXIN2*, enquanto, o inverso ocorreu na população CTT-, na qual houve aumento da ligação de EZH2 na região promotora de *AXIN2*. A linhagem SCC9 CisR e CTT- apresentaram ligação de EZH2 na região promotora de *AXIN2*, no entanto, não houve ligação na população CTT+. Já na linhagem SCC25, houve presença de EZH2 na região promotora de *AXIN2* na linhagem CisR e nas populações CTT- e CTT+, porém, com diminuição da ligação na população CTT-.

EZH2 apresentou ligação de maneira sutil na região promotora de *GSK3 β* da linhagem Cal27 CisR, e aumento da ligação na população CTT-, enquanto não houve ligação na população CTT+. Na linhagem SCC9 CisR e em sua população CTT+, foi observado a ligação de EZH2 no promotor, e pouca ligação foi observada na população CTT-. Enquanto, a linhagem SCC25 CisR e sua população CTT+, não demonstraram ligação de EZH2, no entanto a população CTT- apresentou aumento da ligação da proteína na região promotora de *GSK3 β* .

Para a região promotora do gene *downstream FGF18*, houve ligação de EZH2 para todas as linhagens, com exceção da população CTT+ da linhagem Cal27 CisR, em que não houve ligação de EZH2 na região promotora de *FGF18*.

Na linhagem Cal27 CisR, não houve ligação de EZH2 na região promotora de *MMP7*, no entanto, houve aumento da ligação de EZH2 na população CTT-, e uma diminuição da ligação na população CTT+ dessa região promotora. Observando a linhagem SCC9 CisR e CTT-, essas, não apresentaram nenhuma ligação de EZH2, enquanto a população CTT+, apresentou uma pequena ligação da proteína. Já para a linhagem SCC25 CisR, e as populações CTT- e +, foi visto a ligação de EZH2 na região promotora de *MMP7*, com aumento da ligação para a população CTT+.

Foi observada ligação de EZH2 na região promotora de *VEGFA* para todas as condições, e as linhagens Cal27 CisR, e as populações CTT- e + da linhagem SCC9 CisR apresentaram diminuição da ligação.

Na figura 26C, nós observamos a imunoprecipitação de H3K27me3, avaliando as regiões promotoras de *APC*, *AXIN2*, *GSK3 β* , *FGF18*, *MMP7* e *VEGFA*.

Na linhagem Cal27 CisR e nas populações CTT- e CTT+, foi observado a ligação de H3K27me3 na região promotora de *APC*, em que a maior proporção se deu para a linhagem CisR. H3K27me3 também se ligou na região promotora de *APC* nas linhagens SCC9 CisR e na população CTT-, no entanto, não houve ligação na população CTT+ da linhagem SCC9 CisR. Nas linhagens SCC25 CisR e CTT+, H3K27me3 estava presente no promotor, porém, não foi observada na população CTT-.

Avaliando a região promotora de *AXIN2*, a linhagem Cal27 CisR e a população CTT+ mostraram a presença de H3K27me3, enquanto na população CTT- não foi observada. A linhagem SCC9 CisR e as populações CTT- e CTT+ apresentaram ligação de H3K27me3 na região promotora de *AXIN2*, e a linhagem SCC25 CisR e sua população CTT+ também apresentaram a ligação de H3K27me3. No entanto a população CTT- não apresentou ligação de H3K27me3 ao promotor de *AXIN2*.

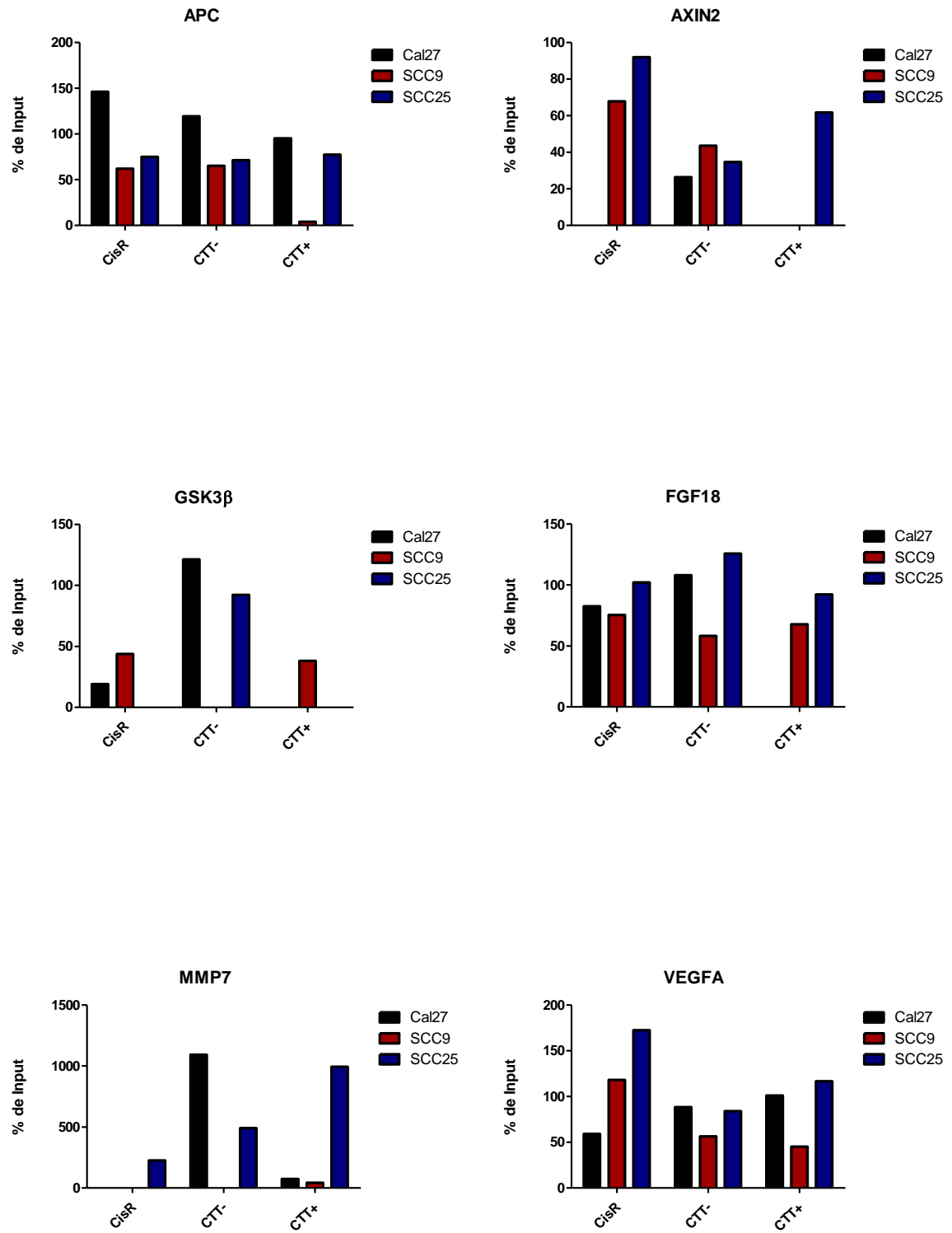
Na região promotora de *GSK3 β* , H3K27me3 estava presente de maneira sutil na população CTT+ da linhagem Cal27 CisR, enquanto não houve ligação na Cal27 CisR e na população CTT-. De maneira semelhante, para a linhagem SCC9 CisR, apenas a população CTT+ apresentou H3K27me3 no promotor de *GSK3 β* , e não foi observado para a CisR e a população CTT-. Enquanto, a linhagem SCC25 CisR apresentou resultados inversos, em que, houve interação na linhagem CisR e CTT-, e não apresentou interação na população CTT+.

