



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA E
SAÚDE**

PALOMA SOUZA GONÇALVES CERQUEIRA

**A DEPLEÇÃO DE COLESTEROL INTERFERE NA EXPRESSÃO
DE CAVEOLINAS EM
LINHAGEM CELULAR DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE
BOCA**

Salvador- BA

2019

PALOMA SOUZA GONÇALVES CERQUEIRA

**A DEPLEÇÃO DE COLESTEROL INTERFERE NA EXPRESSÃO
DE CAVEOLINAS EM
LINHAGEM CELULAR DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE
BOCA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia e Saúde, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Caló de Aquino Xavier

Salvador- BA

2019

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

CERQUEIRA, PALOMA SOUZA GONÇALVES
A DEPLEÇÃO DE COLESTEROL INTERFERE NA EXPRESSÃO DE
CAVEOLINAS EM LINHAGEM CELULAR DE CARCINOMA
EPIDERMÓIDE DE BOCA / PALOMA SOUZA GONÇALVES
CERQUEIRA. -- Salvador, 2019.
78 f. : il

Orientador: Flávia Caló de Aquino Xavier.
Dissertação (Mestrado - odontologia) --
Universidade Federal da Bahia, UFBA, 2019.

1. Câncer de boca,. 2. Caveolina. 3. Transição
epitélio-mesenquimal. 4. Adesão celular,. 5. Cultura
celular. I. Xavier, Flávia Caló de Aquino. II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ODONTOLOGIA E SAÚDE

TERMO DE APROVAÇÃO

C.D. PALOMA SOUZA GONÇALVES CERQUEIRA

“A DEPLEÇÃO DE COLESTEROL INTERFERE NA EXPRESSÃO DE
CAVEOLINAS EM LINHAGEM CELULAR DE CARCINOMA
EPIDERMÓIDE DE BOCA ”

BANCA EXAMINADORA:

Flávia Caló de Aquino Xavier

Profa. Dra. Flávia Caló de Aquino Xavier (Orientadora)
Professora da Universidade Federal da Bahia – Faculdade de Odontologia

Aguida Henriques

Profa. Dra. Aguida Cristina Gomes Henriques Leitão (Examinador Interno)
Professora da Universidade Federal da Bahia – Faculdade de Odontologia

Manoela Carrera M. C. Pereira

Profa. Dra. Manoela Carrera Martinez Cavalcante Pereira (Examinador Externo)
Professora da Universidade Estadual da Bahia

A

Minha menina, para que acredite sempre no tamanho de sua força e no Amor que a conduz.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por seu infinito Amor, manifestado em cada amanhecer.

A Rodrigo Cerqueira, meu marido, meu guerreiro incansável. Meu amor, sem você, esta dissertação seria apenas uma lembrança do que poderia ter sido. Graças ao seu incentivo, sua força, sua confiança, seu amor e sua dedicação à nossa família, aqui estamos. Obrigada por me dar a mão, o colo e o coração.

A minha mãe, Lucinha (*in memoriam*). Sou semente sua, plantada com amor. Obrigada por me dar a Vida, o Amor, e por ter me ensinado o valor da educação.

A meu pai, Eduardo, por seu amor, por me proporcionar a melhor educação, me ensinar a ser forte e a jamais desistir.

A minha filha, Manuela, razão da minha vida, semente minha. Que seu desabrochar seja o mais belo de todos, minha pequena. Obrigada por, mesmo tão pequenina, ser tão compreensiva e amorosa.

Aos meus irmãos, Patrícia e Eduardo, obrigada por estarem ao meu lado nos momentos mais difíceis e nos mais felizes. Que eu possa sempre estar presente na vida de vocês.

A minha admirável orientadora, Prof^a Dr^a Flávia Caló. Muito obrigada por sua dedicação incansável à docência, pelos valiosos ensinamentos e por me aceitar em sua equipe. Minha sincera gratidão por seu carinho, seu olhar humano, por me receber de braços abertos e me permitir concluir este trabalho com amor e dignidade. Davi e Miguel têm uma mãe da qual se orgulhar muito.

Ao Prof. Dr. Jean Nunes, meu primeiro orientador, responsável por minha iniciação científica, obrigada por incentivar a pesquisa naquela jovem menina.

Aos queridos amigos, irmãos e mestres, Prof. Dr. Luis Rasquin e Prof^a Dr^a Fabíola Bastos de Carvalho, os maiores incentivadores deste mestrado. Missão cumprida. Obrigada por serem os “pais” desta professora, eterna aluna, que

tanto tem a aprender.

A minha querida sogra, Dina, obrigada por todo o amor dedicado a nossa Manu. Obrigada por seu apoio e carinho para que eu pudesse me dedicar à conclusão deste trabalho.

Aos meus amigos mais queridos e preciosos, em especial a Aline Viana, obrigada por todo o amor e apoio nesta caminhada.

A minha amiga e chefe, Paula Drago. Obrigada por sua confiança e carinho, por me amparar, me acolher e proporcionar a conclusão deste curso. Seu apoio foi fundamental. Que sejamos sempre girassóis.

A minha amiga, minha cupincha, Catarina Terceiro, por seu carinho, apoio, incentivo e paciência. Você é um presente especialmente camuflado. Sem Nobel.

A todos os irmãos de farda da Odontoclínica, em especial a Houston e Neiva. Vocês tornam a mochila mais leve.

A minha amiga, psicóloga e anjo, Érika Albuquerque. Obrigada por ser o GPS mais querido. Gratidão por eu estar aqui hoje.

Aos queridos Rebeca Barros, Elisa Kauark, Elias dos Santos e Tagna Brandão, que pacientemente tanto me ensinaram e aos demais integrantes do LABI.

Às Prof^a Dr^a Katiúscia Paiva e Maria Fernanda Setúbal pelas parcerias que proporcionaram o enriquecimento de nossa pesquisa.

A todos os colegas e membros do Programa de Pós-graduação em Odontologia e Saúde, em especial a Sueli, à Prof^a Dr^a Águida, e às colegas Thaianne, Renata, Luíza, Amanda, Kátia e Rosângela. Muito obrigada por todo o carinho e apoio.

Às agências que fomentaram essa pesquisa, FAPESB (processo 017/2013) e UNIVERSAL– MCTI/CNPq No 14/2014.

“As pessoas felizes lembram o passado
com gratidão, alegram-se com o
presente e encaram o futuro sem
medo.”

(Epicuro)

CERQUEIRA, P.S.G. A depleção de colesterol interfere na expressão de caveolinas em linhagem celular de carcinoma epidermóide de boca. 76f. 2019. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Odontologia e Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2019.

RESUMO

A cavéola é um microdomínio de membrana celular, rica em colesterol e esfingolipídios, constituída por proteínas estruturais e regulatórias denominadas de caveolinas (Cav-1, -2, e -3). Corresponde a um tipo de balsa lipídica e é um local de ancoramento de receptores celulares e moléculas envolvidas nas vias de transdução de sinal intracelular, inclusive em células neoplásicas. O desenvolvimento do câncer decorre da interrupção da homeostase entre a proliferação celular e apoptose, sendo tais células caracterizadas ainda pela elevada capacidade de invasão tecidual e metástase, evento este dependente do processo de transição epitélio-mesenquimal (TEM). Por meio deste, as células sofrem alterações em suas características epiteliais, adquirindo um fenótipo invasivo (mesenquimal). Dentre as moléculas sinalizadoras da TEM, a Cav-1 tem sido descrita, porém pouco se sabe da sua participação no câncer de boca, bem como em respeito a Cav-2 e Cav-3. Para avaliar a participação de caveolinas no carcinoma epidermóide de boca (CEB) e sua possível relação com a TEM, o presente estudo induziu a desestabilização da estrutura caveolar através do ensaio de depleção do colesterol em linhagem celular de CEB (SCC9). A expressão das Caveolinas 1 e 2 (Cav- 1 e Cav-2) foi avaliada pré e após ruptura da estrutura caveolar. As expressões gênica e proteica foram mensuradas através de qRT-PCR e Western blot, respectivamente, e a sublocalização celular avaliada através de imunofluorescência. A depleção do colesterol resultou em alteração da morfologia celular de CEB nas diferentes concentrações de M β CD, bem como diminuição das taxas de proliferação e viabilidade celular e aumento das taxas de apoptose tardia. A análise da expressão de transcritos de CAV-1 revelou a expressão gênica aumentada nas SCC9 tratadas no período de 24 horas em diferentes concentrações de M β CD: (5mM, 7,5mM, 10mM e 15mM) em relação SCC9 parental com diferença estatisticamente significativa ($p= 0,0004$, teste Kruskal-Wallis). Não houve diferença estatística para a mesma análise em CAV 2 ($p= 0,1$, teste Kruskal Wallis), assim como na análise de associação entre os transcritos CAV 1 e CAV2 ($p= 0,88$, teste de Mann-Whitney). A expressão proteica da Cav-1 mostrou-se aumentada, com posterior diminuição dose-dependente. Apenas nas amostras tratadas com M β CD a 5mM observou-se diferença estatisticamente significativa ($p= 0,02$, teste Krukak-Wallis). O ensaio de imunofluorescência exibiu menor intensidade de marcação citoplasmática e membranar nas amostras tratadas, tanto para Cav-1, quanto para Cav-3. Tais achados indicam a modulação de colesterol como possível mecanismo subjacente à regulação dessas moléculas e ativação da TEM no CEB.

Palavras-chave: Câncer de boca, Caveolina, Transição epitélio-mesenquimal, Adesão celular, Cultura celular.

CERQUEIRA, P.S.G. Cholesterol depletion interferes with caveolins expression in oral squamous cells carcinoma cell line.. 76pp. 2019. Master Dissertation – Dentistry and Health Post Graduation Program, Federal University of Bahia. Salvador, 2019.

ABSTRACT

Caveola is a microdomain of cell membrane, rich in cholesterol and sphingolipídios, constituted by structural and regulatory proteins denominated caveolinas (Cav-1, -2, and -3). It corresponds to a lipid raft type and is an anchoring site of cellular receptors and molecules involved in intracellular signal transduction pathways, including cancerous cells. The development of cancer results from the interruption of homeostasis between cell proliferation and apoptosis. These cells are characterized by high tissue invasion capacity and metastasis, an event that is dependent on the epithelial-mesenchymal transition (EMT) process. Through this, the cells undergo changes in their epithelial characteristics, acquiring an invasive phenotype (mesenquimal). Among EMT participation in oral cancer, Cav-1 had been described, but little is known about it, as well as regarding Cav-2 and Cav-3. In order to evaluate the participation of caveolins in oral squamous cell carcinoma (OSCC) and its relation to EMT, the present study induced destabilization of the caveolar structure through the cholesterol depletion assay in OSCC cell line (SCC9). The expression of Caveolins 1 and 2 was evaluated before and after rupture of the caveolar structure. Gene and protein expression were measured by qRT-PCR and Western blot, respectively, and cell sublocalization assessed by immunofluorescence. Cholesterol depletion resulted in alteration of OSCC cells morphology at different concentrations of M β CD., as well as decreased cell proliferation and viability rates. Analysis of CAV-1 transcript expression revealed increased gene expression in the treated SCC9, over the 24 hours period, at different concentrations of M β CD: 5 mM., 7.5mM, 10mM and 15mM, in relation to parental SCC9. The analysis of the CAV 1 gene expression presented a statistically significant difference ($p = 0.0004$, Kruskal-Wallis test). There was no statistical difference for the same analysis in CAV 2 expression ($p = 0.1$, Kruskal Wallis test), as well as for the association analysis between the CAV 1 and CAV2 transcripts ($p = 0.88$, Mann-Whitney test). Cav-1 protein expression was increased, with subsequent dose-dependent decrease. Only in samples treated with 5mM M β CD there was a statistically significant difference ($p = 0.02$, Krukak-Wallis test). The immunofluorescence assay showed lower cytoplasmic and membrane labeling intensity in the treated samples for both Cav-1 and Cav-3. These findings indicate the modulation of cholesterol as a possible mechanism underlying the regulation of these molecules and activation of EMT in OSCC.

Key Words: Oral Cancer, Caveolin, Epithelial-Mesenchymal Transition, Cellular Adhesion, Cell Culture.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA.....	13
2.2 CAVÉOLA E CAVEOLINAS.....	14
2.2.1 Caveolina 1 e câncer	17
2.2.2 Caveolina 2 e câncer	22
2.3 DEPLEÇÃO DE COLESTEROL	24
2.4 TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL E CAVEOLINAS	26
2.4.1. Caveolinas e TEM no câncer	29
3 PROPOSIÇÃO	33
4 METODOLOGIA	34
5 RESULTADOS	41
6 DISCUSSÃO	60
7 CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer de boca engloba as regiões de lábios, subsítios da cavidade bucal (língua, assoalho de boca, palato, gengiva) e orofaringe, ocupando a 11^a posição no ranking global das neoplasias malignas (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/oral-health>, acesso em 15 de maio de 2019; LING *et al* , 2019). O Carcinoma Epidermóide de Boca (CEB), constitui, neste contexto, a malignidade mais comum da região de cabeça e pescoço, correspondendo a 90% dos diagnósticos histológicos (AUZAIR *et al*, 2016). Por se tratar de uma doença de comportamento agressivo, de elevada capacidade de invasão e metástase, com diagnóstico, na maioria das vezes, tardio, o CEB torna-se responsável pelos maiores índices de mortalidade e morbidade do câncer de boca, principalmente em países de menor desenvolvimento (CAPONIO *et al*, 2019, JOSEPH *et al*, 2018).

Com a finalidade de identificação de novos marcadores biológicos, capazes de atuar como ferramentas auxiliares no diagnóstico, prognóstico e tratamento do câncer, a modulação de balsas lipídicas existentes na membrana plasmática (MP), em especial das cavéolas e seus integrantes, tem-se tornado objeto de pesquisa (PATRA, S.K., 2007). As cavéolas correspondem a microdomínios estruturais da MP, amplamente envolvidas na sinalização e transdução celulares, homeostase e transporte de colesterol, organização citoesquelética, motilidade, polaridade e endocitose (ONODERA *et al*, 2013; MARTINEZ-OUTSCHOORN, SOTGIA, LISANTI, 2015; LAMAZE *et al*, 2017; KETTELER e KLEIN, 2018). Sendo assim, desempenham importante papel na carcinogênese, uma vez que a ativação de cascatas de sinalização nas mesmas pode alterar a morfologia e o comportamento celulares (MARTINEZ-OUTSCHOORN, SOTGIA, LISANTI, 2015; KETTELER e KLEIN, 2018).

As caveolinas (Cav) são proteínas estruturais da cavéola e apresentam-se em 3 isoformas: Cav-1, Cav-2 e Cav-3. O colesterol, juntamente com a Cav-1, corresponde ao principal componente estrutural da cavéola, sendo ambos indispensáveis para sua formação (MARTINEZ-OUTSCHOORN, SOTGIA, LISANTI, 2015, PARTON e SIMONS, 2007). As caveolinas têm sido implicadas em mecanismos da carcinogênese, como sinalização celular, proliferação,

motilidade, capacidade de invasão e metástase, sendo a Cav-1 a mais estudada, com escassos trabalhos acerca do papel da Cav-2. Ambas as proteínas vêm sendo sugeridas como promotoras ou supressoras tumorais, sendo tais características tumor-específicas (MASOOD *et al*, 2013; VERED *et al.*, 2015, AUZAIR *et al*, 2016; LEE *et al*, 2011; KAMIBEPPU *et al*, 2018; LIU *et al.*, 2014, JAAFARI-ASHKAVANDI e ASLANI, 2017; ARIANA *et al*, 2018; KETTELER e KLEIN, 2018; JIANG *et al*, 2019).

No concernente ao CEB, estudos vêm sendo conduzidos na tentativa de elucidar o papel das caveolinas na carcinogênese de boca e de cabeça e pescoço. A participação da Cav-1 vem sendo relatada no CEB, com possível função dual na tumorigênese (promoção e supressão) (HUNG *et al*, 2003; HAN *et al*, 2004; NAKATANI *et al*, 2005; ZHANG *et al*, 2008; XUE *et al*, 2010; BAU *et al*, 2011; MASEULLI *et al*, 2012; MASOOD *et al*, 2013; VERED *et al*, 2015, AUZAIR *et al*, 2016), necessitando assim de melhor compreensão do seu papel nas diversas etapas da carcinogênese. Alusivo à Cav-2, não existem estudos, à luz do nosso conhecimento, da sua expressão em CEB.

Dentre os processos da tumorigênese, a transição epitélio-mesenquimal (TEM) corresponde à aquisição de um fenótipo mesenquimal pelas células epiteliais, conferindo às mesmas características como perda de adesão celular, aumento da mobilidade, capacidade de invasão, metástase. A participação das caveolinas no processo de TEM ainda é pouco conhecida. Ecoy e colaboradores (2019), relatam que o aumento da expressão de Cav-1 em câncer de pulmão está associado à ativação de ambas as vias de sobrevivência celular Akt e Erk, sendo a resistência *anoikis* uma característica das células em TEM. Nohata e colaboradores (2011) verificaram, por meio do silenciamento de CAV1, que a expressão aumentada da CAV1 em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP) está associada à regulação de eventos de migração e invasão celular, e, conseqüentemente, à TEM. Jung e colaboradores (2015), por sua vez, observaram que a redução na expressão de Cav-1 induzia o processo de TEM em células de CECP, possivelmente em consequência da liberação de TGF β e/ou ativação da via ERK 1/2.

Em virtude dos poucos trabalhos publicados, é escasso o conhecimento sobre a relação entre os fenômenos observados no processo de TEM e a

expressão destas proteínas, em especial no que concerne a função biológica de Cav-1 e -2 em CEB, necessitando-se, portanto, de maior elucidação. Sabe-se que os aspectos clínicos e histopatológicos de CEB não representam parâmetros fidedignos para se estimar o comportamento tumoral. Neste cenário, a análise funcional de marcadores de TEM e de caveolinas, após desestruturação caveolar, na carcinogênese de boca, pode revelar marcadores biológicos confiáveis que consigam contribuir na compreensão biológica da progressão tumoral, viabilizando a sua aplicação como possível marcador de diagnóstico, prognóstico e de resistência a drogas. Sendo assim, a investigação destes eventos em CEB mostra-se de grande relevância, sobretudo pela possível aplicabilidade em benefício a pacientes de risco através do diagnóstico precoce, em estágios iniciais da doença, bem como para caracterizar tumores de maior agressividade.

Por conseguinte, o presente trabalho objetiva contribuir com as pesquisas de biomarcadores para CEB, avaliando o efeito da modulação da cavéola no comportamento celular, nos níveis de expressão gênica e proteica, bem como da imunolocalização, de caveolinas, em linhagem celular de CEB (SCC-9), por meio da depleção de colesterol com metil- β -ciclodextrina (M β CD).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA

Neoplasia de desenvolvimento silencioso, comportamento agressivo e com elevado poder de invasão e metástase, o CEB possui prevalência elevada, sendo responsável por números de morte superiores aos consequentes de câncer cervical, melanoma e linfoma de Hodgkin. Histologicamente, corresponde ao diagnóstico mais comum das neoplasias malignas de cabeça e pescoço, sendo sua detecção clínica, na maioria das vezes, tardia (SCANLON *et al*, 2013; BISWAS *et al*, 2019).

Os óbices acerca do diagnóstico precoce do CEB contribuem para o agravamento das lesões e redução na expectativa de vida dos pacientes acometidos pela doença, estando entre os mesmos o reduzido número de biomarcadores disponíveis (SHI *et al*, 2019). Muitos são os fatores que levam ao diagnóstico tardio, tais como exame clínico precário, ou até mesmo inexistente, absenteísmo de pacientes, treinamento profissional inadequado, falta de acesso a ferramentas de diagnóstico por inexistência de suporte financeiro, (GOLDSTEIN *et al*, 2019). Sendo assim, a identificação de mecanismos moleculares relacionados à patogênese do CEB mostra-se crucial para avanços nas técnicas de diagnóstico e estratégias de tratamento (SHIMOMURA-KURIHARA *et al*, 2019, SHI *et al*, 2019).

O CEB acomete principalmente homens numa faixa etária acima de 40 anos, sem distinção étnica, expostos aos principais fatores de risco: tabaco e álcool (BISWAS *et al*, 2019). Apesar dos esforços para o desenvolvimento de novos mecanismos diagnósticos e terapêuticos, o surgimento de novos casos continua consideravelmente alto e a taxa de sobrevivência global do CEB permanece ainda, na última década, de apenas 50% em média (NIKITAKIS *et al*, 2018; JOSEPH *et al*, 2018). Em 2018, a estimativa de novos casos de câncer de boca no Brasil foi, segundo o Instituto Nacional do Câncer (<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>, acesso em 16 de maio de 2019), de 11.200 para o sexo masculino e 3.500 para o sexo feminino. Já nos Estados Unidos da América, Siegel e colaboradores (2019) estimam o surgimento de

53.000 novos casos de câncer de boca e 10.860 óbitos, no corrente ano, para ambos os sexos.

Dentre as atuais metodologias de detecção e diagnóstico do CEB, a maioria exige a realização de biópsias, todavia novas tecnologias menos invasivas e capazes de auxiliar o diagnóstico em estágios iniciais vem sendo desenvolvidas. Durante o processo de carcinogênese, com o rompimento da homeostase entre os processos de proliferação e morte celular, ocorre o acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas. A pesquisa de biomarcadores encontra-se neste cenário, possibilitando a avaliação de tecidos tumorais e não-tumorais a partir de ferramentas genômicas, molecular e de caracterização fenotípicas (GOLDSTEIN *et al*, 2018; WILLIAMS *et al*, 2010; JOU e HESS, 2017).

Em se tratando de câncer de boca, não estão estabelecidos, até o momento, marcadores biológicos confiáveis (VAN DER WAAL *et al*, 2009) e validados (RIVERA *et al.*, 2017). Em virtude da ausência de estudos de validação, 41 moléculas foram identificadas, em revisão sistemática realizada por Rivera e colaboradores (2017), como “possíveis biomarcadores” para CEB, tornando-se crucial o desenvolvimento de estudos destinados à validação dos mesmos e identificação de novos marcadores.

