Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL

**A participação da via fosfatidilinositol3-quinase
(PI3K)/mTOR no carcinoma epidermoide oral**

Andressa Duarte

Ribeirão Preto

2018

Andressa Duarte

**A participação da via fosfatidilinositol
3-quinase (PI3K)/mTOR no carcinoma
epidermoide oral**

**“VERSÃO CORRIGIDA. A VERSÃO ORIGINAL ENCONTRA-SE DISPONÍVEL TANTO NA
BIBLIOTECA DA UNIDADE QUE ALOJA O PROGRAMA, QUANTO NA BIBLIOTECA DIGITAL
DE TESES E DISSERTAÇÕES DA USP (BDTD)”**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Área de Concentração: PATOLOGIA

Orientador: Prof. Dr. Alfredo Ribeiro da
Silva

Ribeirão Preto

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por quaisquer meios convencionais ou eletrônicos, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Duarte, Andressa

A participação da via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)/mTOR no carcinoma epidermoide oral

Ribeirão Preto, 2018.

84 paginas.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências.

Área de concentração: Patologia - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Alfredo Ribeiro da Silva

Palavras-chave: Câncer; via de sinalização; PI3K; mTOR, rapamicina, everolimos, torin1.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Andressa Duarte

A participação da via fosfatidilinositol3-quinase (PI3K)/mTOR no carcinoma epidermoide oral

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de Concentração: Patologia

Aprovado em: 15/03/2018

Banca Examinadora:

Prof(a). Dr(a).
Instituição: _____ Assinatura:

Prof(a). Dr(a).
Instituição: _____ Assinatura:

Prof(a). Dr(a).
Instituição: _____ Assinatura:

Trabalho realizado no Laboratório de Oncopatologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo com auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) juntamente ao laboratório SOAP: Signaling in Oncogenesis, Angiogenesis, and Permeability – Universidade de Nantes, Nantes-França.

Dedicatória

*Aos meus pais, irmãos, ao Tiago, avôs, com muito carinho e apoio, que
não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida
e compreenderam minha ausência.*

Amo vocês!

Agradecimientos

Agradeço...

A Deus, pois sem ele nada seria possível;

Ao Dr Alfredo Ribeiro-Silva, pela oportunidade e confiança;

A todos os funcionários do departamento, pela ótima convivência e amizade;

Aos colegas de laboratório e departamento, pela boa convivência e amizade;

A Dr^a Julie Gavard pela oportunidade e paciência; e a toda equipe 15 pela ótima convivência e período de grande aprendizado;

A minha família, namorado, amigos novos e de longa data, pelos dias bons e pelo apoio sempre.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho. Todos foram de grande importância nesta fase.

A CAPES e a FAPESP, pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

*“Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei
sobre os ombros de gigantes.”*

Isaac Newton

Resumo

Resumo

DUARTE, A. **A participação da via fosfatidilinositol3-quinase (PI3K)/mTOR no carcinoma epidermoide oral.** Tese de Doutorado – Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