Para a região promotora de *FGF18*, houve ligação de H3K27me3 para todas as linhagens, apresentando uma diminuição sutil para as populações CTT- das linhagens Cal27 CisR e SCC9 CisR.

Avaliando a região promotora de *MMP7*, a linhagem Cal27 CisR foi vista com maior interação de H3K27me3, e sua população CTT+ apresentou uma ligação sutil de H3K27me3; enquanto não houve ligação na população CTT-. A linhagem SCC9 CisR também não apresentou ligação de H3K27me3 na região promotora de *MMP7*, já as suas populações CTT- e CTT+ demonstraram ligação de H3K27me3,

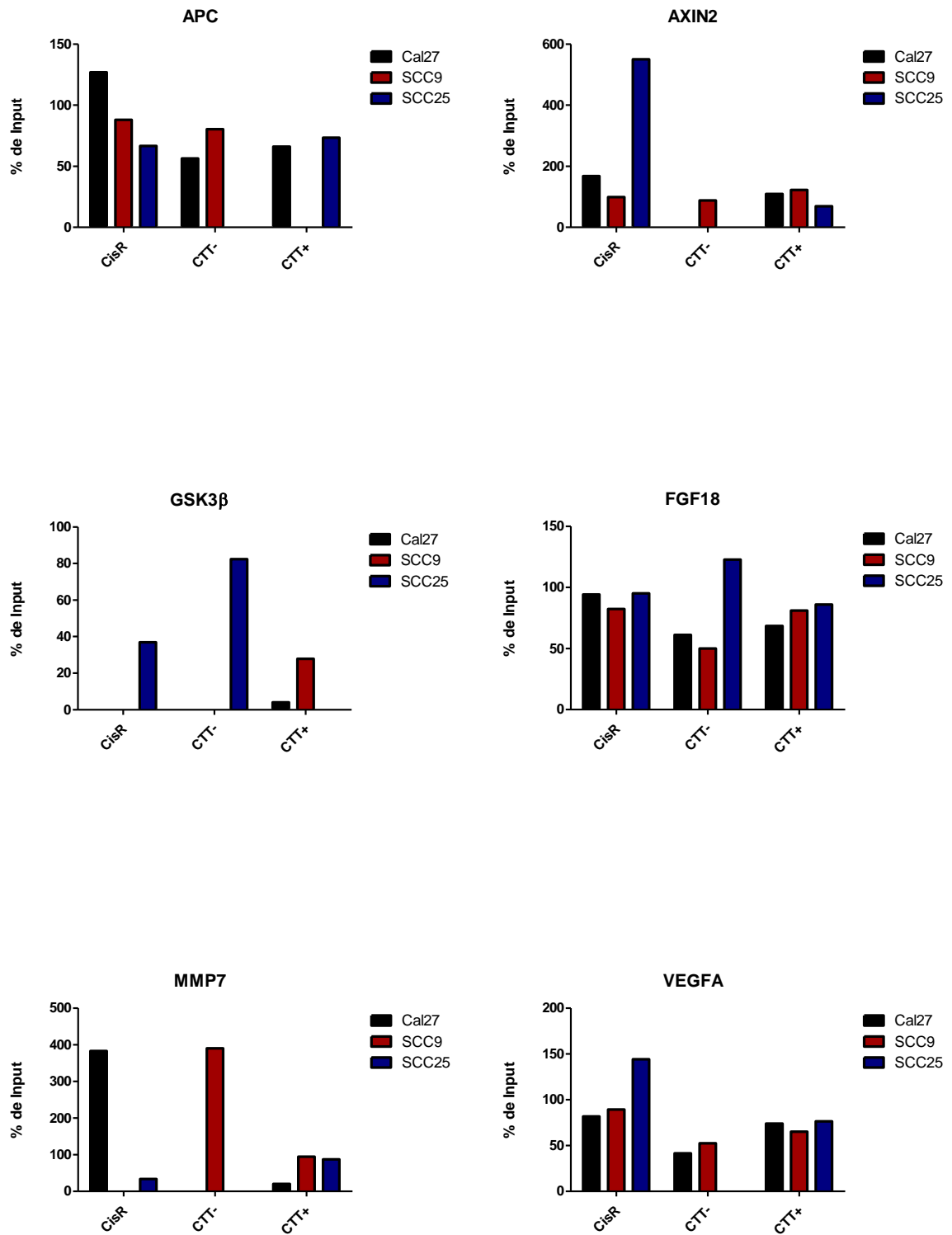
B.

IP: EZH2



C.

IP: H3K27me3



Fonte: Autor

5 DISCUSSÃO

A via de Wnt/ β -catenina está frequentemente ativada no carcinoma oral e em lesões malignas orais (REYES et al., 2020). Estudos recentes demonstraram que a via de Wnt/ β -catenina está envolvida na quimiorresistência do carcinoma colorretal, além de estar relacionada com o acúmulo de células-tronco tumorais (ZHU et al., 2021). Ainda, segundo Li *et al.* (2016), a alta expressão de β -catenina foi associada com a resistência à cisplatina em células de carcinoma espinocelular oral (LI et al., 2016). Em nosso trabalho, análises em larga escala da dinâmica da cromatina e expressão gênica sugerem que a via de Wnt/ β -catenina está mais intensamente ativada nas linhagens celulares resistentes à cisplatina, e a validação desses resultados pela expressão de mRNA de β -catenina (*CTNNB1*) demonstrou seu aumento nas linhagens quimiorresistentes quando comparadas à selvagens. Contudo, outros componentes da via de Wnt/ β -catenina (*LEF1*, *TCF4* e *WNT3A*), apresentaram maior expressão para as linhagens selvagens e isto se deve ao fato de que a via de Wnt/ β -catenina é composta por uma variedade de proteínas Wnt e fatores TCF/LEFs que podem atuar em diferentes tecidos e condições ambientais para regular a expressão de genes específicos (CADIGAN; WATERMAN, 2012).

Por meio da manutenção das células-tronco tumorais, a via de sinalização de Wnt/ β -catenina vêm sendo relacionada com fenótipos agressivos em muitos tipos de cânceres, como o carcinoma oral. Além disso, a localização nuclear de β -catenina e a ativação de fatores de transcrição participam de processos críticos nas células-tronco tumorais. Em células de HNSCC, foram observadas células-tronco tumorais com atividade transcricional de β -catenina aumentada e a inibição de β -catenina diminui a expressão de marcadores de células-tronco tumorais como OCT4 e CD44+ (KARTHA et al., 2018; ROY et al., 2020; SHAHOUMI, 2021; TANAKA et al., 2019; WEND et al., 2013). Nós observamos que os níveis proteicos de β -catenina foram acumulados no núcleo das linhagens resistentes à cisplatina assim como na população de células-tronco tumorais. Estudos relataram que a presença de β -catenina nuclear, a qual marca a ativação da via canônica, não é frequente nas células epiteliais normais. Já nas células cancerosas do epitélio, o nível de β -catenina translocado do citoplasma para o núcleo, é anormalmente acentuado (PALUSZCZAK, 2020b).