2.2 CAVÉOLA E CAVEOLINAS

A membrana plasmática (MP) possui duas funções principais: separação do meio intracelular do meio extracelular por meio de uma barreira lipido-proteica e a provisão de domínios celulares com capacidade de sinalização e de iniciação de eventos, tais como transporte celular, comunicação intercelular e transdução de sinais, constituindo assim uma entidade dinâmica (PATEL e INSEL, 2006; HEAD *et al*, 2014).

Inicialmente, foi descrita por um modelo bidimensional, proposto por Singer-Nicholson, composto por lipídios e proteínas homoganeamente distribuídos, sendo sua especialização em domínios com funções distintas uma característica peculiar das células eucarióticas (PARTON e DEL POZO, 2013; OWEN *et al*, 2012). A descoberta de balsas lipídicas mudou consideravelmente tal descrição clássica da MP (MARTINEZ-OUTSCHOORN *et al*, 2015).

Cavéolas e balsas lipídicas são estruturas ordenadas dos microdomínios caracterizadas pela elevada concentração de colesterol e de glicosíngolipídios, fundamentalmente envolvidos em funções celulares, tais como endocitose, tráfego protéico, transdução de sinais, mecano-transdução e homeostase do colesterol. As balsas lipídicas são classificadas como planares e não-planares, estando as cavéolas incluídas nesta última classificação (PARTON e DEL POZO, 2103; PATEL e INSEL, 2009; CALICETI, 2014; SCHLÖRMANN, 2010).

As cavéolas foram inicialmente descritas por microscopia eletrônica como invaginações da MP em forma de ômega, com diâmetro variável entre 50–100 nm. Todavia, existe controvérsia quanto à forma destas estruturas se semelhantes a garrafas ou ômega, ou mais ainda como crateras ou taças tridimensionais (PARTON E DEL POZO, 2013; PARTON e SIMONS, 2007; CHIDLOW e SESSA, 2010). Encontram-se presentes na maioria das células animais, incluindo os queratinócitos, sendo mais abundantes em fibroblastos, adipócitos, pneumócitos tipo I, células endoteliais, células de músculos liso e estriado (SCHLÖRMANN, 2010; CAMPOS *et al*, 2019).

Existe certa variação na densidade caveolar nos diferentes grupos celulares. Em algumas células, como por exemplo, as endoteliais e adipócitos, as cavéolas correspondem a mais de 1/3 da área superficial da MP, alcançando até 50% da superfície. Enquanto nos adipócitos verifica-se a presença de até um milhão de cavéolas por célula, em algumas células, como as renais, tais estruturas não são detectadas (PARTON e DEL POZO, 2013; PARTON e SIMONS, 2007).

A manutenção dos níveis de colesterol é fundamental para a função caveolar, e depende em parte de sua interação com o principal componente estrutural da cavéola a proteína caveolina. Três são as isoformas desta proteína estrutural caveolar: caveolina-1 (cav-1), caveolina-2 (cav-2) e caveolina-3 (cav-3). Tais proteínas desempenham diferentes papéis nos variados tipos celulares, desde transporte vesicular, homeostase do colesterol e do cálcio, à formação t-tubular (CHIDLOW e SESSA, 2010; FRIDOLFSSON e PATEL, 2013).

Cav-1 e Cav-3 são essenciais para a formação da cavéola. Conforme demonstrado em alguns estudos, a ablação genética da Cav-1 provoca a perda caveolar em tecidos não-musculares. Já a expressão desta proteína em células desprovidas de caveolinas endógenas, ou mesmo de cavéolas, promove uma

espécie de neoformação destas estruturas membranares (PARTON e DEL POZO, 2013).

A Cav-2, por sua vez, não possui um papel claro na formação caveolar, não sendo necessária, por exemplo, na formação de cavéolas do endotélio pulmonar e do tecido adiposo. Entretanto, tem sido sugerido que tal proteína possua um papel coadjuvante na estruturação caveolar por meio de sua hetero-oligomerização com a Cav-1 (CHIDLOW e SESSA, 2010).

As três isoformas de caveolinas expressam-se de maneira diferenciada nas células. A Cav-1 é a mais amplamente expressa e localiza-se no cromossomo 7q31.1, assim como a Cav-2. A Cav-3, por sua vez, expressa-se predominantemente em músculos estriados, localizando-se em um diferente cromossomo (3p25). Alguns tipos celulares, tais como cardiomiócitos, determinadas células de músculo liso e notocorda do peixe-zebra, apresentam a expressão dos três tipos de caveolinas (PARTON e DEL POZO, 2013; PATEL e INSEL, 2009).

Embora sejam relativamente proteínas de baixo peso molecular (21-24 kDa), as caveolinas possuem uma distinta região de arca-bouço essencial à ligação de diversas proteínas sinalizadoras (PANI e SINGH, 2009). A compartimentalização caveolar de moléculas sinalizadoras e sua interação com as caveolinas fornecem um mecanismo para a regulação dos eventos de sinalização, bem como interação entre as diferentes vias de sinalização (MARTINEZ-OUTSCHOORN *et al*, 2015).

Além de constituir-se o principal componente estrutural da cavéola, a Cav-1 promove regulação negativa de diversos receptores e moléculas sinalizadoras presentes nas cavéolas. A Cav-2 está associada a regulação da quantidade destas estruturas na MP, além de ser um regulador mitótico através da fosforilação da serina 36, processo este regulado pela Cav-1. Somada a seu papel crítico na formação da cavéola, a Cav-3, por sua vez, possui importante atuação na regulação da síntese de óxido nítrico endotelial (CALICETI, 2014; CHIDLOW e SESSA, 2010).

A associação da cavéola a diversos processos patológicos (aterosclerose, processos inflamatórios no trato urinário, nos pulmões, doenças

cardiovasculares e leucemia) vem sendo relatada na literatura. Peculiarmente, a Cav-1 tem sido cada vez mais associada a múltiplos processos ligados ao câncer, desde transformação celular, crescimento tumoral, invasão celular e metástase (CALICETI, 2014; CHIDLOW e SESSA, 2010; FRIDOLFSSON e PATEL, 2013; JAAFARI-ASHKAVANDI e ASLANI, 2017).

2.2.1 Caveolina 1 e câncer

Em sua organização estrutural, a Cav-1 apresenta um domínio conhecido como *caveolinscaffoldingdomain* (CSD) que possui a capacidade de ligar-se e afetar a atividade de uma variedade de moléculas de sinalização celular. A respeito das moléculas de sinalização associadas à iniciação e progressão do câncer, a Cav-1 participa da regulação da PI3K/AKT, cinase de adesão focal, EGFR e integrinas (LIANG *et al*, 2014).

Apresenta-se cada vez mais clara na literatura a implicação desta caveolina na regulação de múltiplos processos associados aos diversos tipos de câncer, desde transformação celular, crescimento tumoral, migração, invasão, metástase, resistência a múltiplas drogas e angiogênese (CALICETI, 2014; JAAFARI-ASHKAVANDI, 2016)

O efeito da Cav-1 no desenvolvimento do câncer depende da sua expressão em células neoplásicas ou estromais, sendo a expressão reduzida desta caveolina, ou mesmo sua ausência, em fibroblastos associados ao câncer (CAFs), uma característica comum a cânceres agressivos (MARTINEZ-OUTSCHOORN *et al*, 2015).

Em contrapartida, a Cav-1 pode estar altamente expressa em células estromais, incluindo fibroblastos, e tal expressão pode ser regulada via degradação e autofagia em nichos de hipóxia e má-nutrição do microambiente tumoral (SHEN *et al*, 2015). Tem-se relatado que expressão da Cav-1 varia em resposta a exposições tóxicas durante a diferenciação e migração celular e sob condições de elevadas produções de espécies reativas a oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) (HART *et al*, 2015).

Diversos oncogenes, como c-Myc, v-Abl, v-Src, H-Ras, Neu/ErB2, podem ser constitutivamente ativados pela perda de Cav-1. Tal diminuição em fibroblastos estromais resulta em conversão para miofibroblastos, sendo assim a perda de

Cav-1 suficiente para induzir um fenótipo para CAF no microambiente tumoral (SHEN *et al*, 2015).

Em tumores de cólon, pulmão, melanoma e ovarianos, a Cav-1 atua como supressor tumoral (LIANG *et al*, 2014; QAYUMM *et al*, 2012). No carcinoma ductal invasivo, observou-se que ocorre uma redução precoce nos níveis de Cav-1 durante a progressão tumoral, sendo mais acentuada em estágios mais avançados e agressivos (HART *et al*, 2015).

Em contrapartida, elevados níveis de Cav-1 têm sido associados a alguns tipos de câncer, tais como o hepatocelular, pancreático, renal e de próstata (LIANG *et al*, 2014). Em rhabdomiossarcomas, tal elevação promove um aumento no crescimento tumoral e quimioresistência, enquanto que sua depleção limitou a proliferação, migração e invasão das células tumorais, além de sensibilizar tais células para apoptose induzida por agentes quimioterápicos (FAGGI, 2015). Em tumores de glândulas salivares, benignos e malignos, a expressão acentuada de Cav-1 também sugere sua participação na tumorigênese destas estruturas. Tal aumento na expressão desta caveolina tem sido relatado em alguns outros tumores malignos, como o adenocarcinoma ductal pancreático e o carcinoma mucoepidermoide de glândulas salivares (JAAFARI-ASHKAVANDI, 2016).

Shen e colaboradores (2015), em estudo realizado em CAFs de estômago, verificaram que a perda de Cav-1 contribui de forma distinta no estado de ativação de fibroblastos no microambiente do câncer gástrico e da mucosa gástrica, sendo a expressão da Cav-1 nos CAFs de câncer gástrico e em seus correspondentes associados à inflamação um potencial biomarcador para a progressão desta neoplasia.

A expressão estágio-específica tumoral de Cav-1 pode ser considerada como potencial marcador para o prognóstico e preservação do paciente (JAAFARI-ASHKAVANDI, 2016). A influência da Cav-1 na progressão tumoral é tumor específica. Pode ser tanto negativa quanto positiva, agindo como supressor tumoral ou oncopromotor, além de atuar como fator de pobre prognóstico em variados tipos de câncer, dependendo do seu estado de fosforilação, bem como do estágio e tipo de tumor (CALICET., 2014; FAGGI, 2015; JAAFARI-ASHKAVANDI, 2016; LIANG *et al*, 2014; QAYUMM *et al*, 2012).

Segundo Martinez-Outschoorn, Sotgia e Lisanti (2015), a diminuição da expressão de Cav-1 em CAFs tem sido associada a pobres prognósticos nos

pacientes com câncer. Tal diminuição é mediada por estresse oxidativo, levando a uma degradação da Cav-1 via autofagia, que por sua vez resulta em estresse oxidativo e autofagia em um mecanismo de retroalimentação.

Ando e colaboradores (2007) revelaram que pacientes portadores de carcinoma epidermóide de esôfago, que exibiram expressão positiva de CAV-1, apresentaram redução na sobrevida, sugerindo esta proteína como um marcador prognóstico potencial, corroborando com outros estudos que estabelecem a CAV-1 como “gene tumoral e modificador de metástase” (WILIAMS e LISANTI, 2005).

Alguns estudos já foram conduzidos na tentativa de elucidar o papel da Cav-1 na carcinogênese de boca e de cabeça e pescoço (HUNG *et al*, 2003; HAN *et al*, 2004; NAKATANI *et al*, 2005; ZHANG *et al*, 2008; XUE *et al.*, 2010; BAU *et al*, 2011; MASEULLI *et al*, 2012; MASOOD *et al.*, 2013; VERED *et al*, 2015, AUZAIR *et al*, 2016), e revisados por Routray (2014). O duplo papel da Cav-1 e a variação na sua expressão (alta e baixa) em CEB permanece controversa nesses estudos.

Hung e colaboradores (2003) avaliaram a expressão do perfil de Cav-1 na carcinogênese bucal e sua correlação com as variáveis clinicopatológicas, mucosa bucal normal (MBN), lesões cancerizáveis (LC), carcinoma epidermóide primário (CEBP) e carcinoma epidermóide metastático (CEBM), por meio de imunistoquímica (IC). Dentre os achados do estudo, encontra-se o comportamento bifásico da expressão de Cav-1, com aumento progressivo desta nas sucessivas fases da progressão tumoral (MBN= 8%, LC= 53%, CEBP= 79%) e diminuição na evolução de CEBP para CEBM. Apenas 38% dos CEBM apresentaram imunorreação.

Em 2004, Han e colaboradores avaliaram o papel da Cav-1 na patogênese do CEB, por meio da investigação das sequencias de exon-1 e 3 de Cav-1 em linhagens celulares de 74 casos de CEB e 15 casos de câncer de boca. Foram identificadas mutações na Cav-1 em 05 casos de câncer de boca, sendo todas no exon-3. Por meio deste estudo, os autores sugeriram haver evidência genética de que a inativação da Cav-1, devido a uma mutação ou diminuição de sua expressão, pode desenvolver um significativo papel na patogênese do câncer de boca.

Em 2005, Nakatami e colaboradores avaliaram a correlação entre a cisplatina, utilizada em tratamentos quimioterápicos e a expressão da CAV-1 em 30 casos de CEB, por meio de RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*). A correlação encontrada foi estatisticamente significativa ($p=0,02$), sugerindo os autores que a superexpressão do gene CAV-1 pode propiciar o surgimento de novos marcadores de diagnóstico associados à cisplatina em casos de CEB.

Zhang e colaboradores (2008) avaliaram, por meio de modelo de xenoenxerto ortotópico, a regulação negativa de Cav-1 em linhagens de células metastáticas M4. Foram utilizadas para tanto, clones celulares estáveis de M4 portadoras de Cav-1 humana (CavS) com células expressando vetor vazio. Os autores encontraram uma correlação inversa entre a expressão de Cav-1 e o desenvolvimento metastático. Em estudo realizado por Xue e colaboradores (2010), investigou-se o perfil de expressão da Cav-1 na carcinogênese e no desenvolvimento de CECP, por meio de IC e IF de pontos quânticos. Devido ao aumento da expressão da Cav-1 durante as etapas da carcinogênese, desde a mucosa normal até o tumor de língua primário, os autores sugeriram que o Cav-1 pode ser um oncogene no desenvolvimento do carcinoma epidermóide de língua.

O câncer de boca destaca-se por suas características proliferativas incontroláveis, bem como por sua capacidade de migração e invasão. Assim sendo, genes ativos envolvidos na metástase tumoral podem ser considerados como potenciais marcadores de prognóstico e tratamento do carcinoma epidermóide de boca (CEB) (AUZAIR *et al*, 2016).

A associação entre a susceptibilidade ao câncer de boca e os genótipos da Cav-1 foram avaliados por Bau et al (2011). Neste estudo, os autores concluíram que CAV-1 G14713A e CAV-1 T29107A estão associados com uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento do câncer de boca, de metástases e pobres taxas de sobrevida. Além disso, os genótipos podem se tornar potenciais biomarcadores para a detecção precoce da doença e predição de metástases.

Maseulli e colaboradores (2012) analisaram, em uma coorte de CECP, a existência de associação entre a superexpressão de Cav-1 e a ruptura do complexo E-Caderina/Cateninas e a superexpressão simultânea de receptores ErbB, bem como uma possível correlação entre os modelos de expressão

dessas moléculas e a metástase linfonodal. Os autores observaram a associação entre a expressão aumentada de Cav-1 e a presença de metástase linfonodal, e com a superexpressão de EGFR e ErbB54, e expressão anormal do complexo E-caderina/cateninas. Os achados *in vivo* do referido estudo foram todos comparados *in vitro* com a linhagem celular de tumor hipofaríngeal humano (FaDu), no qual a expressão acentuada de Cav-1 comprovadamente compromete o crescimento e sobrevivência celulares.

Em trabalho realizado em modelo murino ortotópico, Masood e colaboradores (2013) avaliaram a correlação entre os genes CAV-1, TLR-4 (Toll-like receptor 4), MMP-7 (matrix metalloproteinase 7), ALDH1A3, OCT-4 e TRIM-29 e a presença de metástase linfonodal. Foram realizadas análises por microarranjos, WB e IC. Os autores identificaram um aumento progressivo da expressão de CAV-1 por meio de WB, demonstrando que tal gene pode apresentar um importante papel no desenvolvimento de metástases de CECP.

Em 2015, Vered e colaboradores foram os primeiros a avaliar, por meio de IC, a expressão de Cav-1 em células tumorais e no microambiente tumoral (MAT) de carcinoma epidermóide de língua e sua associação com os resultados clínicos. O estudo demonstrou uma maior expressão da Cav-1 no MAT do que nas células tumorais, com um impacto negativo no desenvolvimento clínico.

Em estudo realizado por Jung e colaboradores (2015), relatou-se, pela primeira vez, a baixa expressão de Cav-1 em tumores primários de carcinoma epidermóide em cabeça e pescoço em pacientes com alto risco de desenvolver metástases distantes.

Até o presente momento, o estudo de Auzair e colaboradores (2016) foi o primeiro a identificar, por meio de IC, a superexpressão da Cav-1 como um marcador de prognóstico independente para o CEB

2.2.2 Caveolina-2 e câncer

Proteína estrutural da cavéola, apresentando 20 kDa, a Caveolina 2 possui três isoformas relatadas: Cav-2 α (comprimento total) e Cav-2 β e Cav-2 γ (isoformas truncadas), também citada como Cav – 2c. (COHEN *et al*, 2004; ARIANA *et al*, 2018). Assim como a Cav-1, localiza-se geneticamente no

cromossomo humano 7q31.1. Todavia, embora com distribuição celular semelhante, e apesar da mesma localização cromossômica, suas sequências de aminoácidos são apenas 38% idênticas e 58% similares, sugerindo o desempenho de diferentes funções. (LIU *et al*, 2014; COHEN *et al*, 2004; SCHERER *et al*, 1996; LEE *et al*, 2011). De Almeida (2017) sugeriu, inclusive, após extensa revisão da literatura, o desempenho de papéis antagônicos para a Cav-1 e Cav-2, principalmente no processo inflamatório.

Diversos autores relatam a expressão da Cav-2 como dependente da Cav-1, que, por sua vez, vem sendo estudada em maior proporção. Apesar da menor disponibilidade de estudos sobre a Cav-2, seu papel na carcinogênese vêm sendo relatado como tumor específico, com expressões reguladas positiva e negativamente. (LEE *et al*, 2011; KAMIBEPPU *et al*, 2018; LIU *et al*, 2014)

Ando e colaboradores (2007) analisaram a expressão de Cav-1 e Cav-2, por meio de qRT-PCR e imunomarcagem. Os resultados mostraram-se regulados positivamente nos tecidos tumorais de carcinoma de células escamosas de esôfago (ESCC), ambos com expressão de mRNA aumentada. De acordo com os autores, a maior imunexpressão de Cav-1 e Cav-2 foi associada com o gênero feminino. Os resultados obtidos no estudo inferem que a imunomarcagem, de ambas proteínas, seja mais representativa do que a expressão de mRNA na determinação do potencial de malignidade do ESCC.

Lee e colaboradores (2011), avaliaram a expressão da Cav-2 em diversos tipos de células neoplásicas, por meio de ensaio de proliferação celular, ensaio de formação de colônia e análise de citometria de fluxo. Seus resultados demonstraram que a Cav-2 desempenha um significativo papel modulador da progressão tumoral, independentemente da expressão de Cav-1. Em consequência do silenciamento gênico mediado por siRNA, a diminuição na expressão proteica de Cav-2 resultou no aumento da proliferação de linhagem celular de câncer epitelial cervical (HeLa) e adenocarcinoma pulmonar (A549), e no atenuamento em linhagem C6 de glioma. Já a re-expressão da Cav-2 em linhagem celular SH-SY5Y de neuroblastoma e sua depleção em células A549 de adenocarcinoma pulmonar promoveram a proliferação celular nas mesmas. A expressão de Cav-2 exógena em linhagem de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) promoveu redução na proliferação celular. Em conclusão, os

autores sugerem que a Cav-2 exógena pode ser utilizada como agente anticâncer em carcinoma hepatocelular humano.

Em estudo realizado com camundongos *knockout* (KO) para Cav-2, Liu e colaboradores (2014) sugeriram que tal caveolina atua como promotora do carcinoma pulmonar. Pioneiramente, a implantação de células de carcinoma pulmonar de Lewis nos murinos KO apresentou comprometimento na angiogênese e crescimento tumorais, promovendo a Cav-2 como possível alvo da terapia antiangiogênica.

Codenotti e colaboradores (2016) avaliaram a expressão das proteínas caveolares Cav-1, Cav-2 e Cavin 1 no lipossarcoma. Em células diferenciadas de lipossarcoma, as três proteínas foram exibidas agrupadas e co-localizadas, tanto na IF quanto na IC. Cav-1, Cav-2 e Cavin 1 foram consideradas pelos autores como marcadores confiáveis para a identificação de tumores bem diferenciados, configurando inclusive como possíveis marcadores de prognóstico.

A expressão gênica acentuada de CAV2 foi associada por Liang e colaboradores (2018) com um pobre prognóstico de adenocarcinoma pancreático ductal, especialmente em pacientes que apresentavam níveis normais de antígeno de câncer 125 (CA 125). Os autores utilizaram em sua metodologia: cultura celular, IC, WB e qRT-PCR, ensaios de cicatrização, proliferação e invasão celular, ensaio de luciferase repórter. A regulação negativa de CAV2, correlacionada com a expressão de miRNA-29a, e positivamente relacionada com os níveis de CA 125, mostrou-se associada a melhores prognósticos clínicos, destacando seu potencial valor preditivo.

Ariana e colaboradores (2018), avaliaram o padrão de expressão dos transcritos de Cav-2 no câncer de mama, associado à expressão de Cav-1. Os autores relataram pela primeira vez a presença do transcrito III da Cav-2, cujos resultados não detectaram ou validaram uma proteína correspondente, sugerindo-o como um candidato a RNA não-codificante. A regulação negativa da expressão das Cav-1 e Cav-2 (transcritos I e II), além da expressão tardia de Cav-2 (transcrito III), foi associada pelo estudo à incidência e promoção do câncer de mama, principalmente nos estágios iniciais. Observou-se também que

a expressão simultânea destas caveolinas possui um papel protetor contra o aparecimento de células neoplásicas, especialmente nos tecidos mamários.

