

NATHÁLIA PAIVA DE ANDRADE

**Inibidores de mTOR são potencial terapia com alvo em células tronco tumorais
para o carcinoma mucoepidermóide**

São Paulo

2017

NATHÁLIA PAIVA DE ANDRADE

**Inibidores de mTOR são potencial terapia com alvo em células tronco tumorais
para o carcinoma mucoepidermóide**

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas para obter o título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais

Orientador: Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes

São Paulo

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Andrade, Nathália Paiva de.

Inibidores de Mtor são potencial terapia com alvo em células tronco tumorais para o carcinoma mucoepidermóide / Nathália Paiva de Andrade ; orientador Fábio Daumas Nunes. -- São Paulo, 2017.

117 p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão original

1. Neoplasias das glândulas salivares. 2. Carcinoma de células escamosas. 3. Célula tronco tumoral. 4. Via de sinalização mTOR. 5. Quimioterapia. I. Nunes, Fábio Daumas. II. Título.

Andrade NP. Inibidores de mTOR são potencial terapia com alvo em células tronco tumorais para o carcinoma mucoepidermóide. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: / /2017

Banca Examinadora

Prof. Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Aos meus pais, Reginaldo e Shirley, e meu irmão, Lucas, pelo amor incondicional e apoio em todos os momentos da minha vida. Minha eterna gratidão, admiração e amor.

Ao, Felipe, por todo amor, companheirismo, carinho e por compartilhar os sonhos comigo. Minha eterna gratidão, admiração e amor.

A vocês, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes**, agradeço por todos os valiosos ensinamentos, pela paciência e confiança. Agradeço pelo estímulo e apoio incondicional em todos os momentos desde a iniciação científica até a finalização do doutorado. E registro minha profunda admiração durante todos esses anos por sua dedicação, ética e caráter.

Ao **Prof. Dr. Jacques Nör**, meu orientador no exterior, por ter me recebido de forma tão acolhedora em seu laboratório e por ter orientado, tanto no projeto desenvolvido, como na progressão da minha carreira profissional e na vida. Deixo registrada minha admiração por sua inteligência e generosidade.

Aos professores da disciplina de Patologia Bucal, **Prof. Dra. Suzana C. Orsini Machado de Souza**, **Prof. Dra. Marina Helena C. G. Magalhães**, **Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Junior**, **Prof. Dra. Marília Trierveiler Martins**, **Prof. Dra. Andrea Mantesso** e **Prof. Dra. Karen Ortega** pela disponibilidade para ensinar e pelo agradável convívio.

Aos amigos do Laboratório de Patologia Molecular, **Luciene**, **Sofia**, **Letícia**, **Robson**, **Guilherme**, **Maria Fernanda** e **Lília** pelo convívio, respeito, troca de conhecimentos e amizade nesses últimos anos.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Angiogênese da Universidade de Michigan, **Alex**, **Suny**, **Alexander**, **Zhang**, **Paulo**, **Kristy**, **Min**, **Chirstie** e **Alexandra**, por toda generosidade em compartilhar comigo os conhecimentos científicos e por tornarem muito agradável o período de passei tralhando com vocês.

Aos **colegas da disciplina de Patologia Bucal**, agradeço pelo coleguismo e fácil convivência.

Aos funcionários da Patologia Oral, **Juvani, Edna, Adriana, Elisa, Vinícius e Fátima**, agradeço por toda a disponibilidade em ajudar, fácil convivência e contribuições para a realização deste projeto.

As funcionárias da Comissão de Pós-graduação, **Cátia e Alessandra**, por toda a paciência e auxílio durante os processos de inscrição no programa de doutorado sanduíche e de finalização do doutorado.

Aos **funcionários da Universidade de Michigan**, pela recepção amigável, e por me mostrarem uma nova face do ensino e pesquisa na odontologia.

Aos professores, **Prof. Dra. Albina Altemani e Prof. Dr. Douglas Magno** por cederem amostras de tumores de pacientes diagnosticados com carcinoma mucoepidermóide para a realização de parte desse projeto.

À **Prof. Nayara Cavalcanti** pela amizade, pelo exemplo de ética e dedicação, e por todo o incentivo para eu seguir carreira docente.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão das bolsas de Doutorado e de Doutorado Sanduíche no Exterior.

À **banca** desta defesa de tese, pelo pronto aceite e pelo tempo dedicado à avaliação e aperfeiçoamento deste documento.

A **todos** aqueles, que de alguma maneira contribuíram e incentivaram essa jornada, serei sempre grata e lembrarei com carinho desses momentos.

Acima de tudo, à **Deus**, por ter me proporcionado saúde, paciência e persistência. E por ter iluminado minha mente e meus caminhos.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais volta ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

RESUMO

Andrade NP. Inibidores de mTOR são potencial terapia com alvo em células tronco tumorais para o carcinoma mucoepidermóide [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2017. Versão Original.

O carcinoma mucoepidermóide (CME) é o tumor mais comum entre as neoplasias malignas de glândula salivar. Recentemente, uma rara população de células com características de multipotência, autorrenovação e potencial tumorigênico, denominadas como células tronco tumorais (CTT), foi descrita no CME. As CTT são resistentes as terapias atuais, e têm sido consideradas responsáveis pela recorrência e metástase, levando a um pior prognóstico para o paciente. A descoberta de que as CTT do CME superexpressam componentes da via de sinalização mTOR, levantou a hipótese que os pacientes poderiam ser beneficiados com o uso inibidores de mTOR como terapia para eliminação das CTT. O objetivo desse estudo foi avaliar o potencial uso de inibidores de mTOR como terapia para o CME com foco em CTT, assim como, investigar o funcionamento da via de sinalização mTOR e os efeitos moleculares do tratamento com inibidores dessa via nas CTT do CME. Foi realizada imuno-histoquímica para p-mTOR e p-S6K-1 em casos de pacientes diagnosticados com CME, os resultados foram correlacionados com os dados clínicos dos pacientes e também foi realizada dupla marcação por imunofluorescência para ALDH/p-mTOR. Estudos *in vitro* foram realizados em 3 linhagens de CME (UM-HMC-1, -3A, -3B) e com inibidores da via de sinalização mTOR. Após exposição aos inibidores, realizou-se ensaios de *western blot* (proteínas da via mTOR e BMI-1), citometria de fluxo para ALDH/CD44; salisfera; e apoptose, esse último comparando com quimioterápicos utilizados atualmente. Adicionalmente, foi utilizado o silenciamento genético de mTOR para confirmar os resultados obtidos com inibidores químicos. Por fim, foram realizados ensaios *in vivo* com as células silenciadas e com o inibidor de mTOR tensirolimo. Os resultados evidenciaram que a via de sinalização mTOR está ativa no CME, é correlacionada com pior prognóstico clínico e está superexpressa nas CTT. O tratamento com inibidores da via mTOR levaram a diminuição da fração de CTT, devido a perda de autorrenovação e apoptose das CTT. A apoptose, junto a diminuição de p-AKT revelada por *western blot*, sugeriram que esteja ocorrendo inibição de mTORC2 nas

CTT, um importante componente na eficácia do tratamento com inibição de mTOR no câncer. Além disso, também houve redução de vasos sanguíneos, nichos das CTT, e diminuição do crescimento tumoral com uso de inibidores ou silenciando mTOR *in vivo*. Coletivamente, os resultados mostraram que a inibição de mTOR foi capaz de agir nas CTT por mecanismos diretos (indução de apoptose e diminuição da autorrenovação) e indiretamente através da redução de angiogênese, sugerindo que o uso de inibidores de mTOR no tratamento do CME é uma estratégia molecular eficiente para a redução de CTT, e uma potencial terapia adjuvante.

Palavras-chave: Tumor de glândula salivar. Carcinoma mucoepidermóide. Célula tronco tumoral. Via de sinalização mTOR. Quimioterapia.

ABSTRACT

Andrade NP. Targeting cancer stem cells by mTOR inhibition in human mucoepidermoid carcinoma [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2017. Versão Original.

Mucoepidermoid carcinoma (MEC) is the most common tumor among malignant salivary gland neoplasms. Recently, a rare population of multipotent, self-renewing, and tumorigenic cells, termed cancer stem cells (CSC), was described in MEC. CSC are resistant to current therapies, and have been considered responsible for recurrence and metastasis, leading to worse patient prognosis. The discovery that CSC from MEC overexpressed the mTOR signaling pathway raised the hypothesis that use of mTOR inhibitors as therapy for CSC elimination could benefit patients. The objective of this study was to evaluate the potential use of mTOR inhibitors as a therapy for MEC targeting CTT, as well to investigate the functioning of mTOR signaling pathway and the molecular effects of treatment with mTOR inhibitors in MEC CSC. Immunohistochemistry was performed for p-mTOR and p-S6K-1 in paraffin samples from patients diagnosed with MEC and results were correlated with clinical data, in addition, co-immunofluorescence was performed for ALDH/p-mTOR. In vitro studies were performed with 3 MEC cell lines (UM-HMC-1, -3A, -3B) and with inhibitors of the mTOR signaling pathway. After exposure to inhibitors the following assays were performed: western blot (mTOR signaling pathway proteins and BMI-1), flow cytometry for ALDH/CD44, spheroids, and apoptosis, the latter comparing with currently chemotherapeutic agents used as treatment for cancer patients. In addition, mTOR genetically silent was used to confirm results with chemical inhibitors. Finally, in vivo assays were performed with knockdown cells and with mTOR inhibitor temsirolimus treatment. Results showed that mTOR signaling pathway is active in MEC, it is correlated with worse clinical prognosis and it is overexpressed in CSC. Treatment with inhibitors of mTOR signaling pathway led to a decrease in CSC fraction, caused by loss of self-renewal and apoptosis. Apoptosis, together with the decrease in p-AKT revealed by western blot, suggest that inhibition of mTORC2, an important compound in the efficacy of mTOR inhibition for cancer treatment, is occurring. In addition, there was reduction of blood vessels, CSC niches, and

decreased tumor growth using mTOR inhibitors or silencing mTOR. Collectively, results showed that inhibition of mTOR was able to act in CSC by direct mechanisms (induction of apoptosis, decreased self-renewal) and indirectly through reduction of angiogenesis, suggesting that the use of mTOR inhibitors in treatment of MEC is an efficient molecular strategy to reduce fraction of CSC, and a potential therapy.

Keywords: Salivary gland tumor. Mucoepidermoid carcinoma. Cancer stem cell. mTOR signaling pathway. Chemotherapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 4.1 - Visão esquemática do experimento <i>in vivo</i> para avaliação do impacto do silenciamento de mTOR..... | 46 |
| Figura 4.2 - Visão esquemática do experimento <i>in vivo</i> para avaliação do impacto do tratamento com tensirolimo..... | 48 |
| Tabela 5.1 - Variáveis clínicas, e média de células positivas para p-mTOR e p-S6K-1, segundo cada tumor analisado por imuno-histoquímica..... | 50 |
| Figura 5.1- Correlação entre a ativação da via mTOR e o pior prognóstico dos pacientes portadores de carcinoma mucoepidermóide | 51 |
| Figura 5.2 - Ensaio de citotoxicidade para os inibidores da via de sinalização AKT/mTOR/S6K-1..... | 53 |
| Figura 5.3 - Superexpressão da via de sinalização mTOR nas CTT | 55 |
| Figura 5.4 - Redução da fração de CTT após tratamento com inibidores da via de sinalização AKT/mTOR/S6K-1 | 59 |
| Figura 5.5 - Ensaio de salisferas com inibidores da via de sinalização AKT/mTOR/S6K-1..... | 61 |
| Figura 5.6 - Estratégia de análise para o ensaio de apoptose realizado por citometria de fluxo | 64 |
| Figura 5.7 - Indução de apoptose em CTT por inibidores de mTOR na linhagem celular UM-HMC-1 | 67 |
| Figura 5.8 - Indução de apoptose em CTT por inibidores de mTOR na linhagem celular UM-HMC-3A..... | 69 |
| Figura 5.9 - Indução de apoptose em CTT por inibidores de mTOR na linhagem celular UM-HMC-3B..... | 71 |
| Figura 5.10 - Eficácia do silenciamento de mTOR por vetores lentivirais | 74 |

| | |
|--|----|
| Figura 5.11 - Redução da fração de CTT nas células silenciadas para mTOR | 75 |
| Figura 5.12 - Efeitos do silenciamento mTOR <i>in vivo</i> | 79 |
| Figura 5.13 - Efeitos do tratamento com tensirolimo <i>in vivo</i> | 83 |
| Figura 5.14 - Via de sinalização mTOR nas CTT | 86 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------|--|
| 4E-BP1 | do Inglês “4E-binding protein 1” |
| 7-AAD | do Inglês “7-aminoactinomycin D” |
| ABC | do Inglês “ATP-binding cassette” |
| AKT | do Inglês “protein kinase B” |
| ALDH | do Inglês “aldeído desidrogenase” |
| AMPK | do Inglês “activated protein kinase” |
| APC | do Inglês “allophycocyanin” |
| Bcl-2 | do Inglês “B-cell lymphoma 2” |
| BD | da empresa Becton Dickinson |
| Bmi1 | do Inglês “B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog” |
| CA | estado de Califónia, Estados Unidos da América |
| CB.17.SCID | do Inglês “BALB/c-Igh ^b severe combined immunodeficiency” |
| CD44 | do Inglês “clone of differentiation 44” |
| CME | carcinoma mucoepidemóide |
| CRTC1 | do Inglês “CREB Regulated Transcription Coactivator 1” |
| CRTC3 | do Inglês “CREB Regulated Transcription Coactivator 3” |
| CTT | célula tronco tumoral |
| DAB | 3,3-diaminobenzidina |
| DAPI | do Inglês “4',6-diamidino-2-phenylindole” |
| DEPTOR | do Inglês “domain containing mTOR-interacting protein” |
| DMEM | do Inglês “dulbecco's modified eagle medium” |
| DNA | do Inglês “desoxyribonucleid acid” |
| EBM 2-MV | do Inglês “endotelial basal medium 2 - microvascular cells” |
| EGFR | do inglês “epidermal growth factor receptor” |
| EK293T | do Inglês “embryonic kidney 293” |
| EMT | do Inglês “epithelial mesenchymal transition” |
| EUA | Estados Unidos da América |
| FBS | do Inglês “fetal bovine serum” |
| FDA | do Inglês “Food and Drug Administration” |
| FKBP12 | do Inglês “FK-506 binding proteins” |
| GFP | do Inglês “green fluorescent protein” |

| | |
|---------------|---|
| Grb10 | do Inglês “growth factor receptor bound protein 10” |
| HDMEC | do Inglês “human dermal microvascular endothelial cells” |
| HER-2 | do Inglês “human epidermal growth factor receptor 2” |
| IGFR | do Inglês “insulin-like growth factor 1 receptor” |
| IgG | do Inglês “imunoglobulina G” |
| IRS-1 | do Inglês “insulin receptor substrate 1” |
| JAK | do Inglês “janus kinase” |
| MA | estado de Massachusetts, Estados Unidos da América |
| MAML2 | do Inglês “mastermind like transcriptional coactivator 2” |
| ME | estado de Maine, Estados Unidos da América |
| MGS | meio de cultura de glândula salivar |
| MI | estado de Michigan, Estados Unidos da América |
| microRNAs | do Inglês “micro ribonucleic acid” |
| mLST8 | do Inglês “mTOR associated protein, LST8 homolog” |
| MO | <i>estado de</i> Missouri, Estados Unidos da América |
| MO | estado de Missouri, Estados Unidos da América |
| mTOR | do Inglês “mammalian target of rapamycin” |
| mTORC1 | do Inglês “mammalian target of rapamycin complex 1” |
| mTORC2 | do Inglês “mammalian target of rapamycin complex 1” |
| não-CTT | células tumorais não tronco |
| NY | estado de Nova York, Estados Unidos da América |
| NY | estado de Nova York, Estados Unidos da América |
| Oct-4 | do Inglês “octamer- 4” |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PA | estado de Pará, Brasil |
| PBS | do Inglês “phosphate buffered saline” |
| PBS-A | do Inglês “phosphate buffered saline – albumin” |
| PI3K | do Inglês “phosphoinositide 3-kinase” |
| PKC- α | do Inglês “protein kinase C alpha” |
| PRAS40 | do Inglês “proline-rich Akt substrate of 40 kDa” |
| PTEN | do Inglês “phosphatase and tensin homolog” |
| RAPTOR | do Inglês “regulatory-associated protein of mTOR” |
| RICTOR | do Inglês “rapamycin-insensitive companion of mTOR” |
| RTOG | do Inglês “radiation therapy oncology group” |

| | |
|--------------------|--|
| S6K-1 | do Inglês “ribosomal protein S6 kinase beta-1” |
| Ser ⁴⁷³ | serina 473 |
| SP | estado de São Paulo, Brasil |
| STAT | do Inglês “signal transducers and activators of transcription” |
| TC1 | do Inglês “tuberculosis complex 1” |
| TC2 | do Inglês “tuberculosis complex 2” |
| TFEB | do Inglês “transcription factor EB” |
| TGF- β | do Inglês “transforming growth factor beta” |
| TX | estado de Texas, Estados Unidos da América |
| ULK1 | do Inglês “unc-51 like autophagy activating kinase 1” |
| Wnt | do Inglês “wingless” e “integrated” |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 23 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 27 |
| 2.1 | CARCINOMA MUCOEPIDERMÓIDE | 27 |
| 2.2 | CÉLULAS TRONCO TUMORAIS | 30 |
| 2.3 | VIA DE SINALIZAÇÃO mTOR | 33 |
| 3 | PROPOSIÇÃO | 39 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 41 |
| 4.1 | LINHAGENS CELULARES | 41 |
| 4.2 | QUIMIOTERÁPICOS E INIBIDORES QUÍMICOS | 41 |
| 4.3 | AMOSTRAS DE PACIENTES HUMANOS | 41 |
| 4.4 | IMUNO-HISTOQUÍMICA E IMUNOFLORESCÊNCIA..... | 42 |
| 4.5 | ANÁLISE ESTATÍSTICA DA IMUNO-HISTOQUÍMICA..... | 43 |
| 4.6 | ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE | 43 |
| 4.7 | <i>WESTERN-BLOTTING</i> | 43 |
| 4.8 | CITOMETRIA DE FLUXO | 44 |
| 4.9 | ENSAIO DE SALISFERAS..... | 45 |
| 4.10 | SILENCIAMENTO DE mTOR | 45 |
| 4.11 | XENOENXERTOS DE CARCINOMA MUCOEPIDERMÓIDE | 46 |
| 4.12 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 48 |
| 5 | RESULTADOS | 49 |
| 5.1 | EXPRESSÃO DE P-MTOR E P-S6K-1 RELACIONA-SE COM PIOR PROGNÓSTICO DOS PACIENTES COM CME | 49 |
| 5.2 | VIA DE SINALIZAÇÃO MTOR ESTÁ SUPEREXPRESSA NAS CTT DO CME | 54 |
| 5.3 | INIBIÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO MTOR REDUZ A FRAÇÃO E AUTORRENOVAÇÃO DAS CTT NO CME | 57 |
| 5.4 | INDUÇÃO DE APOPTOSE PREFERENCIALMENTE NAS CTT POR INIBIDORES DE MTOR | 63 |
| 5.5 | SILENCIAMENTO GENÉTICO DE MTOR INIBIU O CRESCIMENTO TUMORAL <i>IN VIVO</i> | 73 |

| | | |
|-----|--|-----|
| 5.6 | INIBIÇÃO DE MTOR POR TENSIOLOLIMO DIMINUIU A FRAÇÃO DE CTT <i>IN VIVO</i> | 81 |
| 5.7 | MODELO DE AÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO MTOR NAS CTT DO CME | 85 |
| 6 | DISCUSSÃO | 87 |
| 7 | CONCLUSÕES | 95 |
| | REFERÊNCIAS | 97 |
| | APÊNDICES | 109 |
| | ANEXO | 117 |

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma mucoepidermóide (CME) é considerado o tumor maligno mais comum, decorrente de glândulas salivares menores e maiores, representando aproximadamente um terço de todas as neoplasias malignas de glândulas salivares¹. O CME é conhecido como uma neoplasia que exhibe diversos comportamentos biológicos e clínicos que variam de tumores altamente agressivos, com grande potencial de recorrência e metástase, até tumores que demonstram uma natureza mais benigna². A ressecção cirúrgica é o principal método terapêutico para o tratamento do CME, em casos avançados e altamente agressivos, o tratamento inclui radioterapia e quimioterapia, mesmo assim muitos pacientes apresentam recidiva loco-regional e metástase^{3,4,5}. Melhorar a compreensão da patobiologia do CME é essencial para a identificação de novos alvos, superar a resistência aos medicamentos e melhorar o prognóstico dos pacientes.

Muitos estudos têm focado no desenvolvimento de novos quimioterápicos para o CME⁶, porém poucos levam em conta a presença de células tronco tumorais (CTT). Estas células são uma população rara, autorrenovável, constituem menos de 10% do total de células no tumor e apresentam um alto potencial tumorigênico⁷. Estudos demonstraram que as CTT também possuem uma grande importância nos processos de metástase e recidiva, que são responsáveis por pior prognóstico dos pacientes^{8,9}. Considerando que CTT são resistentes à quimioterapia e radioterapia, a não eliminação dessas células pode ser a causa da ineficácia das terapias atuais contra o CME¹⁰. CTT foram identificadas em diversos tumores sólidos e recentemente foram identificadas em CME utilizando a alta atividade de ALDH e alta expressão de CD44 como marcadores para enriquecer esta população¹¹. Também foi revelado recentemente que CTT do CME apresentam superexpressão da via de sinalização PI3K/AKT em comparação com as outras células do tumor (não-CTT)¹¹. Além disso, tem sido demonstrado em alguns tumores sólidos que a inibição desta via de sinalização induz diferenciação e apoptose de CTT^{12,13}.

A via de sinalização PI3K/AKT é encontrada frequentemente superexpressa em muitos cânceres humanos, levando a hiperativação de mTOR¹⁴. A ativação de mTOR também foi observada em tumores de glândulas salivares^{15,16} e correlacionada com pior prognóstico clínico¹⁷. O mTOR é um regulador central de

múltiplos processos celulares que promovem o crescimento, a sobrevivência e a metástase das células tumorais ¹⁸. Dois complexos distintos são formados pela interação de mTOR com diversas proteínas, mTOR complexo 1 (mTORC1) e mTOR complexo 2 (mTORC2) ^{19,20}. Estes complexos têm distintas funções, substratos e sensibilidade à rapamicina (inibidor de mTOR), além de formar uma rede complexa de interações com outras vias de sinalização e retroalimentação dentro da própria via de sinalização PI3K/AKT ^{21,22,23}.

Existe um grande interesse pelos inibidores de mTOR como potenciais agentes quimioterápicos devido sua importância nos processos celulares relacionados com a carcinogênese ²⁴. É possível interferir na ativação de mTOR através da utilização de inibidores específicos, tais como rapamicina ou análogos de rapamicina (rapalogs) ²⁴. Os análogos da rapamicina, como tensesolimo e everolimo, inibem o mTOR através do mesmo mecanismo da rapamicina, porém com melhores propriedades farmacocinéticas aumentando a sua conveniência para o uso clínico ²⁵. Tensesolimo e everolimo são aprovados pelo FDA para o tratamento de carcinoma de células renais. E mais recentemente, o everolimo também foi aprovado pelo FDA para tumores neuroendócrinos e tratamento de câncer de mama metastático ^{26,27}. Desde então, vários ensaios clínicos estão investigando a segurança e eficácia de análogos de mTOR como terapia, isoladamente ou em combinação com agentes quimioterápicos típicos, para o tratamento de diversos tipos de câncer ²⁸.

Não existem estudos que demonstrem o efeito da inibição do mTOR no carcinoma mucoepidermóide. Considerando a importância do mTOR na carcinogênese e a evidência de que a via de sinalização do mTOR é superexpressa em CTT do CME, foi levantada a hipótese de que a inibição do mTOR poderia representar uma possível abordagem molecular para o tratamento de CME com foco nas CTT. O objetivo desse estudo foi investigar, *in vitro* e *in vivo*, os efeitos da inibição de mTOR na fração, autorrenovação, crescimento e apoptose de CTT do CME. Assim como, melhor entender o funcionamento molecular da via de sinalização mTOR nessas células. Os resultados demonstram que a inibição terapêutica de mTOR reduziu a fração de células ALDH^{HIGH}CD44^{HIGH}, através da indução de apoptose e redução da autorrenovação em CTT do CME. Observou-se também que a inibição de mTOR foi capaz de reduzir o crescimento e a angiogênese tumoral, reduzindo assim os nichos das CTT. Adicionalmente, foi possível começar a entender através de quais mecanismos moleculares os

inibidores de mTOR estão agindo nas CTT do CME. Coletivamente, nossos resultados sugerem que o uso de inibidores de mTOR no tratamento do carcinoma mucoepidermóide é uma potencial estratégia terapêutica, capaz de reduzir eficientemente a fração de CTT no tumor.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CARCINOMA MUCOEPIDERMÓIDE

A Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou em 2005 a última classificação para os tumores de glândula salivar, distinguindo de acordo com as características histológicas 10 tipos de tumores benignos e 24 tipos de tumores malignos que acometem as glândulas salivares²⁹. Esses tumores são relativamente raros e constituem apenas cerca de 4% dos tumores de cabeça e pescoço³⁰. Entre os tumores malignos de glândula salivar o CME é considerado o mais comum compreendendo aproximadamente 30% dos casos¹. Das glândulas salivares maiores a parótida é a mais atingida, em uma série de 234 casos de CME, 84%, 13% e 3% dos tumores ocorreram nas glândulas parótida, submandibular e sublingual, respectivamente³¹. Nas glândulas salivares menores o palato é a região mais acometida, seguido pela região retromolar da mandíbula³². O CME também pode desenvolver-se em outros locais que não a região de cabeça e pescoço, por exemplo, no pulmão e na mama³³.

O CME é derivado de células do ducto secretor e é composto por proporção variada de células secretoras de muco, intermediárias e epidermóides³⁴. De acordo com as características histológicas o CME é classificado em alto, médio e baixo grau⁵. As características mais relevantes para a classificação são a proporção relativa dos tipos celulares, o grau de invasividade, a taxa mitótica, a presença de necrose, a presença de invasões neurais ou vasculares, e a proporção de espaços císticos em relação às áreas sólidas³³. Os tumores de baixo grau são o tipo mais comum, e apresentam formação cística proeminente, atipia celular mínima e proporção relativamente alta de células mucosas². Os tumores de grau intermediário possuem características que se situam entre aquelas dos de baixo e alto grau². Por sua vez, os tumores de alto grau são constituídos por ilhas sólidas de células epidermóides e intermediárias que podem apresentar pleomorfismo e alta atividade mitótica, enquanto as células secretoras de muco são raras². Tumores de alto grau também apresentam comportamento invasivo e podem ter presença de necrose mais evidente². Os tumores classificados como de baixo grau tendem a ter um

prognóstico clínico melhor para o paciente, embora recorrência e metástase sejam possíveis, enquanto os tumores de alto grau, são associados a um comportamento mais agressivo ².

O principal método terapêutico no tratamento do CME, como na maioria das neoplasias malignas das glândulas salivares, é a ressecção cirúrgica ⁵. Os benefícios da complementação pós-operatória por radio e quimioterapia ainda não estão elucidados ⁴. Nos tumores acessíveis, em estados iniciais e de pacientes livres de metástases, o tratamento de escolha é a ressecção cirúrgica com margens de segurança ³⁵. No entanto, o local e o tamanho do tumor influenciam a extensão cirúrgica ³⁵. Nos tumores de parótida alguns casos podem requerer ressecção da pele, da mandíbula posterior ou do músculo masseter ³⁶. Para CME pequenos e de baixo grau nas glândulas salivares menores, uma grande excisão local é muitas vezes suficiente, mas para casos que se estendem ou que atingem as glândulas salivares maiores pode ser necessário mandibulectomia, maxilectomia, mastoidectomia, ressecção craniofacial anterior, ressecção do palato duro ou avulsão de nervos cranianos ³⁷. Apesar da cirurgia ser curativa, em muitos desses casos acaba sendo multiladora e afetando drasticamente a qualidade de vida do paciente ³⁷.

Para tumores localmente avançados ou inacessíveis, o planejamento terapêutico pode incluir radioterapia, quimioterapia ou ambas ⁴. Embora nunca testada em um ensaio clínico randomizado prospectivo, o uso de radioterapia adjuvante pós-operatória está indicado em pacientes com metástases linfonodais, doença localmente avançada, comprometimento ósseo ou nervoso, doença recorrente ou que apresentam padrão histológico agressivo ³. Estudos retrospectivos mais antigos fornecem evidências limitadas para o uso de radioterapia pós-operatória em pacientes de alto risco, apesar de demonstrar uma vantagem no controle local da doença, quando comparado com a cirurgia isoladamente ³. A falta de estudos exploratórios sobre as terapias para tumores malignos de glândula salivar se deve principalmente a raridade da doença e a dificuldade de encontrar pacientes para os ensaios clínicos ³.