As histonas metiltransferases participam de forma crítica na regulação da via de Wnt/ β -catenina, através da ativação da expressão de agonistas ou da inibição da expressão de antagonistas da via. Além disso, a desregulação das histonas metiltransferases no contexto da via de Wnt, vêm sendo relacionada com vários tipos de tumores (BIAN et al., 2020). Em nossas linhagens quimiorresistentes, foi observado um aumento da expressão gênica das histonas metiltransferases *EZH2* e *EHMT2*. A expressão de *EZH2* em células resistentes à terapia foi observada significativamente aumentada quando comparada as células sensíveis em carcinoma de ovário e mieloma múltiplo (YANG et al., 2020). E, *EHMT2* foi observado em alta expressão em pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço que apresentaram resistência à quimioterapia com cisplatina (LIU et al., 2015). A metiltransferase *MLL1* também está intimamente relacionada com a via de Wnt/ β -catenina e estudos demonstraram que um complexo envolvendo *MLL1*/*CBP*/ β -catenina, promove iniciação tumoral e metástase no carcinoma de cabeça e pescoço (QIANG et al., 2016). Aqui, nós observamos um aumento da expressão gênica de *MLL1* para as linhagens quimiorresistentes comparadas às selvagens.

No contexto da via de Wnt/ β -catenina, o complexo de destruição que envolve *APC*, *GSK3 β* e *AXIN*, são considerados *upstream*, pois quando estão ativos, promovem a fosforilação de β -catenina para posterior degradação por proteassoma, impedindo sua translocação para o núcleo, onde age de forma ativa. No entanto, quando os genes *upstream* estão inativos, o que ocorre na presença de ligantes de Wnt, β -catenina não é degradada, sendo possível sua translocação para o núcleo, ativando e regulando genes *downstream* como as *MMPs* e *FGFs* (LIU et al., 2022; SONG et al., 2018b).

Estudos demonstraram que através da ativação da via *Akt*/*GSK3 β* / β -catenina, o fator de crescimento de fibroblastos 18 (*FGF18*) foi capaz de contribuir para a migração e transição epitélio-mesênquima em células de câncer de mama (SONG et al., 2018b). Almendro et al. (2009), mostraram que a expressão de *MMP7*, a qual tem função pró-metastática, foi aumentada em células de câncer colorretal resistentes à oxaliplatina (ALMENDRO et al., 2009). Em nossas análises de expressão de mRNA, foi possível observar uma diminuição dos genes *upstream* *APC* e *GSK3 β* para as 3 linhagens quimiorresistentes analisadas, e um aumento da expressão dos genes *downstream* *FGF18* e *MMP7* para Cal27 e SCC9 resistentes à cisplatina. Dessa forma, nossos resultados conseguem demonstrar a relação entre a via de Wnt/ β -

catenina e a quimiorresistência, em que, na diminuição dos genes *upstream*, β -catenina fica livre, podendo atuar ativamente no núcleo, regulando os seus genes *downstream*

Na regulação da expressão gênica, a metilação de histonas está envolvida em vias de sinalização importantes para a manutenção e auto-renovação das células-tronco tumorais, como a de Wnt (KEYVANI-GHAMSARI et al., 2021). Estudos demonstraram que as histonas metiltransferases e demetilases são essenciais nas características de auto-renovação e diferenciação de células-tronco tumorais. Um exemplo é a lisina demetilase KDM1A, que quando inibida, diminui a presença de células-tronco tumorais CD44⁺/CD24⁻ em câncer de mama. Já a histona metiltransferase EHMT2 ou G9a, demonstrou ser crítica na indução de propriedades de células-tronco tumorais no HNSCC, e sua inibição impediu a formação de esferas e a expressão de marcadores de células-tronco tumorais (BOULDING et al., 2018; HUANG; CHEN; LIN, 2022; LIU et al., 2015).

Quando nós buscamos avaliar diferenças na expressão gênica entre as populações de células-tronco e não-tronco tumorais, foi observado que a expressão dos genes *EZH2* e *MLL1* foi aumentada nas células-tronco tumorais e a expressão de *EHMT2* foi diminuída. Grinat et al. (2021), demonstraram que a histona metiltransferase MLL1 promove a tumorigênese de células-tronco intestinais induzidas por β -catenina, além de controlar a auto-renovação de células-tronco tumorais no câncer de cólon (GRINAT et al., 2020). EZH2 também é necessário para manter as características de plasticidade das células-tronco tumorais de ovário, e contribui para a manutenção da quimiorresistência (WEN et al., 2021).

Estudos recentes demonstraram que EZH2 e H3K27me3 estão acumuladas em tecidos de câncer de pulmão de pequenas células (SCLC), e em células de SCLC resistentes à multidrogas (FANG et al., 2018). Em nossos resultados, o nível das proteínas EZH2 e H3K27me3 foi aumentado nas linhagens quimiorresistentes. H3K27me3 também foi aumentado nas células-tronco tumorais. Em células de melanoma propensas à metástase (4C11+), as histonas H3K9me2 e H3K36me3, foram observadas aumentadas (AZEVEDO et al., 2020). No presente estudo, um aumento de H3K9me2 e de H3K36me3 foi observado nas linhagens quimiorresistentes e nas células-tronco tumorais. Em muitos cânceres, a expressão de KDM1A está aumentada e correlacionada com pior prognóstico, além de estar envolvida em muitos processos relacionados com o câncer, como regulação do

potencial de células-tronco e transição epitélio-mesênquima (LI et al., 2021). Em nossos resultados, KDM1A apresentou seu nível proteico aumentado na linhagem SCC9 quimiorresistente, e na população de células-tronco tumorais da linhagem Cal27 quimiorresistente.

Muitos estudos vêm relacionando EZH2 com a via de Wnt/ β -catenina. Em células de carcinoma cervical, EZH2 é capaz de se ligar à região promotora de GSK3 β , levando à sua inibição, o que promove a translocação de β -catenina para o núcleo. No carcinoma espinocelular de língua, o RNA longo não codificante H19 promoveu progressão tumoral através da regulação da expressão de β -catenina e GSK3 β , por EZH2. Em resultados *in vitro* e de 433 espécimes humanos de câncer colorretal, EZH2 ajudou a manter as características de células-tronco tumorais por meio da ativação da via de Wnt/ β -catenina. No carcinoma hepatocelular, o RNA longo não codificante Inc- β -Catm se associou com EZH2 e β -catenina, causando a metilação de β -catenina, suprimindo sua ubiquitinação o que levou à ativação da via de Wnt/ β -catenina. Já no câncer de ovário, o microRNA miR-606-3p, que tem como alvo direto EZH2, diminuiu os níveis de β -catenina, quando estava superexpresso (CHEN et al., 2016; CHEN; ZHENG; YANG, 2016; SUN et al., 2021; ZHANG et al., 2017; ZHU et al., 2016).

Como nossos resultados demonstraram aumento da expressão gênica de *CTNNB1* e *EZH2* nas linhagens resistentes à cisplatina, assim como acúmulo de β -catenina e de H3K27me3 na população de células-tronco tumorais, nós buscamos investigar se a inibição destas proteínas poderia ser eficiente para eliminar as células-tronco tumorais, e os inibidores farmacológicos UNC1999, ICG-001 e FH535 foram utilizados.