Gertersberguer e colaboradores (2018) estudaram a correlação entre a expressão estromal de CAV1 e CAV2 e o câncer de pulmão. Foram analisadas amostras do tumor primário e de linfonodos humanos em *Tissue Microarray* (TMA). Assim como os resultados obtidos da CAV1, a expressão estromal de CAV2 nas células do tumor primário não apresentou correlação com parâmetros clínicos, incluindo a taxa de sobrevida.

Em 2018, Liu e colaboradores, avaliaram, *in vitro* e *in vivo*, a expressão de Cav-2 em carcinoma de células renais (RCC), por meio de qRT-PCR, IC e WB. A mesma apresentou-se aumentada no RCC quando comparada ao tecido renal normal. Ainda, o silenciamento da Cav-2 promoveu inibição da proliferação, migração e invasão, inibindo também a expressão de EGFR, PI3K e AKT, e sugerindo a Cav-2 como promotora do crescimento tumoral de RCC associada a esta via de sinalização (LIU *et al*, 2018)

O papel da Cav-2 na tumorigênese do CEB ainda não foi relatado na literatura até o momento, constituindo um dos objetivos do presente estudo.

2.3 DEPLEÇÃO DE COLESTEROL

O colesterol está presente nas células animais, sendo imprescindível para a viabilidade e desenvolvimento das mesmas (GARCIA *et al*, 2019). Assim como a Cav-1, o colesterol é essencial para a formação da cavéola, sendo responsável por manter a estabilidade e arquitetura da membrana. (BADANA *et al*, 2016). Sua concentração está intimamente ligada à quantidade de cavéolas na célula e à forma invaginada das mesmas, além de participar da regulação da expressão da Cav-1 em células estromais. A presença de colesterol e de esfingolípídios promove ainda à cavéola insolubilidade em detergentes aniônicos, como o Triton X-100, sendo essa propriedade útil na purificação e caracterização destes domínios. (MARTINEZ-OUTSCHOORN *et al*, 2015; SCHLÖRMANN *et al*, 2010; LAURENTIIS *et al*, 2007).

Diversos estudos têm avaliado as consequências da modulação do colesterol de membranas plasmáticas de células neoplásicas, uma vez que tais células têm

apresentado uma maior concentração deste nas balsas lipídicas. (LI *et al*, 2006; BADANA *et al*, 2016; SARKAR *et al*, 2017). Dentre os agentes disruptores de colesterol, encontram-se a nistatina, a filipina III e a M β CD. Esta última tem sido aplicada na maioria dos estudos por sua alta sensibilidade em ligar-se ao colesterol, sem interferência nos demais lipídios e componentes da MP. (GARCIA *et al*, 2019; LEE *et al*, 2018)

Sohn e colaboradores (2018) avaliaram os efeitos da manipulação da homeostase do complexo colesterol/Cav-1/cavéola em membranas plasmáticas de células tronco da medula óssea. Dentre os testes aplicados, os autores utilizaram a depleção de colesterol com M β CD a 10mM, por 60 min. Segundo os mesmos, o estudo evidenciou pioneiramente a direta e funcional ligação entre a Cav-1 e o colesterol em membranas plasmáticas em células tronco da medula óssea humana, incluindo alterações na rigidez, fluidez e adesão celulares. A depleção do colesterol, acarretou na redução das expressões gênica e proteica de Cav-1, do número de cavéolas, nas taxas de adesão ao colágeno e fibronectina, bem como na concentração de integrinas de superfície, e em consequência, no aumento da fluidez da membrana.

Badana e colaboradores (2016) avaliaram o efeito da extração de colesterol mediada por M β CD na proliferação, adesão, invasão e angiogênese em células de câncer de mama. Foram utilizados diferentes disruptores de colesterol (M β CD, nistatina e filipina III), em diferentes concentrações: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, e 0.5 mM, por 01, 24 e 48 horas. Uma significativa redução de colesterol foi observada nas células submetidas à M β CD (0.05mM/48h). Esta também promoveu significativa inibição na proliferação, migração e adesão celulares de maneira dose e tempo-dependente.

Westermann e colaboradores (2005), analisaram o efeito da depleção de colesterol na estrutura caveolar e na distribuição de Cav-1 na membrana plasmática. Os autores utilizaram fibroblastos murinos 3T3-L1, por apresentarem alta concentração de cavéolas. As amostras foram submetidas a M β CD na concentração de 15mM. Com a redução do colesterol pela M β CD, a cavéola adquiriu formato plano, com dispersão da distribuição de Cav-1, demonstrando a importância do mesmo para a estrutura caveolar.

Onodera e colaboradores (2013) avaliam o potencial da M β CD como droga anti-tumoral. Foram utilizadas, para tanto, linhagens celulares de CEB (KB), melanoma (Ihara) e colangiocarcinoma (M213). Na concentração de 20mM, em tratamento por duas horas, observou-se atividade citotóxica intensa da M β CD nas três linhagens celulares. Os autores sugerem que a M β CD é capaz de induzir apoptose mitocôndria-dependente por meio da depleção de colesterol das balsas lipídicas de células neoplásicas, agindo como potencial droga anti-tumoral, incluindo células de CEB.

Segundo SARKAR e colaboradores (2017), a modulação do colesterol mostra-se uma ferramenta importante no estudo dos papéis das proteínas presentes na MP, especificamente nas balsas lipídicas, justificando desta forma a importância da análise do efeito da depleção do colesterol no comportamento celular e na expressão das caveolinas em celular de CEB, e sua possível relação com o fenômeno de TEM.

2.4 TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL E CAVEOLINAS

A TEM corresponde a um processo gradual, por meio do qual as células epiteliais transformam-se em células mesenquimais, perdendo suas características e funcionalidade originais (STONE *et al*, 2016).

Por meio deste, as células epiteliais são submetidas a diversos processos bioquímicos, assumindo o fenótipo de células mesenquimais, tais como perda da polaridade, ganho de motilidade, com capacidade de invasão e migração, resistência a apoptose, aumento da produção de componentes da matriz extracelular (MEC), além de assumir características de células-tronco (OH *et al*, 2019; LI e LI, 2015; KALLURI e WEINBERG, 2009).

A TEM é um processo biológico fundamental para o desenvolvimento de diversos tecidos e órgãos, assim como seu processo reverso conhecido com transição mesenquimal-epitelial (TME) (HAN *et al*, 2004; NAKATANI *et al*, 2005; MASEULLI *et al.*, 2012). Os diversos ciclos de TEM e TME são fundamentais para a diferenciação final das células especializadas e conformação tridimensional da estrutura interna dos órgãos (HAN *et al*, 2004).

Pode ser classificada em três tipos. Além de seu importante papel na embriogênese (TEM tipo I), tem sua participação reconhecida nos processos de cicatrização, regeneração tecidual e fibrose de órgãos (TEM tipo II) e progressão tumoral maligna (TEM tipo III) (HAN *et al*, 2004; NAKATANI *et al*, 2005; MASOOD *et al*, 2013; VERED *et al*, 2015).

Os eventos da TEM tipo I ocorrem primariamente durante a implantação embrionária, iniciação da formação placentária, gastrulação e a formação da crista neural. Previamente à implantação, a TEM ocorre durante a formação do endoderma parietal. Durante a gastrulação, uma série de células é originada, tais como células musculares, ósseas, e do tecido conjuntivo, culminando em um evento mais tardio de TEM com a delaminação da crista neural e formação do tubo neural. Este último evento, por sua vez, origina células gliais e neuronais, além de células do tecido glandular adrenal, células epidérmicas pigmentares e dos tecidos conjuntivo e esquelético (MASEULLI *et al*, 2012; MASOOD *et al*, 2013; VERED *et al*, 2015; JAAFARI-ASHKAVANDI e ASLANI *et al*, 2017; MARTIN *et al*, 2016). Em se tratando da cavidade bucal, a TEM tipo I participa também do processo de formação do palato e lábio, com a fusão de camadas epiteliais, perda de adesão celular, colapso da lâmina basal e aumento da mobilidade. (KANG *et al*, 2005)

O processo de TEM é também fundamental para o reparo e cicatrização tecidual, uma vez que durante o mecanismo de re-epitelização há necessidade de migração dos queratinócitos, caracterizando a TEM do tipo II. Tal migração é possibilitada por meio da perda de aderência celular dos mesmos, com alterações nos complexos juncionais, redução do número de desmossomos e junções aderentes, ruptura de ligamentos intermediários e reorganização citoesquelética. (STONE *et al*, 2016)

Thiery e colaboradores (2009) descrevem que tais queratinócitos adquirem por meio da TEM tipo II um fenótipo intermediário conhecido com estado “metaestável”, no qual sua migração não se dá de forma celular individual, e sim, em um movimento conjunto no qual as junções celulares se encontram num estado diminuído, mantendo um contato celular relaxado durante a migração. Além de sua participação no processo de cicatrização tecidual em resposta a

uma injúria, a TEM tipo II atua também no reparo da superfície epitelial ovariana a cada ciclo menstrual durante a cicatrização pós-ovulação.

A TEM tipo III ocorre associada ao crescimento e progressão tumoral, os quais caracterizam-se pela conversão das células neoplásicas malignas em células com perfil mesenquimal e capacidade de invasão acentuada. As alterações genômicas sofridas por tais células facilitam a indução da TEM, promovendo a motilidade celular e disseminação sanguínea e linfática das mesmas para sítios distantes, caracterizando o processo de metástase (KALLURI e WEINBERG, 2009; RADISKY *et al*, 2008; DONGRE e WEINBERG, 2019).

Diversas são as funções exercidas pela TEM tipo III na tumorigênese. Desde sua origem, por meio de células-tronco tumorais; manutenção, por meio de mecanismos de resistência terapêutica; e expansão promovida por angiogênese e metástase. (NANTAJIT *v*, 2015; DONGRE e WEINBERG, 2019)

Durante o processo de TEM, marcadores mesenquimais são expressos em maior número, concomitantemente com a diminuição de expressão de marcadores epiteliais. O acúmulo de N-caderina e a degradação de E-caderina constituem, assim, características marcantes da TEM (NANTAJIT, 2015) e representam o fenômeno de *cadherin switching* (KRISANAPRAKORNKIT e IAMAROON, 2012).

A TEM pode ser induzida pela exposição a algumas citocinas, tais como TGF- β 1 ou pela expressão exógena de diversos fatores de transcrição, tais como os das famílias SNAIL e TWIST (RADISKY *et al*, 2008; DERYNCK *et al*, 2014). Outros marcadores vêm sendo estudados recentemente no processo de elucidação da participação da TEM na carcinogênese, inclusive do CEB, e desenvolvimento de metástase tumoral, tais como Vimentina, β -catenina, Slug (ALOCQUE *et al*, 2009; JUNG *et al*, 2015; DA SILVA *et al*, 2015, NANTAJIT *et al*, 2015).

Considerando-se ainda o envolvimento das caveolinas no processo de TEM, poucos são os estudos em CEB. Todavia diversos estudos vêm avaliando a expressão das caveolinas e seu envolvimento na TEM em outras neoplasias (HOLLESTELLE *et al*, 2013; YAMAZAKI *et al*, 2013; ZHU *et al*, 2017; KAMIBEPPI

et al, 2018)

2.4.1. Caveolinas e TEM no câncer

Em estudo de carcinoma de células renais, Yamasaki e colaboradores (2013), observaram que a regulação negativa de miR-128 contribui com a promoção de invasão tumoral e metástase por meio da regulação positiva de genes relacionados à TEM. Os autores analisaram a influência deste miRNA na expressão de CAV2, cujo silenciamento gênico promoveu a inibição da proliferação, migração e invasão celular em ensaio XTT, cicatrização e Matrigel.

Segundo Hollestelle e colaboradores (2013), a Cav-1 corresponde a um promissor marcador para a TEM. Em linhagens celulares de câncer de mama, a Cav-1 identificou um subconjunto de câncer de mama basal, particularmente de patologia metaplástica, sendo que apenas 50% destes apresentaram diminuição na expressão de E-cad, demonstrando assim o excelente potencial da Cav-1 como marcador do processo de TEM.

Zhu e colaboradores (2017) avaliaram a relação entre a Cav-1 e NDRG1 e seus papéis na progressão do carcinoma colorretal (CCR). De acordo com os autores, a NDRG1 interage com a Cav-1 e reduz sua expressão, promovendo sua ubiquitinação e subsequente degradação via proteassoma nas células de CCR. Soma-se ainda, a ação mediadora da Cav-1 na função supressiva da NDRG1 na TEM, migração e invasão celulares *in vitro*, bem como metástase *in vivo*. A modulação de Cav-1 e NDRG1, tanto expressão quanto silenciamento, influenciaram a regulação da expressão de marcadores da TEM (ZEB1, TWIST1, snail, slug).

Kamibeppu e colaboradores, 2018 demonstraram que a supressão de Cav-1 e Cav-2 em câncer de próstata promove diminuição na migração e expressão de vimentina, sugerindo a participação celular no processo de TME, processo de fenótipo contrário à TEM.

A correlação entre a expressão do Fator Krüppel-like 4 (KLF4) e seus efeitos reguladores na expressão e função da Cav-1 no carcinoma pancreático foi avaliada por Zhu e colaboradores em 2018. O silenciamento da expressão de KLF4 promoveu a TEM e a proliferação celular, bem como metástase *in vitro* e *in*

vivo. Uma correlação negativa entre o KLF4 e a Cav-1 foi observada na IC. Elevados níveis de Cav-1 foram associados pelos autores à pobre diferenciação tumoral, estágio avançado da doença e metástase. Sendo assim, uma nova via de sinalização da TEM e metástase foi identificada, sugerindo uma nova abordagem terapêutica.

Além de sua importância na identificação de possíveis biomarcadores de prognóstico de agressividade tumoral e resistência terapêutica a agentes quimio e radioterápicos, a elucidação da participação da TEM na tumorigênese pode vir a destacar novas estratégias terapêuticas de melhoramento na ação de agentes antineoplásicos convencionais. (FINDLAY *et al*, 2014; DONGRE e WEINBER, 2019)

Biomarcadores da TEM no CEB vêm sendo estudados no intuito de identificar pacientes que possam ser beneficiados com terapias inovadoras, evitando-se assim tratamentos mais agressivos e possibilitando melhor qualidade de vida aos mesmos. (JUNG *et al*, 2015; CHAW *et al*, 2012, ZHOU *et al*, 2014)

Zhou e colaboradores (2014) analisaram o envolvimento do processo de TEM e CAFs no carcinoma epidermóide de língua (CEBL). Os autores utilizaram linhagens celulares SCC9, além de tumores ressecados de 16 pacientes. Em cocultura de CAFs e SCC9, houve indução de TEM nas células de CEB, com regulação positiva de vimentina e fibronectina, e redução na regulação de E-cad, além do aumento da capacidade de proliferação e invasão celular de SCC9, fatos estes que, segundo os autores, devem ser considerados no tratamento de pacientes com CEBL com relação à participação na progressão maligna dos mesmos..

Em 2015, Jiao e colaboradores avaliaram os efeitos e papéis do Fator de Crescimento de Fibroblastos e seu Receptor (FGF1 e FGFR 1) na metástase de CEBL, bem como o envolvimento da TEM na progressão tumoral. Os autores observaram que a expressão ectópica de FGFR1 em CEBL e alta expressão de FGFR1 foram associadas à pobre diferenciação e desenvolvimento de metástase, além do aumento da capacidade metastática das células neoplásicas, através da modulação da TEM. Foram realizadas análises por WB e qRT-PCR em linhagem de células de CEBL Cal27, além de silenciamento gênico por RNA interferência (siRNA). Na ausência do FGF1, a E-cad teve sua

expressão aumentada, obtendo-se efeito contrário no momento da sua adição, onde ocorreu severa diminuição de E-cad e consequente aumento na expressão de vimentina e N-cad.

De modo a analisar o papel da Cav-1 no desenvolvimento metastático em CECp, incluindo o CEB, Jung e colaboradores (2015) investigaram mecanismos moleculares em diversas linhagens celulares (SCC9 inclusive). Os autores demonstraram que baixos níveis de Cav-1 foram expressos em tumores primários de pacientes com alto risco de metástase. A regulação negativa e até mesmo a não-expressão de Cav-1 foram associadas a pobres prognósticos. Os autores associaram a TEM à ausência de Cav-1, o que possibilitou o aumento na motilidade, migração e invasão celulares. Tal indução da TEM, seguida da redução na expressão de Cav-1 foi sugerida no presente estudo como consequência à liberação de TGF β e/ou às vias de sinalização das ERK1/2, consideradas as principais indutoras deste processo de transição celular.

da Silva e colaboradores (2015) investigaram a relação entre a expressão de marcadores da TEM, características clinicopatológicas e probabilidade de sobrevivência em pacientes com tumores primários únicos e múltiplos de CEB. O potencial do processo de TEM foi destacado como possível marcador para a progressão de CEB com múltiplos tumores. As regulações negativas de E-caderina, β -catetina e APC na membrana e positiva de vimentina foram significativamente associadas à presença de tumores primários múltiplos, quando comparadas a tumores primários únicos. A expressão E-caderina, por exemplo, foi citada pelos autores como auxiliar na predição prognóstica, além de participar no planejamento de cirurgias extensas.

Vered e colaboradores (2015) investigaram a associação entre a expressão de Cav-1 em carcinoma epidermóide de língua, dados clínicos e a possibilidade de acúmulo *in vitro* desta no microambiente tumoral (MAT). De acordo com os autores, uma das vias de acúmulo da Cav-1 no MAT é a secreção destas por exossomos e sua fagocitose por células em processo de TEM, por CAF's ou outros tipos celulares. A expressão da Cav-1 foi observada em maior concentração no MAT quando comparada à expressão nas células tumorais, sendo sugeridos novos estudos sobre o papel da Cav-1 no processo de TEM.

Considerando-se o caráter agressivo do carcinoma epidermóide de boca em seus estágios avançados está comumente associado ao tratamento por ressecção mutiladora. A detecção da doença em seus estágios iniciais, promove ao paciente aumento nas chances de cura, minimiza a necessidade de tratamentos radicais e traumáticos, otimizando a reinserção do paciente à sua rotina. Sendo assim, a possibilidade de identificação de novos fatores de prognóstico proposta pelo presente trabalho torna-se urgente para a oferta de tratamentos inovadores e mais conservadores, com conseqüente enriquecimento da qualidade de vida dos pacientes e de seus familiares.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho visa avaliar a participação das caveolinas em linhagem celular de CEB (SCC-9) submetida à depleção de colesterol.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Avaliar a expressão gênica e proteica e imunolocalização das caveolinas (Cav-1, -2 e -3) na linhagem SCC-9 por qRT-PCR, western blotting e imunofluorescência, respectivamente;

b) Avaliar a expressão gênica e proteica e imunolocalização das caveolinas (Cav-1, -2 e -3) na linhagem SCC-9 após a depleção do colesterol utilizando a metil-beta-ciclodextrina por qRT-PCR, western blotting e imunofluorescência, respectivamente

c) Avaliar os parâmetros celulares de morfologia, capacidade de formação de colônias, proliferação e apoptose antes e após a depleção do colesterol, utilizando a metil-beta-ciclodextrina na linhagem SCC-9.

4 METODOLOGIA

4.1 CULTIVO CELULAR

A linhagem celular de CEB (SCC9) foi cultivada em frascos plásticos de 25 ou 75cm² (NUNC, Dinamarca) em meio de cultura DMEN/F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Invitrogen), 400 ng/ml de hidrocortisona (succinato sódico de hidrocortisona – Eurofarma, Brasil) e solução antimicótica e antibiótica 1% (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). As células foram cultivadas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade até que atingissem uma confluência de 60-70%. O crescimento celular foi monitorado diariamente e o meio de cultura trocado a cada dois ou três dias, de acordo com o metabolismo celular.

4.2 DEPLEÇÃO DE COLESTEROL POR METIL-β-CICLODEXTRINA (MβCD)

A MβCD é um composto químico que não penetra na célula, mas liga-se ao colesterol e o remove da membrana celular, rompendo as balsas lipídicas e cavéolas. A linhagem celular SCC9 foi plaqueada em placas de 150 mm (2x10⁶ céls/placa) e a depleção de colesterol realizada tratando as células em diferentes concentrações (5mM; 7,5mM, 10mM e 15mM) de MβCD (C4555, Sigma-Aldrich) por 1 hora a 37°C, seguida de lavagem e, posteriormente, a amostra preparada para os ensaios. Foram realizadas duas condições experimentais:

- (I) Meio MβCD (utilizado para a depleção do colesterol): DMEM sem soro fetal bovino e sem bicarbonato de sódio + 20 mM HEPES, solução a 2% de MβCD, pH 7,4 (sonicação necessária para completa solubilização);
- (II) Meio veículo MβCD (utilizado como controle negativo): DMEM sem soro fetal bovino e sem bicarbonato de sódio + 20 mM HEPES, pH 7,4.

Após o tratamento, foram avaliados os parâmetros celulares (morfologia, formação de colônia, proliferação e viabilidade celular, e apoptose) e a expressão gênica, proteica e imunolocalização das caveolinas.

4.3 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIA

As células foram semeadas em 4 diferentes placas P60 (1×10^6 células) e, após 24h, depletadas com concentrações crescentes de M β CD (5, 7.5, 10 e 15 mM). Após 24h da depleção, o volume total da população de células flutuantes foi dividida em 3 partes e colocado em 3 poços de placas P6. A população de células aderidas foi tripsinizada, contada e plaqueada (100 células/poço), em triplicata. Após 17 dias em cultura, cada poço foi incubado com a solução 1:1 de cristal violeta 0,5% (1.159.40.0025, Certistain®, Merck) e glutaraldeído 6% (383, Vetec) por 30 min sob agitação em temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram cuidadosamente submergidas em um bécker com água, para remoção do excesso do corante e secagem em temperatura ambiente. A análise e a captura da imagem foram realizadas em microscópio óptico invertido (Observer D1, Zeiss). Colônias medindo ao menos 2mm de diâmetro foram contadas visualmente, utilizando-se o software de acesso livre ImageJ® (NIH, EUA), conforme metodologia de Rodrigues e colaboradores (2018).