O carcinoma epidermoide oral (CEO) possui alta incidência no Brasil, correspondendo a aproximadamente 95% das neoplasias malignas orais. A biologia molecular do carcinoma de cabeça e pescoço é complexa e se desenvolve a partir da disfunção de várias vias inter-relacionadas. A via das PI3K/mTOR é conhecida por regular várias funções celulares, como a regulação do ciclo celular, migração, angiogênese, morfologia e organização do citoesqueleto. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o impacto do bloqueio da via PI3K e mTOR na sobrevivência celular, na adesão e na morfologia de células endoteliais, relacionando-o com o processo angiogênico. Em cultura de células, observamos que as inibições farmacológicas de PI3K ou do mTOR diminuem a viabilidade celular do CEO. Houve redução da expressão de PARP, um marcador de apoptose e pS6, uma proteína *downstream* na sinalização do mTOR, após o tratamento das células de CEO com os inibidores de mTOR. Além disso, demonstramos que o tratamento com os inibidores de mTOR diminuem a capacidade das células do CEO em formarem clones. Foi observado ainda que o cultivo de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC, do inglês *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) em meio condicionado (MC) proveniente de células de CEO, tratadas com inibidores de mTOR, resultaram em aumento da adesão celular e modificação na morfologia celular. Para investigar a influência dos fatores liberados pelas células tumorais na migração das células HUVECs, foi realizado ensaio de *wound healing*, em células HUVECs cultivadas em MC. Observamos maior migração das células HUVECs cultivadas em MC quando este era proveniente de células cancerosas tratadas com inibidor de mTOR. Ainda, investigamos a expressão da via VEGF nessa migração por meio do ensaio de ELISA. Observamos que no MC proveniente de células cancerosas tratadas com inibidor de mTOR havia maior presença de VEGF. Nossos dados sugerem que a via da PI3K/mTOR está envolvida na proliferação das células do CEO. Porém, a inibição de mTOR em células cancerosas pode liberar fatores, tais como VEGF, que influenciam na morfologia e migração de células HUVEC.

Palavras-chave: Câncer; via de sinalização; PI3K; AKT; mTOR, rapamicina, everolimus, torin1.

Abstract

Abstract

Duarte, A. **The participation of the pathway Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) / mTOR in oral squamous cell carcinoma.** Thesis (PhD) – Department of Pathology of the School of Medicine of Ribeirao Preto – University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, SP.

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) has a high incidence in Brazil, corresponding to approximately 95% of oral malignancies. The molecular biology of head and neck carcinoma is complex and develops from the dysfunction of several interrelated pathways. The PI3K/mTOR pathway is known to regulate various cellular functions, such as cell cycle regulation, migration, angiogenesis, cytology, and cytoskeletal organization. The aim of the present study was to evaluate the impact of PI3K and mTOR pathway blockade on cell survival, endothelial cell adhesion and morphology, and to correlate it with the angiogenic process. In cell culture, we observed that pharmacological inhibitions of PI3K or mTOR decrease the OSCC's cellular viability. There was a reduction in the expression of PARP, a marker of apoptosis and pS6, a downstream protein in mTOR signaling, after treatment of OSCC cells with mTOR inhibitors. In addition, we have demonstrated that treatment with mTOR inhibitors decreases the ability of the OSCC cells to form clones. It was further noted that human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) culture in conditioned media (CM) from OSCC cells treated with mTOR inhibitors resulted in increased cell adhesion and modification in cell morphology. To investigate the influence of the factors released by the tumor cells in the migration of HUVEC cells, a wound healing assay was performed on HUVEC cells cultured in CM. We observed a greater migration of HUVECs cells cultured in CM when it came from cancer cells treated with mTOR inhibitor. Furthermore, we investigated the role of the VEGF pathway in this migration through the ELISA assay. We observed that in CM from cancer cells treated with mTOR inhibitor there was a greater presence of VEGF. Our data suggest that the PI3K/mTOR pathway is involved in the proliferation of OSCC cells. However, inhibition of mTOR in cancer cells may release factors, such as VEGF, which influence the morphology and migration of HUVEC cells.

Keywords: Câncer ; via de sinalização; PI3K; AKT; mTOR.