Estudos demonstraram que a molécula UNC1999, um inibidor de EZH2 que consequentemente reduz os níveis de H3K27me3, reduziu a população de células-tronco tumorais em câncer de mama triplo negativo (LAWRENCE; BALDWIN, 2016). No presente estudo, nós observamos que a população de células-tronco tumorais é mais sensível ao tratamento com UNC1999 do que a população global da massa tumoral, sugerindo que UNC1999 pode ser um fármaco promissor para eliminar as células-tronco e reverter a quimiorresistência. Da mesma forma, os inibidores de β -catenina, ICG-001 e FH535, apresentaram maior especificidade na eliminação das células-tronco tumorais do que na população de células não-tronco. Liu *et al.* (2017), observaram que ICG-001 suprimiu o crescimento de células de câncer gástrico e aumentou a sensibilidade de células com propriedades tronco tumorais (LIU et al.,

2017), corroborando com nossos resultados. Além disso, o tratamento com FH535 diminuiu os marcadores de células-tronco tumorais de câncer pancreático, sugerindo que FH535 realmente diminui as propriedades tronco tumorais pancreáticas (LIU et al., 2016). Nós também observamos, através das análises de expressão proteica, que UNC1999, ICG-001 e FH535 foram capazes de diminuir a expressão de β -catenina e EZH2, sendo que FH535 obteve a melhor resposta, diminuindo de forma eficaz ambas as proteínas. Em relação as histonas analisadas, os tratamentos envolvendo UNC1999, ICG-001 e FH535 foram mais eficazes na diminuição de H3K27me3.

Avaliando a expressão gênica, os genes *upstream* da via de Wnt/ β -catenina, *APC*, *AXIN2*, e *GSK3 β* foram aumentados quando tratados com UNC1999 nas células-tronco tumorais das linhagens Cal27, SCC9 e SCC25 quimiorresistentes, enquanto o gene *downstream MMP7* foi significativamente diminuído quando a população de células-tronco tumorais das linhagens Cal27, SCC9 e SCC25 quimiorresistentes foram tratadas com ICG-001, FH535 e UNC1999. Esse resultado demonstra a efetividade e a relação entre EZH2 e os componentes da via de Wnt/ β -catenina, de forma que, o complexo de destruição, que envolve os genes *upstream* foram aumentados, o que leva à degradação de β -catenina (LIU et al., 2022).

Levando em consideração que as células-tronco tumorais apresentam uma complexidade hierárquica, mesmo com muitos estudos avaliando tratamentos em monoterapia, esses, apresentam baixa eficácia contra as células-tronco tumorais, demonstrando que os tratamentos em combinação são mais eficazes na eliminação dessa população (CATARA; COLANZI; SPANO, 2021; NAWARA et al., 2021). Um exemplo foi demonstrado por Roy *et al.* (2018) em células de HNSCC, em que a combinação do quimioterápico cisplatina com o inibidor de p53 SB203580, demonstraram eficácia na redução de marcadores de células-tronco tumorais e na formação de esferas (ROY et al., 2018).

Assim como na eliminação das células-tronco tumorais, uma estratégia para evitar falhas no tratamento e minimizar a resistência à terapia, também se dá com a administração de fármacos em combinação (BIGHETTI-TREVISAN, 2019). Estudos observaram que a combinação de ICG-001 e cisplatina suprimiu o crescimento *in vitro* de células C666-1 provenientes de carcinoma da nasofaringe (NPC) e de xenoinxertos de NPC (CHAN et al., 2015). No carcinoma hepatocelular, a combinação de FH535 e um inibidor da via de Akt (AZD5363) promoveu um efeito relevante na morte celular (PATRA et al., 2020). A combinação do UNC1999 com o

inibidor de proteassoma, Bortezomib, inibiu o crescimento de células de mieloma *in vivo* (RIZQ et al., 2017).

Para avaliar a população de células-tronco tumorais é realizado uma cultura celular em condições não aderentes, dessa forma, células diferenciadas do tumor irão sofrer apoptose, enquanto as células-tronco tumorais sobrevivem e se proliferam (MA et al., 2019). No nosso trabalho, o ensaio de esferas demonstrou que os tratamentos envolvendo FH535 em monoterapia, FH535 em combinação com cisplatina, e em combinação com UNC1999 apresentaram maior eficiência para diminuir a população de células-tronco tumorais nas linhagens Cal27, SCC9 e SCC25 CisR. No entanto, a terapia combinada com os inibidores ICG-001+cisplatina e ICG-001+UNC1999 também foram significativamente eficientes.

Uma forma de identificar o potencial tronco (*stemness*) da população de células tumorais é a partir do uso de marcadores moleculares específicos utilizando a citometria de fluxo, sendo que, para a identificação das células-tronco tumorais de carcinoma de cabeça e pescoço, são utilizados os marcadores ALDH e CD44 (CHINN et al., 2012). Analisando a população de células ALDH^{High}/CD44^{High} por citometria de fluxo, essa, foi diminuída na presença de FH535, mas principalmente quando houve combinação entre FH535+cisplatina e UNC1999+FH535 na linhagem Cal27 quimiorresistente. Enquanto para as linhagens SCC9 e SCC25 quimiorresistentes, a melhor combinação se deu com UNC1999+cisplatina. A progressão das células-tronco tumorais que podem levar à metástase no câncer, é promovida pela ativação anormal da via de Wnt/ β -catenina, onde β -catenina participa criticamente na manutenção do potencial tronco das células tumorais, interagindo com fatores de transcrição como OCT4 e SOX2, que estão relacionados com a auto-renovação e diferenciação das células-tronco tumorais (KIM et al., 2015; OUBAN, 2021; ZHANG; WANG, 2020). A histona metiltransferase EZH2 também participa de forma essencial na manutenção e proliferação das células-tronco tumorais (WEN et al., 2017, p. 2), e estudos demonstraram que a auto-renovação das células-tronco tumorais foi promovida por EZH2, através da ativação de β -catenina em câncer colorretal (CHEN et al., 2016). Em nossos resultados, a inibição farmacológica de β -catenina e EZH2 foi eficiente na diminuição das células-tronco tumorais, sugerindo que β -catenina e EZH2 são potenciais alvos moleculares para combater a quimiorresistência das células-tronco tumorais.

No ensaio *in vivo*, nós observamos que a administração do inibidor de β -catenina FH535 e a combinação da inibição de β -catenina e EZH2 através da administração de UNC1999+FH535 foram significativamente eficazes para reduzir o crescimento tumoral, e a combinação entre FH535+cisplatina também foi eficaz para a diminuição do volume e peso tumoral quando comparadas ao controle. β -catenina aumentada é correlacionada com aumento da proliferação celular e desenvolvimento de muitos cânceres. Em modelo de xenoenxerto utilizando células de carcinoma de língua, a inibição gênica de β -catenina reduziu o volume tumoral em camundongos Nude (DUAN; FAN, 2011). EZH2 já vem sendo bastante descrito em muitos tipos de cânceres, como o HNSCC, e serve como um fator prognóstico negativo. Estudos demonstraram que a sua inibição diminuiu o tamanho do tumor em modelo de xenoenxerto em células de HNSCC (ZHAO et al., 2019, p. 2). Em um estudo recente, utilizando modelo de xenoenxerto com células de leucemia mieloide aguda, a inibição de H3K27me3 aumentou a acessibilidade da cromatina, induziu apoptose e suprimiu a leucemia (PORAZZI et al., 2022).