4.4 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR

4.4.1 *Curva de proliferação*

Foi realizado plaqueamento de 5×10^3 células em 1 ml de meio DMEM/F12 contendo 10% de FBS em cada poço de placas para cultivo celular de 24 poços (Nunc). Após 16 horas, os poços foram lavados com PBS, o meio trocado por DMEM/F12 livre de FBS e as células submetidas ao ensaio de depleção. Para estimular o crescimento celular, ao término deste ensaio, foi novamente colocado o meio DMEM/F-12 contendo 10% de FBS. Nos períodos de 24, 48, 72 e 96, após a adição do meio com FBS, as células de três poços de cada placa foram lavadas com PBS e incubadas com 0,3 ml de tripsina a 37°C, até que todas estivessem completamente separadas do fundo da placa. A tripsina foi inativada com 1 ml de meio DMEM/F12 com 10% de FBS e alíquotas de 100 μ l foram utilizadas para contagem. Todas as contagens foram feitas em triplicata utilizando-se câmara de Neubauer e os experimentos repetidos três vezes. Após

obtenção dos valores médios de cada período, foram construídas curvas de proliferação.

4.4.2 Ensaio de Viabilidade Celular

O ensaio de redução de MTT (Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol]-2,5-difeniltetrazólio, Sigma-Aldrich) foi aplicado para mediar a viabilidade celular após o tratamento com diferentes concentrações de M β CD por 1h, determinando os efeitos causados pela atividade da enzima desidrogenase mitocondrial nas células utilizadas no estudo. Para isto, foram semeadas 3×10^4 células em estufa a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂, em estágio de semiconfluência por poço em 1,0 mL de DMEN adicionado de 10% SFB. Após incubação de 48h, as células foram expostas à M β CD, nas diferentes concentrações, por 1h. O meio foi então removido e as células expostas a uma solução de 0,5mg de MTT/mL de DMEN F12 sem SFB, por 4h a 37°C. Foi realizada a remoção desta solução e a extração do pigmento insolúvel reduzido intracelularmente com 1 mL de etanol/poço, sob agitação suave por 10 min em mesa agitadora. Em seguida, a leitura da solução extraída dos poços foi feita em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 570 nm. As células submetidas a diferentes concentrações do M β CD foram então ranqueadas de acordo com a porcentagem de função mitocondrial, considerando-se o grupo controle não tratado como 100%. Quanto maior a função mitocondrial, maior a viabilidade celular e menor a citotoxicidade.

4.5 ENSAIO DE APOPTOSE

A linhagem celular SCC-9 foi mantida em cultura até uma confluência de 50-60%. Em seguida, o grupo tratado recebeu meio de cultura DMENF12 associado à M β CD por 1h e o grupo não tratado foi incubado somente com meio de cultura contendo o veículo de diluição do M β CD. O grupo controle (linhagem SCC9 parental) não recebeu tratamento. O ensaio de apoptose foi realizado utilizando-se o Single Channel Annexin V/ Dead Cell Apoptosis Kit (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. As células foram tripsinizadas, lavadas em PBS e ressuspensas em um tampão de ligação contendo Anexina

V-FITC (1:500) e DAPI (1µg/ml) (SIGMA). O índice de apoptose foi determinado em citômetro de fluxo (BD Bioscience) e analisado com o software FACS Diva versão 6.1.1 (BD Bioscience). Dez mil eventos foram analisados para cada amostra.

4.6 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

4.6.1 Extração de RNA

O experimento de expressão gênica foi realizado na linhagem celular SCC-9 não-tratada e tratada por MβCD nas concentrações de 5mM, 7,5mM, 10mM e 15mM. O RNA total das linhagens celulares foi isolado utilizando o *PureLink™ RNA Mini Kit* (Applied Biosystems). A pureza do RNA extraído foi verificada por meio de leitura em espectrofotômetro NanoDrop™ através da análise das razões $A_{260/280}$ e $A_{260/230}$.

4.6.2 Ensaio TaqMan RT-qPCR

A transcrição reversa foi realizada através da SuperScript™ VILO™ transcriptase reversa (11755500, Invitrogen™). Em seguida, foi realizado tratamento com DNase I (18068015, Invitrogen™) e *RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor* (10777019, Invitrogen™). Os produtos da transcrição reversa serviram de molde para a amplificação pelo ensaio de expressão gênica *TaqMan PCR*, gerando dados quantitativos, para determinar as diferenças de expressão para os genes propostos no estudo (*CAV1*, assay *Hs00971716_m1*; *CAV2*, assay *Hs00184597_m1*; *CAV3*, assay *Hs00154292_m1*) nas linhagens celulares. O gene constitutivo *18S rRNA* (assay *Hs03003631_g1*) foi utilizado para controle de normalização de massa. O protocolo experimental *TaqMan® Array Standard, 96-well Plate* (Applied Biosystems) foi realizado em termociclador ABI PRISM 7500. As reações foram realizadas a um volume final de 20 µl reaction contendo uma mistura contendo 10 µl de *TaqMan Universal PCR Master Mix* (4440038, Applied Biosystems), 100ng de cDNA em água livre DNase para completar o volume de 10uL. As condições de termociclagem foram

2 minutos iniciais a 50 °C e 10 minutos a 95 °C, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos e associação/extensão a 60 °C por 1 min. A expressão gênica relativa foi analisada. Todas as reações foram preparadas em duplicata e em condições de ciclagem específicas para cada gene, sendo a curva de dissociação analisada para assegurar a especificidade da reação. A análise dos dados foi realizada através de quantificação da expressão relativa pelo Método do Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Os dados foram apresentados por média e Desvio Padrão (DP). Todas as reações de qRT-PCR foram realizadas no Laboratório de Patologia Molecular da FOUSP.

4.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA

A expressão das proteínas Cav-1, Cav-2 e Cav-3 foi analisada por meio dos ensaios de *Western-blotting* e por imunofluorescência, utilizando-se anticorpos específicos para cada proteína citada na linhagem SCC-9 não-tratada e tratada por M β CD na concentração ótima por 1h.

4.7.1 Extração de proteínas e *western blotting*

O experimento quantitativo de expressão proteica foi realizado na linhagem SCC-9 não-tratada e tratada por M β CD na concentração ótima por 1h. Os *pellets* de células para a extração proteica foram obtidos por meio de tripsinização celular. As proteínas foram extraídas em um tampão de lise contendo 10% de sacarose, 1% de Triton-X, 20 mM de Tris pH 8,0, 137 mM de NaCl, 10% de glicerol, 2 mM de EDTA, 1 mM de NaF e inibidores de proteases (P8340, Sigma-Aldrich). Todos os extratos protéicos foram imediatamente congelados em gelo seco e transferidos para *freezer* -80 °C. A quantidade de proteína total dos extratos protéicos foi determinada pelo kit de quantificação proteica BCA (BCA Protein Assay Kit, 23225, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) em comprimento de onda de 562 nm.

Trinta microgramas de proteínas de cada extrato celular foram misturadas com um tampão de amostra redutor 4x concentrado (2% de SDS, 125 mM de

Tris-HCl pH 8,0, 10% de glicerol, 0,001 % de azul de bromofenol, 2% de β -mercaptoetanol), aquecidas a 95°C por 5 minutos e separadas eletroforéticamente em géis de poliacrilamida-SDS. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Invitrogen), bloqueadas por 1 hora a 4°C em uma solução contendo 10% leite em pó desnatado dissolvido em tampão contendo 20 mM de Tris-HCl pH 7,6, 150 mM de NaCl e 0,1 % de Tween 20 (TBST). As membranas foram incubadas por 16 horas a 4°C com os anticorpos primários anti-Cav-1 com diluição de 1:1500 (3238, Cell Signaling : Danvers, Massachusetts, EUA), anti- β -Actina clone AC-74 com diluição 1:5000 (A2228, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA); anti-Cav-2 na diluição de 1:1000 (AF5788, ReD Systems, Minneapolis, MN, EUA) e anti-Cav-3 (AB2912, 1:1000, Abcam, Cambridge, UK). Após incubação overnight, as membranas foram lavadas três vezes por 15 minutos com TBST 1x. Posteriormente foram incubadas em anticorpos secundários anti-mouse (β -actina), anti-rabbit (Cav-1 e -3), anti-goat (Cav-2), conjugados com peroxidase (HRP) e diluídos a 1:2000, 1:3000 e 1:1000 respectivamente, em uma solução contendo 5% de leite em tampão contendo 20 mM de Tris-HCl pH 7,6, 150 mM de NaCl e 0,1 % de Tween 20 (TBST), por 1 hora a temperatura ambiente. As membranas foram reveladas através de quimioluminescência, utilizando-se o kit de detecção ECL – Amersham ECL *Western Blotting Analysis System* (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) e o sistema de imagens ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Reino Unido).

4.7.2 Imunofluorescência

Para a realização da reação de imunofluorescência, a linhagem SCC-9 foi plaqueada em lâmina de cultura celular (Lab Tek, Nunc, Naperville, IL, EUA) e mantidas a 37°C por 72 horas. Em seguida, um grupo das células foi tratado por M β CD na concentração ótima por 1h previamente à fixação, e o grupo controle não recebeu o tratamento. As células foram lavadas com PBS e fixadas com etanol a 70% por 15 min. Após bloqueio com 3% BSA em PBS por 1 h para prevenir ligações inespecíficas, as células foram incubadas com os anticorpos primários anti-Cav-1 com diluição de 1:200 (3238, Cell Signaling), anti-Cav-2

com diluição 1:50 (AF5788, ReD Systems) e anti-Cav-3 (AB2912, Abcam) a 4°C por 24h, lavadas em PBS e incubadas novamente em câmara úmida com anticorpo secundário conjugado com o fluoróforo Alexa Fluor® 488 (Invitrogen) por 1 h. As lâminas foram montadas em meio Vectashield-DAPI (Vectorlabs, Peterborough, UK). O material foi protegido da luz até o momento da visualização em microscópio invertido de fase. A documentação foi realizada por captura fotográfica das imagens em câmera acoplada a microscópio. A expressão proteica foi avaliada quanto à presença, ao compartimento celular e ao padrão de marcação.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados através do programa GraphPad Prism 8.1.1 (GraphPad software Inc., San Diego, California, E.UA.). Utilizou-se, para tanto, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn para análise de proliferação, e análise da expressão proteica. O teste One way Anova foi utilizado ensaio de apoptose (pós teste de Tukey) e na análise de expressão gênica, sendo o teste de Wilcoxon executado na análise de associação entre a expressão de CAV1 e CAV2. A correlação foi testada por Spearman, com significância estatística considerada em valores de $p < 0,05$ para todas as análises.

5 RESULTADOS

5.1 MORFOLOGIA CELULAR

As células de linhagem SCC9 foram submetidas à depleção de colesterol com tratamento com metil-beta-ciclodextrina (MBCD) a 5mM, 7.5mM, 10mM e 15mM. A amostra parental exibiu fenótipo mais próximo do epitelial, com células de aspecto poliédrico, presença de adesão célula-célula e discretos pleomorfismos celular e nuclear, além de raras células de formato arredondado sem adesão à placa, consideradas sobrenadantes (*floating cells*). (Figura 1)

Uma vez tratadas, parte das células passou a exibir um formato fusiforme, semelhante a fibroblastos, com aumento do pleomorfismo celular e nuclear proporcional ao da concentração de M β CD (Figuras 2A – 5mM, 2B – 7,5mM, 2C – 10mM, 2D – 15mM), considerada perfil TEM. Prolongamentos citoplasmáticos foram também observados, conferindo a algumas células um aspecto ameboide, nas amostras tratadas com M β CD a 10mM e 15 mM, inclusive com predomínio das células sobrenadantes (asteriscos) e ameboides (setas) nesta última concentração. A Figura 2 (A a D) exemplifica SCC9 nas concentrações progressivas de M β CD em 24 horas pós-tratamento.

Nas amostras com 96h pós-depleção, observou-se que a células passaram a exibir novamente o aspecto poliédrico, com fenótipo tipicamente epitelial, aderidas à placa, com proporção inversa à concentração de M β CD, considerada perfil TME. Nas amostras com maiores concentrações de M β CD é possível ainda a visualização de um maior número de células com aspecto mesenquimal e a presença de células com forma ameboide (asteriscos), com aglomerados mais espaçados de células com aspecto epitelial (seta). (Figura 3 A-D)

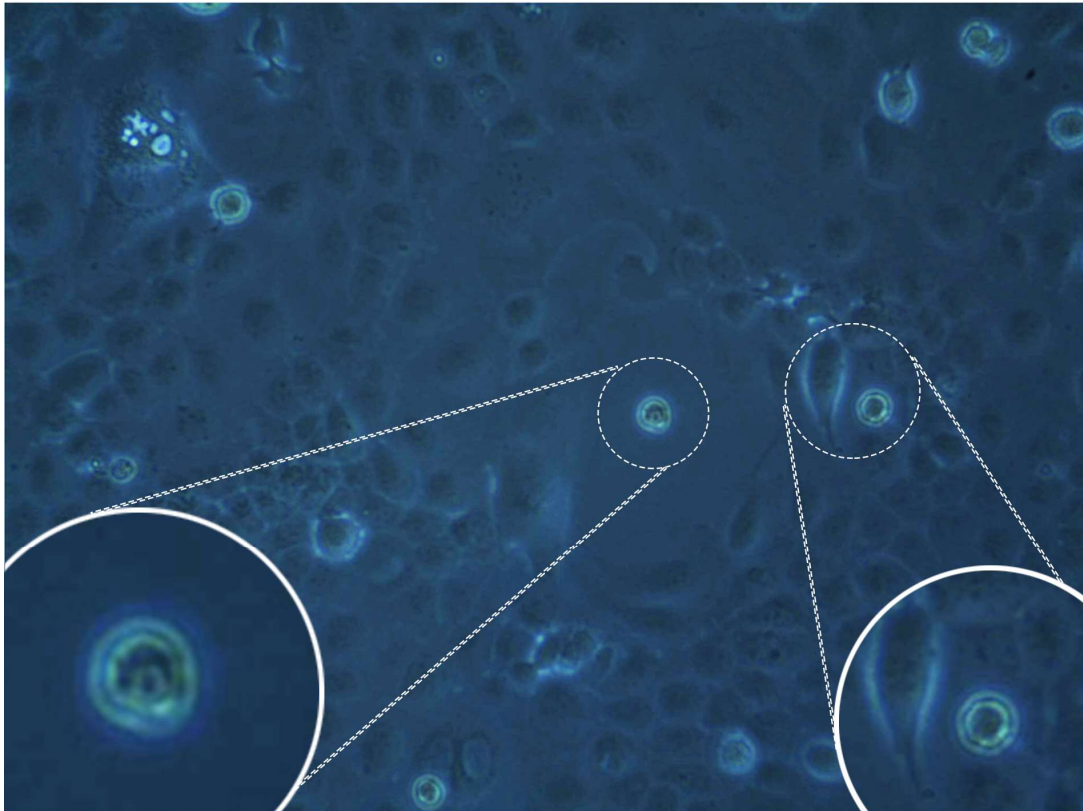


Figura 1 - Fotomicrografia da morfologia celular da linhagem SCC-9 parental após 24h. Célula sobrenadante em detalhe.

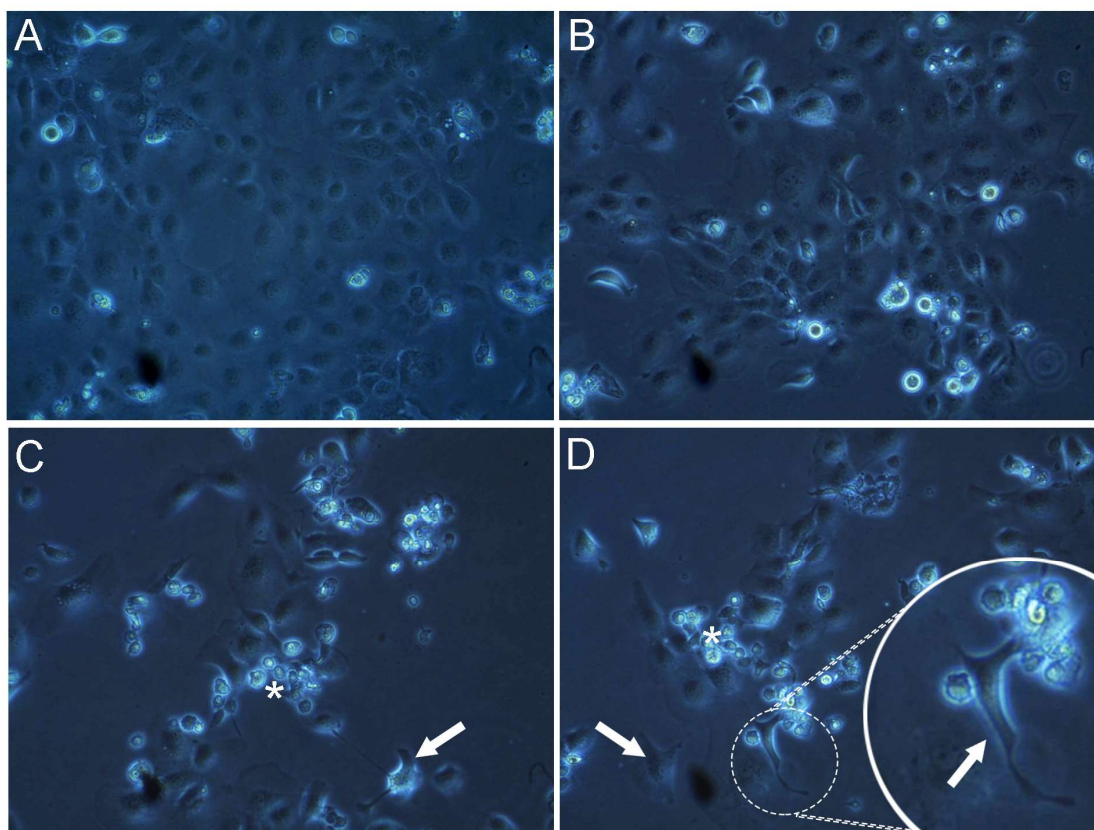


Figura 2 - Fotomicrografia da morfologia celular da linhagem SCC-9 em diferentes concentrações após 24h de tratamento com o M β CD (A - 5mM, C - 7,5mM, D - 10mM e E - 15mM), onde se observa uma maior pleomorfismo celular conforme maior a concentração de M β CD, se assemelhando um perfil mesenquimal. Em destaque células ameboides (setas) e células sobrenadantes (asteriscos).

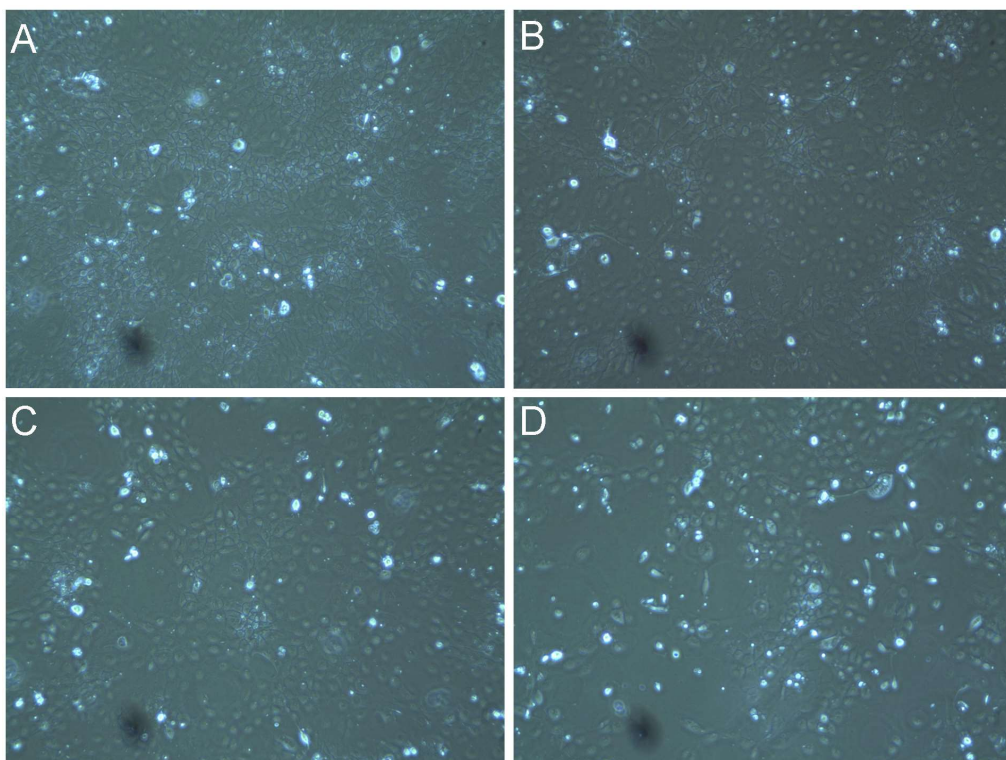


Figura 3 - Fotomicrografia da morfologia celular da linhagem SCC-9 em diferentes concentrações após 96h de tratamento com o M β CD (A - 5mM, B - 7,5mM, C - 10mM e D - 15mM), onde se observa retorno das células a um formato poliédrico, com perfil epitelial.

5.2 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIA

Após depleção de colesterol, observou-se que as linhagens celulares do sobrenadante aumentaram em função do aumento da concentração do M β CD, e se assemelhavam a células flutuantes (*floating cells*). No entanto, ao serem replaqueadas, parte destas células do sobrenadante voltou a se aderir à garrafa de cultivo e retomaram sua atividade metabólica de forma semelhante às aquelas que não se desprenderam no pós-depleção. Foram realizados, então, ensaios complementares de formação de colônia com as células aderidas e com as células do sobrenadante, uma vez observado tal comportamento das células em cultura.

No ensaio de colônia, a linhagem SCC9 parental sem depleção demonstrou uma quantidade de formação de colônia equivalente entre células aderidas e células do sobrenadante, ambas, formando população com morfologia predominantemente epitelial (Figura 4). Após depleção com 5mM de M β CD (Figura 5), as células do sobrenadante formaram muito mais colônias celulares com fenótipo mesenquimal (Figura 5 I, J e K) adjacente a população epitelial, em relação às células aderidas (Figura 5 B-G). Em 7,5mM de M β CD (Figura 6), notou-se aumento de formação de colônias das células do sobrenadante (Figura 6E), em relação a 5mM de M β CD, bem como exuberante população de fenótipo mesenquimal (Figura 6F), na qual se notou foco de diferenciação epitelial emergindo do epicentro da população de células mesenquimais, sugerindo assim uma reversão de fenótipo mesenquimal-epitelial (transição mesênquimo-epitelial).