O uso de quimioterapia sistêmica no CME tem sido geralmente empregada em contextos paliativos, e aplicada em pacientes com doença avançada ou metastática incurável ³⁸. Os regimes com cisplatina, isoladamente ou em combinação com outras drogas, têm sido os mais frequentemente explorados ⁴.

Porém as taxas de resposta ao tratamento com cisplatina têm sido modestas, em um ensaio clínico de fase II, apenas 1 em cada 5 pacientes diagnosticados com CME e tratados com cisplatina apresentaram resposta clínica satisfatória ³⁹. O Grupo de Radioterapia em Oncologia (RTOG) está atualmente realizando um ensaio randomizado de fase II para estabelecer se a administração de cisplatina, juntamente com a radioterapia pós-operatória, melhora o desfecho em pacientes com tumores de glândulas salivares de alto risco, incluindo no CME ². Outros quimioterápicos, como o paclitaxel, também têm sido testados sem resultados significativos ⁴⁰. Em um ensaio clínico de fase II com uso de paclitaxel, somente 3 de 14 pacientes com CME apresentaram resposta parcial ao tratamento ⁴⁰.

Infelizmente, as opções de tratamento são limitadas e frequentemente ineficazes ⁵. Além disso, os pacientes com CME apresentam risco de metástase e recorrência por 10 anos ou mais após o término do tratamento ³⁷. Novas terapias têm sido buscadas com base em aberrações moleculares encontradas no CME, apesar de os relatos sobre a citogenética, biologia molecular e patogênese deste tumor serem bastante escassos ²⁹. O desenvolvimento de novos fármacos contra alvos moleculares em neoplasias epiteliais levou a investigações no perfil molecular dos cânceres de glândula salivar, tanto para avaliação de prognóstico quanto para o desenvolvimento de novos tratamentos ²⁹. Estudos mostraram que a translocação cromossômica t (11; 19) parece ser específica ao CME, e resulta nas proteínas fusionadas CRTC1-MAML2 e CRTC3-MAML2, que têm sido relacionadas a um melhor prognóstico ⁴¹. Pesquisas com o oncogene H-Ras mostraram que 18% dos casos de CME avaliados apresentaram mutações no codon 12, e que esta mutação estava presente principalmente nos tumores de alto grau ⁴². O receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) também tem sido bastante avaliado, está expresso em aproximadamente dois terços dos casos de CME, e está associado a um grau histológico mais elevado do tumor ^{43,44}. Até agora, os resultados de vários ensaios de fase II de terapias dirigidas contra um ou vários destes alvos no tratamento de pacientes com CME avançado têm sido decepcionantes ³³. Mesmo assim, o papel das terapias moleculares direcionadas continua a ser investigado por diversos grupos de pesquisa na busca por melhores tratamentos.

2.2 CÉLULAS TRONCO TUMORAIS

Apesar de muitos estudos atuais buscarem novas terapias com abordagens moleculares para o CME, poucos levam em consideração a presença das CTT nesses tumores ⁶. O subconjunto raro de células, conhecidas como células-tronco tumorais (CTT), possui a propriedade de autorrenovação e a capacidade de gerar heterogeneidade celular dentro de um tumor ⁸. Estas células também possuem uma série de características distintas que lhes tornam resistentes as terapias anticâncer atuais, o que causa falhas no tratamento e possibilita o ressurgimento do tumor ¹⁰. Resumidamente, as CTT têm funções de extrema importância para o desenvolvimento, progressão, metástase, resistência as terapias e recorrência tumoral ¹⁰. As CTT foram identificadas pela primeira vez em neoplasias malignas hematopoiéticas através da expressão de marcadores de superfície celular ⁴⁵. Desde então, as CTT foram identificadas em diversos tumores através de marcadores específicos, incluindo nos tumores sólidos de mama ⁴⁶, glioblastoma ⁴⁷, pâncreas ⁴⁸, melanoma ⁴⁹, próstata ⁵⁰ e carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço ⁵¹.

Foi demonstrado por imunohistoquímica que reconhecidos marcadores de CTT (CD44, BMI-1, Oct-4 e Nanog) estão frequentemente expressos no CME e que podem estar correlacionados com maior agressividade tumoral ⁵². Recentemente, através da associação de dois marcadores, ALDH e CD44, as CTT foram identificadas e isoladas no CME ¹¹. A aldeído desidrogenase (ALDH), é uma enzima citosólica que oxida aldeídos em ácidos carboxílicos e tem sido utilizada na identificação de CTT em diversos tipo de canceres ⁵³. O CD44 é um marcador de superfície celular, que também tem sido utilizado extensivamente para identificar CTT ⁵⁴. O CD44 é uma glicoproteína transmembranar e está presente em processos celulares que regulam sobrevivência, diferenciação, crescimento e motilidade celular ⁵⁴. A alta atividade de ALDH e a alta expressão de CD44 foram utilizadas para identificação e isolamento de células ALDH^{HIGH}CD44^{HIGH} no CME, essa pequena subpopulação de células, que variou de 1,5% a 4,5% da população tumoral total, ao serem inoculadas em animais imunocomprometidos demonstraram possuir alto potencial tumorigênico, assim como capacidade de recriar a heterogeneidade tumoral, características fundamentais das CTT ¹¹. Considerando que em outros tumores as CTT desempenham um papel central na resistência tumoral às terapias atuais, a descoberta da presença dessas células no CME levanta a hipótese de que

estratégias direcionadas à CTT melhorem os resultados clínicos do tratamento dessa neoplasia ¹¹.

Estudos têm demonstrado que as CTT são resistentes aos tratamentos tradicionais com quimioterápicos e radiação ⁸. A resistência das CTT pode ser atribuída a vários atributos únicos dessas células ¹⁰. As CTT são tipicamente encontradas em G0, o que as torna relativamente quiescentes e resistentes a agentes quimioterápicos que agem de um modo dependente do ciclo celular, por exemplo, a quimioterapia com cisplatina ⁵⁵. Estudos também mostraram que as CTT regulam positivamente proteínas de reparo de danos ao DNA, proteínas anti-apoptóticas e proteínas transportadoras, tais como ABC, que são capazes de bombear para fora da célula os agentes quimioterápicos ^{56,57}. Evidências também indicam que alguns medicamentos anticancerígenos convencionais além de não eliminar as CTT, também enriquecem seletivamente essa população ⁵⁸. Nesse contexto, a presença de CTT surge como uma possível explicação para os tumores de glândulas salivares não serem sensíveis aos tratamentos atualmente aplicados aos pacientes ¹⁰.

As CTT podem permanecer em quiescência por longos períodos de tempo, e, portanto, escapar de protocolos de tratamento convencionais ⁵⁵. No entanto, estas células têm potencial para se tornarem ativas novamente, diferenciar e proliferar, levando ao estabelecimento de recidivas locais ou de metástases distantes ⁵⁹. Estudos mostram que o processo de metástase exige a formação de um perfil de CTT metastático, devido a alterações genéticas e epigenéticas essas células passam a ter um perfil mais invasivo e, portanto, mais propenso à metástase ^{60, 61}. Nessas células foi descrita a transição epitélio–mesênquima (EMT), que ocorre quando as células se dissociam umas das outras, diminuem a expressão de marcadores epiteliais, obtêm a expressão de marcadores mesenquimais, alteraram a estrutura do citoesqueleto, e estabelecem novas interações célula-matriz ⁶¹. Curiosamente, células que apresentam um fenótipo EMT, também apresentam características moleculares de CTT ⁶². Ao mesmo tempo que um subgrupo de CTT também expressam um fenótipo de EMT ⁶². Esse fenômeno fortalece as evidências de que o processo EMT e CTT estão intimamente relacionados ⁶². Estudos mostraram que o processo de EMT e a plasticidade celular das CTT, que permite essa variação entre um fenótipo mais invasivo e um fenótipo mais proliferativo, são ativados através de uma regulação epigenética coordenada, incluindo modificações

de DNA e de histonas, para se obter mudanças genéticas flexíveis e rápidas, a fim de estabilizar a mudança no fenótipo celular ⁶³. No processo de metástase a plasticidade das CTT é de fundamental importância, visto que inicialmente essas células devem passar pela transição epitélio-mesenquimal, uma vez que atingem a corrente sanguínea ou vasos linfáticos elas precisam se adaptar para evitar a apoptose induzida por defesas naturais do organismo, e ainda devem ser capazes de se ligar às células endoteliais de um órgão alvo, invadi-lo e iniciar um novo tumor ⁶³. Para isto se envolve uma intensa comunicação entre o tumor primário, CTT e o sítio metastático, através de citocinas, fatores de transcrição, DNA circulante livre e microRNAs ⁶⁴.

Acredita-se que as CTT residem em nichos, microambientes locais especializados, que formam um ambiente complexo onde interações entre as células e componentes da matriz definem a sobrevivência e manutenção das características das CTT ⁶⁵. O microambiente tumoral regula intensamente as CTT, as outras células neoplásicas, o desenvolvimento tumoral, a infiltração imune e também o processo de metástase ⁶⁵. No nicho das CTT vários componentes do microambiente podem interagir com estas células e influenciar sua autorrenovação e promover resistência às terapias ⁶⁶. Este processo de sinalização entre as células que envolvem o tumor, como por exemplo as células endoteliais, e as células neoplásicas também pode estar ocorrendo em órgãos distantes onde ocorre a metástase ⁶⁷. Especula-se que o direcionamento terapêutico para o nicho tumoral pode interromper essa interação entre as células neoplásicas e as células que constituem o nicho, afetando as CTT e tornando o tumor mais suscetível aos efeitos da radioterapia e quimioterapia convencional ⁶⁷.

Enquanto muitos estudos têm revelado os mecanismos de resistência à terapia em outras neoplasias malignas, sabe-se muito pouco sobre a resistência dos tumores de glândula salivar, sendo essa uma das questões clínicas mais importantes que envolvem essa neoplasia ¹⁰. A recente identificação das CTT no CME, indica uma possível explicação para a resistência as terapias, que pode levar a recorrência e metástase, mesmo anos depois de finalizado o tratamento ¹¹. Uma melhor compreensão dos aspectos moleculares das CTT pode levar ao desenvolvimento de tratamentos que visam esta subpopulação celular, sensibilizando assim os tumores das glândulas salivares para terapias que eliminam a população tumoral em massa, mas não atingem as CTT ¹⁰.

Atingir especificamente as CTT é um enorme desafio do ponto de vista terapêutico, pois as estratégias que não são suficientemente seletivas para CTT podem causar toxicidade em tecidos saudáveis e piorar o prognóstico dos pacientes ⁶⁸. Muitas abordagens utilizadas em outros tipos de câncer exploraram as diferenças nos marcadores de superfície celular ou diferenças na ativação de vias de sinalização para identificar compostos que afetem seletivamente as CTT ⁶⁹. Estes alvos incluem fatores anti-apoptóticos, enzimas de reparação do DNA e vias de sinalização oncogênicas distintas tais como Wnt/ β -catenina, TGF- β , Hedgehog, EGFR, PTEN, Bcl-2, JAK/STAT, Notch e PI3K/AKT/mTOR ⁶⁹. Descobriu-se recentemente que no CME a via de sinalização AKT/mTOR está superexpressa em células ALDH^{HIGH}CD44^{HIGH}, em comparação com as outras células do tumor ¹¹. Porém, mais estudos são necessários para entender a participação dessa via de sinalização nos processos celulares que as CTT estão envolvidas, assim como, avaliar a utilização de inibidores dessa via como alvo no tratamento direcionado as CTT no CME.

2.3 VIA DE SINALIZAÇÃO mTOR

Atualmente existe pouca informação sobre a via de sinalização PI3K/AKT/mTOR no CME. Entretanto, estudos que investigaram por imunohistoquímica a expressão de proteínas importantes na via de sinalização PI3K observaram a ativação dessa via em tumores de glândula salivar, incluindo no CME ^{15,16}. Outro estudo realizado especificamente em amostras de pacientes com CME, identificou através de análise do perfil genômico a ativação da via de sinalização PI3K/mTOR, principalmente em casos de CME classificados como de alto grau ⁷⁰. A hiperativação da via PI3K/mTOR também foi recentemente descrita nas CTT do CME ¹¹. A cascata de sinalização PI3K/AKT que leva a fosforilação de mTOR, é crucial para muitas condições fisiológicas e patológicas, como proliferação celular, angiogênese, metabolismo, diferenciação e sobrevivência ⁷¹. A via de sinalização fosfatidilinositol-3-quinase, PI3K, é frequentemente encontrada desregulada na maioria dos cânceres e contribui tanto para a patogênese do câncer como para a resistência às terapias ⁷¹. A desregulação da via PI3K/AKT/mTOR pode acontecer

por uma variedade de mecanismos, incluindo a superexpressão ou ativação de receptores de fatores de crescimento, tais como HER-2 (receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2) e IGFR (receptor de fator de crescimento semelhante a insulina), e mutações em PI3K e AKT ²⁶. PTEN, que é um regulador negativo de sinalização de PI3K, também pode levar a desregulação dessa via devido a mutações, perda de heterozigose, metilação, expressão aberrante de microRNA reguladores, entre outros mecanismos ⁷².

Dentro dos componentes da via PI3K/AKT/mTOR, existe um grande interesse no mTOR como alvo no tratamento de tumores malignos ⁷³. Estudos mostram que mTOR participa da regulação da tradução de proteínas, biogênese dos ribossomos, proliferação, autofagia e sobrevivência celular ⁷⁴. Ensaio clínicos que investigam a segurança e eficácia de inibidores de mTOR como monoterapia, ou em combinação com agentes quimioterápicos típicos, têm apresentado bons resultados para alguns tipos de câncer ^{26,27}. O mTOR foi descoberto como resultado de uma pesquisa que visava descobrir o alvo da rapamicina, um antibiótico produzido pela bactéria *Streptomyces hygroscopicus* que originalmente atraiu atenção devido à sua capacidade de inibir o crescimento de *Candida albicans* e outros fungos ⁷⁵. Rapidamente foi observado que a rapamicina também atua contra células de mamíferos, com efeitos no tamanho e na proliferação celular, levando ao seu desenvolvimento como medicamento imunossupressor e anticancerígeno ⁷⁶. E a proteína alvo da rapamicina em células de mamíferos foi nomeada mTOR, do inglês “mammalian target of rapamycin” (alvo mamífero da rapamicina) ⁷⁷.

O mTOR regula o crescimento, a motilidade e o metabolismo celular formando dois complexos multiprotéicos, mTORC1 e mTORC2 ¹⁹. O complexo mTORC1 é ativado pela via PI3K/AKT e inibido pelo complexo hamartina-tuberina da esclerose tuberosa, conhecido como TSC1/TSC2 ⁷⁸. A proteína AKT pode fosforilar TSC2, interrompendo o complexo TSC1/TSC2, e assim ativar mTORC1 ⁷⁸. O AMPK, proteína quinase ativa, também proporciona um mecanismo para controlar a atividade do complexo TSC1/TSC2, mas em contraste com o AKT serve para promover a atividade de TSC2 e bloquear a função de mTORC1 ⁷⁸. Entre outras proteínas, o complexo mTORC1 contém mTOR, RAPTOR, mLST8, PRAS40 e DEPTOR ⁷⁹. A RAPTOR regula positivamente a atividade de mTOR e funciona como um suporte para o recrutamento dos substratos de mTORC1 ⁷⁹. A PRAS40 regula negativamente a atividade de mTOR ⁸⁰. E as mLST8 e DEPTOR são proteínas de

suporte presentes nos dois complexos ⁸¹. Em resposta a fatores de crescimento e nutrientes, o mTORC1 regula o crescimento celular através da modulação de muitos processos, incluindo síntese proteica, biogênese dos ribossomos e autofagia ⁸¹. A modulação desses processos ocorre principalmente através da fosforilação de S6K-1 e 4EBP1 ⁸¹. Apesar de ser uma medida indireta da atividade de mTORC1, a fosforilação de S6K-1 é amplamente utilizada em pesquisas e na clínica como biomarcador da atividade de mTORC1 ¹⁹. Outros substratos de mTORC1 incluem a quinase ULK1, que é uma reguladora chave da autofagia, e também TFEB, um regulador da biogênese dos lisossomos ¹⁹. Notavelmente, o mTORC1 também exerce potente efeito de retroalimentação na via PI3K/AKT/mTOR através do substrato S6K-1, inibindo a fosforilação do receptor de insulina 1 (IRS-1), que exerce controle inibitório em AKT ⁸¹.

O mTORC2 é constituído pelas proteínas mTOR, RICTOR, mSin1, mLST8, DEPTOR, entre outras ⁸². A RICTOR é uma proteína exclusiva de mTORC2, e não permite a ligação ao complexo formado pela rapamicina, conferindo assim resistência a droga. mLST8 e DEPTOR são componentes presentes em ambos os complexos formados por mTOR. E mSin1 é uma subunidade essencial de mTORC2 importante para a fosforilação de AKT Ser⁴⁷³ ⁸². A ativação de mTORC2 resulta na fosforilação de AKT no sítio hidrofóbico Ser⁴⁷³ o que permite a fosforilação de Thr³⁰⁸ no domínio catalítico pela proteína PDK1, levando a completa ativação de AKT ⁸³. A AKT Ser⁴⁷³ é um substrato bem documentado de mTORC2, que também modula a fosforilação da proteína quinase C α (PKC α), e assim regula o citoesqueleto e a motilidade celular ⁸³. AKT é um componente chave da via de sinalização PI3K e regula uma vasta gama de atividades celulares incluindo crescimento celular, metabolismo e sobrevivência ⁷¹. A fosforilação de AKT Ser⁴⁷³ é estimulada pela ativação PI3K, embora o mecanismo molecular da regulação específica de mTORC2 ainda não esteja bem definido ¹⁸. O estudo de mTORC2 está no início, mas a descoberta de que mTORC2 diretamente fosforila AKT adiciona um novo papel ao mTOR no câncer ²⁵.

Os dois complexos diferem na sua sensibilidade a rapamicina, mTORC1 é sensível e mTORC2 é considerado resistente ¹⁹. A rapamicina liga-se à FKBP12, um membro da família de proteínas de ligação de FK506, e o complexo rapamicina-FKBP12 liga-se ao mTORC1, inibindo a sua atividade ¹⁹. Os análogos da rapamicina, conhecidos como rapalogs, possuem modificações relativamente

pequenas em sua estrutura, agindo pelo mesmo mecanismo que a rapamicina para inibir mTOR, porém com solubilidade e estabilidade aumentadas, o que facilita o uso em pacientes ²⁰. A rapamicina e seus análogos podem inibir vários processos que são importantes no tratamento antitumoral, incluindo angiogênese, proliferação e sobrevivência celular ²⁷. A Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA) aprovou o tensirolimo para o tratamento de carcinoma de células renais de estágio avançado em 2007 ^{27,28}. Desde então, estão sendo realizados ensaios clínicos com rapamicina e rapalogs, tais como tensirolimus e everolimo, para diversos tipos de câncer, alguns deles foram aprovados para uso clínico, entretanto alguns resultados têm sido desapontadores ^{27,28}.

A rapamicina e os rapalogs são inibidores universais da fosforilação de S6K-1 dependente de mTORC1, mas a existência de um forte circuito de retroalimentação negativa de S6K-1 para AKT apresenta um problema terapêutico, uma vez que a inibição de S6K-1 leva a ativação de AKT, o que pode promover a sobrevivência e a quimiorresistência celular ²⁵. No entanto, foi descrito que o tratamento a longo prazo com rapamicina pode inibir a formação do complexo mTORC2 por sequestrar moléculas de mTOR recém-sintetizadas ⁸⁴. Uma questão importante é que o mTORC2 é sensível à rapamicina em algumas células, parcialmente sensível e resistente em outras ¹⁸. Assim, a rapamicina e os seus análogos são inibidores universais de mTORC1 e S6K-1, e inibidores específicos em alguns tipos celulares de mTORC2 e AKT ¹⁸. A complicação desta questão é o fato de que não foram identificados traços genéticos preditivos desse fenômeno, o que permitiria saber em quais tipos de tumores o tratamento com rapamicina e rapalogs teria efeito de inibir mTORC2 e conseqüentemente reduzir a sobrevivência das células neoplásicas ²⁵.

Inibidores para proteínas com funções mais amplas e acima de mTOR na cascata de sinalização, como os inibidores de PI3K/AKT, também estão sendo testados e poderiam resolver essa questão por inibir mTORC1 e mTORC2 ¹⁴. Contudo, é importante considerar que à medida que a ação celular da via de sinalização se torna mais ampla, o risco de toxicidade aumenta, e esta toxicidade pode levar a piores efeitos colaterais e afetar a qualidade de vida dos pacientes ²⁵. Portanto, existe vantagens em inibir diretamente mTOR, no entanto mais conhecimentos são necessários a respeito do funcionamento da via e dos efeitos de sua inibição ²⁵.

O CME, apesar de ser a neoplasia mais prevalente entre os tumores malignos de glândula salivar, ainda não apresenta um tratamento satisfatório, principalmente para os casos mais avançados e agressivos. Nesse estudo buscou-se uma nova terapia para o CME, que pudesse ser utilizada isoladamente ou em conjunto com as terapias atuais, e que fosse capaz de afetar as CTT. Considerando a recente descoberta que a sinalização de mTOR está superexpressa em CTT do CME, decidiu-se avaliar o potencial uso de inibidores de mTOR como terapia para eliminação de CTT, assim como, tentar elucidar o funcionamento da via mTOR e os efeitos moleculares do uso de inibidores de mTOR nas CTT. Esse conhecimento é de extrema importância no caminho para o melhor entendimento sobre o processo de carcinogênese e no desenvolvimento de novas terapias para o carcinoma mucoepidermóide, aspectos essenciais na ambição de melhorar a qualidade de vida e o prognóstico dos pacientes afetados por essa doença.

3 PROPOSIÇÃO

A proposição deste estudo é avaliar o potencial uso de inibidores de mTOR como terapia com alvo em células tronco tumorais no carcinoma mucoepidermóide. Especificamente pretende-se:

- 1) avaliar a ativação da via de sinalização mTOR em amostras de pacientes humanos com CME e a relação da sua ativação com o prognóstico clínico dos pacientes.
- 2) avaliar a ativação e importância da via de sinalização mTOR nas células tronco tumorais do carcinoma mucoepidermóide, assim como, o efeito e especificidade de ação dos inibidores de mTOR nessas células;
- 3) elucidar melhor o funcionamento da cascata de sinalização AKT/mTOR/S6K-1 e avaliar os mecanismos moleculares de ação dos inibidores de mTOR nas células tronco tumorais do CME;
- 4) comparar a ação de inibidores de mTOR com quimioterápicos utilizados atualmente em relação a capacidade de induzir apoptose e de reduzir a fração de células tronco tumorais;
- 5) verificar o potencial dos inibidores de mTOR como terapia contra o CME através da análise dos efeitos *in vivo* da inibição química e silenciamento genético de mTOR, tanto nas células tronco tumorais, como no tumor como um todo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LINHAGENS CELULARES

As linhagens celulares de tumores de carcinoma mucoepidermóide humano, UM-HMC-1, UM-HMC-3A e UM-HMC-3B, geradas e caracterizadas no Laboratório de Angiogênese (Faculdade de Odontologia, Universidade de Michigan, Ann Arbor, MI, EUA) ⁸⁵ foram mantidas em meio de cultura de glândula salivar (MGS) constituído por DMEN (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, Carlsbad, CA, EUA), 1% de l-glutamina (Gibco), 1% de penicilina e estreptomicina (Gibco), 20 ng/mL de fator de crescimento epidérmico (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), 400 ng/ml de hidrocortisona (Sigma Aldrich) e 5 ug/mL de insulina (Sigma Aldrich). As células dérmicas endoteliais microvasculares humanas primárias (HDMEC, Lonza, Basileia, Suíça) foram cultivadas utilizando meio de crescimento endotelial (EBM 2-MV, Lonza).

4.2 QUIMIOTERÁPICOS E INIBIDORES QUÍMICOS

Para os ensaios in vitro foram utilizados os seguintes medicamentos: buparlisibe (inibidor de AKT – Selleckchem, Houston, TX, EUA), rapamicina (inibidor de mTOR - Sigma Aldrich), tensirolimo (inibidor de mTOR - Sigma Aldrich), PF4708671 (inibidor de S6K-1 - Selleckchem), cisplatina (Petah Tikva, Israel) e paclitaxel (Fresenius Kabi, Bad Homburg vor der Höhe, Alemanha). Para o ensaio in vivo utilizou-se tensirolimo (Selleckchem).

4.3 AMOSTRAS DE PACIENTES HUMANOS DIAGNOSTICADOS COM CARCINOMA MUCOEPIDERMÓIDE

O Departamento de Patologia da Universidade de Campinas (Campinas, SP, Brasil) e o Hospital Universitário João de Barros Barreto (Belém, PA, Brazil) forneceram amostras de tumores de 17 pacientes diagnosticados com CME e os dados de acompanhamento clínico. Foram realizadas análise por imunohistoquímica da expressão de p-mTOR e p-S6K-1 em todos os tumores e os

resultados foram correlacionados com os dados clínicos de sobrevivência, recorrência e metástase dos pacientes.

4.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA E IMUNOFLORESCÊNCIA

Para a realização de imuno-histoquímica e imunofluorescência cortes de tecidos parafinados foram incubados a 60°C, desparafinizados em xilol e reidratados em etanol. Para a revelação de epítomos foi utilizado o kit “Citrate Buffer Antigen Retrieval” (Dako, Carpinteria, CA, EUA). Ligações inespecíficas foram bloqueadas por incubação com 0,1% de Triton-x100 (Sigma Aldrich) durante 20 minutos, peróxido de hidrogênio a 3% durante 20 minutos, e “Background Sniper” (Biocare Medical, Pacheco, CA, EUA) durante 20 minutos. As lâminas de imuno-histoquímica foram incubadas por 16 horas a 4°C com anticorpo p-mTOR (1:50, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), anticorpo p-S6K-1 (1:100, Santa Cruz Biotechnology) ou fator VIII (1:50, Thermo Scientific). Os cortes foram lavados duas vezes durante 10 minutos com PBS e depois incubados com “MACHI 3 Probe” (Biocare Medical) durante 20 minutos. Em seguida, foram lavados novamente duas vezes em PBS durante 10 minutos e incubados com “MACHI 3 HRP polymer” (Biocare Medical) durante 20 minutos. Por fim, as lâminas foram coradas com o cromógeno 3,3-diaminobenzidina (DAB), contrastadas com hematoxilina Mayer, desidratadas em etanol e montadas. Os cortes de imunofluorescência foram incubados com o anticorpo ALDH1 derivado de coelho (1:100, Abcam, Cambridge, Reino Unido) e o anticorpo CD44 derivado de camundongo (1:200, Abcam), conjuntamente, por 16 horas a 4°C de temperatura. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com PBS duas vezes durante 10 minutos e incubadas com Alexafluor 488 anti-coelho (1:200, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) durante 20 minutos. Em seguida, as lâminas foram incubadas com Alexafluor 594 anti-camundongo (1:200, Invitrogen) durante 20 minutos. Os núcleos foram corados com DAPI. As lâminas foram visualizadas sob microscopia de luz ou de fluorescência (Leica DM 5000B, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha), e as imagens foram adquiridas com o software Q-Capture (versão Pro 7, Q-imaging). Foram selecionados aleatoriamente 10 campos por lâmina com aumento de 400x e a porcentagem de células positivas foi quantificada utilizando o software ImageJ (versão 1.46, NIH).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA IMUNO-HISTOQUÍMICA

A comparação estatística da porcentagem média de células p-S6K-1 positivas e da porcentagem média de células mTOR positivas entre cada paciente livre de doença após a cirurgia e os acometidos por metástase, recorrência ou morte foram calculadas utilizando o teste U de Mann-Whitney. Todos os cálculos foram realizados utilizando-se o software estatístico R 3.1.0.

4.6 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

Os ensaios de sulforodamina B (SRB) foram realizados para avaliar o efeito dos inibidores da via de sinalização AKT/mTOR/S6K-1 na viabilidade celular. As células foram plaqueadas em uma densidade de 1×10^3 células por poço em placas de 96 poços, e no dia seguinte foram expostas a concentrações crescentes de inibidor de AKT (buparlisibe), inibidores de mTOR (rapamicina e tensirolimo) ou inibidor de S6K-1 (PF4708671) por até 96 horas. As células foram fixadas com ácido tricloroacético 10% gelado durante 1 hora a 4°C. Em seguida, as células viáveis foram coradas com corante SRB a 0,4% (Sigma-Aldrich) durante 30 minutos. As placas foram lavadas com ácido acético a 1% para remover o excesso de corante. Utilizou-se 10 mMol/L de tris base para solubilizar novamente as células coradas e em seguida as placas foram lidas no leitor de microplacas a 560 nm (GENios, Tecan, Durham, NC, EUA). Os resultados foram normalizados e os valores de IC50 foram determinados para os experimentos de 96 h. Os dados foram obtidos em quadruplicatas para cada condição de tratamento e três experimentos independentes foram realizados para verificar a reprodutibilidade dos dados.