Através dos ensaios de imuno-histoquímica, nós observamos a diminuição de β -catenina e de marcadores importantes na regulação epigenética como EZH2, H3K27me3, e KDM6B, além de marcadores de células-tronco tumorais como OCT4 e SOX2, através dos tratamentos em monoterapia e terapia combinada utilizando inibidores de β -catenina, EZH2 e cisplatina. Em carcinoma de mama triplo negativo, 237 tecidos foram avaliados por imuno-histoquímica verificando a expressão de SOX2, o qual foi relacionado com um estado de pior prognóstico, infiltração de linfonodos e baixa taxa de sobrevida. Além de que sua inibição *in vivo*, em modelo de xenoenxerto, suprimiu a tumorigênese e metástase (LIU et al., 2018, p. 2). Outros estudos demonstraram que OCT4 promoveu crescimento do tumor em modelos de xenoenxerto em células de carcinoma esôfago, e sua diminuição, foi capaz de inibir a metástase (LI et al., 2017a).

Na terapia do câncer, EZH2 participa como fator prognóstico, apresentando função de histona metiltransferase, causando a tri-metilação da histona H3 na lisina 27. EZH2 forma o complexo repressivo *polycomb 2* (PRC2), que por meio de seu recrutamento para a cromatina, causa a sua condensação, levando à repressão da transcrição gênica, sendo importante na modulação epigenética (GAN et al., 2018; SAIGUSA et al., 2022).

Em nossos resultados de imunoprecipitação da cromatina (ChIP), dados relevantes foram observados na ligação de EZH2 e H3K27me3 nas regiões promotoras de componentes da via de Wnt/ β -catenina. Nós observamos que nas linhagens quimiorresistentes, onde houve ligação de EZH2 nas regiões promotoras de *APC* e *VEGFA* por ChIP a expressão desses genes avaliados por PCR em tempo real estava diminuída. Assim como nas linhagens quimiorresistentes em que não houve ligação de EZH2 na região promotora de *AXIN2*, e ligação de EZH2 e H3K27me3 na região promotora de *MMP7*, cuja expressão gênica desses componentes da via estavam aumentados. As maiores diferenças entre as linhagens quimiorresistentes e as populações de células não-tronco e tronco tumorais se deram para a ligação de EZH2 e/ou H3K27me3 em *AXIN2*, *GSK3 β* e *MMP7*.

Interessantemente, para a linhagem Cal27 quimiorresistente e a população de células-tronco tumorais, a maioria das regiões promotoras não apresentaram ligação de EZH2, exceto *APC* e *FGF18*. A população de células-tronco tumorais na linhagem SCC9 em sua maioria também não apresentou ligação de EZH2 nas regiões promotoras dos genes analisados, exceto *GSK3 β* e *FGF18*. Porém, analisando a imunoprecipitação com H3K27me3, a mesma não estava presente apenas nas regiões promotoras na população de células não-tronco tumorais da linhagem Cal27. Além de que, com exceção da região promotora de *FGF18*, todas as outras regiões não apresentaram ligação com H3K27me3 na população de células não-tronco tumorais na linhagem SCC25.

Nossos resultados sugerem que a ligação de proteínas envolvidas na metilação de histonas (EZH2 e H3K27me3) que causam repressão da transcrição, estão possivelmente regulando a expressão dos componentes da via de Wnt/ β -catenina, como *APC* e *VEGFA*. Possivelmente EZH2 está regulando a repressão da expressão de *APC*, a partir de sua ligação nessa região promotora, dessa forma, liberando β -catenina para atuar no núcleo, ativando seus alvos como *MMP7*. Estudos recentes demonstraram que no câncer de ovário, o RNA longo não codificador CACS15, inibiu a expressão de APC através do recrutamento de EZH2, aumentando a progressão desse câncer. Em células de carcinoma de mama triplo negativo, o aumento da expressão de EZH2, induziu a repressão da transcrição de TIMP2, um inibidor tecidual de metaloproteinases (MMP), levando à um aumento de MMP2 e MMP9. Outros estudos demonstraram que a inibição de EZH2 foi capaz de suprimir a fosforilação de VEGFR2, prevenindo a angiogênese, e em células não pequenas de

câncer de pulmão, EZH2 promoveu a progressão tumoral regulando VEGFA (CHIEN et al., 2018; GENG et al., 2015; LIU et al., 2019; SHI et al., 2022)

6 CONCLUSÃO

A via de Wnt/ β -catenina está diretamente envolvida na carcinogênese oral, assim como na auto-renovação e proliferação de células-tronco tumorais quimiorresistentes. Os nossos resultados demonstraram que alterações epigenéticas, principalmente aquelas envolvidas na metilação de histonas, estão relacionadas com a ativação da via de Wnt/ β -catenina. Os níveis de β -catenina, EZH2 e H3K27me3 foram maiores nas linhagens quimiorresistentes, resultando na desregulação de genes *downstream* da via, como *FGF18*, *MMP7* e *VEGFA*, o que pode contribuir para a agressividade e progressão tumoral. EZH2 e H3K27me3 parecem agir diretamente inibindo a transcrição de repressores de β -catenina, como *APC*, *AXIN2* e *GSK3 β* , deixando β -catenina livre para translocar-se para o núcleo e atuar como fator de transcrição, favorecendo a auto-renovação das células-tronco tumorais. A administração de inibidores de β -catenina em monoterapia e em combinação com o inibidor de EZH2 foi efetiva na diminuição das células-tronco tumorais, e na redução do volume tumoral, além da diminuição de marcadores de células-tronco tumorais e de metilação de histonas no tecido tumoral, sugerindo que a inibição farmacológica de β -catenina associada à drogas que regulam a maquinaria epigenética pode ser uma estratégia eficaz na eliminação das células-tronco tumorais e na redução do volume tumoral do carcinoma oral que apresenta resistência à terapias convencionais.

7 REFERÊNCIAS

- ALAMOUD, K. A.; KUKURUZINSKA, M. A. Emerging Insights into Wnt/ β -catenin Signaling in Head and Neck Cancer. **Journal of Dental Research**, v. 97, n. 6, p. 665–673, jun. 2018.
- ALMEIDA, L. O. et al. Profiling the Behavior of Distinct Populations of Head and Neck Cancer Stem Cells. **Cancers**, v. 8, n. 1, p. E7, 4 jan. 2016.
- ALMENDRO, V. et al. The Role of MMP7 and Its Cross-Talk with the FAS/FASL System during the Acquisition of Chemoresistance to Oxaliplatin. **PLOS ONE**, v. 4, n. 3, p. e4728, 6 mar. 2009.
- AZEVEDO, H. et al. Gene co-expression and histone modification signatures are associated with melanoma progression, epithelial-to-mesenchymal transition, and metastasis. **Clinical Epigenetics**, v. 12, p. 127, 24 ago. 2020.
- BAHMAD, H. F. et al. Sphere-Formation Assay: Three-Dimensional in vitro Culturing of Prostate Cancer Stem/Progenitor Sphere-Forming Cells. **Frontiers in Oncology**, v. 8, p. 347, 2018.
- BIAN, J. et al. Transcriptional Regulation of Wnt/ β -Catenin Pathway in Colorectal Cancer. **Cells**, v. 9, n. 9, p. E2125, 19 set. 2020.
- BIGHETTI-TREVISAN, R. L. et al. Cancer Stem Cells: Powerful Targets to Improve Current Anticancer Therapeutics. **Stem Cells International**, v. 2019, p. 1–15, 12 nov. 2019.
- BOULDING, T. et al. LSD1 activation promotes inducible EMT programs and modulates the tumour microenvironment in breast cancer. **Scientific Reports**, v. 8, p. 73, 8 jan. 2018.
- BROOKS, M. D.; BURNES, M. L.; WICHA, M. S. Therapeutic Implications of Cellular Heterogeneity and Plasticity in Breast Cancer. **Cell Stem Cell**, v. 17, n. 3, p. 260–271, set. 2015.
- CADIGAN, K. M.; WATERMAN, M. L. TCF/LEFs and Wnt signaling in the nucleus. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 11, p. a007906, 1 nov. 2012.
- CAO, Z. et al. KDM6B is an androgen regulated gene and plays oncogenic roles by demethylating H3K27me3 at cyclin D1 promoter in prostate cancer. **Cell Death & Disease**, v. 12, n. 1, p. 1–15, 6 jan. 2021.
- CATARA, G.; COLANZI, A.; SPANO, D. Combinatorial Strategies to Target Molecular and Signaling Pathways to Disarm Cancer Stem Cells. **Frontiers in Oncology**, v. 11, 2021.
- CHAN, K. C. et al. Therapeutic targeting of CBP/ β -catenin signaling reduces cancer stem-like population and synergistically suppresses growth of EBV-positive nasopharyngeal carcinoma cells with cisplatin. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 9979, 21 abr. 2015.
- CHEN, D.; WANG, C.-Y. Targeting cancer stem cells in squamous cell carcinoma. **Precision Clinical Medicine**, v. 2, n. 3, p. 152–165, 1 out. 2019.
- CHEN, J.-F. et al. EZH2 promotes colorectal cancer stem-like cell expansion by activating p21^{cip1}-Wnt/ β -catenin signaling. **Oncotarget**, v. 7, n. 27, p. 41540–41558, 9 maio 2016.
- CHEN, K.; HUANG, Y.; CHEN, J. Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 34, n. 6, p. 732–740, jun. 2013.