Sumário

Sumário

1. Introdução.....	18
1.1. Carcinoma epidermoide oral (CEO)	19
1.2. Sinalização via fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)/ mTOR.....	20
2. Objetivos.....	25
2.1. Objetivo geral	26
2.2. Objetivos específicos	26
3. Material e Métodos	27
3.1. Cultivo e expansão das linhagens celulares	28
3.2.1. Inibição farmacológica da PI3K	29
3.2.2. Inibição farmacológica da mTOR.....	29
3.2.3. Tabela dos inibidores.....	30
3.3. Meio condicionado	30
3.4. Ensaio de MTT	30
3.5. Imunofluorescência	31
3.6. Análises da expressão proteica por <i>Western Blotting</i>	32
3.6.1. Preparação das Amostras :	32
3.6.2. Extração das Proteínas.	32
3.6.3. Eletroforese e ImunoBlotting.....	32
3.7. Anticorpos utilizados	34

3.8. Ensaio de Migração (<i>wound-healing</i>)	34
3.9. Ensaio clonogênico	35
3.10. Análise da adesão proliferação e viabilidade celular - xCELLigence	35
3.10.1. Procedimento experimental	36
3.11. Análises estatísticas.....	36
4. Resultados.....	37
4.1. A via da PI3K/mTOR está envolvida na proliferação de células de carcinoma epidermoide oral	38
4.2. Os inibidores de PI3K e mTOR não apresentam toxicidade celular	45
4.3. Os inibidores de mTOR são seletivos as de CEO	48
4.4. A inibição de mTOR reduz a fosforilação de S6 e AKT	50
4.5. mTOR influencia a capacidade das CEO em formar clones	52
4.6. A inibição do mTOR em células de CEO libera fatores que favorecem a capacidade de adesão celular de HUVECs	54
4.7. A inibição de mTOR aumenta a capacidade de células do CEO em liberar substâncias que interferem na mudança de morfologia das células HUVECs.....	56
4.8. A inibição de mTOR reduz a capacidade de células CEO em liberar substâncias que interferem na adesão focal das células HUVECs.....	58
4.9. A inibição de mTOR por everolimus e torin 1 aumenta a capacidade de células CEO em liberar substâncias que interferem na migração das células HUVECs.....	59

4.10. O aumento da migração das HUVECS cultivadas em MC provenientes de HN26 e HN30 contendo inibidor de mTOR é via VEGF.	60
5. Discussão	63
Conclusão	71
6. Referências Bibliográficas	74
7. Anexo.....	83

1. Introdução

Introdução

1.1. Carcinoma epidermoide oral (CEO)

O câncer é considerado um problema de saúde pública com uma estimativa para 2030 de 21,4 milhões de novos casos e 13,2 milhões de mortes (Ferlay et al., 2015; Syrjanen, 2005)

Dentre os cânceres de cavidade oral, cerca de 90% dos tumores são subclassificados como carcinoma epidermoide oral (CEO) (Ghantous, Yaffi, & Abu-Elnaaj, 2015). O CEO representa 2-3% de todos os casos de cânceres e é o sexto mais frequente no mundo (Leemans, Braakhuis, & Brakenhoff, 2011; Young et al., 2015).

Apenas 40-50% dos pacientes diagnosticados com CEO sobrevivem mais de 5 anos (Leemans et al., 2011). Os principais fatores de risco incluem o uso de tabaco, álcool e infecção por papiloma vírus humano (HPV) (Iglesias-Bartolome, Martin, & Gutkind, 2013).

Para a escolha do melhor tratamento do paciente com CEO são analisados a natureza do carcinoma e as condições gerais do paciente (Feller & Lemmer, 2012). Porém para a maioria dos pacientes a escolha é pelo tratamento cirúrgico, podendo ainda ser acompanhado de radioterapia ou quimioterapia (Vermorken et al., 2008). No entanto, o tratamento pode estar associado à morbidade e mortalidade, e geralmente apresenta altas taxas de toxicidades sistêmicas.

A biologia molecular do carcinoma de cabeça e pescoço é complexa e se desenvolve a partir da disfunção de varias vias inter-relacionadas. Não há apenas um mecanismo ou molécula que seja isoladamente responsável por

sua carcinogênese (Glazer, Chang, Ha, & Califano, 2009). Nos últimos anos, tem sido demonstrado que a via de sinalização PI3K/mTOR está envolvida em diversos diferentes tipos de câncer em humanos. Esta via desempenha um papel importante não só no desenvolvimento dos tumores, mas também na resposta potencial do tumor (Paoli, Giannoni, & Chiarugi, 2013).