4.7 WESTERN-BLOTTING

Os lisados de proteínas das células UM-HMC e de tecidos derivados dos xenoinxertos foram preparados utilizando o tampão de lise nonidet P-40 (NP-40) a 1% e carregados em gel SDS-PAGE entre 9 e 12%. As membranas foram incubadas de um dia para o outro a 4°C com os anticorpos AKT (Ser⁴⁷³, Cell Signaling, Danvers, MA), p-AKT (Ser⁴⁷³, Cell Signaling), mTOR (Cell Signaling), p-mTOR (Santa Cruz Biotechnology), S6K-1 (Cell Signaling), p-S6K-1 (Santa Cruz

Biotechnology), BMI-1 (Cell Signaling) na concentração de 1:1000, ou com β -actina conjugada com peroxidase na concentração de 1:100.000 (Santa Cruz Biotechnology). As membranas foram bloqueadas com incubação por 4 horas com leite desnatado a 1% e quando necessário, foram expostas a anticorpos secundários anti-coelho ou anti-camundongo conjugados com peroxidase (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, EUA) na concentração de 1:1000. As proteínas imunorreativas foram visualizadas pelo substrato quimioluminescente "SuperSignal West Pico" (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, EUA). Foram realizados três experimentos independentes para verificar a reprodutibilidade dos dados.

4.8 CITOMETRIA DE FLUXO

As células foram filtradas utilizando tubos de poliestireno de 5ml com tampa-filtro (BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA). Para a quantificação de ALDH foi utilizado o kit Aldefluor (Stem Cell Technologies, Vancouver, Columbia Britanica, Canada). Foram preparadas suspensões de células individuais com 2×10^6 células/ml e incubação dessas células com 5 μ l de substrato de Aldefluor® (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, EUA) ou 5 μ l do inibidor da atividade de ALDH dietilaminobenzaldeído (DEAB) durante 40 minutos a 37°C. Em seguida, as células foram lavadas e expostas a ao anticorpo anti-CD44 (APC, BD Pharmingen) na concentração 1:100 durante 30 minutos a 4°C. As células foram então quantificadas de acordo com a atividade de ALDH e expressão de CD44. Alternativamente, as células foram coradas com uma combinação de AldeRed 588-A (Miliipore, Billerica, MA, EUA) com anti-CD44 violeta (V450, BD Horizon, San Jose, CA, EUA) para os experimentos com células transfectadas com GFP; ou com o substrato Aldefluor® (Cayman Chemicals) e anti-CD44 violeta (V450, BD Horizon) para os ensaios de apoptose. Para o ensaio de apoptose, as células foram incubadas com anexina V (APC, BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) na concentração 1: 100 (APC, BD Biosciences) e incubadas durante 20 minutos em temperatura ambiente. Para este ensaio células tratadas com DMSO foram utilizadas como controle positivo. Em todos os experimentos de citometria de fluxo, utilizou-se a 7-aminoactinomicina-D (7-AAD, BD Biosciences) como um controle de viabilidade celular e os *dublets* celulares foram eliminados no início da análise de acordo com o tamanho e complexidade

celular. Os resultados foram analisados utilizando o software FlowJo® (FlowJo, 9.9.5) e os dados foram obtidos a partir de triplicatas e representam pelo menos 3 experimentos independentes.

4.9 ENSAIO DE SALISFERAS

As esferas não aderentes derivadas de células de carcinoma mucoepidermóide (salisferas) foram cultivados em placas de 6 poços de ultrabaixa aderência de 6 poços (Corning, New York, NY, EUA) durante 10 dias com DMEM-F12 (Invitrogen) suplementado com suplemento de N-2 a 1% (Invitrogen), 1% de GlutaMAX (Invitrogen), 1% de penicilina/estreptomicina (Invitrogen), 1 µM de dexametasona (Sigma-Aldrich), 10 µg/ml de insulina (Sigma Aldrich), 20 ng/ml de EGF (Sigma Aldrich) e 20 ng/ml de fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF, Sigma Aldrich). A passagem para esferas secundárias foi realizada com exposição das salisferas a tripsina 0,25% durante 5 minutos, e dissociação mecânica das células. Utilizou-se solução neutralizante de tripsina (Lonza) para neutralizar a tripsina. Em seguida, as células foram contadas, diluídas em 1000 células por 3 ml, adicionadas a placas de ultrabaixa aderência de 6 poços (Corning) e analisadas por 21 dias. Colônias de 50 células ou mais foram consideradas salisferas. Os dados foram obtidos a partir de triplicatas e representam pelo menos 3 experimentos independentes.

4.10 SILENCIAMENTO DE mTOR

Células EK293T foram co-transfectadas de forma transitória com os vetores lentivirais psPAX2, pMD2G e duas sequências de sh-RNA para silenciamento de mTOR e expressão de GFP (sh-mTOR (a), sh-mTOR (b); University of Michigan, Ann Arbor, MI, EUA) pelo método do fosfato de cálcio. As células UM-HMC-1, -3A e -3B foram infectadas com sobrenadantes contendo lentivírus e selecionadas com 1 mg/ml de puomicina (Sigma-Aldrich). O silenciamento de mTOR foi verificado por *western blot* e por análise de citometria de fluxo da expressão de GFP.

4.11 XENOENXERTOS DE CARCINOMA MUCOEPIDERMÓIDE

Para verificar o impacto do silenciamento com mTOR foram preparadas estruturas tridimensionais (*scaffolds*) de ácido poli-láctico altamente porosos (6x6x1mm) semeados com 700.000 de células UM-HMC-3B silenciadas para mTOR ou transfectadas com controle e 300.000 células primárias HDMEC (Lonza) em meio contendo fator de crescimento reduzido (Matrigel; Corning) e EGM2-MV (Lonza) na concentração de 1:1. Foram implantados dois *scaffolds* bilaterais no espaço subcutâneo da região dorsal de camundongos imunodeficientes (CB.17.SCID, Charles River Laboratory, Wilmington, MA, EUA). Os tumores foram medidos 3 vezes por semana durante 90 dias, momento que os primeiros tumores excederam 1.000 mm³ e o experimento foi finalizado (Figura 4.1). O tamanho do tumor foi calculado utilizando a fórmula: volume (mm³) = C × L² / 2 (C para comprimento e L para largura).

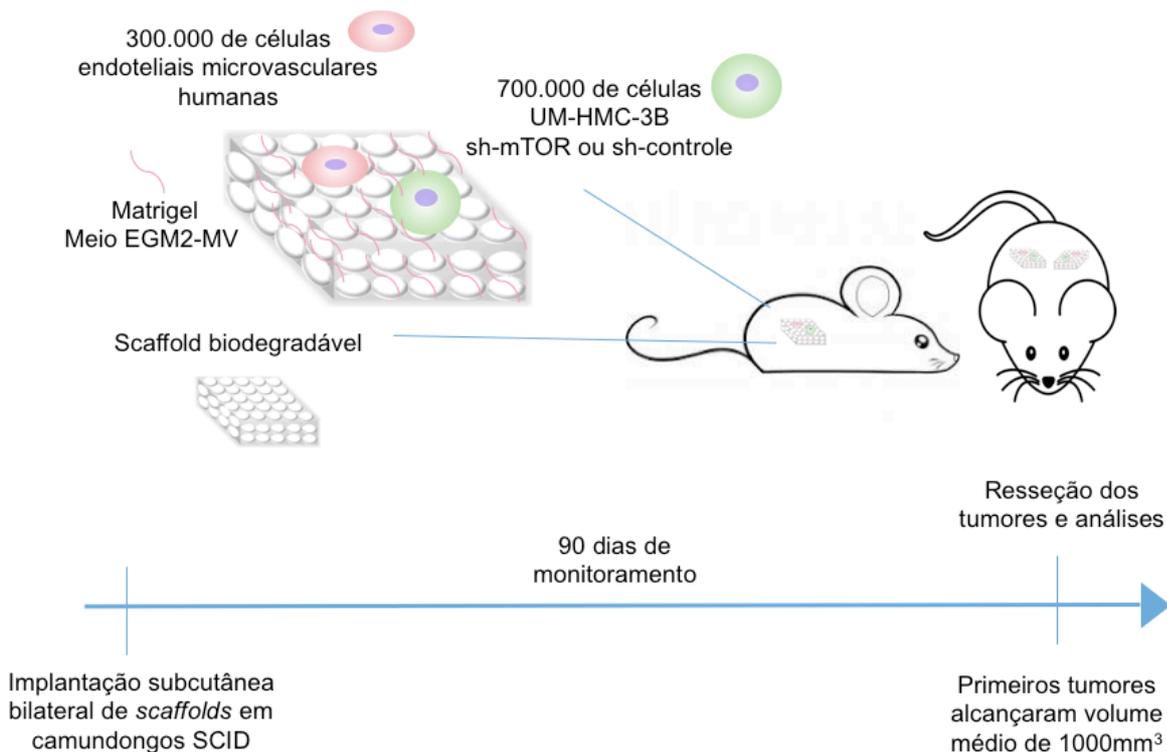


Figura 4.1 - Visão esquemática do experimento *in vivo* utilizado para avaliação do impacto do silenciamento de mTOR

Para verificar *in vivo* o impacto da inibição de mTOR, foram implantadas 700.000 de células UM-HMC-3B juntamente com 300.000 células primárias HDMEC (Lonza) em *scaffolds* da mesma forma que descrito acima. Os tumores foram medidos semanalmente e quando o volume médio dos tumores atingiu 200 mm³, os camundongos foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos e tratados com tensirolimo (10 mg / kg) ou veículo (5% de polietilenoglicol-200 e 0,5% de tween 80 em água) diariamente durante 7 dias, via injeção intraperitoneal (Figura 4.2).

Em ambos os experimentos, os camundongos foram submetidos a eutanásia e ressecção dos tumores. Os tumores removidos foram divididos em 3 frações e preparados para os seguintes experimentos: *western blot*, imuno-histoquímica e citometria de fluxo. A primeira fração de todos os tumores foi fixada durante 24 horas em formalina tamponada a 10% (Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EUA) a 4°C e processada para imuno-histoquímica. A segunda fração foi exposta a tampão de lise nonidet P-40 (NP-40) a 1% para preparar lisados proteicos. E, finalmente, a terceira fração dos tumores foi picada em pequenos pedaços e digerida em solução de colagenase-hialuronidase 10x (Stem Cell Technologies) diluída 1:10 em MGS sem soro fetal bovino a 37°C durante 60 minutos. As células foram passadas através de um filtro de 40 µm (Fisher) e adicionou-se meio MGS com soro bovino fetal (FBS, Invitrogen) às células. As células vermelhas do sangue foram lisadas por incubação em tampão de lise de AKC (Invitrogen) por 1 minuto. Em seguida, as suspensões de células do tecido foram preparadas para citometria de fluxo. O cuidado e tratamento dos animais durante esses experimentos foram de acordo com as diretrizes institucionais da Universidade de Michigan e aprovados pelo comitê de ética (Anexo A).

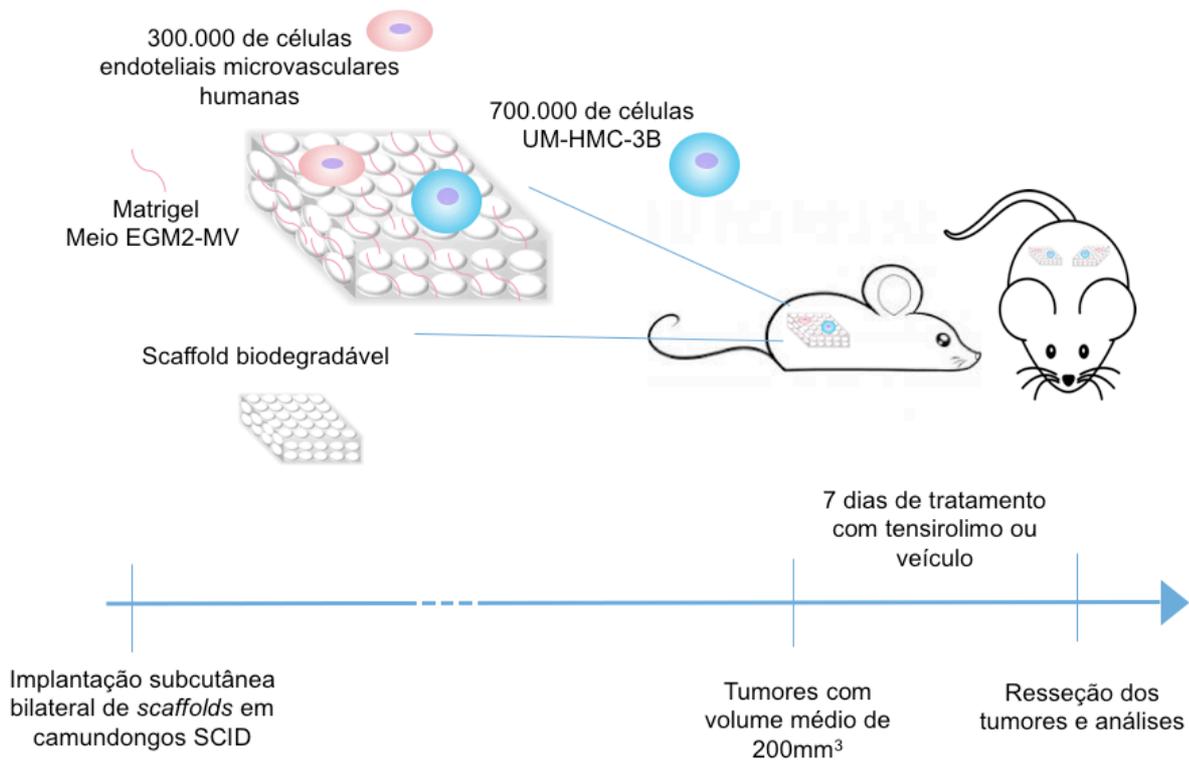


Figura 4.2- Visão esquemática do experimento *in vivo* para avaliação do impacto do tratamento com tensirolimo

4. 12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram analisados por ANOVA, seguido por testes post-hoc Tukey ou teste t de Student, conforme a indicação. Para avaliar o crescimento tumoral *in vivo* utilizou-se uma regressão linear de efeito misto para permitir a interpretação de medições repetidas em cada tumor. Os efeitos fixos do modelo incluíram o tempo, o tamanho inicial do tumor e o tratamento ou o grupo sh-rna. Assumiu-se uma estrutura de correlação autorregressiva de modo que valores de tempo mais próximos são assumidos como sendo mais correlacionados. As curvas de predição foram geradas a partir do modelo de regressão. A análise foi realizada usando no programa de software R, versão 3.1.0. O nível de significância foi determinado em $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 EXPRESSÃO DE P-MTOR E P-S6K-1 CORRELACIONA-SE COM PIOR PROGNÓSTICO DOS PACIENTES COM CME

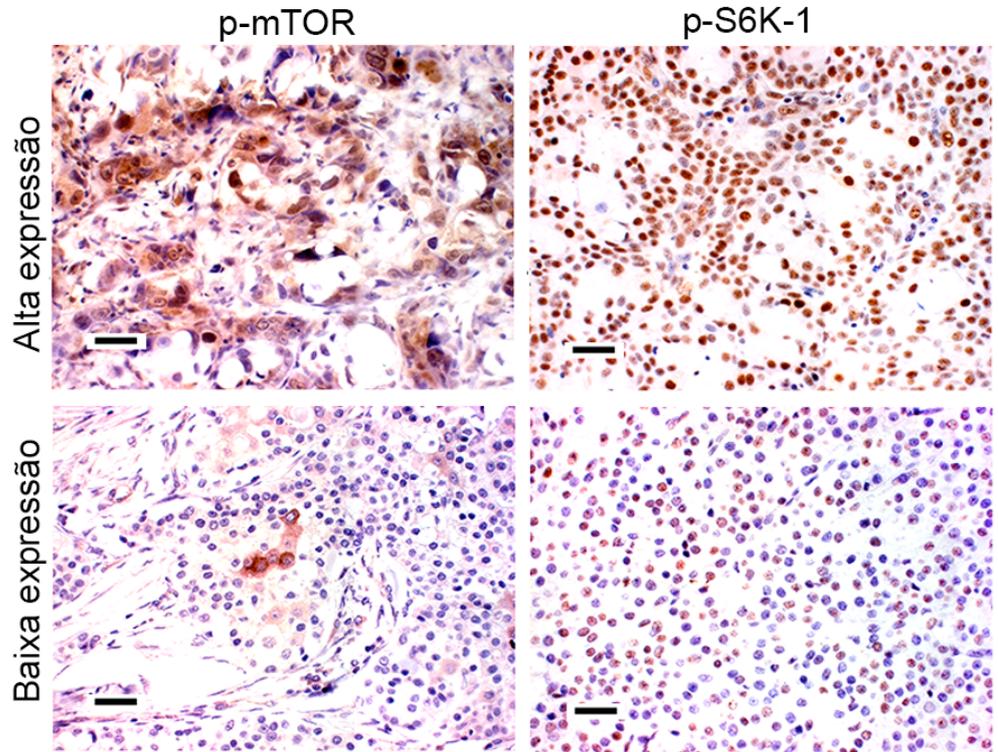
Para investigar os padrões de expressão de p-mTOR e p-S6K-1 no carcinoma mucoepidermóide humano, realizamos análises por imuno-histoquímica em 17 casos de pacientes com acompanhamento clínico de até 13 anos (Tabela 5.1, Figuras 5.1A e 5.1B).

Verificou-se que p-S6K-1 está expresso principalmente no núcleo, enquanto p-mTOR foi encontrado no núcleo e citoplasma das células (Figura 5.1C). Observou-se também que a média da porcentagem de células positivas para p-S6K-1 e de células positivas para p-mTOR foram ambas maiores nos pacientes com metástase, recorrência ou morte ($p = 0,002941$, em ambos os casos) (Figuras 5.1A e 5.1B).

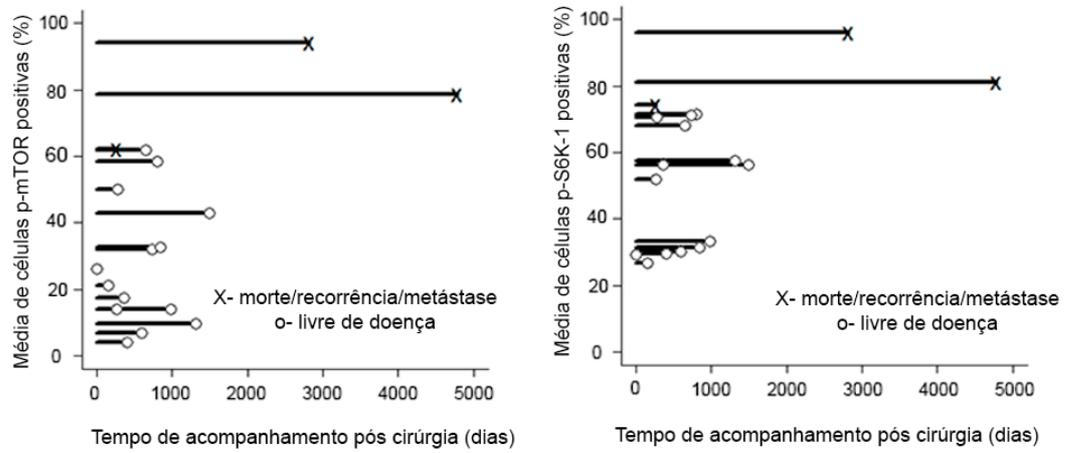
Tabela 5.1 - Variáveis clínicas, e média de células positivas para p-mTOR e p-S6K-1, segundo cada tumor analisado por imuno-histoquímica

| Caso | Sexo | Idade | Localização do tumor | Grau histológico | TNM | Recorrência/metástase | Sobrevida | Data da cirurgia | Última avaliação | p-mTOR % células positivas (desvio padrão) | p-S6K-1 % células positivas (desvio padrão) |
|------|-----------|-------|--------------------------------------|------------------|--------|-----------------------|-----------|------------------|------------------|--|---|
| 1 | Feminino | - | Glândula menor – língua | baixo | T1N0M0 | presente | vivo | 15/09/2008 | 06/10/16 | 94,16 (2,83) | 96,08 (1,8) |
| 2 | Masculino | 62 | Saco lacrimal | intermediário | N0MX | ausente | vivo | 18/09/2014 | 25/06/2015 | 50,18 (3,45) | 70,48 (10,53) |
| 3 | Feminino | 43 | Glândula menor | intermediário | T4N0MX | ausente | falecido | 12/06/00 | 01/08/2014 | 78,78 (5,33) | 81,32 (11,38) |
| 4 | Masculino | 33 | Parótida infra-auricular | intermediário | N0MX | ausente | vivo | 05/06/98 | 30/09/1998 | 21,14 (3,21) | 26,84 (3,5) |
| 5 | Masculino | 71 | Parótida –cervical | alto | N0MX | ausente | vivo | 28/06/1999 | 09/04/01 | 58,34 (1,96) | 71,56 (9,9) |
| 6 | Masculino | 77 | Parótida – pré-auricular | alto | N0MX | ausente | vivo | 25/02/2011 | 12/12/12 | 61,8 (6,32) | 68,18 (11,81) |
| 7 | Feminino | 60 | Palato | baixo | N0M0 | ausente | vivo | 24/08/1994 | 25/08/1994 | 26,14 (3,6) | 29,34 (5,07) |
| 8 | Masculino | 65 | Parótida | intermediário | T1N1M0 | presente | falecido | 04/07/03 | 19/12/2003 | 62,06 (5,10) | 74,28 (9,79) |
| 9 | Masculino | 64 | Posterior de mandíbula | baixo | T2N0M0 | ausente | vivo | 16/03/16 | 13/03/2017 | 17,54 (3,69) | 56,46 (4,87) |
| 10 | Feminino | 44 | Mandíbula - retromolar | intermediário | T2N0M0 | ausente | vivo | 02/02/16 | 13/03/2017 | 4,24 (1,56) | 29,72 (4,01) |
| 11 | Feminino | 74 | Mandíbula - retromolar | baixo | T2N1M0 | ausente | vivo | 17/06/2016 | 13/03/2017 | 13,92 (3,28) | 52,1 (4,22) |
| 12 | Feminino | 39 | Soalho bucal | baixo | T1N0M0 | ausente | vivo | 29/07/2015 | 13/03/2017 | 6,94 (2,87) | 30,12 (5,20) |
| 13 | Feminino | 51 | Palato | intermediário | T2N0M0 | ausente | vivo | 03/08/15 | 13/03/2017 | 32,18 (3,06) | 71,3 (7,18) |
| 14 | Masculino | 75 | Palato | baixo | T2N0M0 | ausente | vivo | 17/11/2014 | 13/03/2017 | 32,8 (4,14) | 31,38 (1,5) |
| 15 | Feminino | 65 | Soalho bucal Mandíbula - ângulo e | baixo | T3N0M0 | ausente | vivo | 07/11/14 | 13/03/2017 | 13,98 (2,99) | 33,3 (3,4) |
| 16 | Feminino | 18 | corpo | baixo | T2N0M0 | ausente | vivo | 14/02/2013 | 13/03/2017 | 42,82 (4,46) | 56,42 (7,8) |
| 17 | Feminino | 30 | Palato | baixo | T1N0M0 | ausente | vivo | 08/10/13 | 13/03/2017 | 9,74 (3,63) | 57,64 (1,9) |

A



B



C

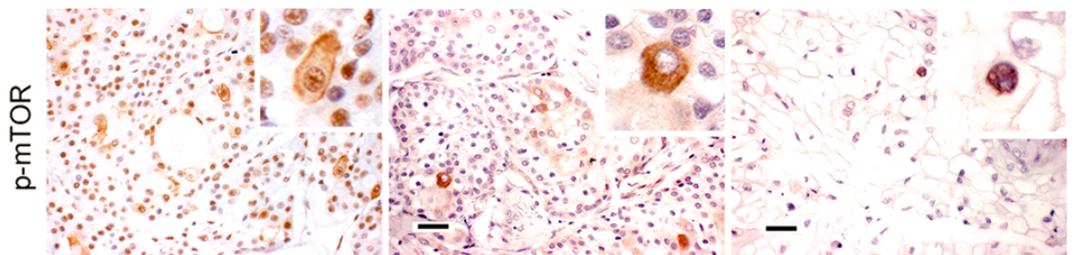


Figura 5.1 - Correlação entre a ativação da via mTOR e o pior prognóstico dos pacientes portadores de carcinoma mucoepidermóide. **A**, Imagens representativas de imuno-histoquímica para p-mTOR e p-S6K-1 realizada em amostras de tumores, segundo o marcador e a intensidade de expressão. As barras de escala representam 25 µm. **B**, Gráfico ilustrando a correlação entre pacientes livre de doença e pacientes que apresentaram recidiva, metástase ou falecidos com a média da expressão de p-mTOR e p-S6K-1 em tumores de CME. **C**, Imagens representativas de imuno-histoquímica para p-mTOR em tecidos tumorais de CME. A expressão de p-mTOR foi encontrada em núcleo, citoplasma ou ambos concomitantemente. Na primeira imagem, apesar da marcação predominantemente nuclear, observamos positividade para mTOR no núcleo e citoplasma de algumas células. Na segunda imagem, observamos expressão de mTOR predominantemente citoplasmática. Na terceira imagem, observamos que células claras também apresentam expressão de mTOR, neste caso com marcação apenas nuclear

A fim de avaliar inicialmente o potencial terapêutico dos inibidores da via AKT/mTOR/S6K-1, foram realizados nas linhagens UM-HMC-1, -3A e -3B ensaios de dependência de dose e tempo para o efeito na viabilidade celular dos seguintes inibidores: buparlisibe (inibidor de AKT), rapamicina e tensirolimo (inibidores de mTOR) e PF4708671 (inibidor de S6K-1). A porcentagem de células viáveis foi determinada por ensaio com corante SRB (Figura 5.2). Os dados foram normalizados e representam pelo menos três experimentos independentes realizados em quadruplicata. Foi observada uma resposta citotóxica dependente da dose e do tempo em todas as linhagens de células CME avaliadas. Os valores de IC50 para cada inibidor utilizado mostrou que mesmo em baixas concentrações, variando entre μM e ng/ml , essas drogas foram capazes de reduzir a população neoplásica em 50%, evidenciando a importância da via de sinalização de mTOR na sobrevivência de células do CME.

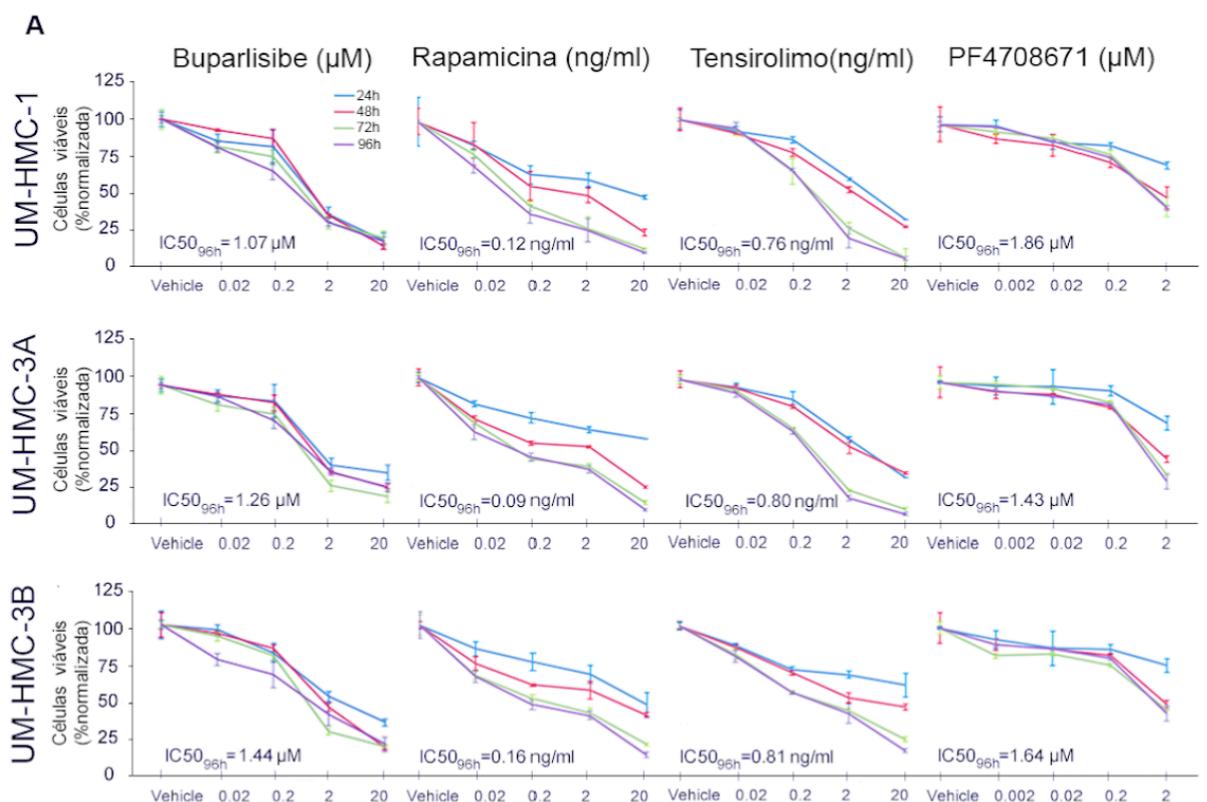


Figura 5.2 - Ensaio de citotoxicidade para os inibidores da via de sinalização AKT/mTOR/S6K-1. Os gráficos descrevem os resultados do ensaio de viabilidade celular nas linhagens UM-HMC-1, -3A e -3B, na dependência do tempo e dose, mostrando o efeito da buparlisibe (inibidor de AKT), rapamicina e tensirolimo (inibidores de mTOR), e PF4708671 (inibidor de S6K-1), conforme determinado pelo ensaio SBR

5.2 VIA DE SINALIZAÇÃO MTOR ESTÁ SUPEREXPRESSA NAS CTT DO CME

Para elucidar a ativação da via de sinalização de mTOR em CTT de CME realizou-se a separação celular, *sorting*, nas linhagens UM-HMC-1, -3A e -3B para isolar a subpopulação de células ALDH^{HIGH}CD44^{HIGH} da subpopulação não-CTT (células ALDH^{HIGH}CD44^{LOW}, ALDH^{LOW}CD44^{HIGH} e ALDH^{LOW}CD44^{LOW}). Em seguida, realizou-se *western blotting* com os lisados celulares das subpopulações isoladas para a expressão dos anticorpos AKT, p-AKT, mTOR, p-mTOR, S6K-1 e p-S6K-1, BMI-1 e β -actina (Figura 5.3A). Os resultados mostraram uma superexpressão de p-AKT, p-mTOR, p-S6K-1 e BMI-1 em células ALDH^{HIGH}CD44^{HIGH} em comparação com as não-CTT, enquanto AKT, mTOR e S6K-1 apresentaram expressão semelhante entre as subpopulações.