CHEN, Q.; ZHENG, P.-S.; YANG, W.-T. EZH2-mediated repression of GSK-3 β and TP53 promotes Wnt/ β -catenin signaling-dependent cell expansion in cervical carcinoma. **Oncotarget**, v. 7, n. 24, p. 36115–36129, 15 abr. 2016.

CHEN, Y. et al. FH535 Inhibits Proliferation and Motility of Colon Cancer Cells by Targeting Wnt/ β -catenin Signaling Pathway. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 16, p. 3142–3153, 2017.

CHEN, Y. et al. Wnt-Induced Stabilization of KDM4C Is Required for Wnt/ β -Catenin Target Gene Expression and Glioblastoma Tumorigenesis. **Cancer Research**, v. 80, n. 5, p. 1049–1063, 1 mar. 2020.

CHENG, A. S. L. et al. EZH2-Mediated Concordant Repression of Wnt Antagonists Promotes β -Catenin-Dependent Hepatocarcinogenesis. **Cancer Research**, v. 71, n. 11, p. 4028–4039, 1 jun. 2011.

CHIEN, Y.-C. et al. EZH2 promotes migration and invasion of triple-negative breast cancer cells via regulating TIMP2-MMP-2/-9 pathway. **American Journal of Cancer Research**, v. 8, n. 3, p. 422–434, 2018.

CHINN, S. et al. The role of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells in tumorigenesis, metastasis, and treatment failure. **Frontiers in Endocrinology**, v. 3, 2012.

DIRKS, P. B. Stem cells and brain tumours. **Nature**, v. 444, n. 7120, p. 687–688, dez. 2006.

DUAN, R.; DU, W.; GUO, W. EZH2: a novel target for cancer treatment. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 13, n. 1, p. 104, dez. 2020.

DUAN, Y.; FAN, M. Lentivirus-mediated gene silencing of beta-catenin inhibits growth of human tongue cancer cells. **Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology**, v. 40, n. 8, p. 643–650, set. 2011.

DUCHARTRE, Y.; KIM, Y.-M.; KAHN, M. The Wnt signaling pathway in cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 99, p. 141–149, mar. 2016.

FANG, S. et al. H3K27me3 induces multidrug resistance in small cell lung cancer by affecting HOXA1 DNA methylation via regulation of the lncRNA HOTAIR. **Annals of Translational Medicine**, v. 6, n. 22, p. 11–11, nov. 2018.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012: Globocan 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359–E386, 1 mar. 2015.

FU, W. et al. Mechanisms and importance of histone modification enzymes in targeted therapy for hepatobiliary cancers. **Discovery Medicine**, v. 28, n. 151, p. 17–28, jul. 2019.

GAN, L. et al. Epigenetic regulation of cancer progression by EZH2: from biological insights to therapeutic potential. **Biomarker Research**, v. 6, p. 10, 2018.

GENG, J. et al. EZH2 promotes tumor progression via regulating VEGF-A/AKT signaling in non-small cell lung cancer. **Cancer Letters**, v. 359, n. 2, p. 275–287, 10 abr. 2015.

GOLDBERG, A. D.; ALLIS, C. D.; BERNSTEIN, E. Epigenetics: A Landscape Takes Shape. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 635–638, fev. 2007.

GRINAT, J. et al. The epigenetic regulator Mll1 is required for Wnt-driven intestinal tumorigenesis and cancer stemness. **Nature Communications**, v. 11, p. 6422, 21 dez. 2020.

GUIMARÃES, D. M. et al. Sensitizing mucoepidermoid carcinomas to chemotherapy by targeted disruption of cancer stem cells. **Oncotarget**, v. 7, n. 27, p. 42447–42460, 5 jul. 2016.

GUNDUZ, M. et al. Identification and chemoresistance of cancer stem cells in HPV-negative oropharyngeal cancer. **Oncology Letters**, 21 nov. 2019.

HE, W. et al. Matrix Metalloproteinase-7 as a Surrogate Marker Predicts Renal Wnt/ β -Catenin Activity in CKD. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 23, n. 2, p. 294–304, fev. 2012.

HU, D. et al. GSK3 β Is Involved in JNK2-Mediated β -Catenin Inhibition. **PLOS ONE**, v. 4, n. 8, p. e6640, 13 ago. 2009.

HUANG, J.-L.; CHEN, S.-Y.; LIN, C.-S. Targeting Cancer Stem Cells through Epigenetic Modulation of Interferon Response. **Journal of Personalized Medicine**, v. 12, n. 4, p. 556, 1 abr. 2022.

HUANG, M. et al. Targeting KDM1A attenuates Wnt/ β -catenin signaling pathway to eliminate sorafenib-resistant stem-like cells in hepatocellular carcinoma. **Cancer Letters**, v. 398, p. 12–21, jul. 2017.

HUNG, C.-C. et al. Differential resistance to platinum-based drugs and 5-fluorouracil in p22phox-overexpressing oral squamous cell carcinoma: Implications of alternative treatment strategies. **Head & Neck**, v. 39, n. 8, p. 1621–1630, ago. 2017.

JAIN, S. et al. Role of GSK-3 β in Regulation of Canonical Wnt/ β -catenin Signaling and PI3-K/Akt Oncogenic Pathway in Colon Cancer. **Cancer Investigation**, v. 35, n. 7, p. 473–483, 9 ago. 2017.

JAKOB, M. et al. Role of cancer stem cell markers ALDH1, BCL11B, BMI-1, and CD44 in the prognosis of advanced HNSCC. **Strahlentherapie und Onkologie**, v. 197, n. 3, p. 231–245, 1 mar. 2021.

JENSEN, M. M. et al. Tumor volume in subcutaneous mouse xenografts measured by microCT is more accurate and reproducible than determined by 18F-FDG-microPET or external caliper. **BMC Medical Imaging**, v. 8, n. 1, p. 16, dez. 2008.