1.2. Sinalização via fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)/ mTOR

O crescimento e proliferação celular são altamente regulados por vias de sinalização, proteína específica e ciclo celular. A via fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)/mTOR (também conhecido como FRAP1) são de grande importância na proliferação celular e tais vias são fortemente associadas a várias oncoproteínas, receptores de fatores de crescimento e eventos associados ao ciclo de vida celular e angiogênese (Utermark et al., 2012; Wymann & Pirola, 1998).

O mTOR é um efetor *downstream* de suma importância da via de sinalização de PI3K/AKT, e essa ativação em cascata regula vários processos celulares que são críticos para a oncogênese. O processo de ativação ocorre da seguinte maneira: as PI3Ks são ativadas via receptores de tirosina quinase, PI3K fosforila o anel de inositol do fosfolípido de membrana fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) para gerar fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato (PIP₃) (Dibble & Cantley, 2015). PIP₃ recruta a quinase dependente de fosfoinosítídeo 1 (PDK1) e AKT para a membrana plasmática (Pearce, Komander, & Alessi, 2010). PDK1 fosforila Thr308 no circuito de ativação de AKT e desse modo, ativa AKT (Alessi et al., 1997). AKT fosforila TSC2, induzindo a liberação lisossômica de TSC (Menon et al., 2014). Após a liberação de TSC, acontece a ativação de

mTOR em seu complexo mTORC1 (Long, Lin, Ortiz-Vega, Yonezawa, & Avruch, 2005).

O mTORC1 promove processos anabólicos como, a biossíntese de proteínas, lipídios e nucleotídeos, e inibe os processos catabólicos, como a autofagia. Os alvos *downstream* de mTORC1 são a proteína ribossomal S6 quinase (S6K), as proteínas de ligação do fator 4E de iniciação da tradução eucariótica (4E-BPs) e a enzima autocorrelante da cinase 1 semelhante a Unc-51 (ULK1) (Long et al., 2005; Mamane, Petroulakis, LeBacquer, & Sonenberg, 2006). Diferente de mTORC1, mTORC2 é insensível à rapamicina. Em um ciclo de feedback negativo, mTORC1 via S6K fosforila e pode atenuar a sinalização PI3K (Efeyan & Sabatini, 2010). Dentre os processos celulares regulados pela via mTOR, a angiogênese é um desses e coletivamente, a via PI3K/AKT/mTOR estimula a angiogênese ao aumentar a secreção de crescimento endotelial vascular (VEGF).

O fator de VEGF é um potente fator angiogênico cujos efeitos sobre células endoteliais são mediados em parte pela via PI3K/mTOR. A família VEGF de mamíferos possui cinco membros: VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD e fator de crescimento placentário (PGF). Os ligantes de VEGF podem ligar-se a três tirosina quinases do receptor tipo III: VEGFR1 / FLT1, VEGFR2 / KDR e VEGFR3 / FLT4, das quais o VEGFR2 tem o papel mais importante na angiogênese induzida por VEGF (Ellis e Hicklin, 2008)

Dentre os inibidores de PI3K temos o LY294002, que foi a primeira molécula sintética conhecida por inibir PI3K em ensaios *in vivo*, mais estável em solução do que wortmannin, um outro conhecido inibidor de PI3K. LY294002 inativa AKT, conseqüentemente inibindo a proliferação celular. O

LY294002 demonstra um efeito inibidor de crescimento e inibidor de apoptose notável nestas linhagens celulares de câncer do cólon, com diminuição da expressão de AKT fosforilado, também inibe a proliferação de células de câncer de ovário *in vitro*.(Ser473) (Semba, Itoh, Ito, Harada, & Yamakawa, 2002). Quando nos referimos a inibidores de mTOR, temos maiores opções e alguns apresentam maior seletividade ao mTOR. No presente trabalho utilizamos os seguintes inibidores de mTOR: rapamicina, everolimos e torin 1.