Para avaliar o potencial de mTOR como terapia direcionada as CTT do MEC, tratamos CTT isoladas, células ALDH^{HIGH}CD44^{HIGH}, com 2ng/ml de rapamicina por 24 horas. Em seguida, avaliou-se por *western blot* as mesmas proteínas do experimento anterior (Figura 5.3A). Surpreendentemente, além do bloqueio da fosforilação da via de sinalização mTOR, observou-se nas células ALDH^{HIGH}CD44^{HIGH} tratadas com rapamicina uma redução significativa de BMI-1, que é o principal regulador da autorrenovação das CTT. Estes dados indicam que a inibição de mTOR exerce efeito sobre as CTT.

A dupla marcação por imunofluorescência para ALDH e p-mTOR em tecidos humanos e em tumores de xenoenxerto derivados de células UM-HMC-3A reforçou a evidência de que as CTT apresentam ativação diferenciada da via de sinalização de mTOR. A expressão de ALDH foi encontrada no citoplasma das células e corada em verde, enquanto o p-mTOR foi corado em vermelho e estava presente no núcleo, citoplasma, ou ambas localizações das células. Os tecidos humanos e de xenotransplantes exibiram uma população de células com expressão de ALDH e p-mTOR, representadas por células que foram coradas em vermelho no núcleo e verde ou amarelo (devido à coexpressão dos dois marcadores na mesma região) no citoplasma. Estas células estavam localizadas principalmente em torno dos vasos sanguíneos e na frente de invasão tumoral (Figura 5.3B). Estes resultados sugerem que a sinalização de mTOR está realmente superexpressa em células ALDH^{HIGH}CD44^{HIGH} e pode ser um alvo importante no tratamento direcionado para as CTT do CME.

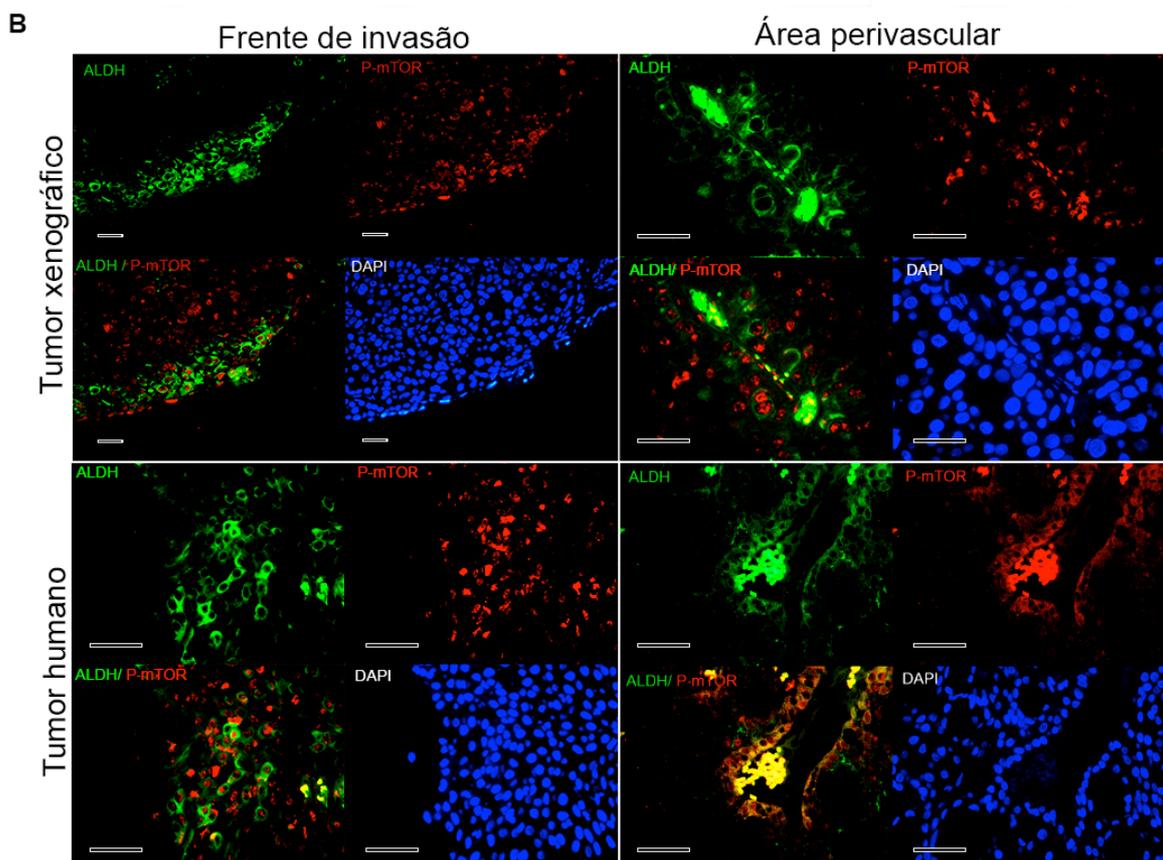
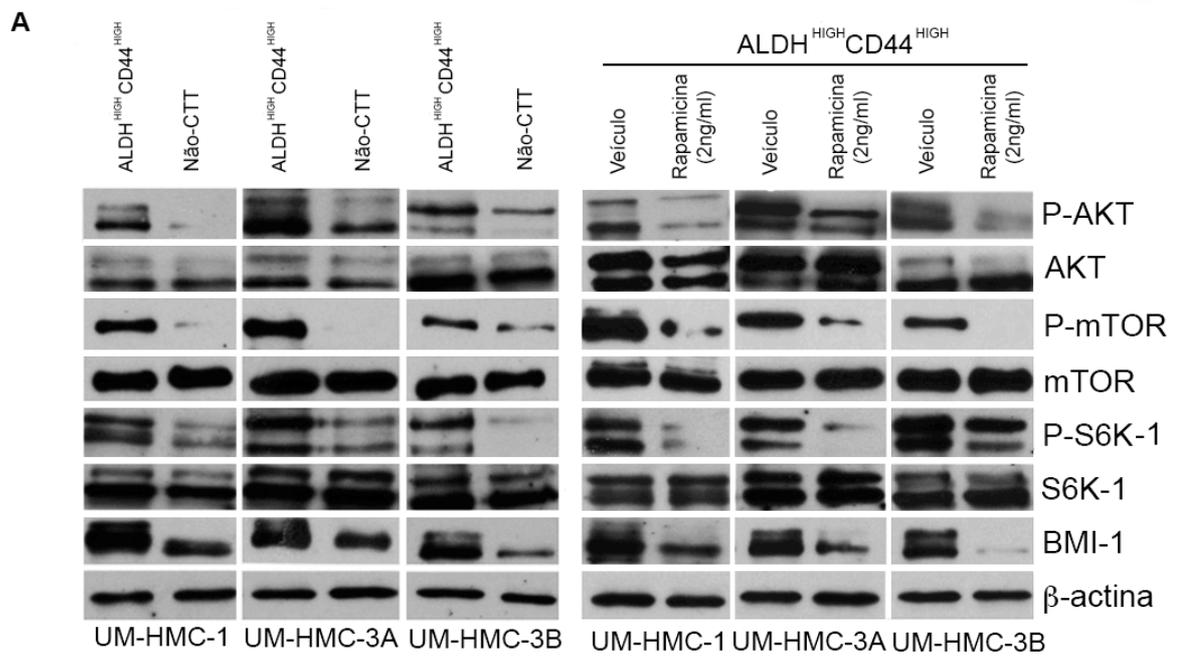


Figura 5.3 - Superexpressão da via de sinalização mTOR nas CTT. **A**, As células, UM-HMC-1, -3A e -3B foram separadas nas subpopulações ALDH^{HIGH}CD44^{HIGH} (CTT) e combinação das células ALDH^{HIGH}CD44^{LOW}, ALDH^{LOW}CD44^{HIGH} e ALDH^{LOW}CD44^{LOW} (não-CTT). A figura mostra os resultados por *western blot* para expressão dos anticorpos p-AKT, AKT, p-mTOR, MTOR, p-S6K-1, S6K-1, BMI-1 e β -actina nas CTT e não-CTT. **B**, *Western blot* para p-AKT, AKT, p-mTOR, MTOR, p-S6K-1, S6K-1, BMI-1 e β -actina na população ALDH^{HIGH}CD44^{HIGH} derivada das linhagens UM-HMC-1, -3A e -3B e expostas a 2 ng/ml de rapamicina durante 24 horas em comparação as mesmas células tratadas apenas com o veículo, utilizado como controle. **C**, Imunofluorescência em tumores de xenoinxertos gerados a partir de células UM-HMC-3A e em amostra de paciente diagnosticado com CME, nas áreas do fronte de invasão e perivascular. ALDH está corado em verde, p-mTOR corado em vermelho e DAPI em azul. As barras de escala representam 25 μ m

5.3 INIBIÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO MTOR REDUZ A FRAÇÃO E AUTORRENOVAÇÃO DAS CTT NO CME.

Para explorar o papel da via de sinalização mTOR nas CTT do CME, a população total UM-HMC-1, -3A e -3B foi exposta durante 24 horas a doses crescentes dos inibidores: inibidores de AKT, de 0,2 a 20 μ M de buparlisibe ou LY2940002, inibidores de mTOR, de 0,2 a 20 ng/ml de rapamicina ou tensirolimo, e inibidor de S6K-1, de 2 a 200 nM de PF4708671. As doses utilizadas foram escolhidas de acordo com as instruções do fabricante de cada inibidor em relação ao momento que as drogas passam a inibir seus alvos. Em seguida, realizou-se *western blot* com lisados proteicos das células tratadas e controles para expressão de p-AKT, AKT, p-mTOR, mTOR, p-S6K-1, S6K-1, BMI-1 e β -actina (Figura 5.4). A inibição de AKT manteve os níveis basais de expressão de AKT, mTOR e S6K-1, contudo reduziu progressivamente a ativação da via de sinalização de acordo com a concentração de inibidores, evitando a fosforilação de AKT, mTOR e S6K-1. A inibição de mTOR também diminuiu a ativação da via de sinalização nas células tratadas, inclusive reduzindo a expressão de p-AKT que é um componente acima de mTOR na via de sinalização. Este efeito presumivelmente ocorreu porque os componentes fosforilados por mTOR realizam um potente efeito de retroalimentação na via de sinalização, atuando sobre AKT. O PF4708671, inibidor de S6K-1, foi capaz de inibir especificamente a fosforilação de S6K-1, não interferindo na ativação de outros componentes da via. E curiosamente, todos os inibidores testados para AKT, mTOR e S6K-1 reduziram significativamente a expressão de BMI-1.

Também foi investigado o efeito da inibição da via de sinalização mTOR na fração de CTT. Analisou-se a fração de células ALDH^{HIGH}CD44^{HIGH} após todas as condições de tratamento citadas acima através de citometria de fluxo. Observou-se uma redução significativa e consistente na fração de células ALDH^{HIGH}CD44^{HIGH} em todas as linhagens celulares avaliadas (UM-HMC-1, -3A e 3B) e para todos os inibidores, mesmo quando expostos a baixas concentrações (Figura 5.4 – APÊNDICES A, B e C). Curiosamente, o inibidor de S6K-1, que apresentou o IC50 em 96 horas entre 1,43 e 1,86 μ M, foi capaz de reduzir a fração de células ALDH^{HIGH}CD44^{HIGH} em todas as linhagens com concentrações expressivamente mais baixas que o IC50, de 2 a 200 nM, durante apenas 24 horas de tratamento.

Este resultado, junto aos resultados obtidos por *western blot*, sugere que S6K-1 tem importância fundamental na regulação da fração de CTT, considerando que outros componentes da via de sinalização permaneceram ativos nesses experimentos com PF4708671.

Com o propósito de confirmar a redução na fração de CTT e para compreender melhor por quais mecanismos esta redução está acontecendo realizou-se o ensaio de salisferas (Figura 5.5). Uma concentração de cada inibidor foi escolhida com base no ponto em que houve redução da expressão de BMI-1 por *western blot*. As células UM-HMC-1, -3A e -3B foram plaqueadas em placas de ultrabaixa aderência para formação de salisferas. As células foram tratadas com 20 mM de buparlisibe, 20 μ M de LY2940002, 2 ng/ml de rapamicina, 2 ng/ml de tensirolimo ou 200 nM de PF4708671, assim como, veículo para controle e foram monitorizadas durante 10 dias. Observou-se que todas as linhagens celulares testadas formaram salisferas quando tratadas com veículo, enquanto o tratamento com cada um dos inibidores resultou em redução significativa no número de salisferas. Para avaliar a eficácia de cada inibidor para reduzir a autorrenovação, como sugerido pela redução de expressão de BMI-1, as salisferas primárias foram dissociadas e plaqueadas em salisferas secundárias. Foi observada redução na formação de salisferas secundárias em células que foram expostas a inibidores em comparação com as células expostas apenas ao veículo. O ensaio de salisfera confirmou a redução na fração de CTT e a expressão de BMI-1 observada pelos ensaios de citometria de fluxo e *western blot*, respectivamente. Esses resultados mostram que um dos mecanismos que levou a redução na fração de CTT foi à perda no potencial de autorrenovação, característica fundamental das CTT.

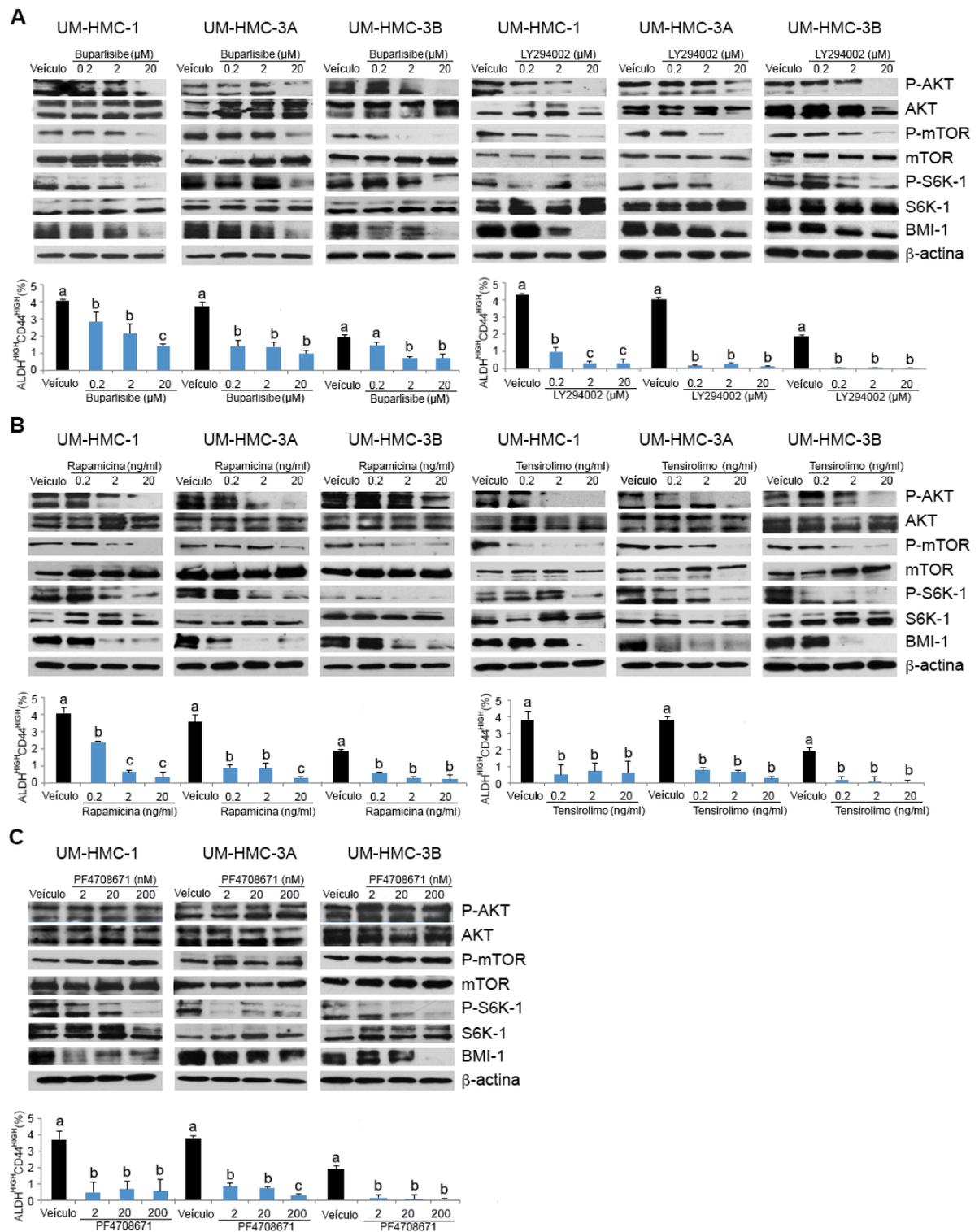


Figura 5.4 - Redução da fração de CTT após tratamento com inibidores da via de sinalização AKT/mTOR/S6K-1. **A**, *Western blots* para p-AKT, AKT, p-mTOR, mTOR, p-S6K-1, S6K-1, BMI-1 e β -actina; e abaixo o gráfico que representa a fração de CTT (ALDH^{HIGH}CD44^{HIGH}), após exposição das células UM-HMC-1, -3A e -3B a concentrações crescentes de inibidores de AKT (buparlisibe ou LY2940002 - 0,2 a 20 μ M) ou veículo. **B**, *Western blots* para p-AKT, AKT, p-mTOR, mTOR, p-S6K-1, S6K-1, BMI-1 e β -actina; e abaixo o gráfico que representa a fração de CTT (ALDH^{HIGH}CD44^{HIGH}), após exposição das células UM-HMC-1, -3A e -3B a concentrações crescentes de inibidores de mTOR (rapamicina ou tensinolimo - 0,2 a 20 ng/ml). **C**, *Western blots* para p-AKT, AKT, p-mTOR, mTOR, p-S6K-1, S6K-1, BMI-1 e β -actina; e abaixo o gráfico que representa a fração de CTT (ALDH^{HIGH}CD44^{HIGH}), após exposição das células UM-HMC-1, -3A e -3B a concentrações crescentes de inibidor de S6K-1 (PF4708671 - 2 a 200 nM). Para todas as análises estatísticas foram utilizados os testes ANOVA unidirecional e pos-hoc Tukey. Diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os grupos (P <0,05)

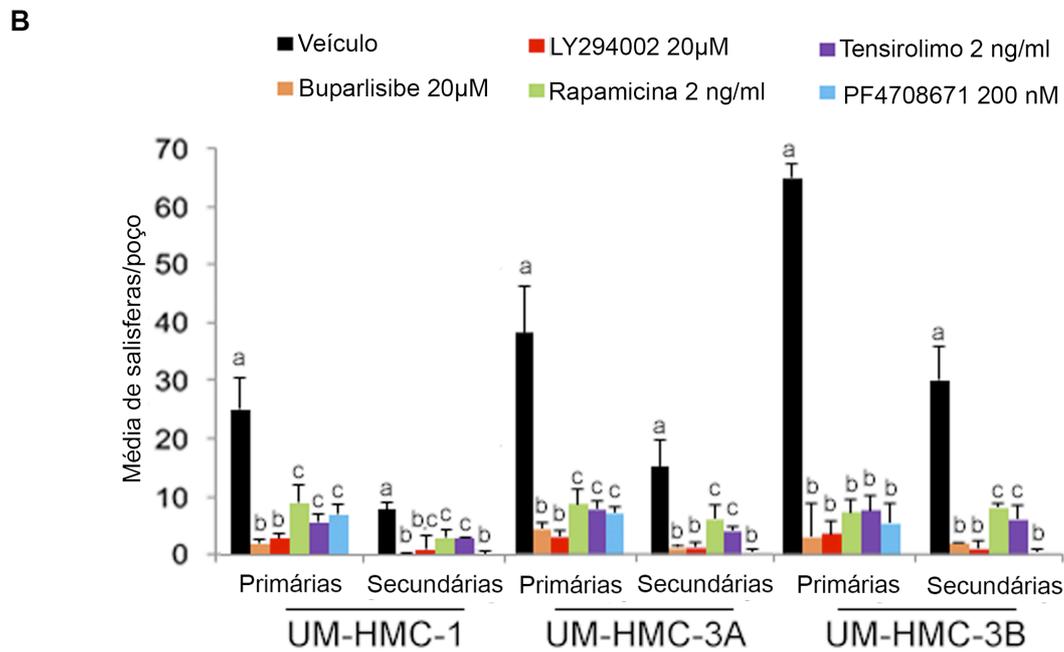
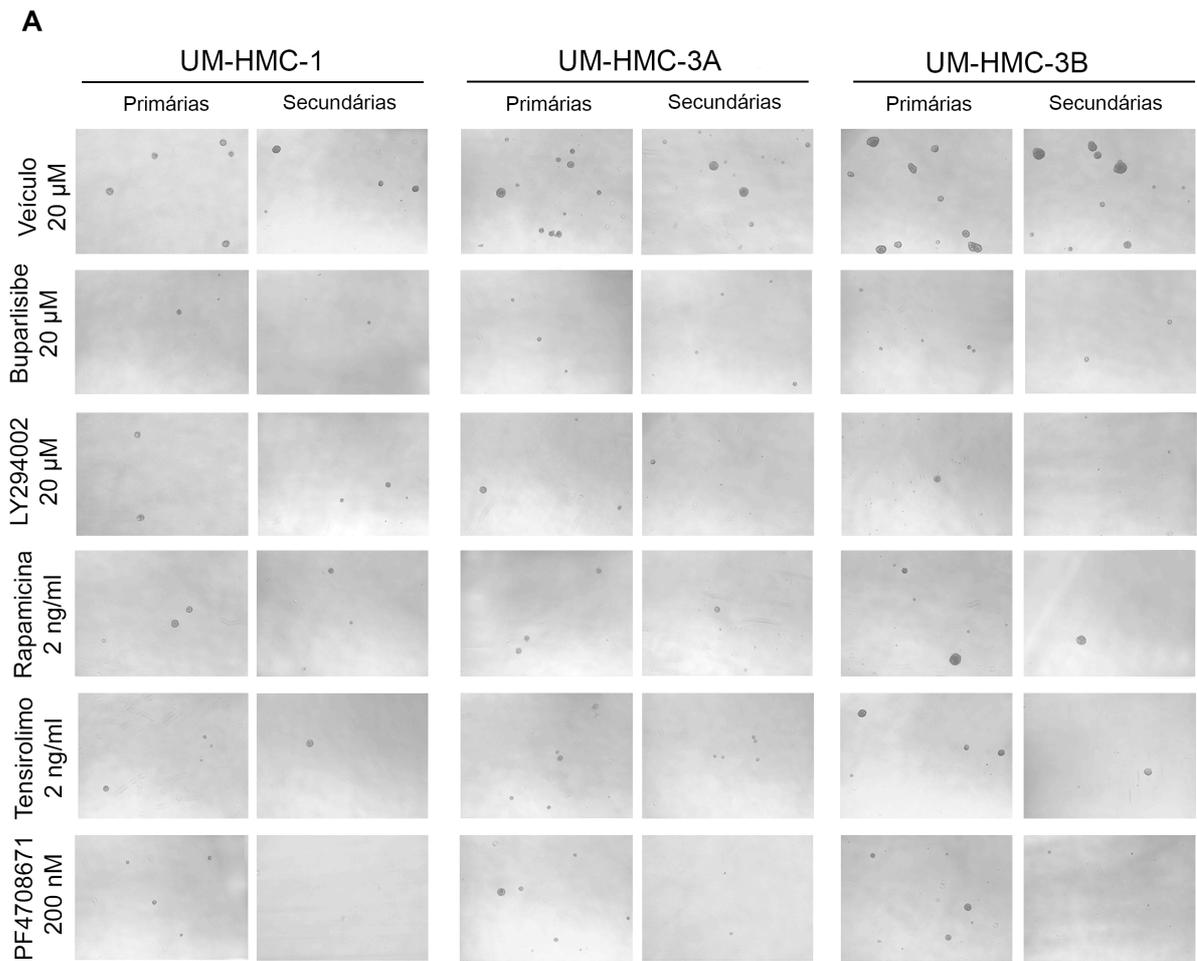


Figura 5.5 - Ensaio de salisferas com inibidores da via de sinalização AKT/mTOR/S6K-1. **A**, Imagens representativas de salisferas derivadas das linhagens celulares UM-HMC-1, -3A and -3B após exposição a 20 μ M de buparlisibe, 20 μ M de LY2940002, 2 ng/ml de rapamycin, 2ng/ml de tensirolimo, 200 μ M de PF4708671 ou veículo (aumento de 40X). **B**, Gráfico que representa o número médio de salisferas primárias e secundárias por poço em todas as condições de tratamento. Para todas as análises estatísticas foi utilizado ANOVA unidirecional e pos-hoc Tukey. Diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os grupos ($P < 0,05$)

5.4 INDUÇÃO DE APOPTOSE PREFERENCIALMENTE NAS CTT POR INIBIDORES DE MTOR

Para verificar a especificidade do efeito da inibição de mTOR sobre as CTT e para compreender melhor o mecanismo que conduz à redução de fração destas células, analisou-se por citometria de fluxo a expressão de anexina V nas linhagens celulares UM-HMC-1, -3A e -3B após tratamento com inibidores de mTOR. Em seguida, as células apoptóticas (anexina V^{HIGH}) foram correlacionadas com a expressão de ALDH e CD44. Também foram avaliados nesse experimento agentes quimioterápicos utilizados atualmente no tratamento de pacientes, cisplatina e paclitaxel. As células UM-HMC-1, -3A e -3B foram tratadas durante 24 horas com concentrações crescentes de rapamicina (0,2-20 ng / ml), tensinolimo (0,2-20 ng / ml), cisplatina (0,2-20 µM), paclitaxel (0,2-20 nM) ou veículo. Primeiramente, as células mortas foram eliminadas de acordo com a expressão de 7-AAD. As células viáveis selecionadas foram avaliadas quanto à expressão da anexina V e células com alta expressão foram consideradas apoptóticas. As células vivas também foram analisadas quanto à expressão de ALDH e CD44, sendo divididas em 4 populações (ALDH^{HIGH}CD44^{HIGH}, ALDH^{HIGH}CD44^{LOW}, ALDH^{LOW}CD44^{HIGH} e ALDH^{LOW}CD44^{LOW}). Em seguida, ambas análises foram sobrepostas revelando a qual população celular pertenciam as células apoptóticas. A fim de evitar a sobreposição entre as fluorescências dos anticorpos, foram utilizados fluorocromos lidos em lasers diferentes, o substrato Aldefluor® (Cayman Chemicals) lido no laser azul, CD44 (V450, BD Horizon) lido no laser violeta e anexina V (APC; BD Biosciences) lido no laser vermelho. A estratégia desenvolvida para seleção e avaliação das células concomitantemente para anexina V, ALDH e CD44 está descrita na figura 5.6