Já na depleção em 15mM de M β CD (Figura 7), notou-se que as células do sobrenadante formaram maior quantidade de colônias (Figura 5B) do que as células aderidas (Figura 7A). As células do sobrenadante assumiram um fenótipo misto mesenquimal e epitelial. O retorno ao fenótipo epitelial foi mais rápido nessa última concentração de M β CD. Esses achados foram dependentes da concentração de M β CD.

A contagem de colônias no grupo de células aderidas apresentou diminuição do número de unidades formadoras de colônia com o aumento da

concentração de M β CD (Média Relativa: SCC9= 32,67 / Desvio Padrão= 3,51; 5 mM= 26,67/ DP=2,31; 7,5 mM= 24,67 / 4,93; 10 mM= 21,33 / 1,52 e 15 mM= 15 / DP=5,29), todavia sem diferença estatisticamente significativa ($p= 0.4060$). Já no grupo de células do sobrenadante, houve aumento do número de colônias diretamente proporcional à concentração de M β CD (MR: SCC9= 27,67 / DP= 1,52; 5 mM= 19 / DP= 3,60; 7,5 mM= 22,33 / DP= 8,62; 10 mM= 25 / DP= 10,44 e 15 mM= 29,67 / DP= 5,68), com ausência de significância estatística ($p= 0.4060$). Submetendo-se os resultados à análise de variância One Way ANOVA, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos de células aderidas e os grupos de células do sobrenadante ($p= 0.6427$).

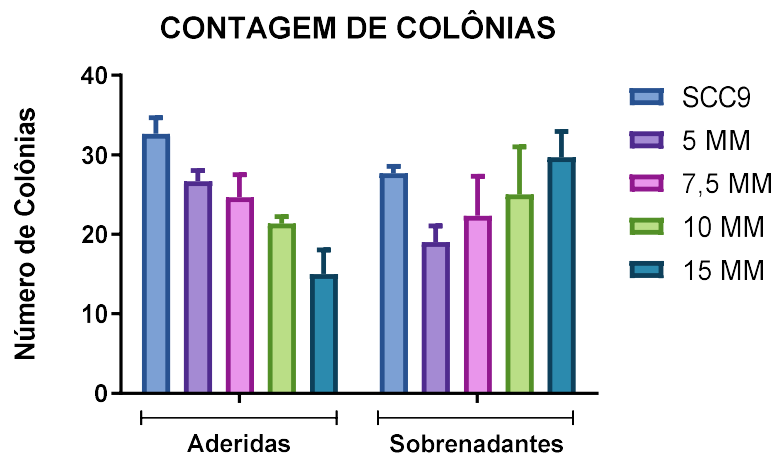


Gráfico 1. Análise de variância One Way ANOVA da quantificação do número de colônias existentes. Linhagem SCC9 parental e submetidas ao tratamento com M β CD nas diversas concentrações nos grupos de células aderidas e sobrenadantes. $p= 0.6427$.

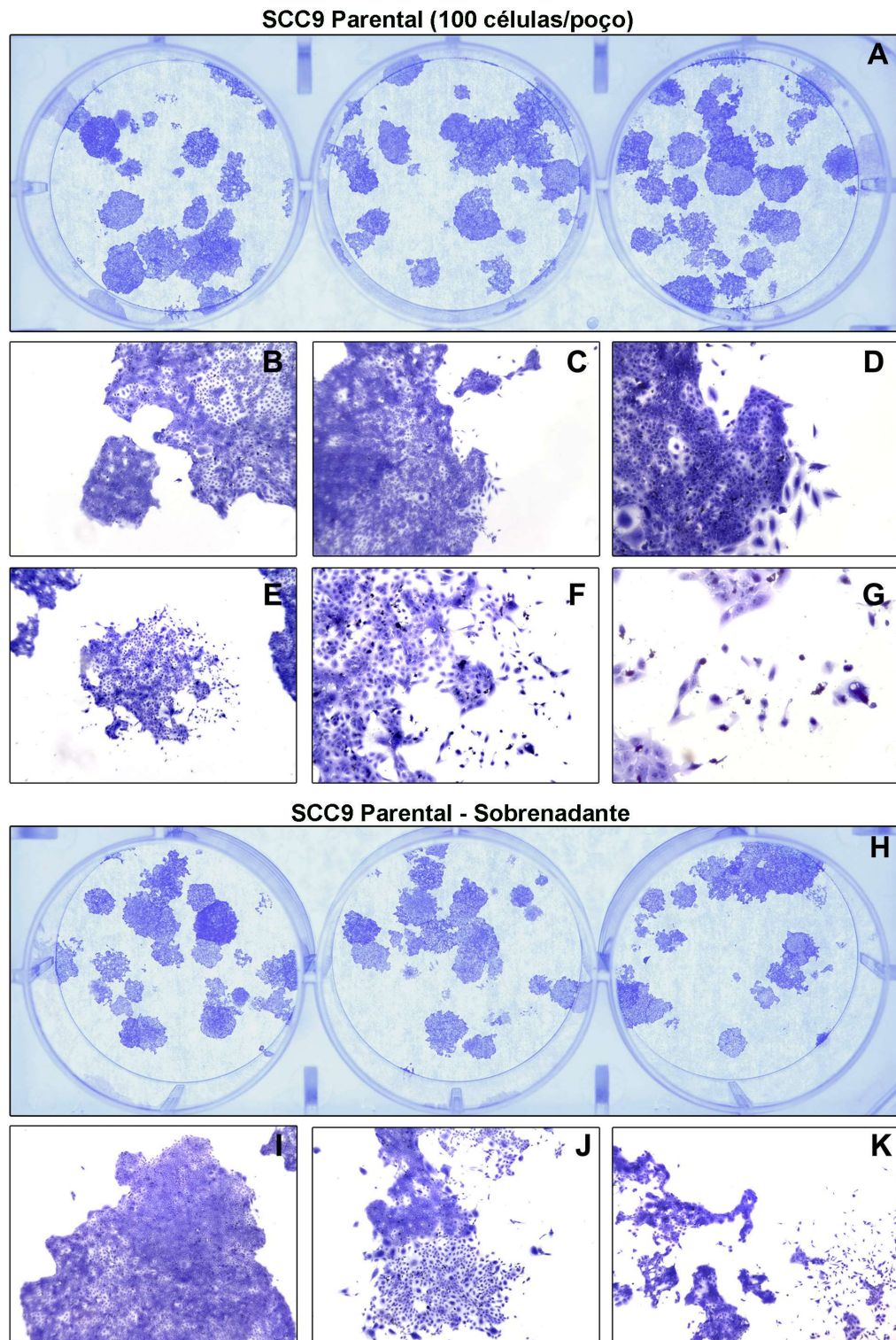


Figura 4 - Ensaio de unidades formadoras de colônias (UFC) da linhagem SCC9 parental. (A) Imagens e fotomicrografias representativas das colônias formadas pelas células plaqueadas na densidade de 100 células/poço, obtidas a partir das células aderidas (A-G) e das células coletadas do sobrenadante (H-K). Vista macroscópica da formação de UFC mostrando que as células aderidas (A) formaram colônias UFC igualmente às do sobrenadante (H). Fotomicrografias revelam agregados de morfologia epitelial (B, C, D e E) e por vezes com pleomorfismo e células satélites (F e G). Fotomicrografia das células do sobrenadante revelam a população de fenótipo epitelial predominante (I), com células arranjo mais frouxo (J) ou formando lençol (K).

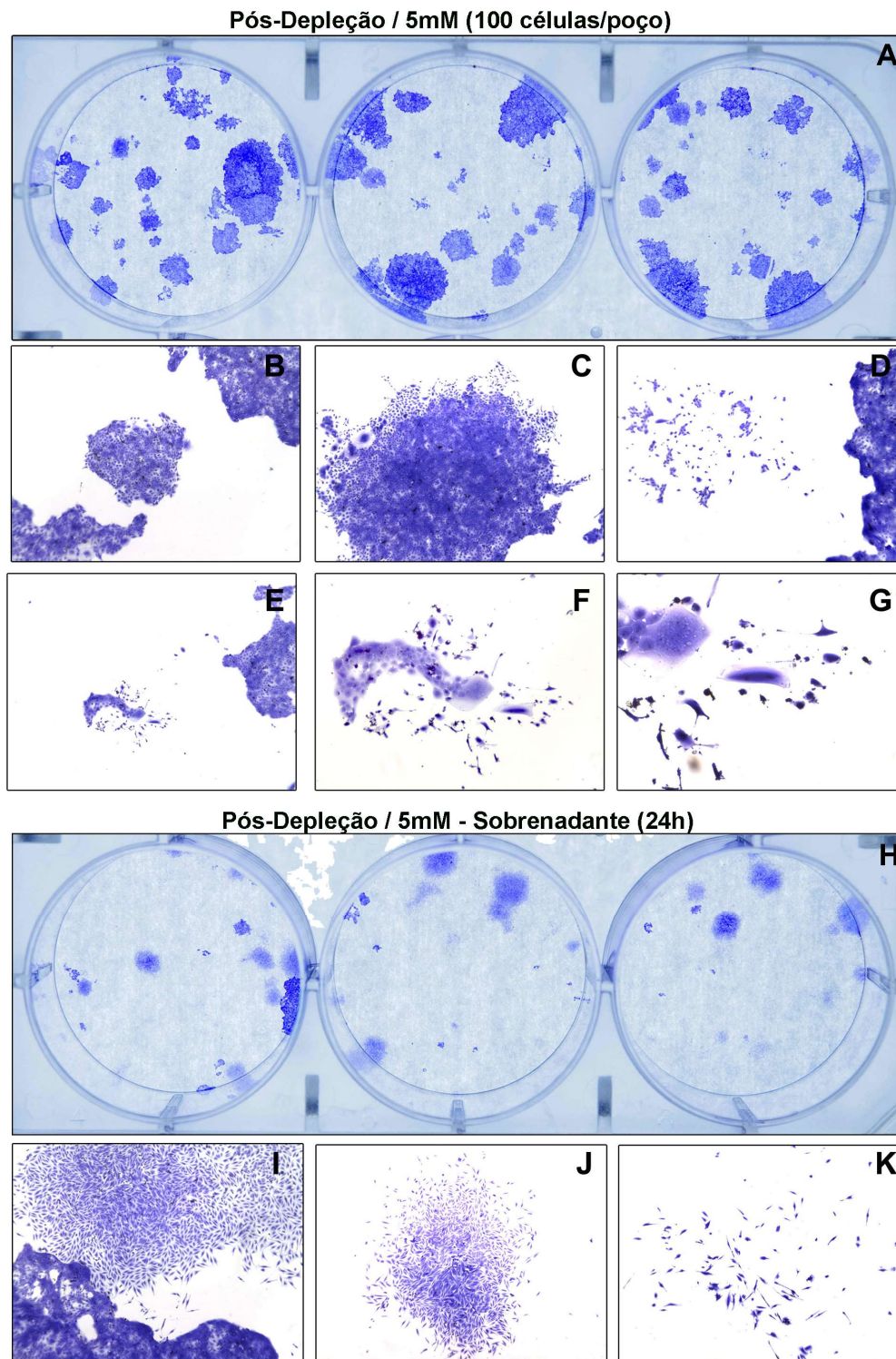


Figura 5- Ensaio de unidades formadoras de colônias (UFC) da linhagem SCC9 submetida a depleção de colesterol a 5mM de M β CD. (A) Imagens e fotomicrografias representativas das colônias formadas pelas células plaqueadas na densidade de 100 células/poço, obtidas a partir das células aderidas (A-G) e das células coletadas do sobrenadante (H-K). Vista macroscópica da formação de UFC mostrando que as células aderidas (A) formaram mais colônias UFC do que as do sobrenadante (H). Fotomicrografias revelam agregados de morfologia epitelial (B, C, D e E) e por vezes com intenso pleomorfismo e até de formato fusiforme (G). Fotomicrografia das células do sobrenadante revelam a população de fenótipo mesenquimal predominante (I, J e K) adjacente a colônias epiteliais (I).

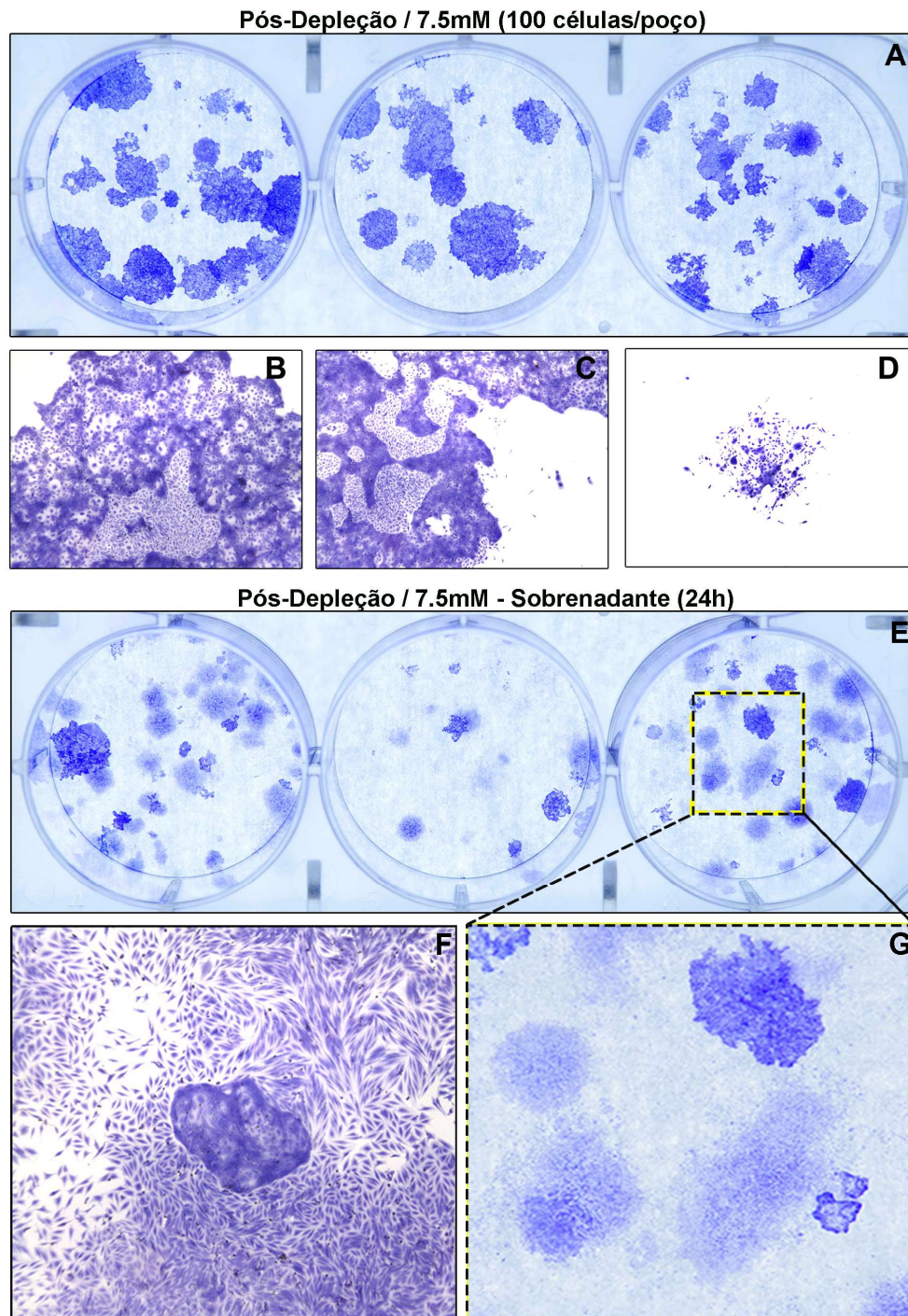


Figura 6- Ensaio de unidades formadoras de colônias (UFC) da linhagem SCC9 submetida a depleção de colesterol a 7,5mM de M β CD. (A) Imagens e fotomicrografias representativas das colônias formadas pelas células plaqueadas na densidade de 100 células/poço, obtidas a partir das células aderidas (A-D) e das células coletadas do sobrenadante (E-G). Vista macroscópica da formação de UFC mostrando que as células aderidas (A) formaram mais colônias UFC do que as do sobrenadante (E). Fotomicrografias revelam agregados de morfologia epitelial (B, C e D) formando cordões que se anastomosam, entremeados por células frouxamente arranjadas (B e C). Fotomicrografia das células do sobrenadante revelam a população de fenótipo mesenquimal exuberante (F), cujo epicentro emerge colônia epitelial.

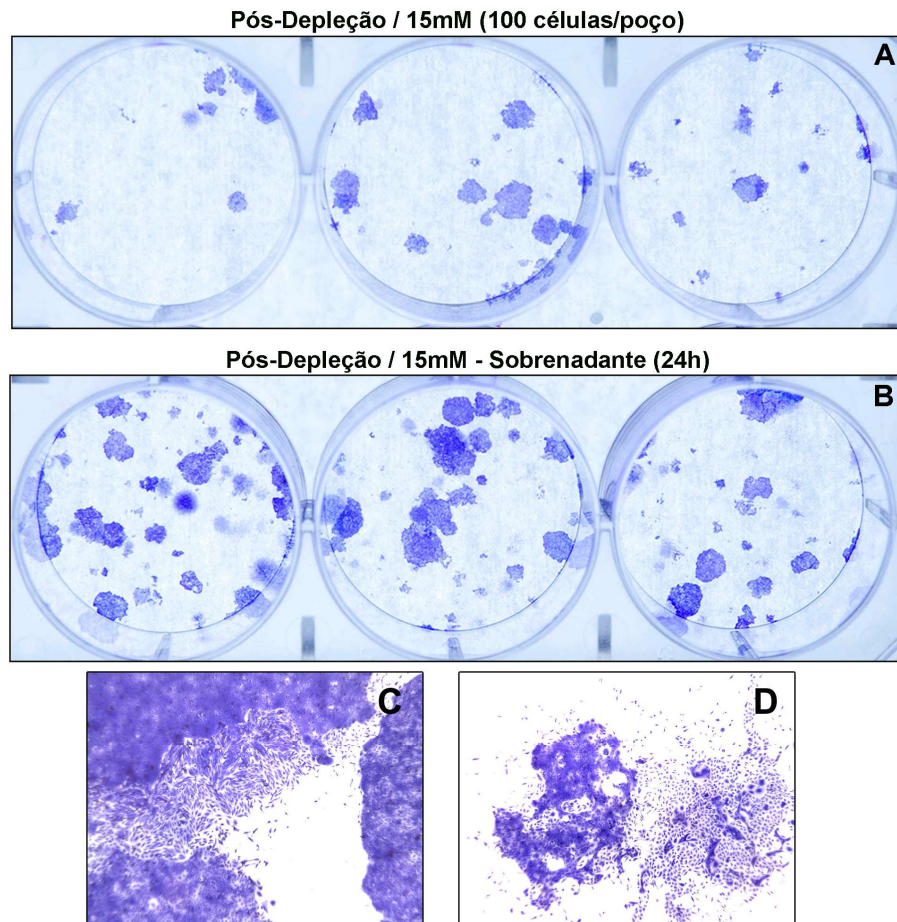


Figura 7- Ensaio de unidades formadoras de colônias (UFC) da linhagem SCC9 submetida a depleção de colesterol a 15mM de M β CD. (A) Imagens e fotomicrografias representativas das colônias formadas pelas células plaqueadas na densidade de 100 células/poço, obtidas a partir das células aderidas (A) e das células coletadas do sobrenadante (B-D). Vista macroscópica da formação de UFC mostrando que as células aderidas (A) formaram menos colônias UFC do que as do sobrenadante (B). Fotomicrografias revelam agregados de morfologia mista epitelial e mesenquimal (C e D).

5.3 TAXAS DE PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULARES

Avaliando as diferentes concentrações com relação aos diferentes tempos, em ambas as análises realizadas (contagem de células e MTT), a amostra relativa à parental (controle), apresentou o maior aumento da proliferação de forma linear nas análises realizadas através de MTT e um pico de proliferação no tempo de 72 h correspondente a cerca de 3 vezes mais que no período inicial na análise feita por contagem de células (curva de proliferação). Dentre as amostras tratadas, todas apresentaram proliferação inferior àquela observada na amostra parental, sendo que a relativa a 5mM de tratamento apresentou a maior proliferação e a relativa a 15mM apresentou a menor. A análise estatística apresentou diferença significativa com $p = 0,0028$.

Por meio do ensaio de MTT com M β CD, foi observada redução na viabilidade celular, de forma dose dependente, nas células tratadas quando comparadas às parentais. Ou seja, foi menor quanto maior a dose da substância administrada, em todos os tempos avaliados, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h (Gráfico 2). Houve significância estatística, com $p = 0,0177$.

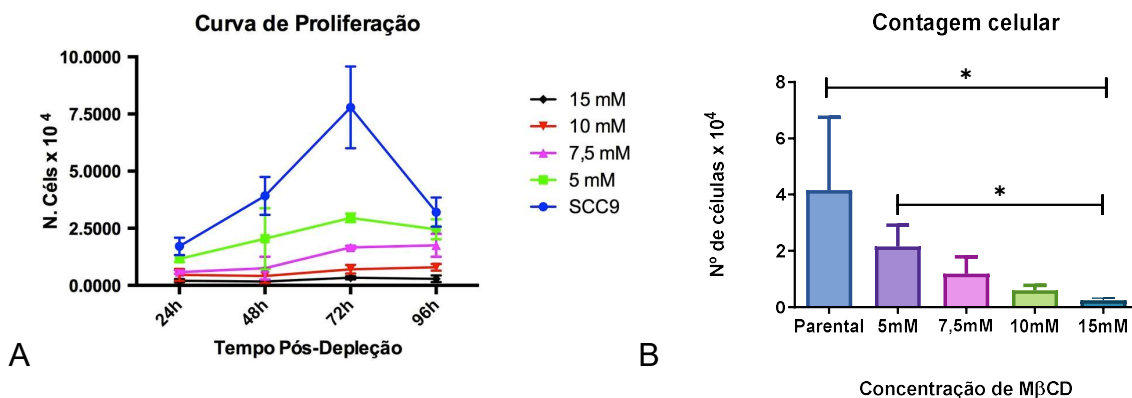


Gráfico 1: Curva de proliferação por contagem de células (A). Análise estatística One Way ANOVA, $p = 0,0028$ (B).