KAHN, M. Wnt Signaling in Stem Cells and Cancer Stem Cells: A Tale of Two Coactivators. Em: **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. [s.l.] Elsevier, 2018. v. 153p. 209–244.

KANDOTH, C. et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. **Nature**, v. 502, n. 7471, p. 333–339, 17 out. 2013.

KARTHA, V. K. et al. Functional and genomic analyses reveal therapeutic potential of targeting β -catenin/CBP activity in head and neck cancer. **Genome Medicine**, v. 10, n. 1, p. 54, 20 jul. 2018.

KEYVANI-GHAMSARI, S. et al. Current understanding of epigenetics mechanism as a novel target in reducing cancer stem cells resistance. **Clinical Epigenetics**, v. 13, n. 1, p. 120, 29 maio 2021.

- KIM, B. W. et al. Clinical significance of OCT4 and SOX2 protein expression in cervical cancer. **BMC Cancer**, v. 15, n. 1, p. 1015, 26 dez. 2015.
- KOHN, A. D.; MOON, R. T. Wnt and calcium signaling: β -Catenin-independent pathways. **Cell Calcium**, v. 38, n. 3–4, p. 439–446, set. 2005.
- KOMIYA, Y.; HABAS, R. Wnt signal transduction pathways. **Organogenesis**, v. 4, n. 2, p. 68–75, abr. 2008.
- LAWRENCE, C. L.; BALDWIN, A. S. Non-Canonical EZH2 Transcriptionally Activates RelB in Triple Negative Breast Cancer. **PLOS ONE**, v. 11, n. 10, p. e0165005, 20 out. 2016.
- LEE, N. P. et al. Tumor xenograft animal models for esophageal squamous cell carcinoma. **Journal of Biomedical Science**, v. 25, n. 1, p. 66, 29 ago. 2018.
- LEE, S. H. et al. Wnt/ β -catenin signalling maintains self-renewal and tumourigenicity of head and neck squamous cell carcinoma stem-like cells by activating Oct4. **The Journal of Pathology**, v. 234, n. 1, p. 99–107, set. 2014.
- LI, C. et al. Transcriptional factor OCT4 promotes esophageal cancer metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition through VEGF-C/VEGFR-3 signaling pathway. **Oncotarget**, v. 8, n. 42, p. 71933–71945, 22 set. 2017a.
- LI, J. et al. KDM3 epigenetically controls tumorigenic potentials of human colorectal cancer stem cells through Wnt/ β -catenin signalling. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 15146, 28 abr. 2017b.
- LI, L. et al. Overexpression of β -Catenin Induces Cisplatin Resistance in Oral Squamous Cell Carcinoma. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 5378567, 2016.
- LI, L. et al. KDM1A Identified as a Potential Oncogenic Driver and Prognostic Biomarker via Multi-Omics Analysis. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 2021, p. 1–18, 9 dez. 2021.
- LIMA DE OLIVEIRA, J. et al. Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: A route to acquired cisplatin resistance through epigenetics in HNSCC. **Oral Diseases**, 11 abr. 2022.
- LIN, H. et al. DHX32 Promotes Angiogenesis in Colorectal Cancer Through Augmenting β -catenin Signaling to Induce Expression of VEGFA. **eBioMedicine**, v. 18, p. 62–72, 1 abr. 2017.
- LIU, J. et al. Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, p. 3, dez. 2022.
- LIU, L. et al. FH535, a β -catenin pathway inhibitor, represses pancreatic cancer xenograft growth and angiogenesis. **Oncotarget**, v. 7, n. 30, p. 47145–47162, 26 jul. 2016.
- LIU, P. et al. SOX2 Promotes Cell Proliferation and Metastasis in Triple Negative Breast Cancer. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, 2018.
- LIU, S. et al. G9a is essential for EMT-mediated metastasis and maintenance of cancer stem cell-like characters in head and neck squamous cell carcinoma. **Oncotarget**, v. 6, n. 9, p. 6887–6901, 29 jan. 2015.
- LIU, Y. et al. ICG-001 suppresses growth of gastric cancer cells and reduces chemoresistance of cancer stem cell-like population. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR**, v. 36, p. 125, 11 set. 2017.

LIU, Y. et al. LncRNA CACS15 accelerates the malignant progression of ovarian cancer through stimulating EZH2-induced inhibition of APC. **American Journal of Translational Research**, v. 11, n. 10, p. 6561–6568, 15 out. 2019.

MA, X.-L. et al. Sphere-forming culture enriches liver cancer stem cells and reveals Stearoyl-CoA desaturase 1 as a potential therapeutic target. **BMC Cancer**, v. 19, n. 1, p. 760, 1 ago. 2019.

MARTIN-OROZCO, E. et al. WNT Signaling in Tumors: The Way to Evade Drugs and Immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 2854, 20 dez. 2019.

NAWARA, H. M. et al. Paclitaxel-Based Chemotherapy Targeting Cancer Stem Cells from Mono- to Combination Therapy. **Biomedicines**, v. 9, n. 5, p. 500, 2 maio 2021.

NÖR, C. et al. Cisplatin induces Bmi-1 and enhances the stem cell fraction in head and neck cancer. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, v. 16, n. 2, p. 137–146, fev. 2014.

OKAMOTO, A. et al. Expansion and characterization of cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Oral Oncology**, v. 45, n. 7, p. 633–639, jul. 2009.

OUBAN, A. SALL4 stemness agent expression in oral squamous cell cancer and its clinical significance. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 35, n. 1, p. 665–673, 1 jan. 2021.

PALUSZCZAK, J. The Significance of the Dysregulation of Canonical Wnt Signaling in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. **Cells**, v. 9, n. 3, p. 723, 15 mar. 2020a.

PALUSZCZAK, J. The Significance of the Dysregulation of Canonical Wnt Signaling in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. **Cells**, v. 9, n. 3, p. 723, 15 mar. 2020b.

PARK, J. W.; HAN, J.-W. Targeting epigenetics for cancer therapy. **Archives of Pharmacal Research**, v. 42, n. 2, p. 159–170, fev. 2019.

PATRA, T. et al. A combination of AZD5363 and FH5363 induces lethal autophagy in transformed hepatocytes. **Cell Death & Disease**, v. 11, n. 7, p. 1–13, 17 jul. 2020.

PFISTER, D. G. et al. Head and neck cancers. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN**, v. 9, n. 6, p. 596–650, 1 jun. 2011.

PORAZZI, P. et al. Targeting Chemotherapy to Decondensed H3K27me3-Marked Chromatin of AML Cells Enhances Leukemia Suppression. **Cancer Research**, v. 82, n. 3, p. 458–471, 2 fev. 2022.

QIANG, R. et al. MLL1 promotes cervical carcinoma cell tumorigenesis and metastasis through interaction with β -catenin. **OncoTargets and Therapy**, v. 9, p. 6631–6640, 2016.

RAMPERSAD, S. N. Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 9, p. 12347–12360, 10 set. 2012.

REERS, S. et al. Stem cell profiling in head and neck cancer reveals an Oct-4 expressing subpopulation with properties of chemoresistance. **Oral Oncology**, v. 50, n. 3, p. 155–162, mar. 2014.

REYES, M. et al. Wnt/ β -Catenin Signaling in Oral Carcinogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 13, p. 4682, 30 jun. 2020.

RIZQ, O. et al. Dual Inhibition of EZH2 and EZH1 Sensitizes PRC2-Dependent Tumors to Proteasome Inhibition. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 23, n. 16, p. 4817–4830, 15 ago. 2017.