A rapamicina é um inibidor específico de mTOR e o tratamento com a mesma *in vivo*, bloqueia especificamente alvos *downstream* ao mTOR, tais como a fosforilação e a ativação do pS6K e a liberação da inibição do fator de iniciação eucariótica (4EIF4E/4E-BP1). O everolimos é um fármaco utilizado no tratamento avançado de câncer renal com metástases. Possui como mecanismo de ação a inibição da proteína mTOR que proporciona diminuição do crescimento das células tumorais (Lane et al., 2009). Torin1 inibe a fosforilação dos substratos mTORC1 e mTORC2. (Liu et al., 2010; Thoreen et al., 2009) e ainda provoca a parada do ciclo celular através de um mecanismo resistente à rapamicina que também é independente do mTORC2. O Torin1 também interrompe os fenótipos dependentes de mTORC1 com maior eficiência do que a rapamicina .

O medicamento everolimus também está sendo investigado para tratamento de outros tipos de câncer e é usado na prevenção de rejeição de órgãos em transplantes (Liu et al., 2017b).

Já existem alguns inibidores de mTOR e PI3K aprovados em ensaios clínicos para terapia de câncer (Benjamin, Colombi, Moroni, & Hall, 2011;

Ilagan & Manning, 2016; Liko & Hall, 2015). Apesar da aprovação de algumas drogas e do desenvolvimento clínico de outros agentes que visam inibir via PI3K/mTOR, pouco se sabe sobre quais pacientes são mais propensos a se beneficiar da segmentação dessa via.

A via PI3K/mTOR tem sido associada à fisiopatologia de várias doenças neoplásicas (Courtney, Corcoran, & Engelman, 2010; Engelman, 2009). A ativação desta via pode ser o resultado de mutações nos genes PI3K ou AKT, perda de fosfatase e homóloga de tensina (PTEN), ou ativação constitutiva de vias como as dos receptores de tirosina quinase (Courtney et al., 2010; Engelman, 2009). Dado o papel pro-oncogênico da via PI3K/mTOR, a via tornou-se alvo de interesse para o desenvolvimento de medicamentos. A inibição de mTOR com rapalogos, drogas análogas a rapamicina, mostrou eficácia clínica contra alguns tumores sólidos, incluindo everolimus para angiomiolipoma associado a esclerose tuberosa, carcinoma metastático de células renais, câncer de mama ou carcinomas neuroendócrinos pancreáticos e temsirolimus para carcinoma de células renais (Bissler et al., 2013; Hudes et al., 2007). Muitos outros agentes em desenvolvimento clínico são projetados para inibir a via PI3K/AKT/mTOR em diferentes níveis e incluem inibidores específicos para PI3K e inibidores abrangentes a PI3K/mTOR. Estes dados sugerem um papel importante da via PI3K/mTOR no câncer, podendo se expandir para o CEO, alguns trabalhos já mostram a relação do mTOR com o CEO, porém existem muitos mecanismos a serem esclarecidos. No entanto, os sítios de ação alvo e efeito da inibição de mTOR sob o as células endoteliais *in vitro*, ainda não foram elucidados. E para recapitular algumas características do

2. Objetivos

Objetivos

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o impacto do bloqueio da via PI3K e mTOR na sobrevivência celular das linhagens de carcinoma epidermoide oral HN12, HN26, HN30 e SCC26, na adesão e na morfologia de células endoteliais, relacionando-o com o processo angiogênico.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o impacto do bloqueio da via PI3K e mTOR na sobrevivência celular e na expressão das proteínas pS6 e pAKT que são *downstream* da via.
- Investigar o papel de mediadores liberados por células tumorais após o bloqueio de mTOR na morfologia das células endoteliais.
- Avaliar os mediadores liberados por células tumorais após o bloqueio de PI3K/mTOR e sua ação na adesão de células endoteliais.