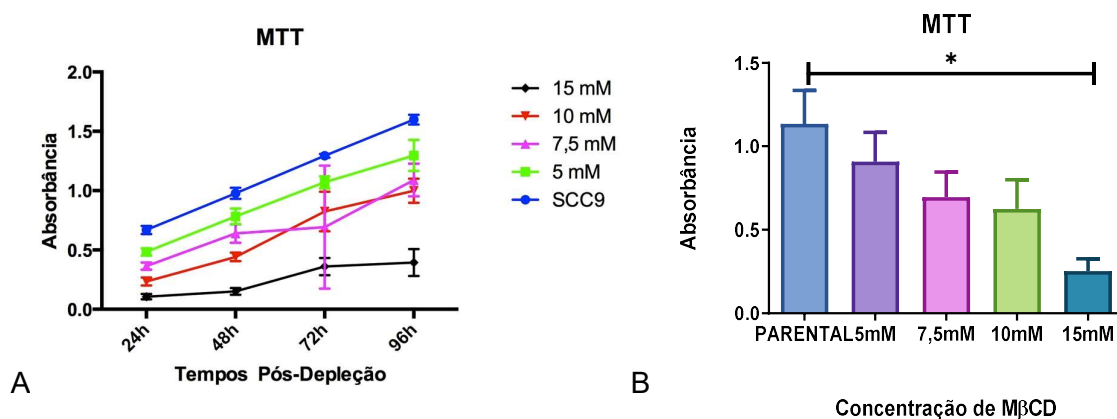


Gráfico 2: Curva de ensaio de MTT (A). Análise estatística One Way ANOVA, $p = 0,0177$ (B).

5.4 ENSAIO DE APOPTOSE

Os ensaios com Anexina V/FITC e DAPI foram utilizados para determinar a porcentagem de células apópticas em linhagem SCC9 submetida ao tratamento com MβCD. Os mesmos foram realizados em duplicata e analisados por citometria de fluxo, com resultados expressos em percentual, conforme Quadro 1. Células coradas positivamente para Anexina V/FITC e negativas para DAPI foram consideradas em apoptose em estágio precoce e apresentaram valores percentuais médios de 17,05% (células parentais), 19,55% (5 mM), 17,43% (7,5 mM), 11,54% (10 mM) e 6,41% (15 mM). Todavia, avaliando-se as células com coloração positiva para Anexina V/FITC e DAPI, simultaneamente, o que sugere os eventos de necrose ou apoptose tardia, observou-se um aumento dose dependente das taxas, com valores percentuais médios de 8,20% (células parentais), 4,31% (5 mM), 7,86% (7,5 mM), 25,35% (10 mM) e 49% (15 mM). A necrose isolada (células positivas para DAPI e negativas para Anexina V) foi observada em 0,43% das células parentais, 0,36%, 1,64%, 10,81% e 5,04%, respectivamente, nas células tratadas com MβCD nas diversas concentrações (5 mM, 7,5 mM, 10 mM e 15 mM). A viabilidade celular mostrou-se dependente da concentração de MβCD, diminuindo proporcionalmente com o aumento desta, exceto no grupo tratado com 5 mM, onde observou-se um discreto aumento médio de 1,45% da viabilidade quando comparado ao grupo parental.

As porcentagens das taxas foram submetidas à análise de variância One Way ANOVA, seguida do teste de Tukey (múltiplas comparações). Os resultados

percentuais de células positivas para Anexina V/FITC e DAPI, em necrose ou apoptose tardia, mostrou diferença estatisticamente significativa ($p= 0,0119$), conforme o gráfico 6. Não houve significância estatística ($p= 0,3627$) entre as taxas de necrose (células positivas para DAPI), vide gráfico 7. Entre as taxas de apoptose (células positivas para Anexina V/FITC), observou-se diferença estatística entre os grupos submetidos ao tratamento com M β CD a 5 mM e 15 mM (gráfico 8). Apesar de apenas 39,30% das células tratadas a 15 mM apresentarem-se viáveis, não houve diferença estatisticamente significativa ($p= 0,0528$) entre as amostras.

Quadro 1 – Dados percentuais, com média e desvio padrão, da análise por citometria de fluxo com marcação de Anexina V/FITC e DAPI em linhagem celular SCC9 tratada com M β CD nas concentrações 5 mM, 7,5 mM, 10 mM e 15 mM.

AMOSTRAS	NECROSE	MÉDIA	DP	ANEXINA	MÉDIA	DP	NEC/ANEX	MÉDIA	DP	VIÁVEL	MÉDIAS	DP
CONTROLE1	0,48%	0,43%	0,08%	17,10%	17,05%		9,21%	8,20%	1,02%	73,20%	74,30%	1,56%
CONTROLE2	0,37%			17,00%		0,05%	7,18%			75,40%		
5mM 1	0,40%	0,36%	0,06%	19,40%	19,55%		4,40%	4,31%	0,09%	75,80%	75,75%	0,07%
5 mM 2	0,31%			19,70%		0,15%	4,22%			75,70%		
7,5 mM 1	2,24%	1,64%	0,86%	17,40%	17,43%		9,36%	7,86%	1,51%	71,00%	73,10%	2,97%
7,5 mM 2	1,03%			17,45%		0,025%	6,35%			75,20%		
10 mM 1	2,72%	10,81%	11,44%	16,10%	11,54%		12,60%	25,35%	12,75%	68,20%	52,10%	22,77%
10 mM 2	18,90%			6,98%		4,56%	38,10%			36,00%		
15 mM 1	2,63%	5,04%	3,41%	7,64%	6,41%		49,40%	49,00%	0,40%	40,30%	39,30%	1,41%
15 mM 2	7,45%			5,18%		1,23%	48,60%			38,30%		

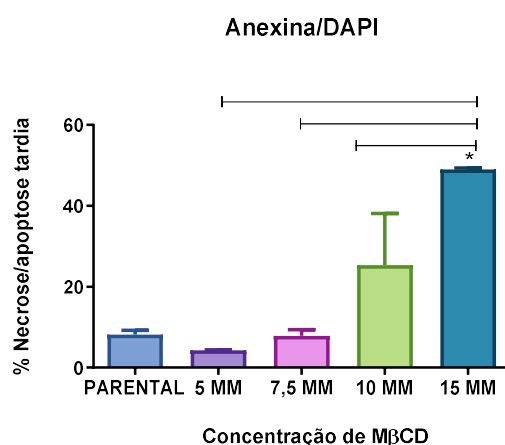


Gráfico 6 - Taxa de necrose/apoptose tardia (células positivas para Anexina/DAPI) nas amostras parentais e tratadas com M β CD concentrações de 5 mM, 7,5 mM, 10 mM e 15 mM, em duplicata. Análise de variância One Way (ANOVA) e Teste de Tukey, $P= 0,0119$.

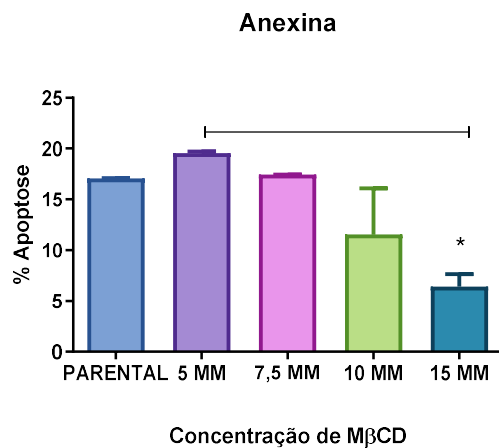


Gráfico 7 - Taxa de apoptose (células positivas para Anexina/FITC) nas amostras parentais e tratadas com MβCD concentrações de 5 mM, 7,5 mM, 10 mM e 15 mM, em duplicata. Análise de variância One Way (ANOVA) e Teste de Tukey, P= 0,0331.

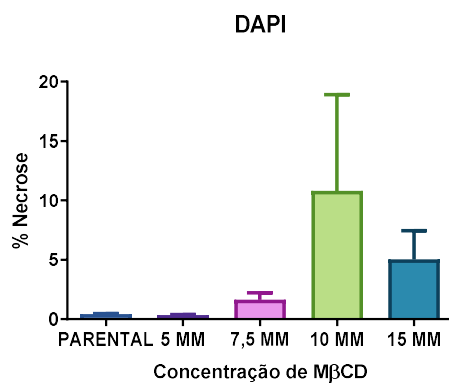


Gráfico 8 - Taxa de necrose (células positivas para DAPI) nas amostras parentais e tratadas com MβCD concentrações de 5 mM, 7,5 mM, 10 mM e 15 mM, em duplicata. Análise de variância One Way (ANOVA) e Teste de Tukey, P= 0,3627.

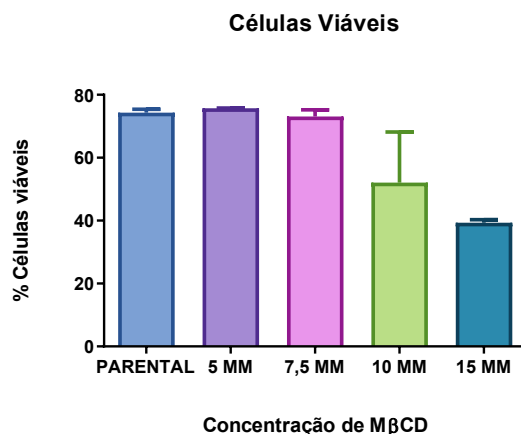


Gráfico 9. Taxa de células viáveis (negativas para Anexina/FITC e DAPI) nas amostras parentais e tratadas com MβCD concentrações de 5 mM, 7,5 mM, 10 mM e 15 mM, em duplicata. Análise de variância One Way (ANOVA) e Teste de Tukey, P= 0,0528.

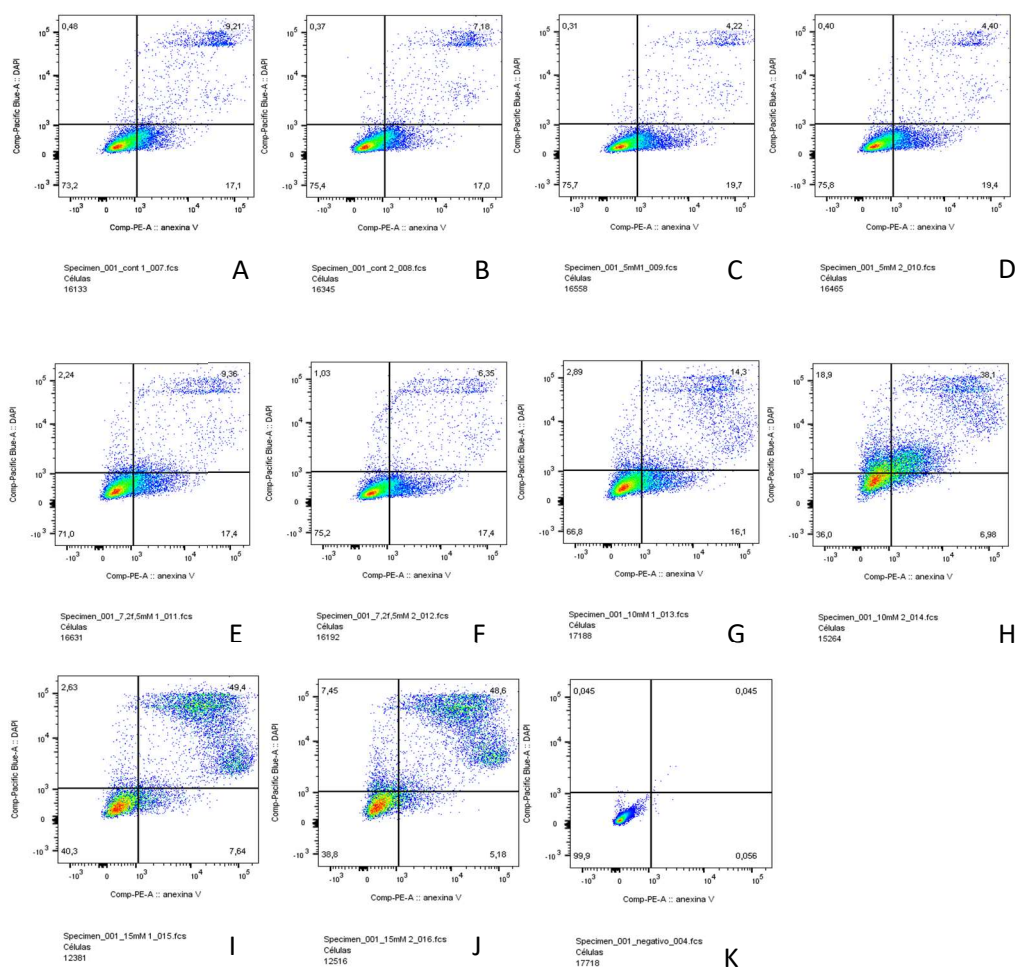


Figura 8 - Gráficos Dotplot da análise de apoptose com Anexina V-FITC/DAPI, por citometria de fluxo, da linhagem SCC9 submetida a depleção de colesterol com MβCD. Duplicata parentais 1 e 2 (A e B), Amostras em duplicata 1 e 2 tratadas com MβCD 5 mM (C e D); 7,5 mM (E e F); 10 mM (G e H); 15 mM (I e J), controle negativo (K).

5.5 ENSAIO TAQMAN RT-QPCR

A expressão gênica foi determinada através de experimento de TaqMan RT-qPCR das linhagens celulares SCC9 tratadas com M β CD a 5mM, 7,5mM, 10mM e 15mM no tempo de 24h em relação à SCC9 parental, utilizada como calibradora.

A análise da expressão de transcritos de *CAV-1* revelou a expressão gênica aumentada nas SCC9 tratadas, em triplicata, no período de 24 horas em diferentes concentrações de M β CD: 5mM. (Média=-:0,88 e Desvio Padrão= 0,3), 7,5mM (Média=1,25 e DP= 0,83), 10mM (Média= 0,75 e DP= 0,21) e 15mM (Média= 0,27 e DP= 0,21), em relação SCC9 parental, utilizada como calibradora (Gráfico 3). Os valores das médias de expressão nas diferentes concentrações, no período de 24 horas, foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis e pelo pós-teste múltiplo de Dunn, revelando-se diferença estatisticamente significativa ($p=0,0004$) entre os grupos, especificamente entre as concentrações de 5mM e 7,5mM.

A análise da expressão de transcritos de *CAV-2* também revelou a expressão gênica aumentada nas SCC9 tratadas, em triplicata, no período de 24 horas em diferentes concentrações de M β CD: 5mM. (Média=-:1,15 e Desvio Padrão= 0,17), 7,5mM (Média=1,35 e DP= 1,26), 10mM (Média= 0,69 e DP= 0,51) e 15mM (Média= 0,24 e DP= 0,64), em relação SCC9 parental, utilizada como calibradora (Gráfico 4). Os valores das médias de expressão nas diferentes concentrações, no período de 24 horas, foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis, não havendo diferença estatisticamente significativa ($p=1,002$) entre os grupos.

A expressão gênica de Cav-3 foi negativa para as amostras estudadas.

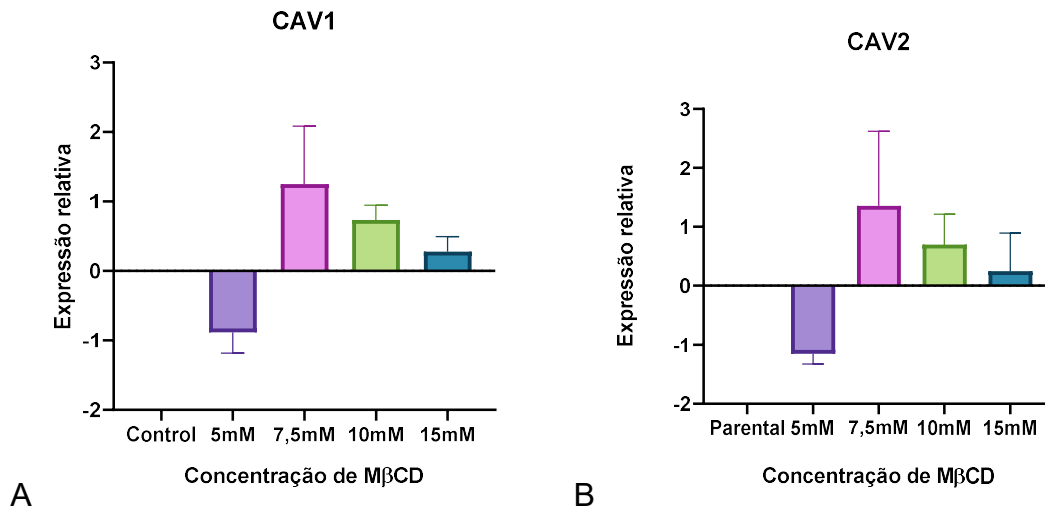


Gráfico 3: A - Expressão gênica de CAV1 em linhagem SCC-9 em diferentes concentrações após 24h de tratamento com o MβCD. Análise Kruskal-Wallis - Ensaio TaqMan RT-qPCR. B - Expressão gênica de CAV2 em linhagem SCC-9 em diferentes concentrações após 24h de tratamento com o MβCD. Análise Kruskal-Wallis - Ensaio TaqMan RT-qPCR.

A associação entre a expressão de transcritos de CAV1 e CAV2 foi analisada pelo teste de Mann-Whitney, com média (0,34) e DP (0,91) para CAV1 e média (0,28) e de DP (1,06) para CAV2, não sendo detectadas diferenças estatisticamente significativas entre ambas, como demonstrado no Gráfico 5.

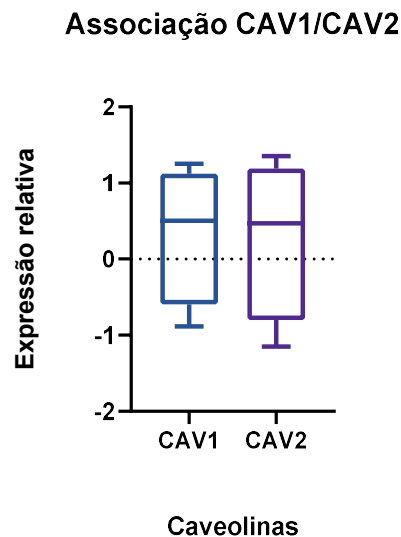


Gráfico 5: Expressão gênica diferencial de CAV1 e CAV2 em linhagem SCC-9 em diferentes concentrações após 24h de tratamento com o MβCD. Análise de Mann-Whitney

5.5. ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA

5.5.1. Western-Blotting

A expressão proteica de Cav-1 em células de linhagem SCC9 parentais e submetidas à depleção de colesterol com M β CD a 5 mM, 7,5 mM e 10 mM, em três tempos experimentais (24h, 48h e 72h), foi analisada por meio do software ImageJ® (NIH, EUA). Os valores obtidos foram normalizados com os valores da expressão de β -actina, apresentando, a razão desta expressão normalizada, os seguintes valores: 24 horas (Parental=1,0; 5 mM= 5,44; 7,5 mM= 2,47; 10 mM= 1,17), 48 horas (Parental=1,0; 5 mM= 5,59; 7,5 mM= 1,81; 10 mM= 2,47) e 72 horas (Parental=1,0; 5 mM= 4,94; 7,5 mM= 2,58; 10 mM= 2,25) . Todos os grupos de células tratadas apresentaram aumento na expressão de Cav-1 quando comparadas às células parentais. Todavia, submetidos os resultados ao teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn, apenas nos grupos tratados com M β CD a 5mM, observou-se diferença estatisticamente significativa ($p= 0,02$) (Figura 9).

A expressão proteica de Cav-2 e -3 não alcançou êxito na normalização dos experimentos realizados.

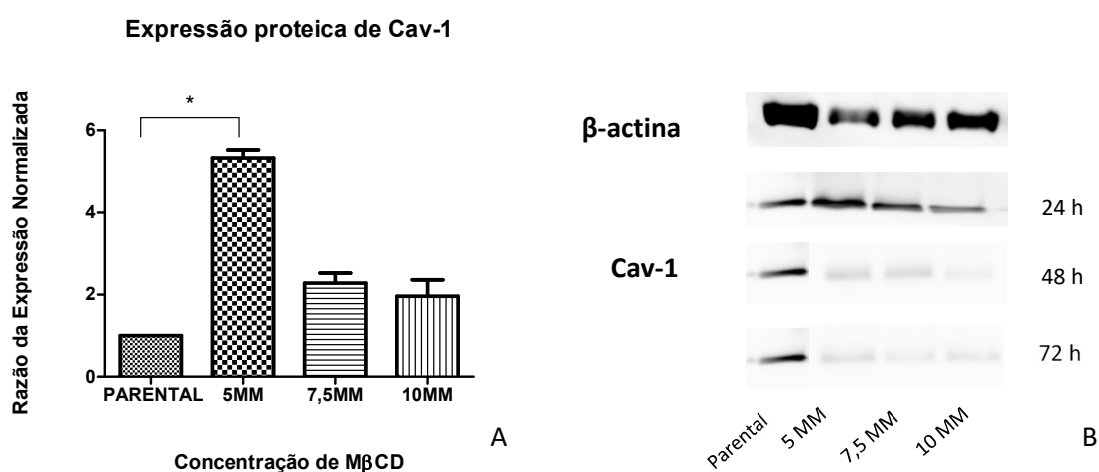


Figura 9. Distribuição dos valores de expressão proteica de Cav-1 nas células SCC-9 parentais e tratadas com M β CD em diferentes concentrações (5mM, 7,5 mM e 10mM). Teste de Kruskal-Wallis ($p= 0,02$) (A). *Western-blotting* realizado com proteínas extraídas das células SCC9, utilizando-se anticorpo específico para Cav-1 e β -actina. Pode-se observar variação da expressão de proteína Cav-1 nas linhagens SCC-9 parental e tratadas, em referência ao anticorpo contra β -actina.