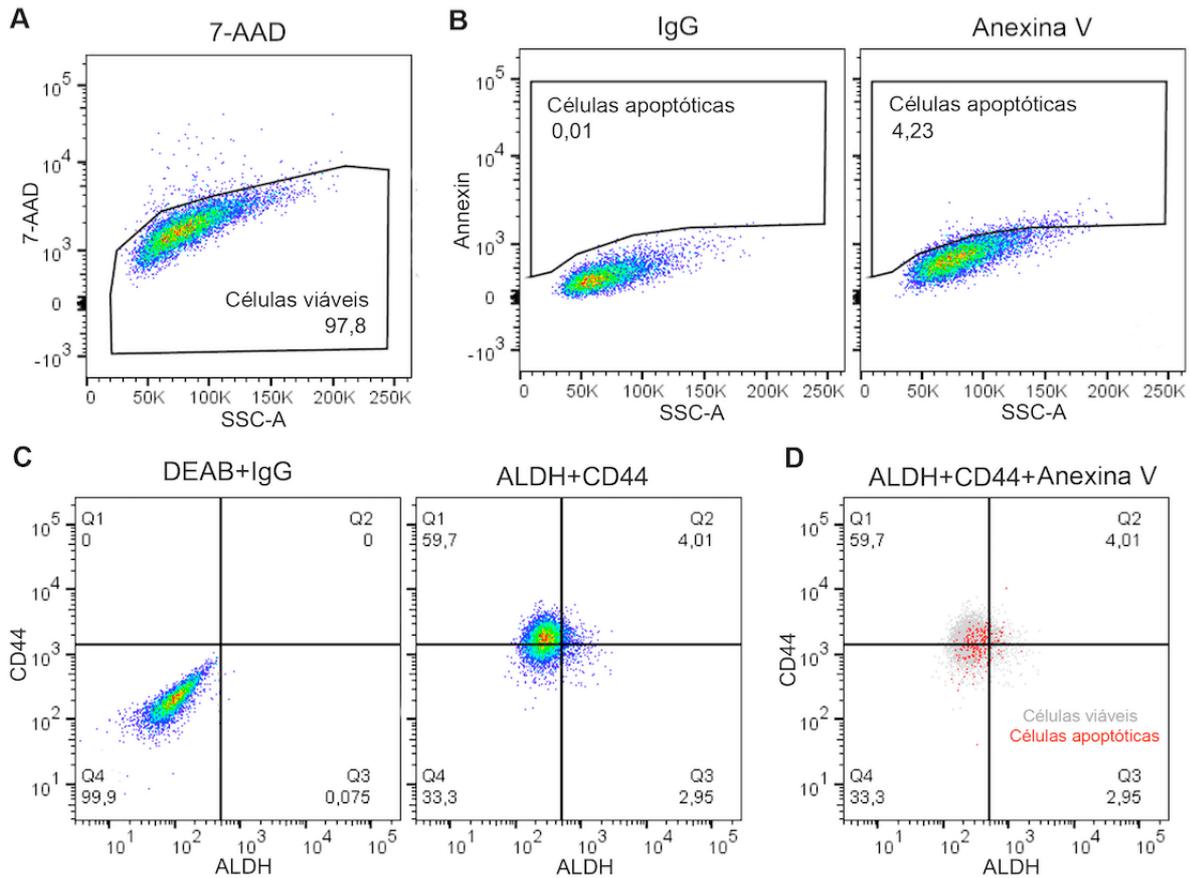
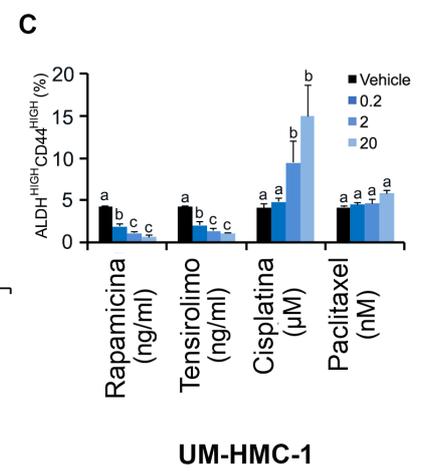
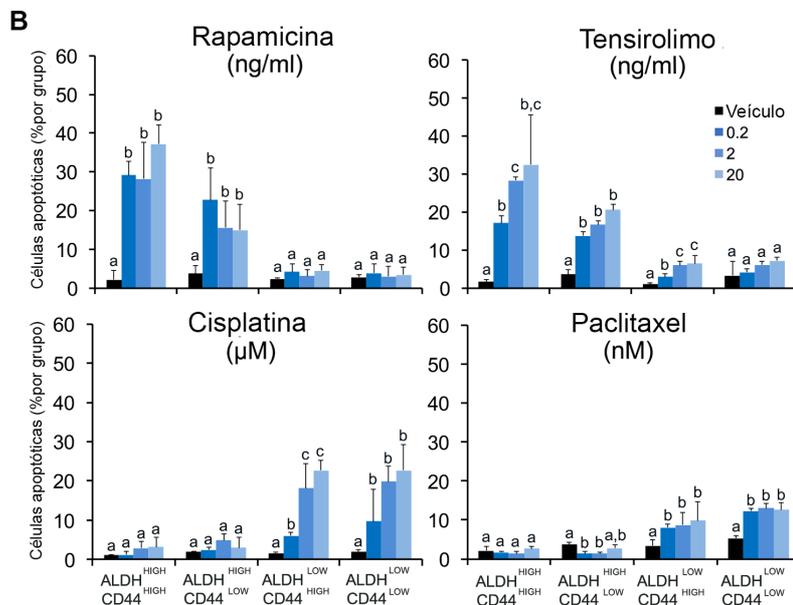
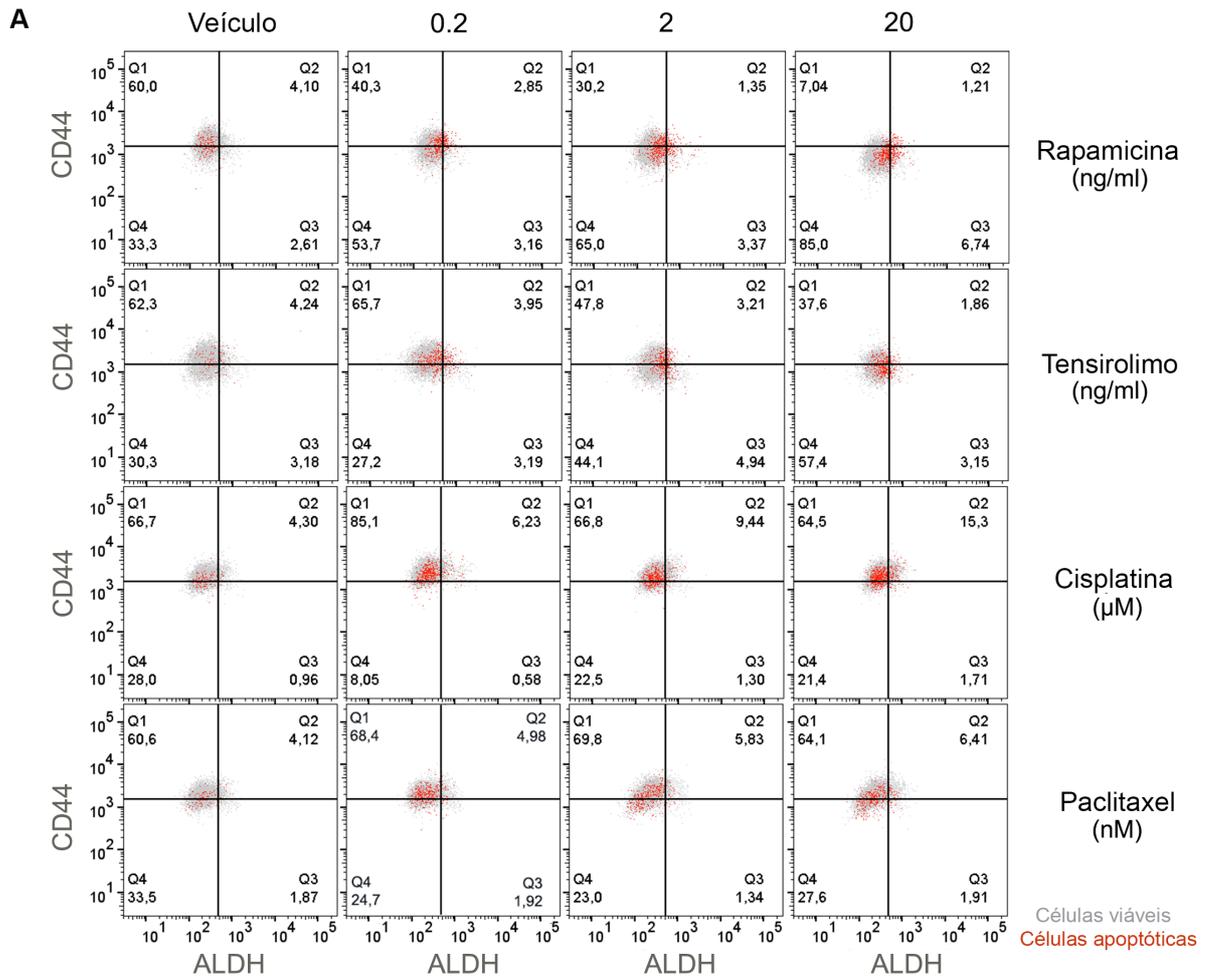


Figura 5.6 - Estratégia de análise para o ensaio de apoptose realizado por citometria de fluxo. **A**, Exclusão das células mortas através da expressão de 7-AAD. **B**, Análise das células apoptóticas quanto à expressão de anexina V determinada através dos controles (IgG em células não tratadas x anexina V em células tratadas). **C**, Análise da expressão de ALDH/CD44 determinada através dos controles (DEAB+IGG). **D**, Gráficos da expressão conjugada de anexina V e ALDH/CD44

Os resultados mostraram que a subpopulação $ALDH^{HIGH}CD44^{HIGH}$ apresentou uma diferença significativa na porcentagem de células apoptóticas entre os grupos expostos ao veículo e os grupos tratados com rapamicina ou tensirolimo, mesmo em baixas concentrações dos inibidores. Além disso, as células $ALDH^{HIGH}CD44^{HIGH}$ mostraram uma porcentagem mais elevada de células apoptóticas em comparação com as não-CTT tratadas com rapamicina e tensirolimo, essa ação nas CTT foi observada em todas as linhagens testadas (Figuras 5.7, 5.8, 5.9). Estes resultados sugerem que os inibidores de mTOR têm uma ação direcionada as CTT, induzindo apoptose nesta subpopulação de células. É interessante que, nos grupos tratados com rapamicina e tensirolimo, as células $ALDH^{HIGH}CD44^{LOW}$ apresentaram porcentagem mais elevada de células apoptóticas do que as células com baixa atividade de ALDH. Nos grupos tratados com cisplatina e paclitaxel não houve

diferença significativa na porcentagem de células apoptóticas em células $ALDH^{HIGH}CD44^{HIGH}$ tratadas, em comparação com as células expostas apenas ao veículo. Em oposição, as subpopulações com baixa atividade de ALDH ($ALDH^{LOW}CD44^{HIGH}$ e $ALDH^{LOW}CD44^{LOW}$) apresentaram percentual significativamente maior de células apoptóticas após exposição a cisplatina ou paclitaxel.

A fração total de células $ALDH^{HIGH}CD44^{HIGH}$ também foi analisada para todas as condições de tratamento (Figuras 5.7C, 5.8C e 5.9C). As células expostas a rapamicina e tensirolimo apresentaram redução na fração de células $ALDH^{HIGH}CD44^{HIGH}$, como foi demonstrado nos experimentos anteriores. Enquanto que, a exposição a cisplatina aumentou a fração das células $ALDH^{HIGH}CD44^{HIGH}$, e a exposição a paclitaxel não exerceu efeito significativo na fração dessas células. Coletivamente, estes resultados demonstram que a indução de apoptose preferencialmente em células $ALDH^{HIGH}CD44^{HIGH}$ é um dos mecanismos que conduzem à redução da fração de CTT em CME pelos inibidores de mTOR.



UM-HMC-1

Figura 5.7- Indução de apoptose em CTT por inibidores de mTOR na linhagem celular UM-HMC-1. **A**, Representação gráfica da sobreposição da expressão de ALDH/CD44 com anexina V na linhagem celular UM-HMC-1 após 24 horas de tratamento com concentrações crescentes de rapamicina, tensirolimo, cisplatina ou paclitaxel analisadas por citometria de fluxo. As células viáveis estão representadas em cinza. As células apoptóticas (células com alta expressão de anexina V) estão representadas em vermelho. Dentro dos quadrantes está a porcentagem das populações divididas de acordo com expressão de ALDH e CD44. **B**, Gráfico da porcentagem de células apoptóticas presente em cada subpopulação celular ($ALDH^{HIGH}CD44^{HIGH}$, $ALDH^{HIGH}CD44^{LOW}$ e $ALDH^{LOW}CD44^{HIGH}$ $ALDH^{LOW}CD44^{HIGH}$) para todas as condições de tratamento. **C**, Gráficos representando a fração de CTT ($ALDH^{HIGH}CD44^{HIGH}$) identificadas por citometria de fluxo em tumores tratados com concentrações crescentes de rapamicina, tensirolimo, cisplatina ou paclitaxel. Para todas as análises estatísticas foram utilizados os testes ANOVA unidirecional e pos-hoc Tukey. Diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os grupos ($P < 0,05$)

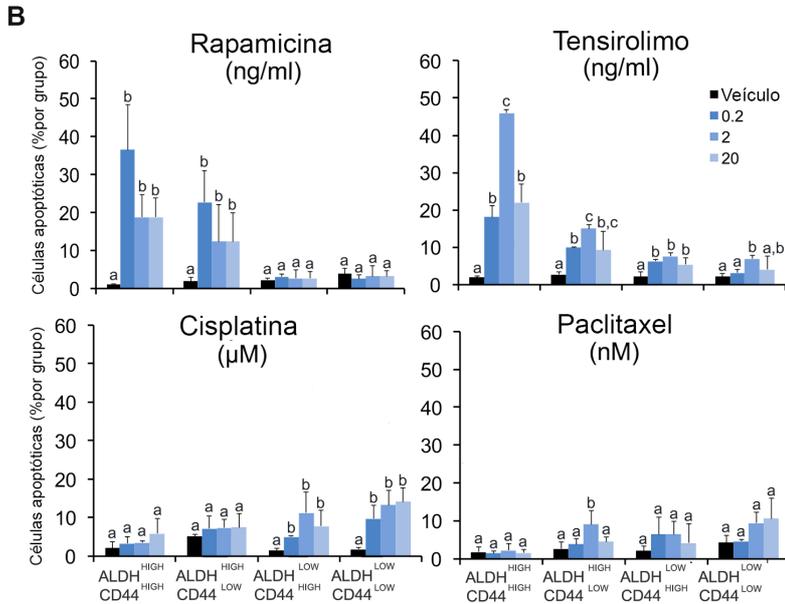
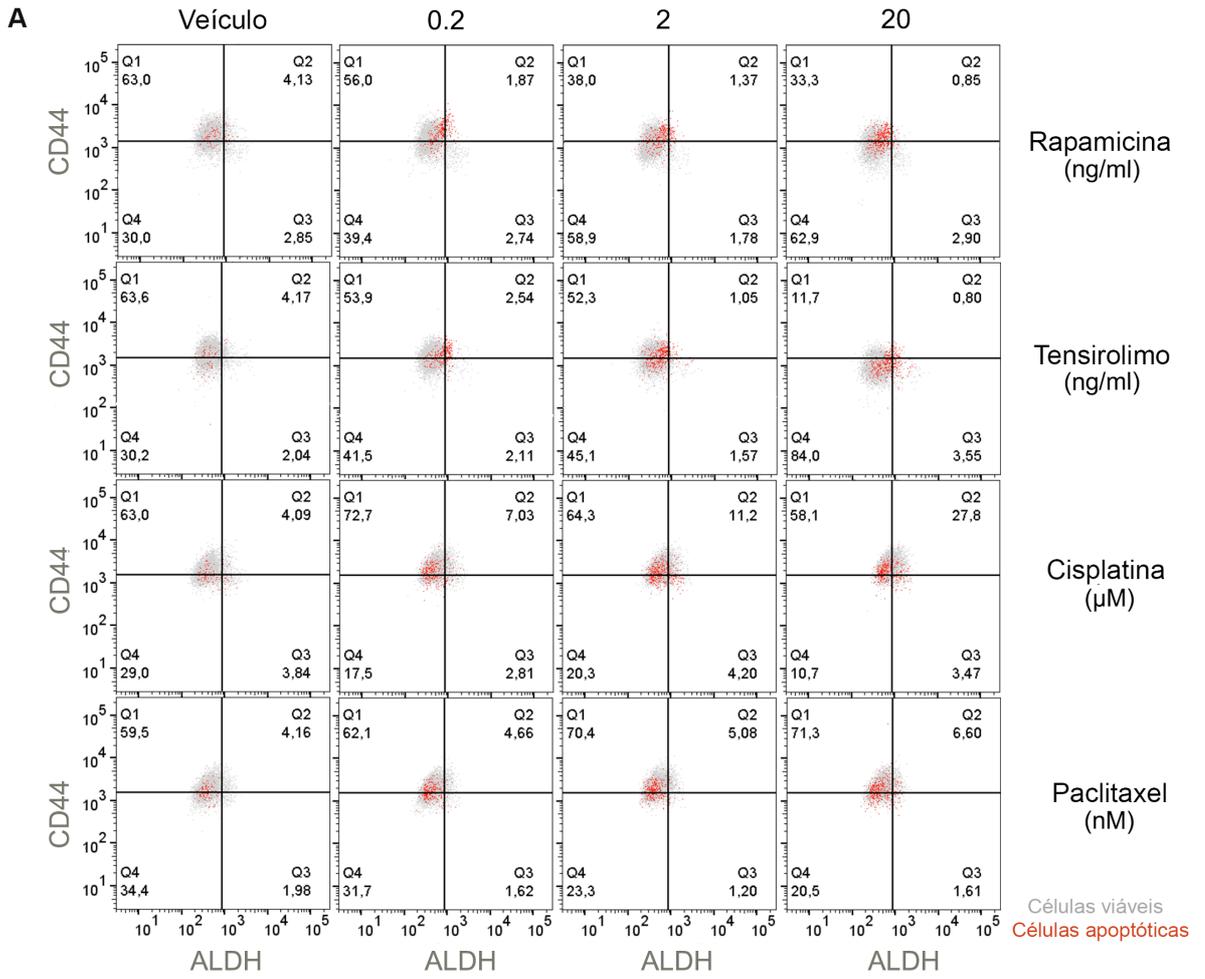


Figura 5.8- Indução de apoptose em CTT por inibidores de mTOR na linhagem celular UM-HMC-1. **A**, Representação gráfica da sobreposição da expressão de ALDH/CD44 com anexina V na linhagem celular UM-HMC-1 após 24 horas de tratamento com concentrações crescentes de rapamicina, tensirolimo, cisplatina ou paclitaxel analisadas por citometria de fluxo. As células viáveis estão representadas em cinza. As células apoptóticas (células com alta expressão de anexina V) estão representadas em vermelho. Dentro dos quadrantes está a porcentagem das populações divididas de acordo com expressão de ALDH e CD44. **B**, Gráfico da porcentagem de células apoptóticas presente em cada subpopulação celular ($ALDH^{HIGH}CD44^{HIGH}$, $ALDH^{HIGH}CD44^{LOW}$ e $ALDH^{LOW}CD44^{HIGH}$ $ALDH^{LOW}CD44^{HIGH}$) para todas as condições de tratamento. **C**, Gráficos representando a fração de CTT ($ALDH^{HIGH}CD44^{HIGH}$) identificadas por citometria de fluxo em tumores tratados com concentrações crescentes de rapamicina, tensirolimo, cisplatina ou paclitaxel. Para todas as análises estatísticas foram utilizados os testes ANOVA unidirecional e pos-hoc Tukey. Diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os grupos ($P < 0,05$)

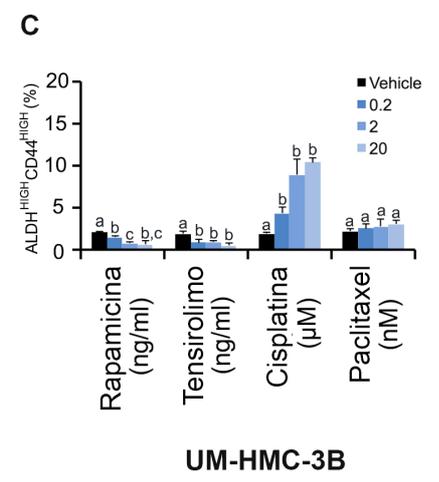
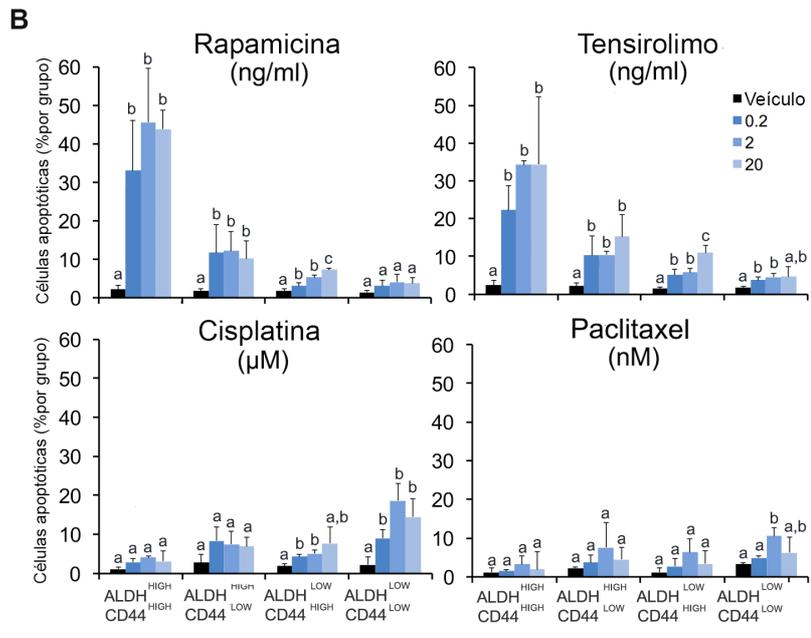
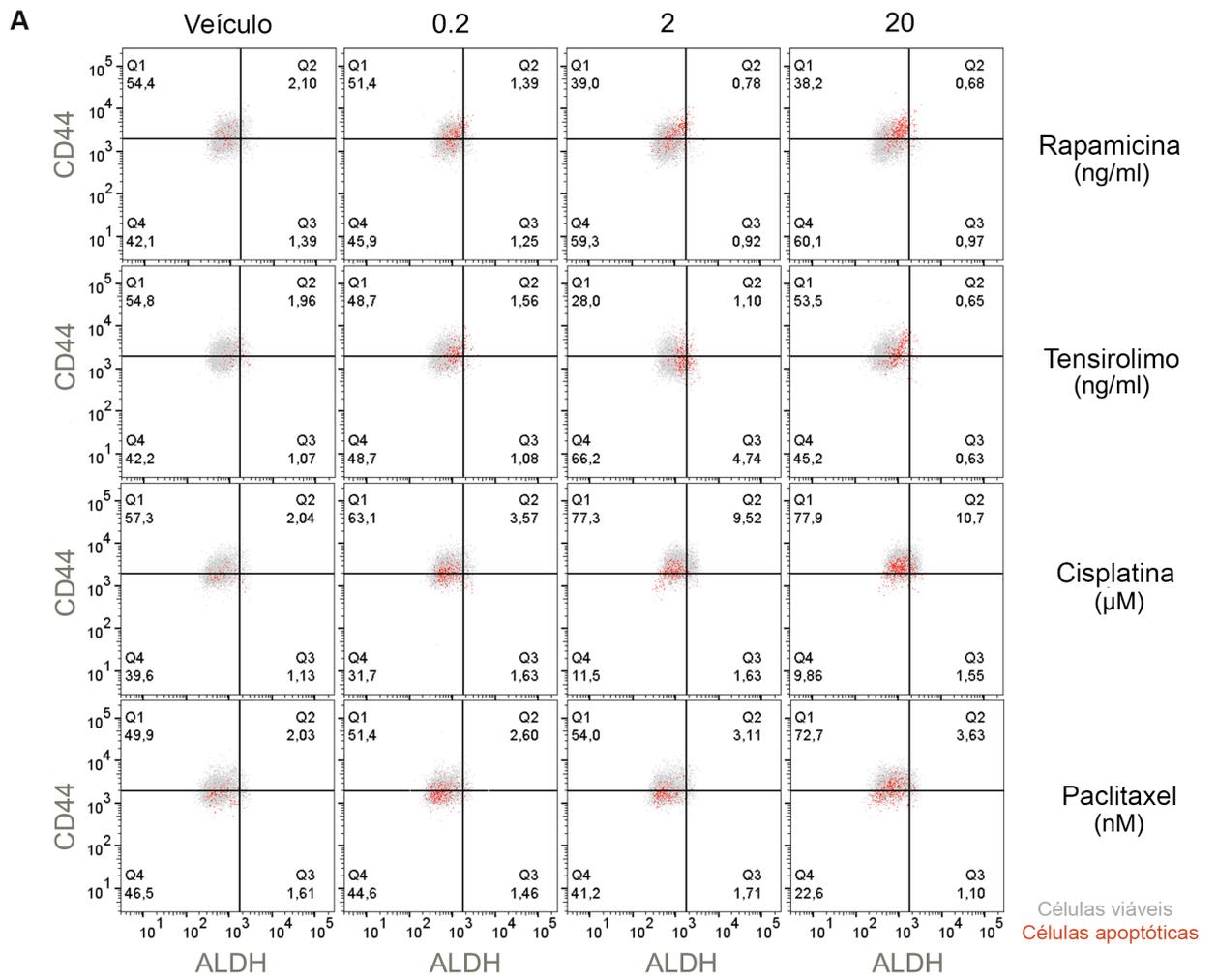


Figura 5.9- Indução de apoptose em CTT por inibidores de mTOR na linhagem celular UM-HMC-1. **A**, Representação gráfica da sobreposição da expressão de ALDH/CD44 com anexina V na linhagem celular UM-HMC-1 após 24 horas de tratamento com concentrações crescentes de rapamicina, tensirolimo, cisplatina ou paclitaxel analisadas por citometria de fluxo. As células viáveis estão representadas em cinza. As células apoptóticas (células com alta expressão de anexina V) estão representadas em vermelho. Dentro dos quadrantes está a porcentagem das populações divididas de acordo com expressão de ALDH e CD44. **B**, Gráfico da porcentagem de células apoptóticas presente em cada subpopulação celular ($ALDH^{HIGH}CD44^{HIGH}$, $ALDH^{HIGH}CD44^{LOW}$ e $ALDH^{LOW}CD44^{HIGH}$ $ALDH^{LOW}CD44^{HIGH}$) para todas as condições de tratamento. **C**, Gráficos representando a fração de CTT ($ALDH^{HIGH}CD44^{HIGH}$) identificadas por citometria de fluxo em tumores tratados com concentrações crescentes de rapamicina, tensirolimo, cisplatina ou paclitaxel. Para todas as análises estatísticas foram utilizados os testes ANOVA unidirecional e pos-hoc Tukey. Diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os grupos ($P < 0,05$)

5.5 O SILENCIAMENTO GENÉTICO DE MTOR INIBIU O CRESCIMENTO TUMORAL *IN VIVO*

Para verificar os dados obtidos com inibidores químicos de mTOR, uma abordagem genética foi utilizada para silenciar a via de sinalização de mTOR em células UM-HMC-1, -3A e -3B com vetores lentivirais. Foram utilizadas duas sequências de sh-RNA para silenciar mTOR (sh-mTOR (a) e sh-mTOR (b)) e uma sequência foi utilizada como controle (sh-controle). As células também foram transfectadas com proteína de fluorescência verde (GFP). Os lisados proteicos das células transfectadas foram avaliados por *western blot* para expressão de mTOR e ambas sequências de sh-RNA utilizadas mostraram ser eficientes para silenciar mTOR em todas as linhagens (Figura 5.10A). As células transfectadas também foram analisadas por citometria de fluxo, utilizando células não transfectadas como controle. Primeiro realizou-se a análise da expressão de GFP para confirmar a eficiência de transfecção. Mais de 95% das células transfectadas apresentaram expressão de GFP, o que indica que a transfecção foi bem sucedida, reforçando os resultados obtidos por *western blot* (Figura 5.10B e 5.10C).

A citometria de fluxo foi também realizada para analisar a fração de células $ALDH^{HIGH}CD44^{HIGH}$. Para evitar a sobreposição, e considerando que as células transfectadas expressam GFP, foram utilizadas os seguintes substratos fluorescentes para avaliar a atividade de ALDH e a expressão de CD44: AldeRred (Millipore - laser vermelho) e CD44 V450 (BD Horizon - laser violeta). Reforçando resultados obtidos com inibidores químicos, as linhagens celulares silenciadas para mTOR mostraram uma redução significativa na fração de células $ALDH^{HIGH}CD44^{HIGH}$ quando comparadas com as células sh-controle e células não transfectadas (Figura 5.11A, 5.11B). Ensaios de salisferas também foram realizados para confirmar a redução na fração de células CTT. As células UM-HMC-1, -3A e -3B silenciadas para mTOR e as respectivas células sh-controles foram plaqueadas em ultrabaixa aderência e monitoradas durante 10 dias (Figura 5.11C, 5.12D). Apesar de todas as células testadas formarem salisferas, observou-se uma redução no número de salisferas derivadas de células silenciadas para mTOR. Porém, a diferença não foi estatisticamente significativa em todos os grupos.