3. Material e Métodos

3.1. Cultivo e expansão das linhagens celulares

As linhagens HN-12 (carcinoma epidermoide de língua, derivado de linfonodo metastático), HN 26 (carcinoma epidermoide de origem da cavidade oral), HN30 (carcinoma epidermoide de origem da faringe), SCC-25 (carcinoma epidermoide de origem da língua) e HUVEC (células endoteliais da veia umbilical humana) foram mantidas em estufa a 5% de CO₂, a 37°C, conforme instruções da bula. Em seguida as células foram observadas em microscópio invertido para avaliação da adesão celular. Uma vez confirmada a correta adesão das células, estas foram então removidas das garrafas de cultura através da dissociação enzimática. Para este procedimento utilizamos 4mL de Tripsina 0,25% para uma superfície de 75cm². As células foram observadas em microscópio invertido e, uma vez confirmado que as células haviam se soltado da garrafa, a tripsina foi inativada com 8 mL de meio de cultura contendo soro fetal bovino (SFB) e o conteúdo da garrafa foi transferido para um tubo cônico e levado à centrifuga por 3 minutos, 300 g, 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em meio de cultura suplementado. A solução de células foi transferida para uma garrafa específica para meio de cultura, com superfície de 75cm², e mantida em estufa a 5% de CO₂, a 37°C. As células foram observadas diariamente e, quando a confluência chegava a 80-90% da superfície da garrafa, as células eram então tripsinizadas e replaqueadas em novas garrafas.

A suplementação do meio foi realizada da seguinte maneira: 500 mL meio de cultura DMEM contendo phenolred, 10% de soro fetal bovino, 5mL de antibiótico (penicilina e estreptomicina) 500 µL de antifúngico (fungizona) e 20µl de hidrocortizona.

3.2. Inibição Farmacológica

3.2.1. Inibição farmacológica da PI3K

A inibição farmacológica de PI3K foi feita através do LY294002 (Calbiochem, 440202), o qual foi reconstituído em DMSO e armazenado -20°C até o dia de uso.

3.2.2. Inibição farmacológica da mTOR

A inibição farmacológica do mTOR foi realizado com três diferentes drogas: rapamicina (Tocris, 1292), um inibidor específico de mTOR o qual se complexa ao FKBL-12 e liga inibindo a atividade de mTOR; everolimus (Tocris, 6188), inibidor de mTOR, inibe a proliferação tumoral *in vitro* e *in vivo* porém não afeta a permeabilidade vascular; e torin 1 (Selleckchem, S2827), inibe a fosforilação de mTORC1 e mTORC2. Todos foram reconstituídos em DMSO e armazenados -20°C até o dia de uso quando diluído em meio de cultura específico, sendo este procedimento de diluição repedido a cada experimento.

Em todos os controles foram adicionado DMSO, da forma que o resultado que obtivemos foi realmente das drogas e não um efeito secundário ao diluente da droga (DMSO).

3.2.3. Tabela dos inibidores

Inibidor	Veiculo	Concentração
Ly294002	DMSO	20 uM
Rapamicina	DMSO	50nM
Everolimos	DMSO	50nM
Torin1	DMSO	100nM

Para chegarmos a esta concentração foram feito testes utilizando a metodologia de MTT.

3.3. Meio condicionado

O meio condicionado foi preparado na presença ou não de droga da seguinte forma: células em confluência de 80 a 100% tiveram o meio contendo SFB retirado, sendo a placa lavada com PBS à temperatura ambiente. A seguir meio de cultura livre de SFB foi adicionado e o mesmo coletado após 3 dias (72 horas) e centrifugado à 300g por 3 minutos. O sobrenadante foi recuperado e utilizado posteriormente para os ensaios necessários.