5.5.2 Imunofluorescência

Na análise da imunomarcação de Cav-1, observou-se um padrão de IF pontilhado membranar na SCC-9 parental um dia após a depleção, além de marcação citoplasmática glanular (Figura 10A). Nas células tratadas com M β CD, em diferentes concentrações (5mM, 7,5 mM e 10mM), notou-se menor intensidade de marcação citoplasmática e membranar (Figura 10B, C e D respectivamente). Por vezes, a SCC-9 tratada a 10 mM exibiu marcação nuclear (Figura 10 D).

Assim como na análise por WB, IF da proteína Cav-2 não alcançou êxito nas tentativas de padronização do anticorpo, sendo atingida a diluição máxima recomendada de 1:50.

A expressão proteica de Cav-3 por IF revelou padrão de expressão similar na SCC9 parental (Figura 11A), em relação as amostras tratadas a 5mM, 7,5mM e 10mM (Figura 11 B, C e D respectivamente), caracterizado por discreta expressão citoplasmática e eventual marcação nuclear.

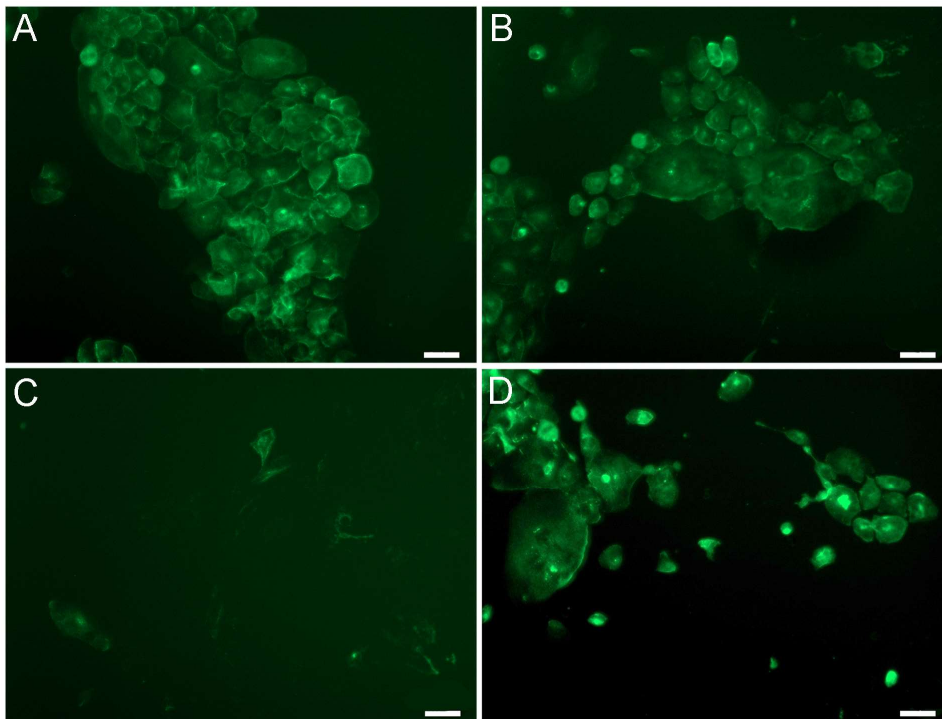


Figura 10: Fotomicrografia da imunomarcção de Cav-1 por imunofluorescência da linhagem SCC-9 parental (A) e nas concentrações de 5mM, 7,5mM e 10mM após 24h de tratamento com o M β CD (B, C e D, respectivamente).

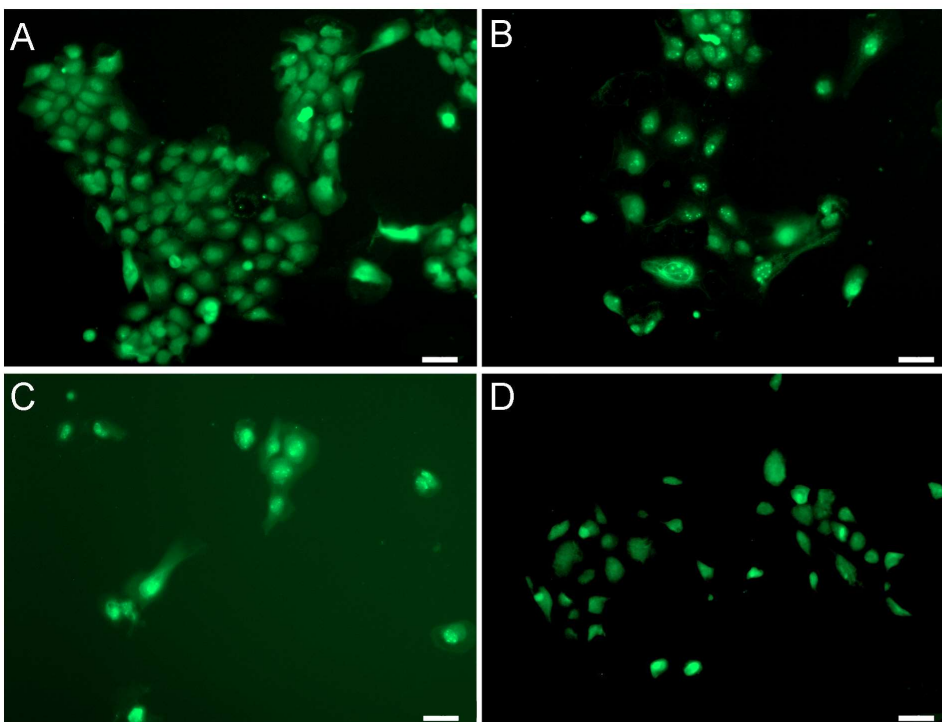


Figura 11: Fotomicrografia da imunomarcção de Cav-3 por imunofluorescência da linhagem SCC-9 parental (A) e nas concentrações de 5mM, 7,5mM e 10mM após 24h de tratamento com o M β CD (B, C e D, respectivamente).

6 DISCUSSÃO

Componente de suma importância das balsas lipídicas, em especial das cavéolas, o colesterol vem sendo objeto de manipulação em diversos estudos com células neoplásicas, peculiarmente por sua maior concentração nestas quando comparado a células normais (SHARMA *et al*, 2019; BADANA *et al*, 2016). Dentre as metodologias estudadas, destaca-se a depleção do colesterol pela M β CD, uma vez que esta, ao formar complexos de inclusões específicos com o mesmo, apresenta mínima interação com os demais lipídios da MP. (GARCIA *et al*, 2019; SOHN *et al*, 2018; PORTILHO *et al*, 2012). O presente trabalho propôs-se a analisar o efeito da depleção de colesterol na expressão das caveolinas em linhagem celular de carcinoma epidermóide de boca. Após o tratamento das células com M β CD, em variadas concentrações, modificações nos parâmetros celulares avaliados foram observadas. Alterações nas expressões gênica e proteica das caveolinas 1 e 2, e na imunolocalização das Cav-1 e -3 foram observadas, demonstrando assim que a modulação do colesterol interfere na expressão de Cav-1 e -2.

A análise da morfologia celular de linhagem de CEB revelou, em nossos resultados, um aspecto poliédrico na linhagem SCC9 parental, enquanto que as células SCC9 tratadas com M β CD após 24h assumiram uma morfologia de fusiforme a fibroblastoide, em conformidade com o aumento progressivo da concentração de M β CD em 5mM, 7,5 mM, 10mM e 15mM. Além disso, de acordo com o aumento da concentração de M β CD, outras células passaram a adquirir um aspecto ovoide e destacaram-se das placas. Possivelmente, este comportamento está relacionado à morte celular por apoptose devido à perda de adesão de celular, como consequência da exposição ao depletor de colesterol. Este último achado corrobora com o estudo de Li e colaboradores (2006) no qual células de Carcinoma Epidermóide Humano (A431) foram tratadas com 5 mM de M β CD, observando-se que estas alteraram seu formato de espalhado para arredondado, destacando-se da placa 6h após o tratamento, e constataram apoptose devido à perda de adesão (Anoikis). No mesmo estudo, os autores relacionaram a alteração na morfologia à alteração da organização do citoesqueleto de actina e foram capazes de reverter tais alterações com o restabelecimento do colesterol. Resultados semelhantes após repleção do

colesterol foram obtidos por Park e colaboradores (2009). Adicionalmente, os autores atribuíram as alterações ao tempo de tratamento.

Vale ressaltar que esses achados também foram observados em linhagens celulares distintas. Em estudo recente realizado por Zhang e colaboradores (2019), a M β CD foi utilizada, em duas concentrações (5mM e 10mM) em fibroblastos de ovário Hamster chinês (CHO-K1). Por meio de microscopia de força atômica, os autores observaram um padrão de retração celular nas células tratadas, bem como destacamento das mesmas da placa, sugerindo a perda de adesão celular. Este mesmo padrão de retração celular e destacamento das placas foi observado por Guerra e colaboradores (2016) em linhagem celular de câncer de mama MDA-MB 231.

No presente trabalho, as amostras tratadas com maiores concentrações de M β CD, 10mM e 15mM exibiram células com prolongamentos citoplasmáticos aumentados e aspecto amebóide foram observadas. De acordo com Ladani e colaboradores (2011), células de fenótipo mesenquimal presentes no processo de TEM podem exibir aspecto amebóide, deslocando-se com maior velocidade e apresentando variações morfológicas durante o movimento. Tal característica confere às mesmas elevada capacidade de migração e invasão e, conseqüentemente, poder de metástase. Segundo Liu e colaboradores (2015) células neoplásicas de fenótipo mesenquimal podem, sob condições de baixa adesão e forte confinamento, adquirir um fenótipo de aspecto amebóide que lhes permite rápido e espontâneo deslocamento da área do tumor primário.

O caráter invasivo e agressivo do CECP, além de seu elevado potencial metastático, está associado à ativação da motilidade mesenquimal e amebóide de suas células (KAKURINA *et al*, 2018). As alterações no fenótipo epitelial de células poliédricas e unidas, para um fenótipo fusiforme, menos diferenciado, é compatível com maior agressividade tumoral (MASUELLI *et al*, 2012). Assim, a alterações morfológicas observadas no fenótipo celular da linhagem de CEB estudada (SCC9) sugerem a capacidade da depleção de colesterol por M β CD de induzir a TEM. Foi possível detectar uma população de células do sobrenadante pós-depleção que aparentam exibir maior potencial ativado de TEM, devido a alternância de fenótipo observada, além da presença do fenótipo

amebóide.

Apesar de realizado em linhagem celulares de tecidos distintos, nossos resultados corroboram com os encontrados por Sharma e colaboradores (2019), no qual a depleção de colesterol com M β CD, em variadas e crescentes concentrações, promoveu diminuição da viabilidade celular, aumento da migração e indução de TEM em células de câncer de mama humano. O tratamento das amostras celulares, também de câncer de mama, com M β CD, em diferentes concentrações, promoveu alterações na morfologia e na viabilidade celular, avaliada por ensaio de MTT, observando-se redução da mesma na concentração de 10mM, não havendo alterações na viabilidade em menores concentrações (LI et al, 2006). Nossos resultados, todavia, exibem alterações dose-dependentes na viabilidade celular desde a concentração de 5mM, tanto no ensaio de viabilidade por MTT, quanto da análise da viabilidade pelo ensaio de apoptose Anexina V/FITC e DAPI.

Diversas concentrações de M β CD vem sendo empregadas na literatura recente, avaliando citotoxicidade, efeitos sobre a viabilidade e proliferação celulares, e indução de apoptose. Badana e colaboradores (2016) observaram, em estudo com linhagens celulares de câncer de mama humano, menores taxas de proliferação e migração, e maior índice de apoptose, após a depleção de colesterol com M β CD a 0.5 mM por 48 horas. Tais achados corroboram com os do presente estudo, com redução na proliferação celular, na formação de colônia, bem como na viabilidade celular, associado ao aumento da concentração de M β CD, a despeito da linhagem celular. Salienta-se que as nossas amostras tratadas com M β CD a 15mM apresentaram redução significativa na viabilidade celular nos ensaios por MTT e uma tendência significativa no percentual de células viáveis no ensaio de apoptose.

Sohn e colaboradores (2018) listaram as condições ideais de depleção de colesterol por M β CD em células tronco mesenquimais humanas, evidenciando que o tratamento com na concentração de 10mM diminuiu em torno de 50% o colesterol da MP. Contudo, o grau de depleção varia também de acordo com a concentração, tempo de incubação, a temperatura e o tipo celular.

Devido à importante participação do colesterol na sinalização celular, particularmente na morte celular por apoptose, autores como Onodera e colaboradores (2013) avaliaram a ação da M β CD na aceleração deste processo de morte celular como uma das estratégias de terapia antitumoral. De acordo com os achados de Li e colaboradores (2006), células neoplásicas, que apresentam maior número de cavéolas, são mais sensíveis à morte por depleção de colesterol. A M β CD vem sendo amplamente estudada associada drogas antineoplásicas, no intuito de promover apoptose celular em células tumorais de forma específica (YAMAGUCHI *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2018).

Durante o processo de apoptose, ocorrem diversos eventos bioquímicos, fundamentalmente ligados a ativação de caspases, que promovem alterações moleculares e estruturais nas células. Liberação de citocromo-c mitocondrial para o citoplasma, inversão da fosfatidilserina, presente no interior da MP, para o meio extracelular e danos na membrana nuclear (MN) com liberação de material genético, estão dentre os eventos decorrentes da ativação de uma das vias de apoptose. (LI *et al.*, 2006; YAMAGUCHI, PERKINS e HIROTA, 2015; RATHORE *et al.*, 2017).

A apoptose precoce está associada a alterações, inclusive perda, no potencial da membrana mitocondrial, além da translocação da fosfatidilserina da MP. Tais eventos podem ser identificados por meio de ensaios colorimétricos, utilizando-se, respectivamente, JC-1 (corante seletivo para mitocôndrias) e Anexina V, que se liga à fosfatidilserina. Danos na MP e MN promovem a exposição de material genético, indicativos de apoptose tardia ou necrose celular. A identificação destas entidades de morte celular pode ser realizada por meio de corantes específicos como o iodeto de propídio (IP) e o DAPI (4'6'-diamino-2-phenylindole), que possui forte afinidade a regiões do DNA ricas em adenina e timina. (BRENTNAL *et al.*, 2013; RATHORE *et al.*, 2017).

Estudos como o de Onodera e colaboradores (2013), nos quais avalia-se o efeito da depleção de colesterol em linhagens de CEB, são escassos. Esses autores utilizaram a M β CD na concentração de 20 mM, em distintas linhagens de células neoplásicas, dentre estas células KB de CEB humano, e observaram a associação de citotoxicidade celular à capacidade de depleção de colesterol,

bem como a indução de apoptose celular. Nos ensaios de apoptose realizados em nosso trabalho, observamos que o tratamento das células com M β CD não parece estar associado à morte celular por apoptose precoce. Todavia, as taxas mais elevadas de células coradas por Anexina V/FITC e DAPI simultaneamente, atingido até 49% na concentração de 15 mM, sugerem que o agente depletor de colesterol utilizado está relacionado à morte celular por apoptose tardia.

Tais resultados corroboram com os encontrados por Li e colaboradores (2006), onde foram observados os fenômenos de apoptose precoce e tardia associados ao tratamento com M β CD (5mM) em linhagem de carcinoma epidermóide A431. Todavia, apesar de corresponder a carcinoma epidermóide humano, tal linhagem não representa células de câncer de boca. Adicionalmente, a M β CD na concentração de 5 mM foi utilizada por Park e colaboradores (2009) em linhagem de carcinoma epidermóide humano (A431). Os autores observaram a indução de apoptose relacionada com perda de adesão (Anoikis) associada à internalização das cavéolas.

Estudo realizado por Jung e colaboradores (2015) em linhagem celular de CECF relatou alteração de formato cuboide das mesmas para um aspecto fibroblástico, associado a uma diminuição na expressão de Cav-1, conforme nossos resultados, onde tais alterações na morfologia celular, com a depleção de colesterol, encontram-se associadas à diminuição na expressão gênica (CAV-1 e -2) e proteica (Cav-1) das caveolinas. Os autores ainda verificaram aumento na expressão de marcadores da TEM, tais como Snail, Slug, E-caderina associados à redução na expressão de Cav-1, sugerindo, inclusive, que a ausência de Cav-1 induz as células ao processo de TEM. O presente trabalho é integrante de um macroprojeto de pesquisa onde marcadores da TEM (Snail, Slug, E-caderina, N-caderina, Vimentina e β -catenina) vêm sendo estudados, nos mesmos moldes apresentados para as caveolinas, de modo a melhor embasar os achados morfológicos que sugerem a indução da TEM em linhagem celular SCC-9, por meio da depleção de colesterol por M β CD, e a participação das caveolinas neste processo.

O papel bifásico da Cav-1 na carcinogênese oral foi sugerido pela primeira vez em 2003 por Hung e colaboradores. No estudo, os autores observaram

aumento progressivo na expressão proteica de Cav-1 em amostras de mucosa normal, lesões orais potencialmente malignas, CEB primário e CEB metastático, sugerindo a associação deste aumento ao envolvimento linfonodal. Em nosso estudo, as expressões gênica e proteica de Cav-1 e -2 apresentaram-se aumentadas nas células submetidas à ação da M β CD, quando comparadas às amostras parentais. Tal aumento na expressão, associado às alterações fenotípicas, sugestivas de um perfil TEM ativado, sugere um papel promotor tumoral das caveolinas. Apesar de avaliarmos o efeito da depleção de colesterol em diferentes concentrações de M β CD, nossos resultados referem-se a comparação entre as células tratadas e as parentais. Em continuidade a este trabalho, objetivamos contribuir com pesquisas comparativas da expressão de caveolinas em queratinócitos de mucosa oral normal.

A expressão aumentada de CAV1 foi observada em estudo realizado por Auzair e colaboradores (2016) em células de CEB e mucosa normal, indicando sua participação na tumorigênese. Os autores observaram a ausência de associação da expressão de CAV1 com parâmetros clinicopatológicos, porém verificaram que o aumento da mesma estava associado a pobres prognósticos. A expressão de Cav-1 e -2 em células tumorais e CAFs tem sido associada a agressividade tumoral em diversas neoplasias epiteliais (Liu *et al*, 2014; Nwosu *et al*, 2016; Gertensberguer *et al*, 2018). Os resultados obtidos por Gertensberguer e colaboradores (2018), todavia, foram muito heterogêneos e, portanto, os autores não encontraram associação entre a expressão destas duas proteínas e parâmetros clínicos. A expressão reduzida encontrada em estroma linfonodal, todavia foi relatada pelos autores com ausência de associação com prognósticos sombrios, contrariando os resultados obtidos por Auzair e colaboradores (2016) em CEB.

Em recente estudo clínico, Zorrilla e colaboradores (2019) avaliaram a correlação entre os níveis plasmáticos de exossomos de Cav-1 (EXO-CAV1) em pacientes com CEB em estágio T4, sem metástase. Os níveis plasmáticos de EXO-CAV1 apresentaram-se maiores após o tratamento cirúrgico. Maiores taxas de EXO-CAV1, por sua vez foram associadas a menores taxas de sobrevida. O acúmulo de Cav-1 em MAT de CEB foi estudado por Vered e colaboradores (2015), onde os autores verificaram a associação de elevação do mesmo a

pobres prognósticos. A expressão da Cav-1 como biomarcador tumoral apresenta-se, neste cenário, com maiores possibilidades além da sua expressão restrita ao compartimento celular.

Em se tratando da imunolocalização das caveolinas nas células SCC-9, foi analisada no presente estudo por IF, observando-se marcação citoplasmática e membranar para a Cav-1. Tal resultado corrobora com os achados de Auzair e colaboradores (2016) e Hung e colaboradores (2003). Quanto às discretas marcações para Cav-3 em citoplasma e núcleo encontradas no presente estudo, não foram encontrados resultados comparativos na literatura de CEB. A avaliação da imunolocalização tecidual e no MAT não foi realizada, sendo portanto uma possibilidade para novos estudos.

O caráter agressivo do CEB, somado à ausência de ferramentas que auxiliem no seu diagnóstico precoce, tornam o tratamento desta neoplasia, na maioria das vezes, mutilador. Consequentemente, compromete-se a qualidade de vida dos pacientes e de seus familiares, uma vez que o impacto de tratamentos desta natureza na reinserção social e profissional possui magnitude significativa. A identificação de moléculas capazes de permitir a detecção de desordem oral potencial maligna e de carcinoma *in situ* em seus estágios iniciais, e sua validação como biomarcadores, torna-se cada vez mais urgente e crucial.

Conforme observado em recente revisão da literatura, escassas são as publicações acerca da expressão de caveolinas em CEB. Até o presente momento, apesar de as Cav-1 e -2 apresentarem-se como biomarcadores de diagnóstico e prognóstico nas diversas neoplasias, apenas publicações sobre a participação da Cav-1 na carcinogênese bucal encontram-se disponíveis.

A modulação da estrutura caveolar, por meio da depleção de colesterol com M β CD, apresentou impactos na expressão das caveolinas e nos parâmetros celulares da linhagem de CEB estudada (SCC-9). O tratamento com a substância depletora promoveu aumento das expressões gênica (Cav-1) e proteica (CAV-1 e -2), com subsequente redução dose-dependente nas diferentes concentrações; diminuição do percentual de células aderidas e aumento do de células sobrenadantes; além de modificações na morfologia celular, sugerindo um perfil TEM ativado. Promoveu, ainda, redução na

proliferação e viabilidade celulares, de maneira dose-dependente; além de elevação das taxas de apoptose tardia. Sugere-se, assim, a modulação do colesterol como um mecanismo consentâneo para o estudo das caveolinas na patogênese do CEB e sua possível participação no processo de TEM. Estudos longitudinais de validação clínica das caveolinas como biomarcadores de diagnóstico e prognósticos são de suma importância para o incremento na qualidade de vida dos pacientes acometidos com o câncer de boca.