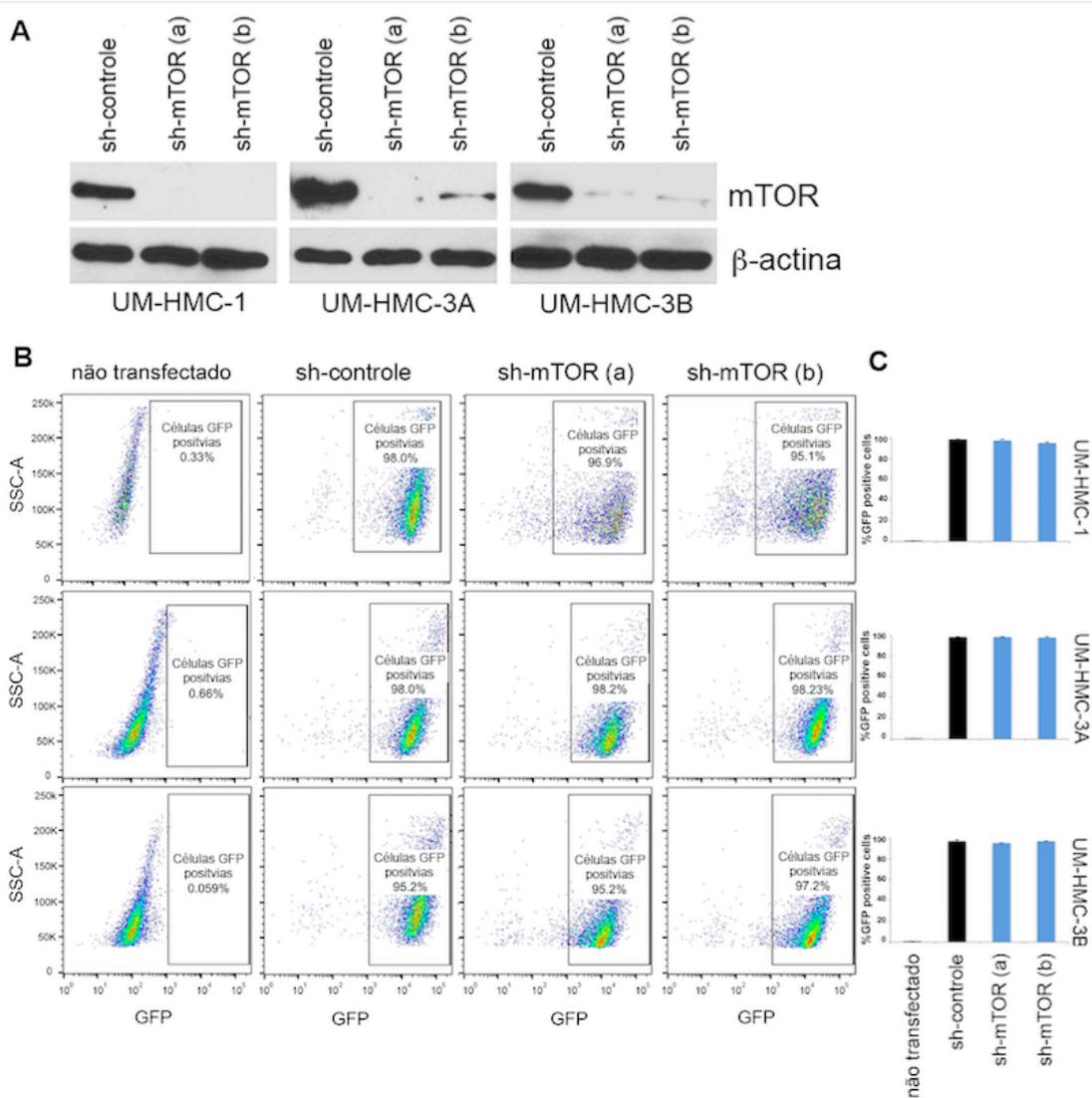


Figura 5.10- Eficácia do silenciamento de mTOR por vetores lentivirais. **A**, Western blot para mTOR e β -actina de lisados proteicos gerados a partir de células sh-mTOR e sh-control das linhagens celulares UM-HMC-1, -3A e -3B. **B**, Representação gráfica em pontos da análise por citometria de fluxo da expressão de GFP em células não-transfectadas e transfectadas com sh-control, sh-mTOR (a) e sh-mTOR (b) nas linhagens celulares UM-HMC-1, -3A e -3B. **C**, Gráfico quantificando a fração de células positivas para GFP analisadas por citometria de fluxo

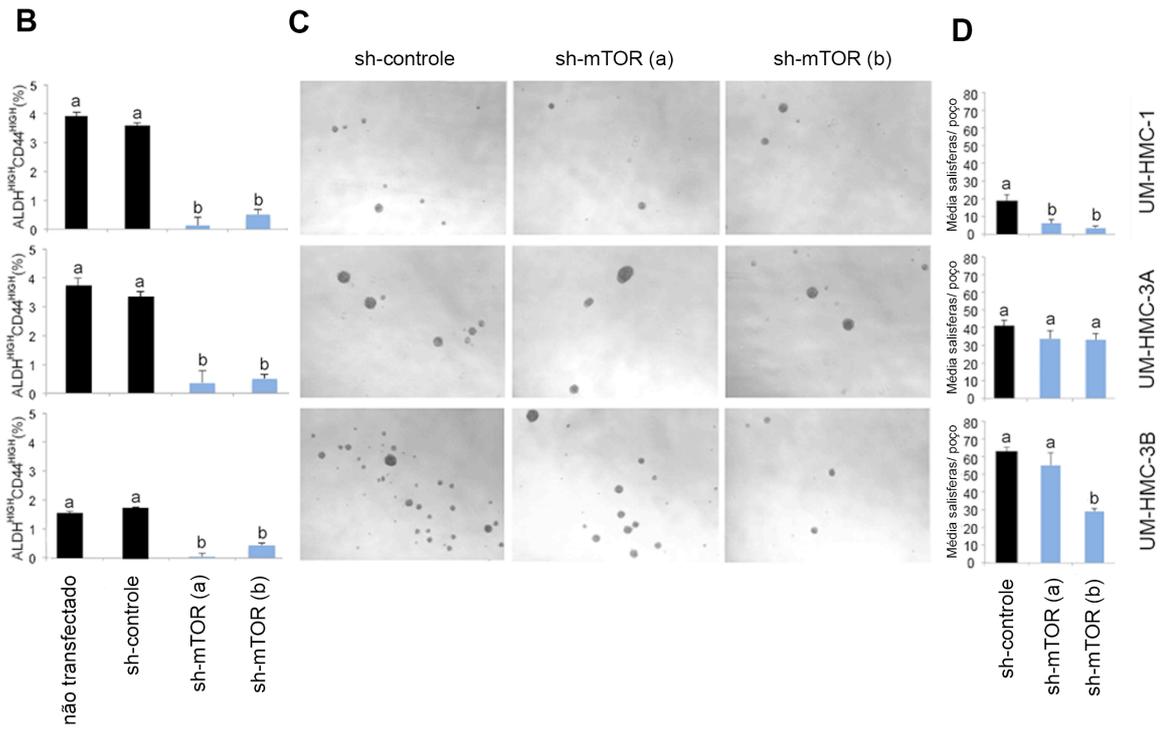
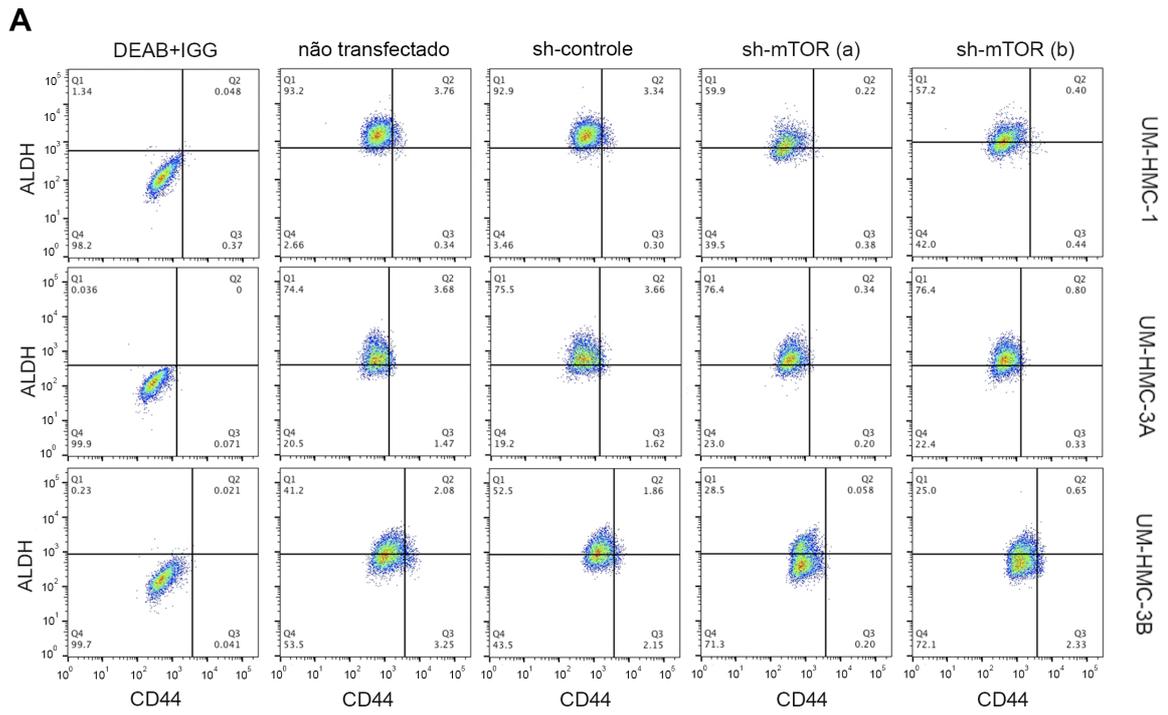


Figura 5.11- Redução da fração de CTT nas células silenciadas para mTOR. **A**, Representação gráfica em pontos da análise por citometria de fluxo para ALDH e CD44 nas linhagens celulares UM-HMC-1, -3A e -3B transfectadas com sh-controle, sh-mTOR (a) e sh-mTOR (b), e nas células não transfectadas. **B**, Gráficos representando a fração de CTT (ALDH^{HIGH}CD44^{HIGH}) identificadas por citometria de fluxo em células sh-mTOR e nos controles para cada linhagem celular avaliada (UM-HMC-1, -3A e -3B). **C**, Imagens representativas das salisferas formadas pelas células silenciadas para mTOR e controles derivadas das linhagens UM-HMC-1, -3A e -3B. **D**, Gráficos representando o número médio de salisferas por poço das células silenciadas para mTOR e controles derivadas das linhagens UM-HMC-1, -3A e -3B. Para todas as análises estatísticas foram utilizados os testes ANOVA unidirecional e pos-hoc Tukey. Diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os grupos (P <0,05)

Para determinar o efeito do silenciamento de mTOR *in vivo* foram selecionadas as células UM-HMC-3B transfectadas com a sequência sh-mTOR (b) com base nos bons resultados apresentados durante os experimentos *in vitro*. Foram implantadas células sh-mTOR UM-HMC-3B ou células sh-controle UM-HMC-3B, juntamente com células primárias endoteliais microvasculares humanas (HDMEC), semeadas em *scaffolds* biodegradáveis no dorso de camundongos imunocomprometidos. Os animais foram monitorados durante 90 dias e, após esse período, todos os animais foram submetidos a eutanásia, os tumores foram removidos e processados para os experimentos *in vitro*. A análise por citometria de fluxo mostrou que os tumores derivados de células silenciadas com mTOR apresentavam uma fração significativamente mais baixa de células ALDH^{HIGH}CD44^{HIGH}, em comparação com o grupo controle ($p = 0,0078$) (Figura 5.12A). Para verificar o silenciamento de mTOR, lisados proteicos resultantes de todos os tumores foram avaliados por *western blot* e revelaram redução da expressão de mTOR e p-mTOR em tumores derivados das células silenciadas para mTOR. A expressão de p-S6K-1 também foi reduzida neste grupo, enfatizando que S6K-1 é um componente fosforilado por mTOR (Figura 5.12B). Observou-se também uma redução drástica na expressão de BMI-1 em tumores derivados de células silenciadas com mTOR, o que é semelhante aos resultados obtidos *in vitro* com inibidores químicos. Os tumores derivados de células silenciadas para mTOR exibiram uma taxa de crescimento mais baixa em relação ao grupo de controle, como pode ser observado nos gráficos que representam o volume tumoral e a regressão linear (Figuras 5.12C, 5.12D, 5.12E e 5.12F). Utilizando medidas repetidas de regressão, avaliamos o tamanho em log dos tumores e o crescimento tumoral. O grupo implantado com células sh-mTOR apresentou taxas de crescimento tumoral significativamente menores do que o grupo implantado com células sh-controle ($p < 0,0001$) (Figura 5.12D).

Curiosamente, durante a cirurgia para a remoção de tumores, observou-se maior sangramento em animais implantados com células sh-controle, do que em animais implantados com células sh-mTOR. Para verificar se realmente houve uma alteração na angiogênese, analisou-se por imuno-histoquímica a expressão de fator VII (marcador de células endoteliais) nos tumores. Observou-se uma diminuição significativa da densidade de microvasos em tumores de células silenciadas com mTOR, quando comparados ao controle ($p < 0,0001$) (Figura 5.12G e 15.12H).

Adicionalmente, foi realizada imuno-histoquímica para p-S6K-1 que revelou uma diminuição significativa desse marcador em tumores derivados de células silenciadas para mTOR em comparação com controle ($p= 0,0006$), reforçando os resultados obtidos por *western blot* sobre a eficiência do silenciamento de mTOR. Os resultados com as células transfectadas mostraram que o silenciamento de mTOR levou a uma redução na taxa de crescimento tumoral, bem como uma redução na fração de células ALDH^{HIGH}CD44^{HIGH}. Evidenciou-se também que a sinalização de mTOR desempenha um papel importante na angiogênese do CME.

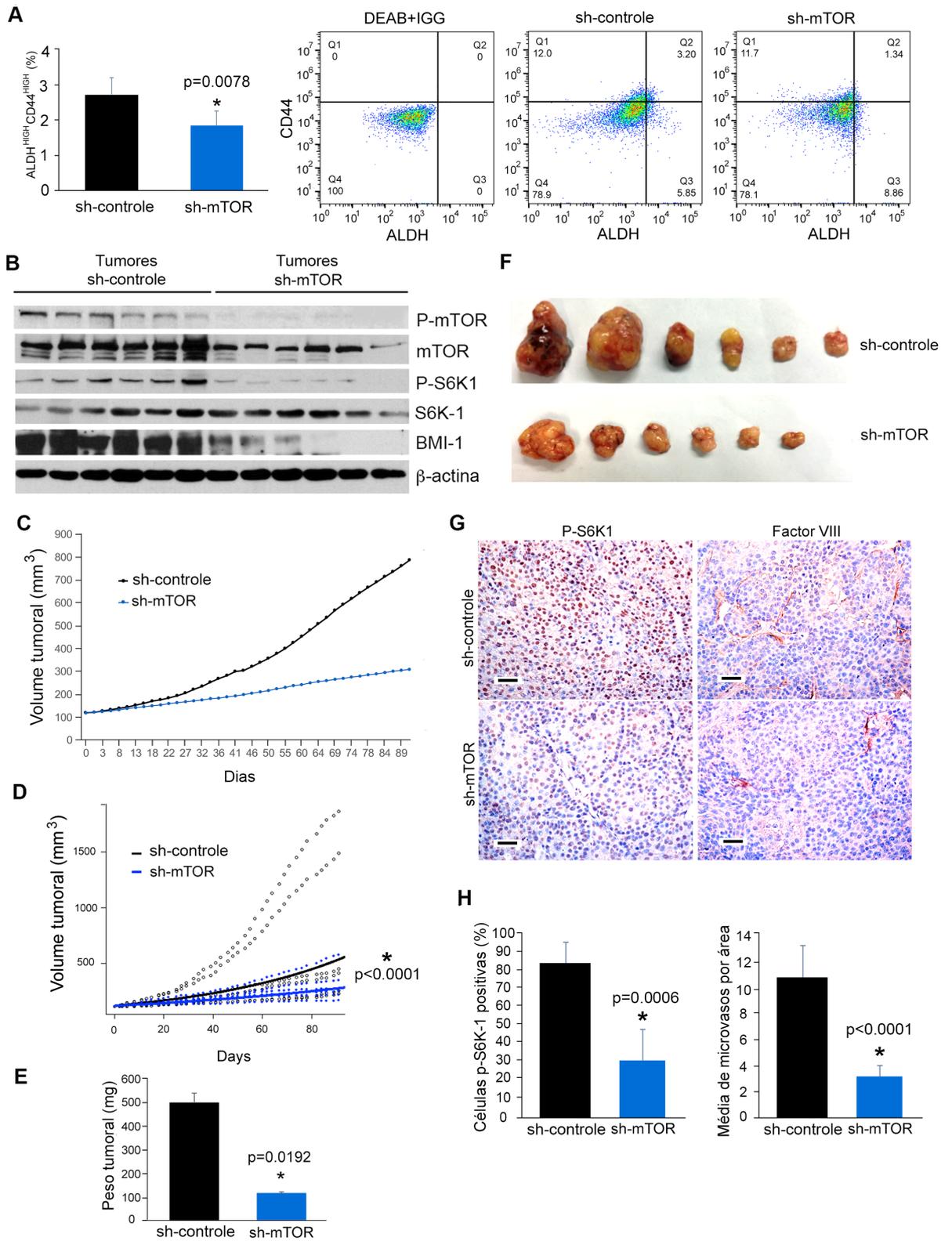


Figura 5.12 - Efeitos do silenciamento de mTOR *in vivo*. **A**, Gráficos representando a fração de CTT (ALDH^{HIGH}CD44^{HIGH}) identificada por citometria de fluxo em tumores após 90 dias de crescimento das células UM-HMC-3B sh-mTOR ou controle implantadas. **B**, *Western blot* para expressão de p-mTOR, mTOR, p-S6K-1, S6K-1, BMI-1 e β -actina em tumores derivados de células UM-HMC-3B transfectadas com sh-mTOR ou sh-controle. **C**, Gráfico representando o volume tumoral após 90 dias de implantação das células. **D**, Análise de regressão linear do crescimento tumoral durante os 90 dias de monitoramento dos animais após implantação de células sh-mTOR (linha azul) ou células sh-controle (linha preta) derivadas da linhagem UM-HMC-3B. **E**, Gráfico que representa a média do peso total dos tumores após 90 dias de implante das células sh-mTOR ou sh-controle. **F**, Imagem de todos os tumores derivados do xenoinxerto de células sh-mTOR ou células sh-controle. **G**, Representação da imuno-histoquímica em tumores derivados de células sh-mTOR e sh-controle para os anticorpos p-S6K1 e Fator VII. As barras de escala representam 25 μ m. **H**, Gráfico representando a média de células positivas para p-S6K-1 e Fator VII nos tumores. Para as análises estatísticas comparativas entre dois grupos foram utilizados os testes ANOVA unidirecional, seguido por teste t de student. E para a análise do crescimento tumoral foi utilizada regressão linear

5.6 A inibição de mTOR por tensirolimo diminui a fração de CTT in vivo

Para elucidar o impacto da inibição terapêutica de mTOR no CME, células UM-HMC-3B foram implantadas no dorso de camundongos juntamente com células primárias endoteliais microvasculares humanas (HDMEC) apoiadas em *scaffolds*. Quando os tumores atingiram um volume médio de 200 mm³, os animais foram tratados diariamente com 10 mg/kg de tensirolimo, ou veículo, por injeção intraperitoneal durante 7 dias. Após a conclusão do tratamento, os tumores foram ressecados e a proporção de CTT foi analisada por citometria de fluxo para expressão de ALDH e CD44 (Figura 5.13A). Notavelmente, o tensirolimo diminuiu a fração de CTT (células ALDH^{HIGH}CD44^{HIGH}) quando comparado ao controle tratado apenas com veículo ($p < 0,0027$). Estes dados foram reforçados pela imunofluorescência para expressão conjunta de ALDH e CD44 (Figura 5.13B), na qual observou-se que o tensirolimo diminuiu a expressão de células marcadas simultaneamente para ALDH e CD44. Estes dados foram consistentes com os resultados *in vitro* que também mostraram redução significativa na fração de CTT após tratamento com inibidores de mTOR. Os resultados de imuno-histoquímica para p-S6K-1 mostraram que a sua expressão foi substancialmente reduzida em tumores do grupo tratado com tensirolimo ($p < 0,0001$) evidenciando que tensirolimo inibiu a ativação da via de sinalização mTOR (Figura 5.13C e 5.13D). Os tumores tratados com tensirolimo também mostraram diminuição significativa na densidade de vasos sanguíneos ($p = 0,0005$), assim como nos tumores derivados de células silenciadas para mTOR. A imunofluorescência realizada em tumores de humanos e de xenoenxerto das células UM-HMC-3A mostrou que as células ALDH/p-mTOR positivas estavam próximas dos vasos sanguíneos. Estes achados revelam uma relação entre a angiogênese, a via de sinalização mTOR e as CTT no CME, sugerindo a existência de nichos perivasculares para as CTT, que também são inibidos pela ação do tensirolimo. A análise dos resultados obtidos por *western blot* mostra que tensirolimo mediou uma redução substancial nos níveis de expressão de p-mTOR e p-S6K-1 (Figura 5.13E), enquanto manteve o nível basal de mTOR e S6K-1.

A expressão de BMI-1 também foi afetada pela ação do tensirolimo, apresentando uma redução drástica em todos os tumores tratados com o inibidor de

mTOR (Figura 5.13E). Apesar do curto tempo de tratamento, observamos que o tensinolimo foi capaz de causar regressão no volume tumoral (Figura 5.13F, 5.13G e 5.13H). Novamente, utilizou-se uma regressão linear de efeito misto para avaliar se as taxas de crescimento exponenciais do tumor foram afetadas pela inibição de mTOR. Os tumores tratados com tensinolimo mostraram uma taxa de crescimento significativamente menor do que os tumores tratados com placebo ($p < 0,0001$), sendo importante ressaltar que o tratamento com tensinolimo não causou perda de peso dos animais (Figura 5.13I). Resumindo, os resultados indicam que a inibição de mTOR pelo tensinolimo reduz o volume tumoral e a angiogênese tumoral, assim como a fração de CTT no MEC.

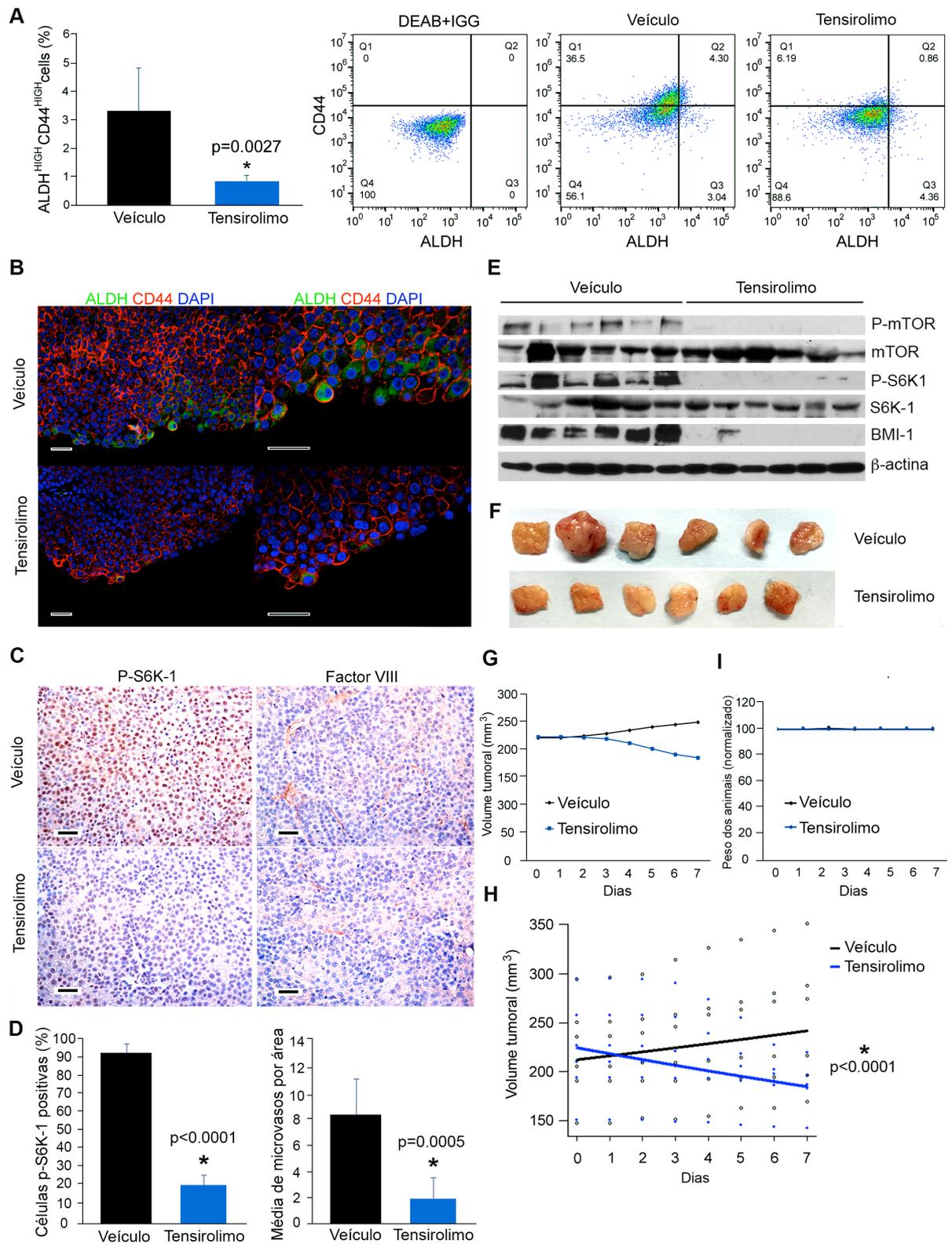


Figura 5.13 - Efeitos do tratamento com tensirolimo *in vivo*. **A**, Gráficos representando a fração de CTT (ALDH^{HIGH}CD44^{HIGH}) identificada por citometria de fluxo em tumores após 7 dias de tratamento com 10 mg/kg de tensirolimo ou com veículo. **B**, Dupla marcação por imunofluorescência em tumores de xenoinxerto após tratamento de 7 dias com 10 mg/kg de tensirolimo ou veículo. ALDH está corado em verde, CD44 está corado em vermelho e DAPI em azul. As barras de escala representam 25 μ m. **C**, Análise imunohistoquímica do tumores tratados ou não com tensirolimo para os anticorpos p-S6K1 e Fator VII. As barras de escala representam 25 μ m. **D**, Gráfico representando a média de células positivas para p-S6K-1 e Fator VII nos tumores tratados ou não com tensirolimo. **E**, *Western blot* para expressão de p-mTOR, mTOR, p-S6K-1, S6K-1, BMI-1 e β -actina em tumores tratados ou não com tensirolimo. **F**, Imagem de todos os tumores após tratamento com tensirolimo ou veículo. **G**, Gráfico representando o volume tumoral após 7 dias de tratamento com 10 mg/kg com tensirolimo ou veículo. **H**, Análise de regressão linear do crescimento tumoral durante os 7 dias de tratamento com tensirolimo (linha azul) ou veículo controle (linha preta). **I**, Gráfico representando o peso médio dos animais durante os 7 dias de tratamento. Para as análises estatísticas comparativas entre dois grupos foram utilizados os testes ANOVA unidirecional, seguido por test t de student. E para a análise do crescimento tumoral foi utilizada regressão linear

5.7 MODELO DE AÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO MTOR NAS CTT DO CME

Com os resultados obtidos foi possível estabelecer inicialmente o funcionamento da via de sinalização mTOR nas CTT do CME, como está representado na Figura 5.14. Primeiro, foi observado que a via AKT/mTOR é realmente ativa e superexpressa nas CTT em comparação com as não-CTT. Os ensaios com inibidores de AKT/mTOR/S6K-1 permitiram observar que p-S6K-1 é um componente fosforilado por mTOR e está diretamente correlacionado com o potencial de autorrenovação das CTT, visto que, mesmo com outros componentes da via permanecendo ativos e somente S6K-1 inibido, houve redução expressiva do potencial de autorrenovação nas CTT. É interessante que, a inibição de p-AKT após tratamento de rapamicina e tensirolimo sugeriu que existe um circuito de retroalimentação na via mTOR. Sabe-se que o mTORC2 exerce um efeito de estimulação positiva em AKT, assim provavelmente a inibição de AKT ocorreu porque também estava ocorrendo inibição de mTORC2. Além disso, houve redução na angiogênese tumoral e apoptose devido a inibição de mTOR.