RODRÍGUEZ-UBREVA, J.; BALLESTAR, E. Chromatin Immunoprecipitation. Em: STOCKERT, J. C.; ESPADA, J.; BLÁZQUEZ-CASTRO, A. (Eds.). **Functional Analysis of DNA and Chromatin**. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2014. v. 1094p. 309–318.

ROY, S. et al. Role of p38 MAPK in disease relapse and therapeutic resistance by maintenance of cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology**, v. 47, n. 5, p. 492–501, maio 2018.

ROY, S. et al. Inhibition of CD44 sensitizes cisplatin-resistance and affects Wnt/ β -catenin signaling in HNSCC cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 149, p. 501–512, 15 abr. 2020.

RYBAK, A. P.; BRISTOW, R. G.; KAPOOR, A. Prostate cancer stem cells: deciphering the origins and pathways involved in prostate tumorigenesis and aggression. **Oncotarget**, v. 6, n. 4, p. 1900–1919, 10 fev. 2015.

SAIGUSA, N. et al. The Role of the EZH2 and H3K27me3 Expression as a Predictor of Clinical Outcomes in Salivary Duct Carcinoma Patients: A Large-Series Study With Emphasis on the Relevance to the Combined Androgen Blockade and HER2-Targeted Therapy. **Frontiers in Oncology**, v. 11, 2022.

SHAHOUMI, L. A. Oral Cancer Stem Cells: Therapeutic Implications and Challenges. **Frontiers in Oral Health**, v. 2, 2021.

SHI, Y. et al. Inhibition of EZH2 suppresses peritoneal angiogenesis by targeting a VEGFR2/ERK1/2/HIF-1 α dependent signaling pathway. **The Journal of Pathology**, 6 jul. 2022.

SIERRA, J. et al. The APC tumor suppressor counteracts β -catenin activation and H3K4 methylation at Wnt target genes. **Genes & Development**, v. 20, n. 5, p. 586–600, 1 mar. 2006.

SONG, H. et al. Androgen receptor drives hepatocellular carcinogenesis by activating enhancer of zeste homolog 2-mediated Wnt/ β -catenin signaling. **EBioMedicine**, v. 35, p. 155–166, set. 2018a.

SONG, N. et al. FGF18 Enhances Migration and the Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer by Regulating Akt/GSK3 β /B-Catenin Signaling. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 49, p. 1019–1032, 1 set. 2018b.

STEINHART, Z. et al. Genome-wide CRISPR screens reveal a Wnt–FZD5 signaling circuit as a druggable vulnerability of RNF43-mutant pancreatic tumors. **Nature Medicine**, v. 23, n. 1, p. 60–68, jan. 2017.

SUN, Y. et al. MicroRNA-506-3p increases the response to PARP inhibitors and cisplatin by targeting EZH2/ β -catenin in serous ovarian cancers. **Translational Oncology**, v. 14, n. 2, p. 100987, fev. 2021.

SUN, Z. et al. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Risk Factors, Molecular Alterations, Immunology and Peptide Vaccines. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 28, n. 1, p. 19, jan. 2022.

SZKLARCZYK, D. et al. STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D607–D613, 8 jan. 2019.

TANAKA, H. et al. Nuclear Accumulation of β -Catenin in Cancer Stem Cell Radioresistance and Stemness in Human Colon Cancer. **Anticancer Research**, v. 39, n. 12, p. 6575–6583, dez. 2019.

TANG, D. G. Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. **Cell Research**, v. 22, n. 3, p. 457–472, mar. 2012.

TEIMOORI-TOOLABI, L.; AZADMANESH, K.; ZEINALI, S. Selective suicide gene therapy of colon cancer cell lines exploiting fibroblast growth factor 18 promoter. **Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals**, v. 25, n. 1, p. 105–116, fev. 2010.

TODARO, M. et al. Colon Cancer Stem Cells: Promise of Targeted Therapy. **Gastroenterology**, v. 138, n. 6, p. 2151–2162, maio 2010.

TORRE, L. A. et al. Global cancer statistics, 2012: Global Cancer Statistics, 2012. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, n. 2, p. 87–108, mar. 2015.

VIGNESWARAN, N.; WILLIAMS, M. D. Epidemiologic Trends in Head and Neck Cancer and Aids in Diagnosis. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 123–141, maio 2014.

WEN, Y. et al. Role of EZH2 in cancer stem cells: from biological insight to a therapeutic target. **Oncotarget**, v. 8, n. 23, p. 37974–37990, 6 jun. 2017.

WEN, Y. et al. EZH2 activates CHK1 signaling to promote ovarian cancer chemoresistance by maintaining the properties of cancer stem cells. **Theranostics**, v. 11, n. 4, p. 1795–1813, 2021.

WEND, P. et al. Wnt/ β -catenin signalling induces MLL to create epigenetic changes in salivary gland tumours. **The EMBO Journal**, v. 32, n. 14, p. 1977–1989, 4 jun. 2013.

WIEHLE, L.; BREILING, A. Chromatin Immunoprecipitation. Em: LANZUOLO, C.; BODEGA, B. (Eds.). **Polycomb Group Proteins**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York, 2016. v. 1480p. 7–21.

WIESE, M. et al. The β -catenin/CBP-antagonist ICG-001 inhibits pediatric glioma tumorigenicity in a Wnt-independent manner. **Oncotarget**, v. 8, n. 16, p. 27300–27313, 18 abr. 2017.

XIE, J. et al. Roles of the Wnt Signaling Pathway in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 7, 2021.

XU, J. et al. β -Catenin Is Required for the Tumorigenic Behavior of Triple-Negative Breast Cancer Cells. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. e0117097, 6 fev. 2015.

YANG, C. et al. Histone methyltransferase and drug resistance in cancers. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR**, v. 39, p. 173, 28 ago. 2020.

YANG, Y. et al. Targeting the canonical Wnt/ β -catenin pathway in cancer radioresistance: Updates on the molecular mechanisms. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 15, n. 2, p. 272–277, 2019.

YUAN, H. et al. Histone methyltransferase SETD2 modulates alternative splicing to inhibit intestinal tumorigenesis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 9, p. 3375–3391, 21 ago. 2017.

ZHANG, D.-M. et al. lncRNA H19 promotes tongue squamous cell carcinoma progression through β -catenin/GSK3 β /EMT signaling via association with EZH2. **American Journal of Translational Research**, v. 9, n. 7, p. 3474–3486, 15 jul. 2017.

ZHANG, Q. et al. A subpopulation of CD133+ cancer stem-like cells characterized in human oral squamous cell carcinoma confer resistance to chemotherapy. **Cancer Letters**, v. 289, n. 2, p. 151–160, mar. 2010.

ZHANG, Y.; WANG, X. Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in cancer. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 13, n. 1, p. 165, 4 dez. 2020.

ZHAO, M. et al. Targeting of EZH2 inhibits epithelial-mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma via regulating the STAT3/VEGFR2 axis. **International Journal of Oncology**, v. 55, n. 5, p. 1165–1175, 1 nov. 2019.

ZHU, G.-X. et al. Wnt/ β -catenin signaling: Causes and treatment targets of drug resistance in colorectal cancer (Review). **Molecular Medicine Reports**, v. 23, n. 2, p. 1–1, 1 fev. 2021.

ZHU, P. et al. lnc- β -Catm elicits EZH2-dependent β -catenin stabilization and sustains liver CSC self-renewal. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 23, n. 7, p. 631–639, jul. 2016.