7 CONCLUSÃO

Por meio do presente trabalho, concluiu-se que o tratamento das células com M β CD, em variadas concentrações, altera as expressões gênica e proteica das caveolinas 1 e 2, e interfere na imunolocalização das Cav-1 e -3. Ainda, pode-se concluir que:

- A depleção de colesterol aumentou a expressão gênica e proteica de caveolinas 1 e 2 da SCC9, em relação a parental, com diminuição dos níveis de expressão de forma dose-dependente de M β CD;

- A depleção de colesterol modificou a morfologia da SCC9 com o aumento a concentração de M β CD, com ganho de aspecto fibroblastoide e ameboide;

- A depleção de colesterol diminuiu o percentual de células SCC9 aderidas e aumenta o percentual de células SCC9 flutuantes de forma dose-dependente de M β CD;

- A depleção de colesterol diminuiu a proliferação e viabilidade celular das SCC9 de forma dose-dependente de M β CD;

- A depleção de colesterol diminuiu a apoptose precoce e aumentou apoptose tardia das SCC9 de forma dose-dependente de M β CD.

REFERÊNCIAS

de ALMEIDA CJG. Caveolin-1 and Caveolin-2 can be antagonistic partners in inflammation and beyond. *Front Immunol.* 2017;8(NOV):1-15. doi:10.3389/fimmu.2017.01530

ANANTHI S, LAKSHMI CNP, ATMIKA P, ANBARASU K, MAHALINGAM S. Global Quantitative Proteomics reveal Deregulation of Cytoskeletal and Apoptotic Signalling Proteins in Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma. *Sci Rep.* 2018;8(1):1-13. doi:10.1038/s41598-018-19937-

ANDO T, ISHIGURO H, KIMURA M, MITSUI A, MORI Y, SUGITO N, TOMODA K, MORI R, HARADA K, KATADA T, OGAWA R, FUJII Y, KUWABARA Y. The overexpression of caveolin-1 and caveolin-2 correlates with a poor prognosis and tumor progression in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2007 Sep;18(3):601-9

ARIANA M, ARABI N, PORNOUR M, ET AL. The diversity in the expression profile of caveolin II transcripts, considering its new transcript in breast cancer. *J Cell Biochem.* 2018;119(2):2168-2178. doi:10.1002/jcb.26378

AUZAIR, L.B., VINCENT-CHONG, V.K., GHANI, W.M, KALLARAKKAL, T.G, RAMANATHAN, A, LEE, C.E, RAHMAN, Z.A, ISMAIL SM, ABRAHAM MT, ZAIN RB. Caveolin 1 (Cav-1) and actin-related protein 2/3 complex, subunit 1B (ARPC1B) expressions as prognostic indicators for oral squamous cell carcinoma (OSCC). *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2016 Jul;273(7):1885-93.

BADANA, A., CHINTALA, M., VARIKUTI, G., PUDI, N., KUMARI, S., KAPPALA, V. R., e MALLA, R. R. (2016). Lipid Raft Integrity Is Required for Survival of Triple Negative Breast Cancer Cells. *Journal of Breast Cancer.* 2016 19(4), 372.

BAI, L, SHI, G, ZHANG, L, et al. Cav-1 deletion impaired hematopoietic stem cell function. *Cell Death Dis.* 2014;5(3):1-8

BAIS, M. V. Impact of Epigenetic Regulation on Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Dent Res.* 2019;98(3):268-276

BAKER, N. e TUAN, R.S. The less-often-traveled surface of stem cells: caveolin-1 and caveolae in stem cells, tissue repair and regeneration. *Stem Cell Research e Therapy* 2013, 4:90

BAU DT, TSAI MH, TSOU YA, WANG CH, TSAI CW, SUN SS, HUA CH, SHYUE SK, TSAI RY. The association of Caveolin-1 genotypes with oral cancer susceptibility in Taiwan. *Ann SurgOncol.* 2011 May;18(5):1431-8.

BISWAS, N. K., DAS, C., DAS, S., MAITRA, A., NAIR, S., GUPTA, T., MAJUMDER, P. P.. Lymph node metastasis in oral cancer is strongly

associated with chromosomal instability and DNA repair defects. *International Journal of Cancer*.2019

BRENTNALL, M; RODRIGUEZ-MENOCA, L L; DE GUEVARA, R.L.; CEPERO, E., BOISE, L.H. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biol* 14:32. 2013

CALICETI, C. Role of Plasma Membrane Caveolae/Lipid Rafts in VEGF - Induced Redox Signaling in Human Leukemia Cells. *BioMed Research International* Volume 2014, p. 1-13

CAMPOS, A.; BURGOS-RAVANAL, R.; GONZÁLEZ, M.F.; HUILCAMAN, R.; LOBOS GONZÁLEZ, L.; QUEST, A.F.G. Cell Intrinsic and Extrinsic Mechanisms of Caveolin-1-Enhanced Metastasis. *Biomolecules*. 2019 Jul 29;9(8)

CAPONIO, V. C. A., TROIANO, G., BOTTI, G., PEDICILLO, M. C., LO RUSSO, L., MASTRANGELO, F., ... PANNONE, G. (2019). Overexpression of ADAR1 into the cytoplasm correlates with a better prognosis of patients with oral squamous cells carcinoma. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 48(2), 108–114.

CHIDLOW, J. H., SESSA, W.C. Caveolae, caveolins, and cavins: complex control of cellular signalling and inflammation. *Cardiovascular Research* (2010) 86, 219–225

CIPRIANI, P. et al. Impaired Cav-1 expression in mesenchymal cells upregulates VEGF signaling: a link between vascular involvement and fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2014, 7:13

DONGRE A, WEINBERG RA. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(2):69-84.

FAGGI F, MITOLA S, SORCI G et al. Phosphocaveolin-1 enforces tumor growth and chemoresistance in rhabdomyosarcoma. *PLoS One* 2014;9:e84618.

FAGGI, F. Cavin-1 and Caveolin-1 are both required to support cell proliferation, migration and anchorage-independent cell growth in rhabdomyosarcoma. *Laboratory Investigation* Volume 95 June 2015

FRIDOLFSSON, H.N e PATEL, H.H. Caveolin, caveolae in age associated cardiovascular disease. *Journal of Geriatric Cardiology* (2013) 10: 66–74

GARCIA, A., LEV, B., HOSSAIN, K. R., GORMAN, A., DIAZ, D., PHAM, T. H. N., CLARKE, R. J. (2019). Cholesterol depletion inhibits Na,K-ATPase activity in a near-native membrane environment. *Journal of Biological Chemistry*. 2019. 294(15), 5956–5969.

GARNETT, D.J. Caveolae as a target to quench autoinduction of the metastatic phenotype in lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* (2016) 142:611–618

GOEDICKE-FRITZ, S. et al. Evidence for functional and dynamic microcompartmentation of Cav-1/TRPV4/KCa in caveolae of endothelial cells. *European Journal of Cell Biology*. 2015. 391–400.

GOLDSTEIN, L. B., DUONG, M., LEVINE, R. & DILLENBERG, J. The Future of Oral Cancer Diagnosis: Merging Provider Awareness, Patient Education, and Technology to Achieve Early Detection. **40**, 208–214 (2019)

GUERRA FS, SAMPAIO L DA S, KONIG S, et al. Membrane cholesterol depletion reduces breast tumor cell migration by a mechanism that involves non-canonical Wnt signaling and IL-10 secretion. *Transl Med Commun*. 2016;1(1):1-10.

HAINES, P. et al. Elevated expression of cav-1 in a subset of SSc fibroblasts contributes to constitutive Alk1 /Smad1 activation. *J. Cell. Mol. Med*. Vol 16, No 9, 2012 pp. 2238-2246

HAN, S.E.; PARK, K.H.; LEE., G.; HUH, Y.J.; MIN, B.M. Mutation and aberrant expression of Caveolin-1 in human oral squamous cell carcinomas and oral cancer cell lines. *Int J Oncol*. 2004 Feb;24(2):435-40

HART, P.C. et al. Caveolin-1 regulates cancer cell metabolism via scavenging Nrf2 and suppressing MnSOD-driven glycolysis. *Oncotarget*, Vol. 7, No. 1. 2015

HEAD, B.P. et al. Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: impact on signaling and function: Membrane/Lipid Rafts, Mediators of Cytoskeletal Arrangement and Cell Signaling. *BiochimBiophysActa*. 2014 February 1838(2)

HOLLESTELLE A, PEETERS JK, SMID M, et al. Loss of E-cadherin is not a necessity for epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;138(1):47-57. doi:10.1007/s10549-013-2415-3

HUNG KF, LIN SC, LIU CJ, CHANG CS, CHANG KW, KAO SY. The biphasic differential expression of the cellular membrane protein, caveolin-1, in oral carcinogenesis. *J Oral Pathol Med*. 2003 Sep;32(8):461-7

Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2018 - Incidência de Câncer no Brasil [Internet]. Ministério da Saúde Inst Nac Cancer José Alencar Gomes da Silva [Internet].. Available from: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-incidencia-de-cancer-no-brasil-2018.pdf>. (Acesso em 19 de Maio de 2019)

JAAFARI-ASHKAVANDI, Z. et al. Caveolin-1 overexpression in benign and malignant salivary gland tumors. *Tumor Biol*. (2016) 37:1863–1869

JAAFARI-ASHKAVANDI, Z., e ASLANI, E. (2017). Caveolin-1 expression in oral lichen planus, dysplastic lesions and squamous cell carcinoma. *Pathology Research and Practice*, 213(7), 809–814

JENSEN, D.H., THERKILDSEN, M.H., DABELSTEEN, E. A reverse Warburg metabolism in oral squamous cell carcinoma is not dependent upon myofibroblasts. *J Oral Pathol Med* (2015) 44: 714–721

JOSEPH, J. P., HARISHANKAR, M. K., PILLAI, A. A., e DEVI, A. (2018). Hypoxia induced EMT: A review on the mechanism of tumor progression and metastasis in OSCC. *Oral Oncology*, 80(February), 23–32.

JUNG AC, RAY AM, RAMOLU L, MACABRE C, SIMON F, NOULET F, BLANDIN AF, RENNER G, LEHMANN M, CHOULIER L, KESSLER H, ABECASSIS J, DONTENWILL M, MARTIN S. Caveolin-1-negative head and neck squamous cell carcinoma primary tumors display increased epithelial to mesenchymal transition and prometastatic properties. *Oncotarget*. 2015[Internet]. 2015;6(39)

KAMIBEPU, T., YAMASAKI, K., , NAKAHARA K, NAGAI T, TERADA N, TSUKINO, H., MUKAI, S., KAMOTO, T. Caveolin-1 and -2 regulate cell motility in castration-resistant prostate cancer. *Res Reports Urol*. 2018; Volume 10:135-144.

KURIHARA-SHIMOMURA M, SASAHIRA T, SHIMOMURA H, NAKASHIMA C, KIRITA T. The Oncogenic Activity of miR-29b-1-5p Induces the Epithelial-Mesenchymal Transition in Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Med*. 2019;8(2):273.

LAMAZE C, TARDIF N, DEWULF M, VASSILOPOULOS S, BLOUIN CM. The caveolae dress code: structure and signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 2017;47:117-125. doi:10.1016/j.ceb.2017.02.014

LAURENTIIS, A. de, DONOVAN, L., ARCARO, A. Lipid Rafts and Caveolae in Signaling by Growth Factor Receptors. *The Open Biochemistry Journal*, 2007, 1, 12-32

LEE JM, DEDHAR S, KALLURI R AND THOMPSON EW: The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 172: 973-981, 2006.

LEE J-A, CHOI D-I, CHOI J, KIM S, CHO K, LEE J-B, et al. Methyl- β -cyclodextrin up-regulates collagen I expression in chronologically-aged skin via its anti-caveolin-1 activity. *Oncotarget* [Internet]. 2015 Feb 10;6(4):1942–53.

LEE SY, KO SH, SHIM JS, KIM DD, CHO HJ. Tumor Targeting and Lipid Rafts Disrupting Hyaluronic Acid-Cyclodextrin-Based Nanoassembled Structure for Cancer Therapy. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018;10(43):36628-36640. doi:10.1021/acsami.8b08243

LI S, GUAN JL, CHIEN S. Biochemistry and biomechanics of cell motility. *Annu Rev Biomed Eng* 2005;7:105–50.

LI YC, PARK MJ, YE SK, KIM CW, KIM YN. Elevated levels of cholesterol-rich lipid rafts in cancer cells are correlated with apoptosis sensitivity induced by cholesterol-depleting agents. *Am J Pathol* 2006;168:1107–1118.

LIU P, KANG B, WU Y, SUN J, YEN L, FU T-Y, et al. Vimentin is a potential prognostic factor for tongue squamous cell carcinoma among five epithelial–mesenchymal transition-related proteins. Coleman WB, editor. *PLoS One* [Internet]. 2017 Jun 1;12(6):e0178581.

LIU P, RUDICK M, ANDERSON RGW: Multiple functions of caveolin- 1. *J Biol Chem* 2002;277(44):41295-41298.

LIANG, W. et al. CAV-1 contributes to bladder cancer progression by inducing epithelial-to-mesenchymal transition. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 32 (2014) 855– 863

LING, Z., YANG, X., CHEN, X., XIA, J., CHENG, B., e TAO, X. (2019). CCL2 promotes cell migration by inducing Epithelial-Mesenchymal transition in OSCC. *Journal of Oral Pathology e Medicine*, jop.12869.

MARTIN, S., JUNG, A., RAY, A. M., RAMOLU, L., MACABRE, C., ABECASSIS, J., e DONTEN, M. (2016). Caveolin-1-negative head and neck squamous cell carcinoma primary tumors display increased epithelial to mesenchymal transition and prometastatic properties. *European Journal of Cancer*, 61(39), S44.

MARTINEZ-OUTSCHOORN, U. E., SOTGIA, F., LISANTI, M. P. Caveola and signalling in cancer. *Nature*. April, 2015. v. 15.225-237

MASOOD R, HOCHSTIM C, CERVENKA B, ZU S, BANIWAL SK, PATEL V, et al. A novel orthotopic mouse model of head and neck cancer and lymph node metastasis. *Oncogenesis* [Internet]. 2013;2(July):e68.

MASUELLI L, BUDILLON A, MARZOCHELLA L, MROZEK MA, VITOLO D, DI GENNARO E, et al. Caveolin-1 overexpression is associated with simultaneous abnormal expression of the E-cadherin/catenins complex and multiple erbb receptors and with lymph nodes metastasis in head and neck squamous cell carcinomas. *J Cell Physiol*. 2012;227(9):3344–53.

NAKATANI K, WADA T, NAKAMURA M, UZAWA K, TANZAWA H, FUJITA S. Expression of caveolin-1 and its correlation with cisplatin sensitivity in oral squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2005;131(7):445–52.

NIKITAKIS, N. G. (2018). Special focus issue on potentially premalignant oral epithelial lesions: introduction and perspective. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 125(6), 575–576

NOHATA N, HANAZAWA T, KIKKAWA N, MUTALLIP M, FUJIMURA L, YOSHINO H, et al. Caveolin-1 mediates tumor cell migration and invasion and its regulation by miR-133a in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* [Internet]. 2011 Jan;38(1):209–17.

ONODERA,R., MOTOYAMA, K, OKAMATSU, A., HIGASHI, T., KARIVA, R., OKADA, S., ARIMA, H. Involvement of cholesterol depletion from lipid rafts in apoptosis induced by Methyl- β -cyclodextrin. *Int J Pharm*, 2013. 452, 2013.

OH K, CHO S, YOON H, LEE J, AHN S, HONG S. High prevalence of mutations in Korean patients with ameloblastoma: Clinicopathological significance and correlation with epithelial-mesenchymal transition. *J Oral Pathol Med*. 2019.

OWEN, D.M., et al. The lipid raft hypothesis revisited – New insights on raft composition and function from super-resolution fluorescence microscopy. *Bioessays* 34: 739–747, 2012 WILEY Periodicals, Inc

PANI, B.; SINGH, B. B. Lipid rafts/caveolae as microdomains of calcium signaling. *Cell Calcium*. 2009 June ; 45(6): 625–633

PARK E. K.; PARK M. J.; LEE S.H.; LI, Y.C.; KIM, J.; LEE, J.S, et al. Cholesterol depletion induces anoikis-like apoptosis via FAK down-regulation and caveolae internalization. *J Pathol* [Internet]. 2009 Jul;218(3):337–49.

PARPAL S, KARLSSON M, THORN H, STRÅLFORS P. Cholesterol depletion disrupts caveolae and insulin receptor signaling for metabolic control via insulin receptor substrate-1, but not for mitogen-activated protein kinase control. *J Biol Chem*. 2001 Mar 30;276(13):9670-8

PARTON, R. G. e DEL POZO, M. A. Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nature Rev. Mol. Cell Biol*. 14, 98–112 (2013).

PARTON, R. G. e SIMONS, K. The multiple faces of caveolae. *Nature Rev. Mol. Cell Biol*. 8, 185–194(2007).

PATEL, H.H.; INSEL, P.A. Lipid Rafts and Caveolae and Their Role in Compartmentation of Redox Signaling. *Antioxidants e redox signaling*. Volume 11, Number 6, 2009

PORTILHO DM, SOARES CP, MORROT A, et al. Cholesterol depletion by methyl- β -cyclodextrin enhances cell proliferation and increases the number of desmin-positive cells in myoblast cultures. *Eur J Pharmacol*. 2012;694(1-3):1-12

QAYUMM, T. et al. The interrelationships between Src, Cav- 1 and Rho GD 12 in transitional cell carcinoma of the bladder. *British Journal of Cancer*(2012) 106, 1187 – 1195

RATHORE, R. et al. “Overcoming chemotherapy drug resistance by targeting inhibitors of apoptosis proteins (IAPs).” *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* vol. 22,7 (2017): 898-919.

RIVERA, C. et al. Prognostic biomarkers in oral squamous cell carcinoma : A systematic review. **72**, 38–47 (2017).

ROUTRAY S. Caveolin-1 in oral squamous cell carcinoma microenvironment: an overview. *Tumor Biol* [Internet]. 2014 Oct 16;35(10):9487–95.

SARKAR, P., CHAKRABORTY, H., CHATTOPADHYAY, A. (2017). Differential Membrane Dipolar Orientation Induced by Acute and Chronic Cholesterol Depletion. *Scientific Reports*, 7(1), 1–9

SCANLON CS, VAN TUBERGEN EA, INGLEHART RC, D'SILVA NJ. Biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma. *J Dent Res*. 2013;92(2):114-121.

SCHLÖRMANN, W. The shape of caveolae is omega-like after glutaraldehyde fixation and cup-like after cryofixation. *HistochemCellBiol* (2010) 133:223–228

SHARMA A, BANDYOPADHAYAYA S, CHOWDHURY K, et al. Metformin exhibited anticancer activity by lowering cellular cholesterol content in breast cancer cells. *PLoS One*. 2019;14(1):1-17

SHEN, X. J, et al. Caveolin-1 is a Modulator of Fibroblast Activation and a Potential Biomarker for Gastric Cancer. *Int. J. Biol. Sci*. 2015, Vol. 11

SHI B, MA C, LIU G, GUO Y. MiR-106a directly targets LIMK1 to inhibit proliferation and EMT of oral carcinoma cells. *Cell Mol Biol Lett*. 2019;24(1):1-14.

SIEGEL, R. L., MILLER, K. D., JEMAL, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 69(1), 7–34.

DA SILVA SD, MORAND GB, ALOBAID FA, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers have prognostic impact in multiple primary oral squamous cell carcinoma. *Clin Exp Metastasis*. 2015;32(1):55-63.

SOHN, J., LIN, H., FRITCH, M. R., e TUAN, R. S. (2018). Influence of cholesterol/caveolin-1/caveolae homeostasis on membrane properties and substrate adhesion characteristics of adult human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research and Therapy*. 2018. 9(1), 1–15.

STONE, R.C. TOMIC-CANIC M, OJEH N, LIU S, et al. Epithelial-mesenchymal transition in tissue repair and fibrosis. *Cell Tissue Res.* 2016;365(3):495-506.

VERED, M; LEHTONEN, M; HOTAKAINEN, L; PIRILÄ, E; TEPPONEN, S; NYBERG, P *et al.* Caveolin-1 accumulation in the tongue cancer tumor microenvironment is significantly associated with poor prognosis: an in-vivo and in-vitro study. *BMC Cancer.* 2015;15(1):25.

WESTERMANN, M., STEINIGER, F., RICHTER, W. Belt-like localisation of caveolin in deep caveolae and its re-distribution after cholesterol depletion. *Histochemistry and Cell Biology.* 2005.123(6), 613–620

WORLD HEALTH ORGANIZATION <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/oral-health>, acesso em 15 de maio de 2019]

XUE J, CHEN H, DIAO L, CHEN X, XIA D. Expression of caveolin-1 in tongue squamous cell carcinoma by quantum dots. *Eur J Histochem.* 2010 Apr 14;54(2).

YAMAGUCHI, R; PERKINS, G; HIROTA, K. Targeting cholesterol with β -cyclodextrin sensitizes cancer cells for apoptosis. *FEBS Lett.* 2015 Dec 21;589

ZHAO, X; LIU, Y; MA, Q; WANG, X; JIN, H; MEHRPOUR, M; CHEN, Q. Caveolin-1 negatively regulates TRAIL-induced apoptosis in human hepatocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Jan 2;378(1):21-6.

ZHANG H, SU L, MÜLLER S, TIGHIOUART M, XU Z, ZHANG X, et al. Restoration of caveolin-1 expression suppresses growth and metastasis of head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* [Internet]. 2008;99(10):1684–94.

ZHOU J, TAO D, XU Q, GAO Z, TANG D. Expression of E-cadherin and vimentin in oral squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* [Internet]. 2015;8(3):3150–4.

ZHU LL, CUI Y, CHANG YS, FANG FD. A second protein marker of caveolae: caveolin-2. *Chin Med.Sci.J* 2010;25(2):119-124

ZHU F, MI L, YANG X, et al. The metastatic suppressor NDRG1 inhibits EMT, migration and invasion through interaction and promotion of caveolin-1 ubiquitylation in human colorectal cancer cells. *Oncogene.* 2017;36(30):4323-4335.