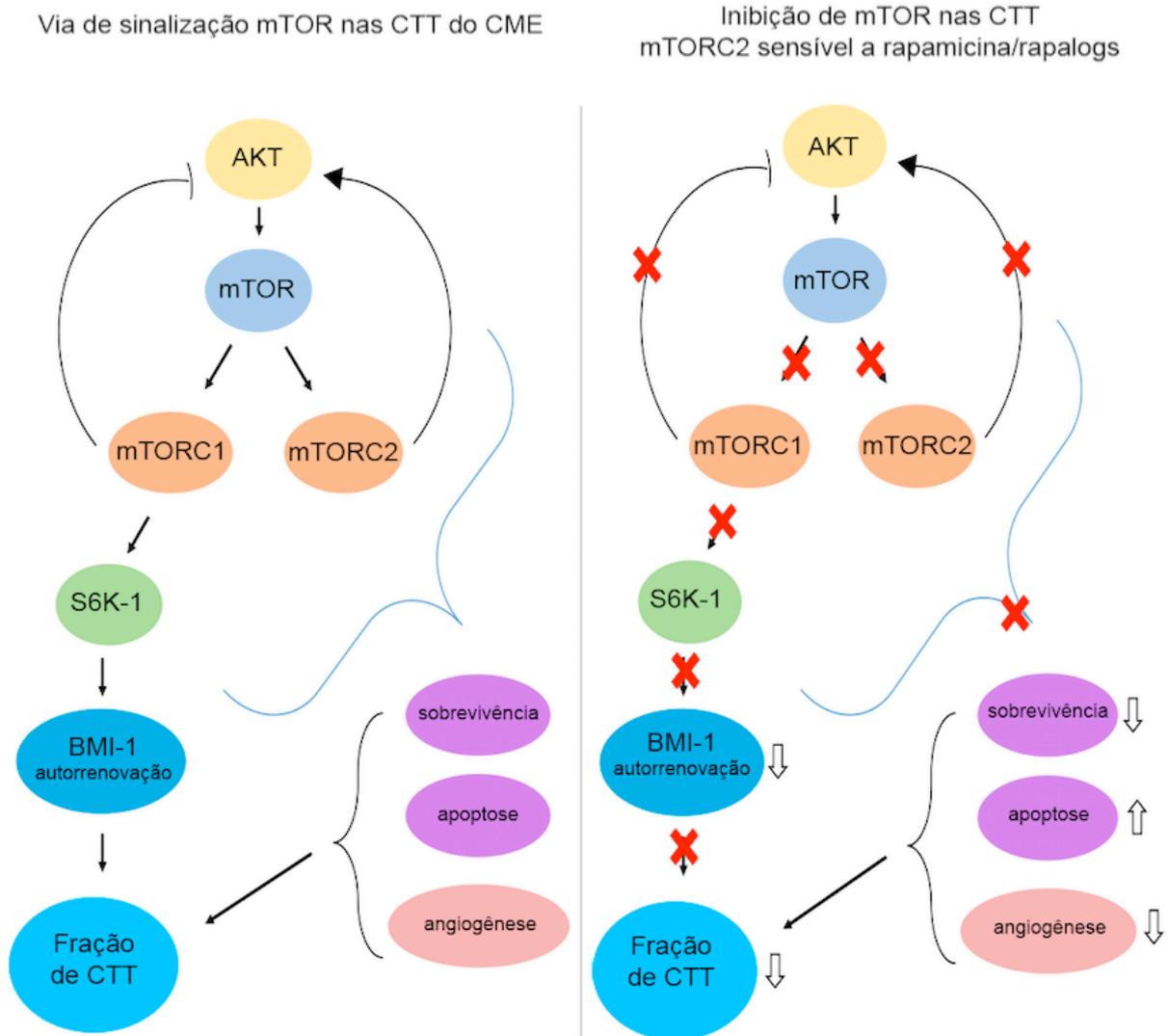


Figura 5.14 - Via de sinalização mTOR nas CTT. Vista esquemática da ação da via de sinalização mTOR e os efeitos de sua inibição nas CTT do CME

6 DISCUSSÃO

Os tratamentos para casos avançados de carcinoma mucoepidermóide são baseados em cirurgia e radioterapia, o que não tem impedido um prognóstico ruim para os pacientes ⁴. A quimioterapia sistemática também tem sido utilizada para o tratamento, porém não foram observados benefícios relevantes ⁴. Poucos estudos que buscam novas terapias para o CME consideram a presença das CTT, células altamente tumorigênicas e fundamentais no processo de metástase e recorrência ^{6,7}. Recentemente as CTT foram identificadas no CME, e considerando que CTT são resistentes à quimioterapia e radioterapia, a não eliminação dessas células pode contribuir para a ineficácia das terapias atuais do CME ¹⁰. Também foi identificada a superexpressão da via PI3K/mTOR em CTT de CME, o que levanta a hipótese que essa via pode ser um possível alvo no tratamento de CME visando a eliminação de CTT ¹⁰.

Estudos recentes identificaram por imuno-histoquímica a ativação da via de sinalização mTOR em tumores de CME humanos e sugeriram que essa via de sinalização poderia ser um potencial alvo no tratamento do CME ^{15,16}. No presente estudo, foi demonstrado por imuno-histoquímica uma correlação da ativação da via de sinalização mTOR com o pior prognóstico dos pacientes com CME. Na literatura, outro estudo apresentou uma relação entre os tumores das glândulas salivares e a expressão da via de sinalização PI3K/AKT/mTOR, mostrando que uma maior expressão citoplasmática de mTOR indicava pior prognóstico clínico ¹⁷. Estudos específicos sobre o CME mostraram que esta via está ativa nos tumores, porém não tentaram correlacionar com o seguimento clínico dos pacientes como realizado neste trabalho.

O consenso de vários estudos independentes é que a localização de mTOR nas células é predominantemente citoplasmática ^{86,87}. Os estudos também sugerem que mTOR pode sofrer transferências entre o núcleo e o citoplasma, e por um mecanismo desconhecido essa transferência pode regular a fosforilação de S6K-1 ^{86,87}. Considerando que muitos componentes da via mTOR são expressos em compartimentos tanto nucleares como citoplasmáticos e que muitas proteínas da via mTOR estão localizadas no núcleo, devido a ser uma das principais funções da mTORC1 a biogênese e transcrição de ribossomos, conclui-se que mTOR realmente

pode funcionar via sinalização núcleo-citoplasmática⁸⁸. Nossos resultados também demonstraram que mTOR pode ser encontrado no núcleo, no citoplasma, ou em ambas localizações ao mesmo tempo. Um estudo com 272 pacientes, com 40 casos de CME, relacionou a expressão de p-AKT e p-mTOR no núcleo com o comportamento menos agressivo do tumor, e no citoplasma com tumores mais agressivos⁸⁹.

Recentemente, foi revelado que as CTT no CME apresentam alta expressão da via de sinalização PI3K/AKT, incluindo superexpressão de mTOR¹¹. Os experimentos realizados no nosso estudo também evidenciaram a superexpressão da via de sinalização de mTOR em CTT através da expressão conjunta de ALDH e p-mTOR por imunofluorescência em uma pequena população de células no CME, e também pela elevada expressão de mTOR fosforilado e outros componentes da sua via de sinalização em células ALDH^{HIGH}CD44^{HIGH} derivadas do CME. Isso sugere que o tratamento com foco na inibição da via de sinalização mTOR poderia exercer efeitos especialmente sobre as CTT. Foi demonstrado em células de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço que as CTT são resistentes as terapias tradicionais e apresentam superexpressão da via de sinalização PI3K/mTOR¹². Também foi observado que tratamentos com inibidores de PI3K são capazes de reduzir a população tumoral *in vitro*¹².

Nossos experimentos com ensaios de citotoxicidade também demonstraram que os inibidores da via de sinalização PI3K foram capazes de reduzir a população neoplásica *in vitro* de linhagens celulares de CME, inclusive quando utilizado inibidores que atingem somente os componentes fosforilados por PI3K/AKT, como o inibidor de S6K-1. A análise por citometria de fluxo para atividade de ALDH e expressão de CD44 mostrou que as CTT foram particularmente afetadas por esses inibidores apresentando uma redução significativa na fração de células ALDH^{HIGH}CD44^{HIGH} em todas as linhagens celulares de CME estudadas. A redução da fração CTT foi também demonstrada pela redução de salisferas e redução na expressão do regulador de autorrenovação, BMI-1, após tratamento com inibidores de AKT, mTOR e S6K-1. A passagem das salisferas primárias para as secundárias também demonstrou perda de autorrenovação nas células tratadas, sendo esta uma potencial explicação para a redução da fração dessa subpopulação após o tratamento com inibidores da via mTOR.

Diversos estudos em diferentes tipos de câncer mostraram o papel da via mTOR na manutenção de CTT ⁹⁰. Em câncer de próstata descobriram que a resistência a radioterapia está associada à transição epitelial-mesenquimal (EMT) e fenótipos de CTT, e que a ativação da via de sinalização PI3K/AKT/ mTOR fortalece essa resistência ⁹¹. Em câncer de mama, observaram que a ativação da via mTOR estimula a capacidade de formação de colônias e aumenta o potencial tumorigênico *in vivo* ⁹². A fim de entender um pouco melhor a ação da via de sinalização mTOR nas CTT do CME, nós tratamos células de CME com inibidores de diferentes etapas da via de sinalização AKT/mTOR/S6K-1. Para inibir AKT, utilizou-se os inibidores de buparsilibe ou LY294002. LY294002 é um inibidor antigo da via PI3K e não é específico para esta via de sinalização ⁹³. Um estudo revelou que a LY294002 não se liga somente a PI3K, mas também a outras quinases, e até mesmo outros alvos não relacionados com a família PI3K, incluindo ALDH ⁹³. Mesmo assim o LY294002 ainda é um reconhecido inibidor de PI3K/AKT ⁹³, porém para ter certeza dos efeitos da inibição de AKT sem interferência de outros componentes fora da via foi utilizado em paralelo outro inibidor mais específico, o buparsilibe ⁹⁴. O buparsilibe, também conhecido como BKM-120, foi desenvolvido mais recentemente e é considerado pela literatura como um inibidor potente e específico de PI3K/AKT ⁹⁴. Ambos inibidores utilizados, foram capazes de inibir AKT, assim como seus substratos, mTOR e S6K-1. Buparsilibe, como é um agente mais específico, teve um efeito ligeiramente menor do que LY294002, embora ambos tenham sido capazes de causar uma grande redução da fração de CTT.

Para inibir S6K-1 utilizou-se PF4708671 que é um inibidor específico, e retém a expressão de AKT e mTOR ⁹⁵. Estudos mostraram que outros componentes fosforilados por mTOR, como 4E-BP, permanecem ativos após a ação de PF4708671, que evita apenas a fosforilação de S6K-1 ⁹⁵. Experimentos realizados neste trabalho demonstraram que a inibição específica de S6K-1 desempenha um papel importante na manutenção de CTT e no seu potencial de autorrenovação. Em baixas concentrações, não tóxicas para as células em geral, o PF4708671 foi capaz de exercer uma grande redução na fração CTT, assim como na expressão de BMI-1 e na formação de salisferas, mesmo com AKT e mTOR permanecendo ativos. Embora existam poucos estudos inibindo especificamente S6K-1, foi demonstrado em leucemia que S6K-1 age através de diversos alvos da via de sinalização mTOR para promover a autorrenovação das CTT e a progressão da leucemia ⁹⁶. Outros

estudos também demonstram que a via de sinalização de mTOR/S6K-1 está fortemente associada a manutenção não somente das CTT, como também de células tronco embrionárias ^{97, 98}.

A inibição direta da sinalização de mTOR, por rapamicina e tensirolimo, também revelou aspectos interessantes. Experimentos *in vitro* com exposição de células de CME a rapamicina ou tensirolimo, mostraram significativa redução na fração de CTT. Houve também diminuição na expressão de BMI-1 e redução do potencial de autorrenovação nas CTT, evidenciada no ensaio de salisferas. Resultados semelhantes foram encontrados na abordagem genética realizada pelo silenciamento mTOR em células de CME. Curiosamente, a inibição de mTOR também reduziu a expressão de p-AKT, nas células ALDH^{HIGH}CD44^{HIGH} isoladas e na população total de todas as linhagens. mTOR consiste em dois complexos, mTORC1 e mTORC2 ¹⁹. Sabe-se que a rapamicina e rapalogs inibem mTORC1 devido à interação com a proteína FKBP12 ¹⁹. No entanto, foi demonstrado em células de câncer do colo do útero e câncer de próstata que após a exposição durante 24 horas a rapamicina, mTORC2 também foi inibido ⁸⁴. Especula-se que em algumas linhagens celulares, a exposição crônica a rapamicina, embora não afete os complexos mTORC2 pré-existentes, promove uma inibição das moléculas livres de mTOR, impedindo nova formação de mTORC2 ⁸⁴. Estudos em outros tumores demonstraram que o componente mTORC2 tem um efeito de retroalimentação positiva sobre AKT aumentando a sobrevivência celular e, quando inibido, também inibe AKT e conseqüentemente reduz a sobrevivência celular ⁹⁹. AKT é tanto um regulador acima de mTOR, como um alvo ativado por ele ⁹⁹. Assim, a redução de p-AKT pelos inibidores rapamicina e tensirolimo sugere que mTORC2 também foi inibido pelo tratamento.

A inibição de AKT por rapamicina e rapalogs foi observada em outros tumores, como o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço ¹⁰⁰. No entanto, nem todas as células respondem dessa forma a rapamicina e seus análogos ⁸⁴. Algumas células têm mTORC2 sensível a estes fármacos, enquanto que outras células não apresentam mTORC2 sensível aos inibidores ⁸⁴. Esta diferença de sensibilidade resulta em respostas diferentes à inibição de mTOR ¹⁸. Em células sensíveis, a inibição de mTOR/AKT leva a diminuição da sobrevivência celular e aumento da apoptose ¹⁰¹. Enquanto que em células que o mTORC2 não é sensível, o tratamento com rapamicina e rapalogs atua apenas em mTORC1, inibindo S6K-1 que tem um

efeito de retroalimentação negativa em AKT através do receptor de insulina IGF e do receptor de tirosina quinase, ativando este componente e melhorando a sobrevivência celular ¹⁰¹.

A análise da indução de apoptose realizada neste estudo reforçou a ideia de que os inibidores de mTOR agem preferencialmente nas CTT e que o componente mTORC2 dessas células é sensível aos tratamentos com inibidores de mTOR. O tratamento com rapamicina e tensirolimo induziu uma maior porcentagem de CTT a apoptose, do que as outras populações celulares não-CTT. Isso demonstra que esses inibidores exerceram um efeito preferencialmente nas CTT, enquanto os quimioterápicos atualmente utilizados apresentaram o efeito inverso. A cisplatina e o paclitaxel, não foram capazes de induzir apoptose em uma porcentagem significativa de CTT em relação ao controle utilizado, sendo que a cisplatina ainda causou aumento da fração total de CTT. Essa seleção da subpopulação de CTT pelos quimioterápicos utilizados atualmente também foi demonstrada em outros estudos, inclusive em outros tipos de câncer que afetam a cavidade oral, como o carcinoma epidermóide ⁵⁸. O efeito inibitório preferencialmente sobre CTT pelos inibidores de mTOR também foi demonstrado em outros tipos de câncer ¹⁰², assim como efeitos da rapamicina e rapalogs promovendo estímulos pro-apoptóticos ^{103, 104}. Os efeitos da rapamicina sobre a apoptose variam dependendo da linhagem que é testada, e estão relacionados com a sensibilidade de mTORC2 nessas células ao tratamento com inibidores de mTOR, e seus efeitos variados em AKT ²⁰. Nas células nas quais o fármaco inibe mTORC2, AKT também é inibido e pode promover a apoptose ¹⁰⁵. Por outro lado, quando o fármaco não inibe mTORC2, a inibição de mTORC1 conduz à ativação de AKT, e o fármaco pode até mesmo proteger as células contra a apoptose ¹⁰⁶.

Na clínica os efeitos da inibição de mTORC2 e conseqüentemente de AKT, e os diferentes níveis de sensibilidade de mTORC2, podem ser a explicação dos diferentes efeitos da rapamicina nos tumores ²⁰. Apesar dos dados pré-clínicos substanciais que indicam que a rapamicina e os seus análogos têm efeitos antitumorais, os inibidores de mTOR não tem apresentado efeito antitumoral universal nos ensaios clínicos iniciais ¹⁸. Provavelmente, nas células tumorais que mTORC2 não é sensível aos inibidores de mTOR, o efeito clínico da medicação não seja o desejado ¹⁸. O fenômeno de inibição de mTORC2 parece ocorrer apenas em uma minoria de tumores, o que leva a necessidade de identificar marcadores

preditivos de resposta que podem ser úteis para selecionar prospectivamente pacientes portadores de tumores que possam responder e se beneficiar das terapias de inibição de mTOR¹⁸. Apesar de ainda não haver marcadores específicos, nossos resultados sugerem que as CTT do CME têm sensibilidade para rapamicina e tensirolimo em seu componente mTORC2. Isso coloca o CME entre os tumores que poderiam ser beneficiados pelo tratamento com inibidores de mTOR, pois a inibição de mTORC2 induziria a apoptose nas células tronco tumorais. Contudo, são necessários mais estudos para regular a concentração e o tempo de exposição necessários para existir o efeito benéfico da inibição de mTORC2, e ser possível a transposição para seres humanos.

Os nossos experimentos *in vivo* com células silenciadas para mTOR e com tratamento utilizando tensirolimo confirmaram os resultados *in vitro* da redução da fração de CTT, redução da expressão de BMI-1 e inibição de S6K-1. A inibição de mTOR também causou redução no crescimento tumoral, mesmo com poucos dias de tratamento com tensirolimo. E as células silenciadas para mTOR também foram significativamente afetadas no potencial de crescimento, apresentando menor média de volume tumoral em relação ao controle. Esses resultados eram esperados, visto que um dos principais processos que a via de sinalização mTOR está envolvida é no crescimento celular⁷⁷. Adicionalmente, observamos redução da angiogênese em tumores com inibição química ou silenciamento genético de mTOR. Isto pode ter ocorrido porque as células endoteliais possuem mTORC2 sensível a rapamicina e rapalogs, e como efeito do tratamento ocorreu inibição de AKT e consequentemente a apoptose dessas células pode ter ocorrido¹⁰⁷. Trabalhos recentes indicam que a rapamicina inibe a sinalização de AKT em células endoteliais e suprime a angiogênese¹⁰⁷. As células endoteliais são um exemplo em que se sabe que ocorre inibição da fosforilação de AKT por inibição de mTORC2 após tratamento com rapamicina⁸⁴. É possível que o efeito anti-angiogênico da rapamicina seja o resultado combinado da inibição de mTORC1 e mTORC2, pois a droga inibe a proliferação conduzida por VEGF e promove apoptose das células endoteliais^{107,108}. Foi demonstrado em camundongos que animais deficientes para mTORC2 ou para atividade de AKT possuíam um sistema vascular fetal subdesenvolvido, evidenciando a importância de AKT e mTORC2 no processo de angiogênese^{99,109}.

A redução dos vasos sanguíneos pode ter afetado as CTT de forma indireta, pois são considerados os nichos dessas células¹¹⁰. Pesquisas sugerem que o

microambiente circundante das CTT aumenta a resistência dessas células aos tratamentos com quimioterápicos e radiação, e também tem participação na manutenção da autorrenovação e progressão do câncer ¹¹⁰. Evidências sugerem que as células do microambiente tumoral, como células endoteliais, são capazes de sinalizar e promover o crescimento e a manutenção do câncer ¹¹⁶. Também se demonstrou que fatores secretados pelas células endoteliais aumentam a sobrevivência e a autorrenovação das CTT ¹¹¹. Terapias direcionadas que rompem ou reduzem a ligação dessas das CTT com o microambiente, podem inibir a sobrevivência e a autorrenovação de CTT ¹¹⁰.

Resumindo, nossos resultados mostraram que a via de sinalização mTOR possui importante função na manutenção das CTT e que o tratamento com inibidores de mTOR é capaz de reduzir a fração de CTT no CME por mecanismos diretos, indução de apoptose e diminuição da autorrenovação, e indiretamente através da redução de vasos sanguíneos, que são nichos das CTT. Os resultados também sugerem que os inibidores de mTOR avaliados, rapamicina e tensirolimo, agem não somente através da inibição de mTORC1, mas também através da inibição de mTORC2 nas CTT e células endoteliais do CME. E a utilização de inibidores de mTOR, tais como o tensirolimo, que possuem uma forte e preferencial ação nas CTT, é uma potencial abordagem molecular na terapia para o tratamento do carcinoma mucoepidermóide que pode trazer benefícios ao prognóstico dos pacientes.

7 CONCLUSÕES

Após avaliação dos resultados conclui-se que:

- 1) a via de sinalização mTOR está ativada no CME, e sua expressão se relaciona com o pior prognóstico clínico dos pacientes;
- 2) a via de sinalização mTOR está superexpressa e possui importante função na manutenção das CTT; e o tratamento com inibidores de mTOR é capaz de atingir particularmente as CTT, reduzindo sua fração no CME por mecanismos diretos (indução de apoptose, diminuição da autorrenovação) e indiretamente através da redução de vasos sanguíneos, que são nichos das CTT;
- 3) a cascata de sinalização AKT/mTOR/S6K-1 está intimamente relacionada a sobrevivência e autorrenovação das CTT do CME, e possui mecanismos de retroalimentação que levaram os inibidores de mTOR avaliados, rapamicina e tensirolimo, a inibirem a ação de AKT nessas células;
- 4) os inibidores de mTOR mostraram efeitos superiores aos quimioterápicos utilizados atualmente, cisplatina e paclitaxel, na capacidade de induzir apoptose nas CTT. Adicionalmente, os inibidores de mTOR foram capazes de reduzir a fração total de CTT, enquanto a cisplatina aumentou e o paclitaxel não exerceu efeito nessa população;
- 5) o tratamento com tensirolimo e o silenciamento gênico de mTOR, afetam a fração de CTT, e atingem o crescimento e a angiogênese tumoral no CME *in vivo*. Isto demonstra que a inibição de mTOR é uma potencial abordagem molecular na terapia para o tratamento do carcinoma mucoepidermóide e pode trazer benefícios ao prognóstico dos pacientes.

REFERÊNCIAS¹

- 1 Speight PM, Barrett AW. Salivary gland tumours. *Oral Dis*. 2002 Sep;8(5):229-40.
- 2 Coca-Pelaz A, Rodrigo JP, Triantafyllou A, Hunt JL, Rinaldo A, Strojan P, Haigentz M Jr, Mendenhall WM, Takes RP, Vander Poorten V, Ferlito A. Salivary mucoepidermoid carcinoma revisited. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2015 Apr;272(4):799-819.
- 3 Adelstein DJ, Koyfman SA, El-Naggar AK, Hanna EY. Biology and management of salivary gland cancers. *Semin Radiat Oncol*. 2012 Jul;22(3):245-53.
- 4 Alfieri S, Granata R, Bergamini C, Resteghini C, Bossi P, Licitra LF, Locati LD. Systemic therapy in metastatic salivary gland carcinomas: A pathology-driven paradigm? *Oral Oncol*. 2017 Mar;66:58-63.
- 5 Vander Poorten V1, Hunt J, Bradley PJ, Haigentz M Jr, Rinaldo A, Mendenhall WM, Suarez C, Silver C, Takes RP, Ferlito A. Recent trends in the management of minor salivary gland carcinoma. *Head Neck*. 2014 Mar;36(3):444-55.
- 6 Keller G, Steinmann D, Quaas A, Grünwald V, Janssen S, Hussein K. New concepts of personalized therapy in salivary gland carcinomas. *Oral Oncol*. 2017 Mar;18:1368-8375.
- 7 Ailles LE, Weissman IL. Cancer stem cells in solid tumors. *Curr Opin Biotechnol*. 2007 Oct;18(5):460-6.
- 8 Zhang Z, Filho MS, Nör JE. The biology of head and neck cancer stem cells. *Oral Oncol*. 2012 Jan;48(1):1-9.
- 9 Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, Qian D, Lam JS, Ailles LE, Wong M, Joshua B, Kaplan MJ, Wapnir I, Dirbas FM, Somlo G, Garberoglio C, Paz B, Shen J, Lau SK, Quake SR, Brown JM, Weissman IL, Clarke MF. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature*. 2009 Apr 9;458(7239):780-3.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

- 10 Adams A1, Warner K, Nör JE. Salivary gland cancer stem cells. *Oral Oncol.* 2013 Sep;49(9):845-53.

- 11 Adams A, Warner K, Pearson AT, Zhang Z, Kim HS, Mochizuki D, Basura G, Helman J, Mantesso A, Castilho RM, Wicha MS, Nör JE. ALDH/CD44 identifies uniquely tumorigenic cancer stem cells in salivary gland mucoepidermoid carcinomas. *Oncotarget.* 2015 Sep 29;6(29):26633-50

- 12 Keysar SB, Le PN, Miller B, Jackson BC, Eagles JR, Nieto C, Kim J, Tang B, Glogowska MJ, Morton JJ, Padilla-Just N, Gomez K, Warnock E, Reisinger J, Arcaroli JJ, Messersmith WA, Wakefield LM, Gao D, Tan AC, Serracino H, Vasiliou V, Roop DR, Wang XJ, Jimeno A. Regulation of Head and Neck Squamous Cancer Stem Cells by PI3K and SOX2. *J Natl Cancer Inst.* 2016 Sep 15;109(1).

- 13 Kim MJ, Koo JE, Han GY, Kim B, Lee YS, Ahn C, Kim CW. Dual-Blocking of PI3K and mTOR Improves Chemotherapeutic Effects on SW620 Human Colorectal Cancer Stem Cells by Inducing Differentiation. *J Korean Med Sci.* 2016 Mar;31(3):360-70.

- 14 Mayer IA, Arteaga CL. The PI3K/AKT Pathway as a Target for Cancer Treatment. *Annu Rev Med.* 2016;67:11-28.

- 15 Suzuki S, Dobashi Y, Minato H, Tajiri R, Yoshizaki T, Ooi A. EGFR and HER2-Akt-mTOR signaling pathways are activated in subgroups of salivary gland carcinomas. *Virchows Arch.* 2012 Sep;461(3):271-82.

- 16 Clauditz TS, Gontarewicz A, Bokemeyer C, Sauter G, Knecht R, Münscher A, Wilczak W. Abundant expression of mTOR kinase in salivary gland tumors - potentials as therapy target? *J Oral Pathol Med.* 2013 Nov;42(10):769-73.

- 17 Ettl T, Schwarz-Furlan S, Haubner F, Müller S, Zenk J, Gosau M, Reichert TE, Zeitler K. The PI3K/AKT/mTOR signalling pathway is active in salivary gland cancer and implies different functions and prognoses depending on cell localisation. *Oral Oncol.* 2012 Sep;48(9):822-30.

- 18 Sabatini DM. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat Rev Cancer.* 2006 Sep;6(9):729-34.

- 19 Jhanwar-Uniyal M, Amin AG, Cooper JB, Das K, Schmidt MH, Murali R. Discrete signaling mechanisms of mTORC1 and mTORC2: Connected yet apart in cellular and molecular aspects. *Adv Biol Regul.* 2017 Jan;4:2212-4926.

- 20 Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell*. 2007 Jul;12(1):9-22.
- 21 Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*. 2002 Jul 26;110(2):163-75.
- 22 Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol*. 2004 Jul 27;14(14):1296-302.
- 23 Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Rüegg MA, Hall A, Hall MN. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol*. 2004 Nov;6(11):1122-8.
- 24 Guertin DA, Sabatini DM. An expanding role for mTOR in cancer. *Trends Mol Med*. 2005 Aug;11(8):353-61.
- 25 Easton JB, Houghton PJ. mTOR and cancer therapy. *Oncogene*. 2006 Oct 16;25(48):6436-46.
- 26 Pópulo H, Lopes JM, Soares P. The mTOR signalling pathway in human cancer. *Int J Mol Sci*. 2012 13(2):1886-918.
- 27 Huang Z, Wu Y, Zhou X, Qian J, Zhu W, Shu Y, Liu P. Clinical efficacy of mTOR inhibitors in solid tumors: a systematic review. *Future Oncol*. 2015 11(11):1687-99.
- 28 Granville CA, Memmott RM, Gills JJ, Dennis PA. Handicapping the race to develop inhibitors of the phosphoinositide 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin pathway. *Clin Cancer Res*. 2006 Feb 1;12(3 Pt 1):679-89.
- 29 Ochal-Choińska AJ, Osuch-Wójcikiewicz E. Particular aspects in the cytogenetics and molecular biology of salivary gland tumours - current review of reports. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2016 20(4):281-6.
- 30 Bień S, Ziłkowska M, Kamiński B, Klimas A, Okła S, Postuła S, Żyłka S. Clinical and epidemiological assessment of salivary gland tumors. *Medical Studies of Swietorzyska Academy*. 2006 3: 21-30.

- 31 Goode RK, Auclair PL, Ellis GL. Mucoepidermoid carcinoma of the major salivary glands: clinical and histopathologic analysis of 234 cases with evaluation of grading criteria. *Cancer*. 1998 Apr 1;82(7):1217-24.
- 32 Eversole LR. Mucoepidermoid carcinoma: review of 815 reported cases. *J Oral Surg*. 1970 Jul;28(7):490-4.
- 33 Fonseca FP, Sena Filho M, Altemani A, Speight PM, Vargas PA. Molecular signature of salivary gland tumors: potential use as diagnostic and prognostic marker. *J Oral Pathol Med*. 2016 Feb;45(2):101-10.
- 34 Ghosh-Laskar S, Murthy V, Wadasadawala T, Agarwal J, Budrukkar A, Patil N, Kane S, Chaukar D, Pai P, Chaturvedi P, D'Cruz A. Mucoepidermoid carcinoma of the parotid gland: factors affecting outcome. *Head Neck*. 2011 Apr;33(4):497-503.
- 35 Lewis AG, Tong T, Maghami E. Diagnosis and Management of Malignant Salivary Gland Tumors of the Parotid Gland. *Otolaryngol Clin North Am*. 2016 Apr;49(2):343-80.
- 36 Chen AM1, Lau VH, Farwell DG, Luu Q, Donald PJ. Mucoepidermoid carcinoma of the parotid gland treated by surgery and postoperative radiation therapy: clinicopathologic correlates of outcome. *Laryngoscope*. 2013 Dec;123(12):3049-55.
- 37 Byrd SA, Spector ME, Carey TE, Bradford CR, McHugh JB. Predictors of recurrence and survival for head and neck mucoepidermoid carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2013 Sep;149(3):402-8.
- 38 Laurie SA, Licitra L. Systemic therapy in the palliative management of advanced salivary gland cancers. *J Clin Oncol*. 2006 Jun 10;24(17):2673-8.
- 39 Licitra L, Marchini S, Spinazzè S, Rossi A, Rocca A, Grandi C, et al. Cisplatin in advanced salivary gland carcinoma. A phase II study of 25 patients. *Cancer*. 1991 Nov 1;68(9):1874-7.
- 40 Gilbert J, Li Y, Pinto HA, Jennings T, Kies MS, Silverman P, et al. Phase II trial of taxol in salivary gland malignancies (E11934): a trial of Eastern Cooperative Oncology Group. *Head Neck*. 2006 Mar;28(3):197-204.

- 41 Tonon G, Modi S, Wu L, Kubo A, Coxon AB, Komiya T, O'Neil K, Stover K, El-Naggar A, Griffin JD, Kirsch IR, Kaye FJ. t(11;19)(q21;p13) translocation in mucoepidermoid carcinoma creates a novel fusion product that disrupts a Notch signaling pathway. *Nat Genet* 2003. Feb;33(2):208-13.
- 42 Yoo J, Robinson RA. Ras gene mutations in salivary gland tumours. *Arch Pathol Lab Med*. 2000 124: 836-9
- 43 Shang J, Shui Y, Sheng L, et al. Epidermal growth factor receptor and human epidermal growth receptor 2 expression in parotid mucoepidermoid carcinoma: possible implications for targeted therapy. *Oncol Rep*. 2008 19:435-40.
- 44 Nakano T, Yamamoto H, Hashimoto K, et al. HER2 and EGFR gene copy number alterations are predominant in high-grade salivary mucoepidermoid carcinoma irrespective of MAML2 fusion status. *Histopathology*. 2013 63:378-92.
- 45 Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997 3:730-7.
- 46 Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 100:3983-8.
- 47 Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*. 2003 63:5821-8.
- 48 Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*. 2007 67:1030-7.
- 49 Frank NY, Margaryan A, Huang Y, Schatton T, Waaga-Gasser AM, Gasser M, Sayegh MH, Sadee W, Frank MH. ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer Res*. 2005 65:4320-33.
- 50 Miki J, Furusato B, Li H, Gu Y, Takahashi H, Egawa S, Sesterhenn IA, McLeod DG, Srivastava S, Rhim JS. Identification of putative stem cell markers, CD133 and CXCR4, in hTERT-immortalized primary nonmalignant and malignant tumor-derived human prostate epithelial cell lines and in prostate cancer specimens. *Cancer Res*. 2007 Apr 1;67(7):3153-61.

- 51 Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 104(3):973-8.
- 52 Destro Rodrigues MF, Sedassari BT, Esteves CM, de Andrade NP, Altemani A, de Sousa SC, Nunes FD. Embryonic stem cells markers Oct4 and Nanog correlate with perineural invasion in human salivary gland mucoepidermoid carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2017 Feb;46(2):112-120.
- 53 Clay MR, Tabor M, Owen JH, Carey TE, Bradford CR, Wolf GT, Wicha MS, Prince ME. Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase. *Head Neck*. 2010 Sep;32(9):1195-201.
- 54 Zöller M. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat Rev Cancer*. 2011 Apr;11(4):254-67.
- 55 Venezia TA, Merchant AA, Ramos CA, Whitehouse NL, Young AS, Shaw CA, et al. Molecular signatures of proliferation and quiescence in hematopoietic stem cells. *PLoS Biol*. 2004 2(10):e301.
- 56 Park Y, Gerson SL. DNA repair defects in stem cell function and aging. *Annu Rev Med*. 2005 56:495–508.
- 57 Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res*. 2006 Feb 15;66(4):1883-90.
- 58 Nör C, Zhang Z, Warner KA, Bernardi L, Visioli F, Helman JI, Roesler R, Nör JE. Cisplatin induces Bmi-1 and enhances the stem cell fraction in head and neck cancer. *Neoplasia*. 2014 Feb;16(2):137-46.
- 59 Krishnamurthy S, Nör JE. Head and neck cancer stem cells. *J Dent Res*. 2012 91(4):334–40.
- 60 Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T. Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2005 Sep;5(9):744-9.

- 61 Biddle A, Gammon L, Liang X, Costea DE, Mackenzie IC. Phenotypic Plasticity Determines Cancer Stem Cell Therapeutic Resistance in Oral Squamous Cell Carcinoma. *EBioMedicine*. 2016 Jan 9;4:138-45.
- 62 Baccelli I, Trumpp A. The evolving concept of cancer and metastasis stem cells. *J Cell Biol*. 2012 Aug 6;198(3):281-93.
- 63 Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer*. 2009 Apr;9(4):265-73.
- 64 Zhe X, Cher ML, Bonfil RD. Circulating tumor cells: finding the needle in the haystack. *Am J Cancer Res*. 2011 1(6):740-51.
- 65 Agliano A, Calvo A, Box C. The challenge of targeting cancer stem cells to halt metastasis. *Semin Cancer Biol*. 2017 Mar;(18):1-18.
- 66 Rosen JM, Jordan CT. The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science*. 2009 Jun 26;324(5935):1670-3.
- 67 Gomes FG, Nedel F, Alves AM, Nör JE, Tarquinio SB. Tumor angiogenesis and lymphangiogenesis: tumor/endothelial crosstalk and cellular/microenvironmental signaling mechanisms. *Life Sci*. 2013 Feb 7;92(2):101-7.
- 68 Cho K, Wang X, Nie S et al. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin Cancer Res*, 2008 Mar 1;14(5):1310-6.
- 69 Ahmed M, Chaudhari K, Babaei-Jadidi R, Dekker LV, Shams Nateri A. Concise Review: Emerging Drugs Targeting Epithelial Cancer Stem-Like Cells. *Stem Cell*. 2017 Apr;35(4):839-850.
- 70 Wang K, McDermott JD, Schrock AB, Elvin JA, Gay L, Karam SD, Raben D, Somerset H, Ali SM, Ross JS, Bowles DW. Comprehensive genomic profiling of salivary mucoepidermoid carcinomas reveals frequent BAP1, PIK3CA, and other actionable genomic alterations. *Ann Oncol*. 2017 Apr 1;28(4):748-753.
- 71 Lien EC, Dibble CC, Toker A. PI3K signaling in cancer: beyond AKT. *Curr Opin Cell Bio*. 2017 Mar 23;45:62-71.

- 72 Sansal, I.; Sellers, W.R. The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J. Clin. Oncol.* 2004 Jul 15;22(14):2954-63.
- 73 Chappell WH, Steelman LS, Long JM, Kempf RC, Abrams SL, Franklin RA, Bäsecke J, Stivala F, Donia M, Fagone P, Malaponte G, Mazzarino MC, Nicoletti F, Libra M, Maksimovic-Ivanic D, Mijatovic S, Montalto G, Cervello M, Laidler P, Milella M, Tafuri A, Bonati A, Evangelisti C, Cocco L, Martelli AM, McCubrey JA. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. *Oncotarget.* 2011 Mar;2(3):135-64.
- 74 Reiling JH1, Sabatini DM. Stress and mTOR signaling. *Oncogene.* 2006 Oct 16;25(48):6373-83.
- 75 Vézina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo).* 1975 Oct;28(10):721-6.
- 76 Seto B. Rapamycin and mTOR: a serendipitous discovery and implications for breast cancer. *Clin Transl Med.* 2012 Nov 15;1(1):29.
- 77 Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 2012. Apr 13;149(2):274-93.
- 78 Harrington LS1, Findlay GM, Gray A, Tolkacheva T, Wigfield S, Rebholz H, Barnett J, Leslie NR, Cheng S, Shepherd PR, Gout I, Downes CP, Lamb RF. The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *J Cell Biol.* 2004 Jul 19;166(2):213-23.
- 79 Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, Tokunaga C, Avruch J, Yonezawa K. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell.* 2002 Jul 26;110(2):177-89.
- 80 Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, Lindquist RA, Kang SA, Spooner E, Carr SA, Sabatini DM. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell.* 2007 Mar 23;25(6):903-15.
- 81 Wullschleger S1, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell.* 2006 Feb 10;124(3):471-84.

- 82 Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*. 2005 Feb 18;307(5712):1098-101.
- 83 Gulati N, Karsy M, Albert L, Murali R, Jhanwar-Uniyal M. Involvement of mTORC1 and mTORC2 in regulation of glioblastoma multiforme growth and motility. *Int J Oncol*. 2009 Oct;35(4):731-40.
- 84 Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell*. 2006 Apr 21;22(2):159-68.
- 85 Warner KA, Adams A, Bernardi L, Nor C, Finkel KA, Zhang Z, McLean SA, Helman J, Wolf GT, Divi V, Queimado L, Kaye FJ, Castilho RM, Nör JE. Characterization of tumorigenic cell lines from the recurrence and lymph node metastasis of a human salivary mucoepidermoid carcinoma. *Oral Oncol*. 2013 Nov;49(11):1059-66.
- 86 Bachmann RA1, Kim JH, Wu AL, Park IH, Chen J. A nuclear transport signal in mammalian target of rapamycin is critical for its cytoplasmic signaling to S6 kinase 1. *J Biol Chem*. 2006 Mar 17;281(11):7357-63.
- 87 Kim JE, Chen J. Cytoplasmic-nuclear shuttling of FKBP12-rapamycin-associated protein is involved in rapamycin-sensitive signaling and translation initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec 19;97(26):14340-5.
- 88 Bachmann RA, Kim JH, Wu AL, Park IH, Chen J. A nuclear transport signal in mammalian target of rapamycin is critical for its cytoplasmic signaling to S6 kinase 1. *J Biol Chem*. 2006 Mar 17;281(11):7357-63.
- 89 Wang K, McDermott JD, Schrock AB, Elvin JA, Gay L, Karam SD, Raben D, Somerset H, Ali SM, Ross JS, Bowles DW. Comprehensive genomic profiling of salivary mucoepidermoid carcinomas reveals frequent BAP1, PIK3CA, and other actionable genomic alterations. *Ann Oncol*. 2017 Jan 16;28(4):748-753.
- 90 Xia P, Xu XY. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in cancer stem cells: from basic research to clinical application. *Am J Cancer Res*. 2015 Apr 15;5(5):1602-9.

- 91 Chang L, Graham PH, Hao J, Ni J, Bucci J, Cozzi PJ, Kearsley JH and Li Y. Acquisition of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell phenotypes is associated with activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway in prostate cancer radioresistance. *Cell Death Dis.* 2013;4:e875.
- 92 Zhou J, Wulfkühle J, Zhang H, Gu P, Yang Y, Deng J, Margolick JB, Liotta LA, Petricoin E 3rd and Zhang Y. Activation of the PTEN/mTOR/STAT3 pathway in breast cancer stem-like cells is required for viability and maintenance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104:16158-16163.
- 93 Gharbi SI, Zvelebil MJ, Shuttleworth SJ, Hancox T, Saghir N, Timms JF, Waterfield MD. Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002. *Biochem J.* 2007 May 15;404(1):15-21.
- 94 Burger MT, Pecchi S, Wagman A, Ni ZJ, Knapp M, Hendrickson T, Atallah G, Pfister K, Zhang Y, Bartulis S, Frazier K, Ng S, Smith A, Verhagen J, Haznedar J, Huh K, Iwanowicz E, Xin X, Menezes D, Merritt H, Lee I, Wiesmann M, Kaufman S, Crawford K, Chin M, Bussiere D, Shoemaker K, Zaror I, Maira SM, Voliva CF. Identification of NVP-BKM120 as a Potent, Selective, Orally Bioavailable Class I PI3 Kinase Inhibitor for Treating Cancer. *ACS Med Chem Lett.* 2011 Aug 26;2(10):774-9.
- 95 Pearce LR, Alton GR, Richter DT, Kath JC, Lingardo L, Chapman J, Hwang C, Alessi DR. Characterization of PF-4708671, a novel and highly specific inhibitor of p70 ribosomal S6 kinase (S6K1). *Biochem J.* 2010 Oct 15;431(2):245-55
- 96 Ghosh J, Kobayashi M, Ramdas B, Chatterjee A, Ma P, Mali RS, Carlesso N, Liu Y, Plas DR, Chan RJ, Kapur R. S6K1 regulates hematopoietic stem cell self-renewal and leukemia maintenance. *J Clin Invest.* 2016 Jul 1;126(7):2621-5.
- 97 Bulut-Karslioglu A, Biechele S, Jin H, Macrae TA, Hejna M, Gertsenstein M, Song JS, Ramalho-Santos M. Inhibition of mTOR induces a paused pluripotent state. *Nature.* 2016 Dec 1;540(7631):119-123.
- 98 Yu JS, Cui W. Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. *Development.* 2016 Sep 1;143(17):3050-60.
- 99 Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, Burds AA, Kalaany NY, Moffat J, Brown M, Fitzgerald KJ, Sabatini DM. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev Cell.* 2006 Dec;11(6):859-71

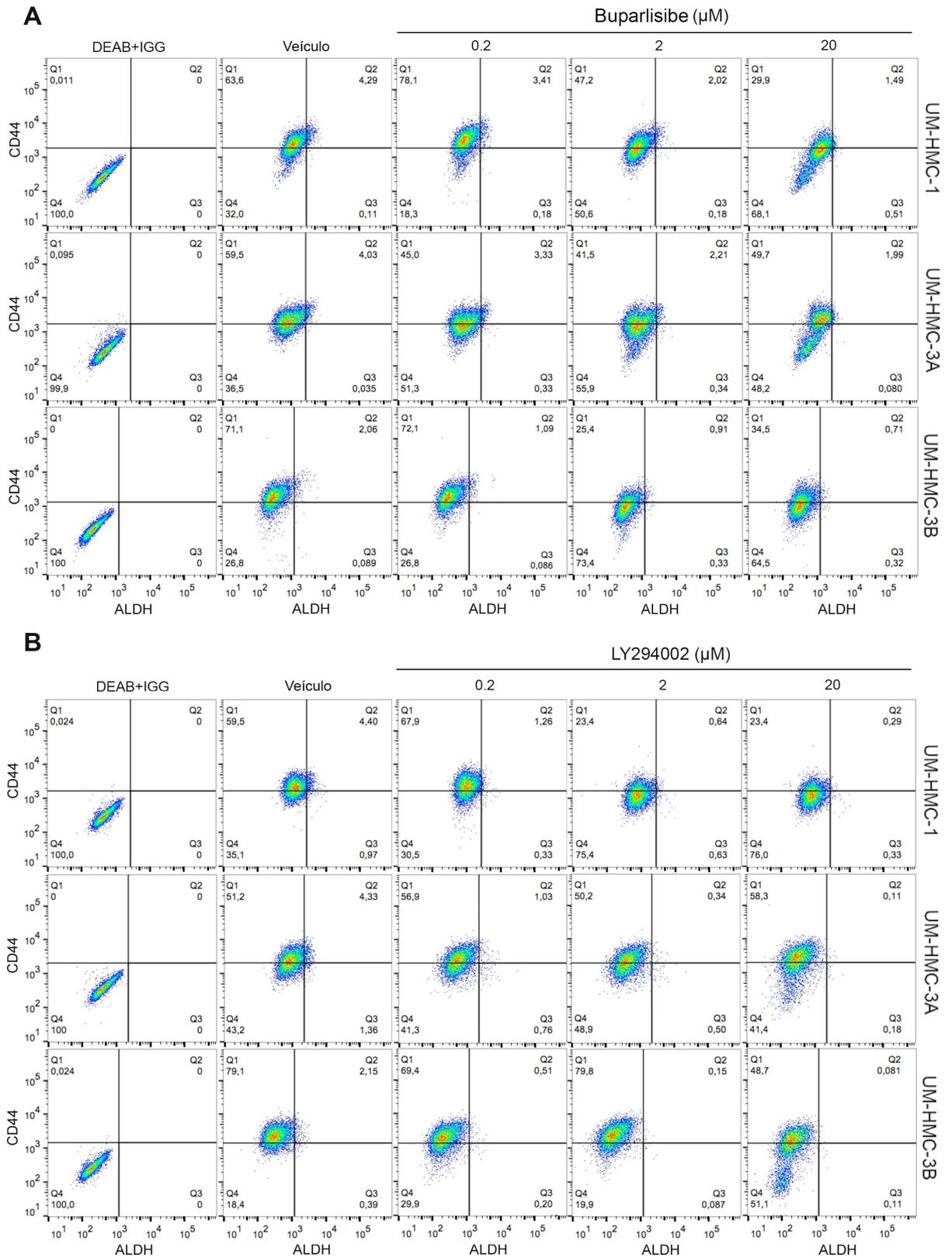
- 100 Patel V, Marsh CA, Dorsam RT, Mikelis CM, Masedunskas A, Amornphimoltham P, Nathan CA, Singh B, Weigert R, Molinolo AA, Gutkind JS. Decreased lymphangiogenesis and lymph node metastasis by mTOR inhibition in head and neck cancer. *Cancer Res.* 2011 Nov 15;71(22):7103-12.
- 101 Rozengurt E, Soares HP, Sinnet-Smith J. Suppression of feedback loops mediated by PI3K/mTOR induces multiple overactivation of compensatory pathways: an unintended consequence leading to drug resistance. *Mol Cancer Ther.* 2014 Nov;13(11):2477-88.
- 102 Francipane MG, Lagasse E. Therapeutic potential of mTOR inhibitors for targeting cancer stem cells. *Br J Clin Pharmacol.* 2016 Nov;82(5):1180-1188.
- 103 Castedo M, Ferri KF, Kroemer G. Mammalian target of rapamycin (mTOR): pro- and anti-apoptotic. *Cell Death Differ.* 2002 Feb;9(2):99-100.
- 104 Teachey DT, Obzut DA, Cooperman J, Fang J, Carroll M, Choi JK, Houghton PJ, Brown VI, Grupp SA. The mTOR inhibitor CCI-779 induces apoptosis and inhibits growth in preclinical models of primary adult human ALL. *Blood.* 2006 Feb 1;107(3):1149-55.
- 105 Sun SY, Rosenberg LM, Wang X, Zhou Z, Yue P, Fu H, Khuri FR. Activation of Akt and eIF4E survival pathways by rapamycin-mediated mammalian target of rapamycin inhibition. *Cancer Res.* 2005 Aug 15;65(16):7052-8.
- 106 O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, Smith D, Lane H, Hofmann F, Hicklin DJ, Ludwig DL, Baselga J, Rosen N. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res.* 2006 Feb 1;66(3):1500-8.
- 107 Phung TL, Ziv K, Dabydeen D, Eyiah-Mensah G, Riveros M, Perruzzi C, Sun J, Monahan-Earley RA, Shiojima I, Nagy JA, Lin MI, Walsh K, Dvorak AM, Briscoe DM, Neeman M, Sessa WC, Dvorak HF, Benjamin LE. Pathological angiogenesis is induced by sustained Akt signaling and inhibited by rapamycin. *Cancer Cell.* 2006 Aug;10(2):159-70.
- 108 Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, Bruns CJ, Zuelke C, Farkas S, Anthuber M, Jauch KW, Geissler EK. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med.* 2002 Feb;8(2):128-35.

109 Shiota C, Woo JT, Lindner J, Shelton KD, Magnuson MA. Multiallelic disruption of the rictor gene in mice reveals that mTOR complex 2 is essential for fetal growth and viability. *Dev Cell*. 2006 Oct;11(4):583-9.

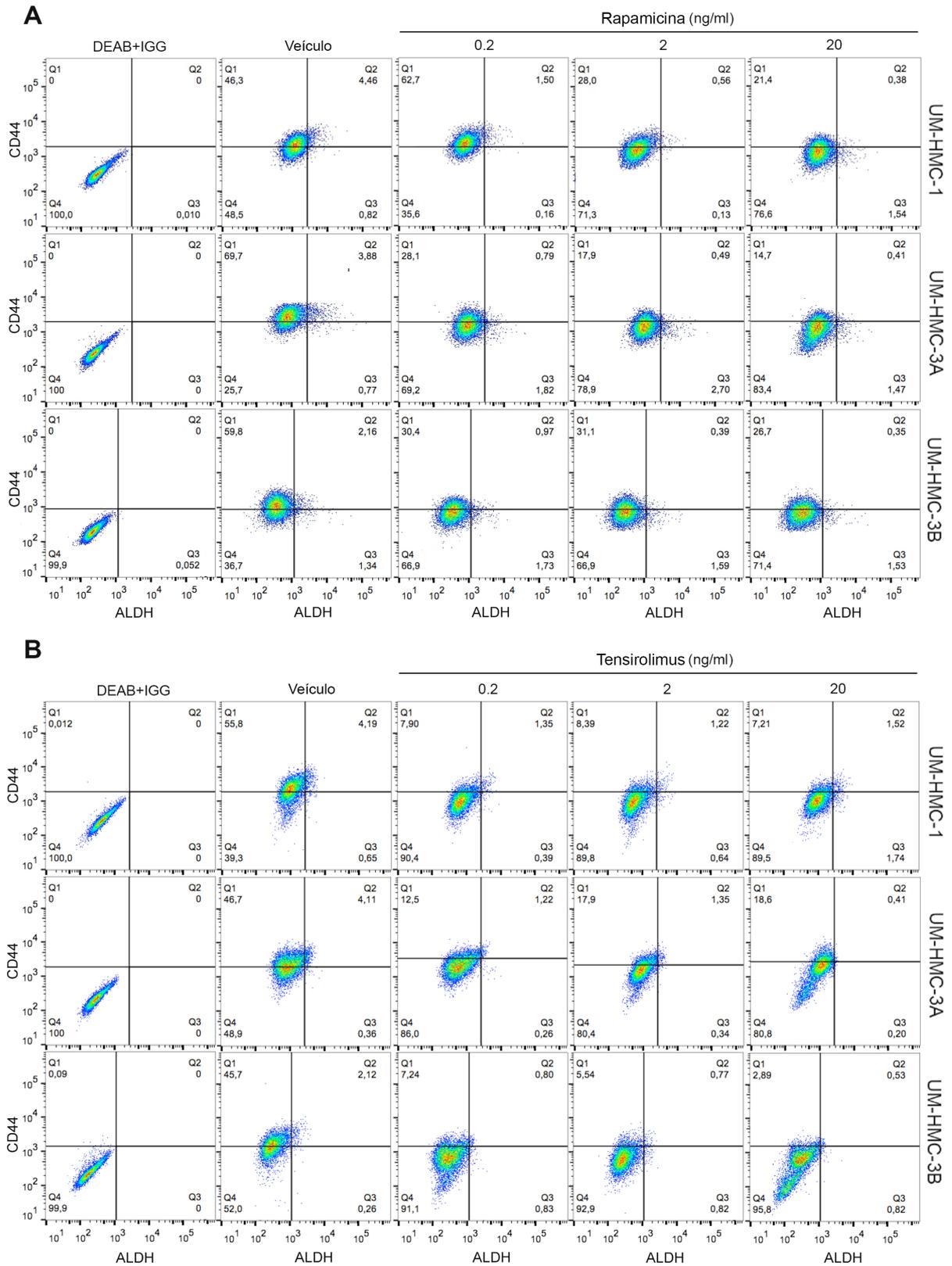
110 Ritchie KE, Nör JE. Perivascular stem cell niche in head and neck cancer. *Cancer Lett*. 2013 Sep 10;338(1):41-6.

111 Mochizuki D, Adams A, Warner KA, Zhang Z, Pearson AT, Misawa K, McLean SA, Wolf GT, Nör JE. Anti-tumor effect of inhibition of IL-6 signaling in mucoepidermoid carcinoma. *Oncotarget*. 2015 Sep 8;6(26):22822-35.

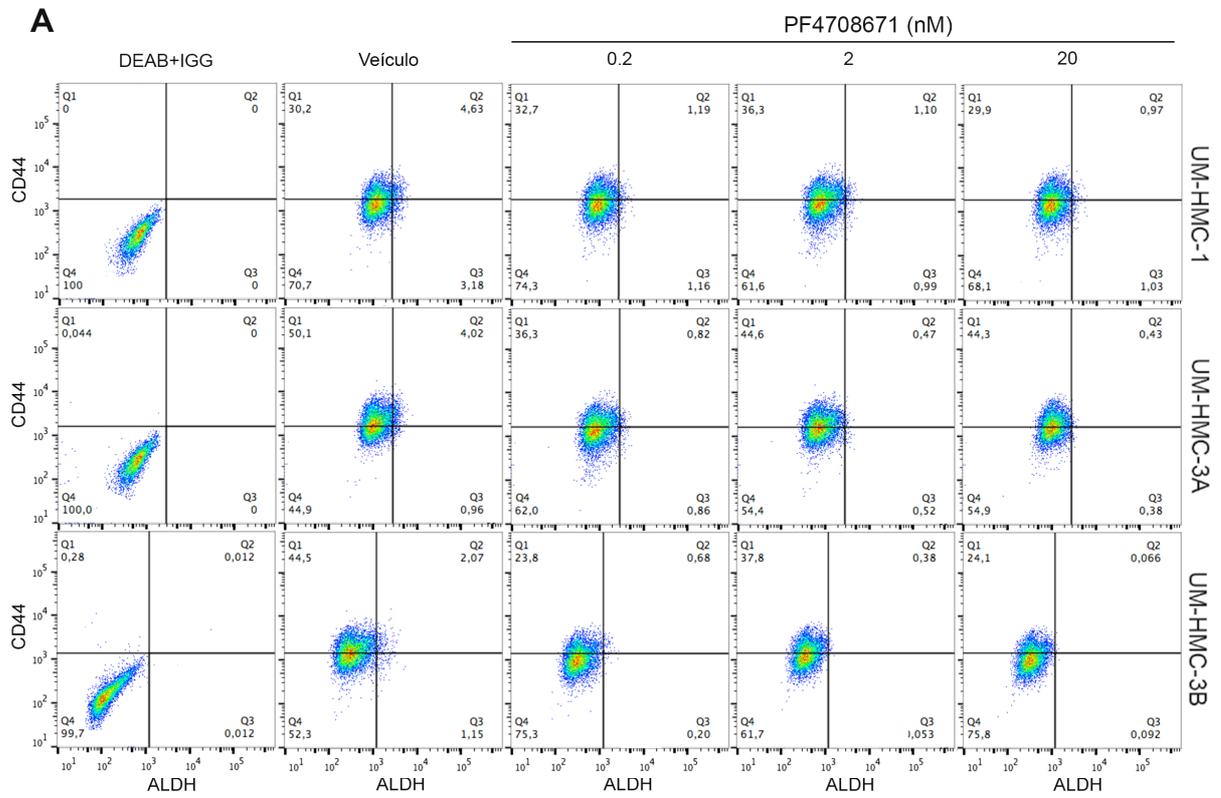
APÊNDICE A - Representação gráfica da análise por citometria de fluxo para a expressão de ALDH e CD44 nas células UM-HMC-1, -3A e -3B após exposição crescente de inibidores de AKT, 0.2 – 20 μ M de buparlisibe (A) ou 0.2 – 20 μ M de LY2940002 (B), ou veículo



APÊNDICE B - Representação gráfica da análise por citometria de fluxo para a expressão de ALDH e CD44 nas células UM-HMC-1, -3A e -3B após exposição crescente de inibidores de mTOR 0.2 – 20 ng/ml de tensirolimo (A) ou 0.2 – 20 ng/ml de rapamicina (B), ou veículo



APÊNDICE C - Representação gráfica da análise por citometria de fluxo para a expressão de ALDH e CD44 nas células UM-HMC-1, -3A e -3B após exposição crescente de inibidores de S6K-1, 2 – 200 nM de PF4708671 ou veículo



ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética

O projeto “Inibidores de mTOR são potencial terapia com alvo em células tronco tumorais para o carcinoma mucoepidermóide” faz parte do protocolo aprovado no comitê de ética da Universidade de Michigan sob o número PRO00006471, com coordenação do Prof. Jacques Nör, e desenvolvido no Laboratório de Angiogênese pertencente ao departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade de Michigan. O referido protocolo foi aprovado em 20 de agosto de 2015 e possui data de expiração em 20 de agosto de 2018.