3.4. Ensaio de MTT

O ensaio baseia-se na redução do sal de tetrazólio de coloração amarela (3-(4,5 – dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) (MTT) em um composto de coloração roxa (formazan). Assim, o MTT quando incubado com células vivas tem seu substrato metabolizado pela ação de enzimas mitocondriais, reduzindo a coloração amarela inicial a um composto roxo que pode ser quantificado e reflete o estado funcional da cadeia respiratória. Brevemente: às células foram tratadas com as drogas e incubadas por 24

horas em câmara de CO₂ juntamente com as células controle. Em seguida foi adicionado 20 µl da solução contendo o MTT e incubado por 4 horas. O formazan resultante foi então dissolvido isopropanol ácido (13 ml de álcool isopropílico + 43 µl de HCL) e realizada a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570nm.

3.5. Imunofluorescência

Inicialmente realizamos a padronização da diluição dos anticorpos, do tempo e da temperatura de incubação. Utilizamos o protocolo de dupla marcação simultânea proposto pela empresa Abcam. Brevemente: as amostras foram cultivadas em garrafas de 75cm², transferidas placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro, as células foram tratadas ou não com as drogas e incubadas por 2h. Após 2 esse período as células foram fixadas em paraformaldeído 4% por 20 minutos, lavadas em PBS 3 vezes de 5 minutos cada, permeabilizadas por 15 minutos em Triton 1x e novamente lavadas 3 vezes de 5 minutos cada em PBS. Em seguida foi feito um bloqueio inespecífico com BSA 1% por 30 minutos. As amostras foram incubadas *overnight* a 4°C em uma mistura contendo os dois anticorpos primários (mouse anti-human e rabbit anti-human) diluídos em BSA 1%, lavadas 3 vezes de 5 minutos cada em PBS e incubadas por uma hora, temperatura ambiente, em uma mistura contendo os dois anticorpos secundários (alexa fluor 594 goat anti-mouse e alexa fluor 488 goat anti-rabbit, Thermo Fisher Scientific) diluídos em BSA 1%. As amostras foram lavadas em PBS 3 vezes de 5 minutos cada e a lâmina foi montada com Prolong + DAPI.

3.6. Análises da expressão proteica por *Western Blotting*

3.6.1. Preparação das Amostras :

3.6.2. Extração das Proteínas.

As células foram cultivadas em placas de 6 poços e submetidas ao tratamento farmacológico. Após 48 horas o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas 3 vezes com PBS estéril, as células foram lisadas em tampão de lise constituído de RIPA Buffer® (sigma Aldrich) e inibidores de protease. O lisado foi centrifugado a 13000 g durante 15 minutos a 4 °C. Uma alíquota do sobrenadante foi separado para dosagem de proteínas pelo método colorimétrico *Coomassie* (Bradford) *Protein Assay Kit* (Pierce, Rockford, IL, USA).

3.6.3. Eletroforese e ImunoBlotting

Amostras foram desnaturadas a 95 °C durante 5 minutos. Em seguida, as amostras foram aplicadas (10 µg por grupo) em gel de poliacrilamida (1,5 mm de espessura) na presença de SDS (SDS-PAGE) para separação por eletroforese, utilizando-se o sistema *Mini-Protean II Eletrophoresis Cell* (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA). Inicialmente, pelo período de 30 minutos a corrida foi realizada sob voltagem de 80V e após esse período a voltagem foi alterada para 100V. Para esse processo foi utilizado o tampão Tris-HCl 25 mM, pH 8,3, glicina 192 mM e SDS 0,1%. As proteínas separadas por SDS-PAGE foram transferidas para membranas de nitrocelulose 0,2 µm (*Bio Rad-Transfer Pack*), utilizando-se o sistema de transferência Trans-Blot turbo-Transfer System. Após a transferência as membranas foram coradas com Ponceau 0,5% em ácido tricloroacético 3% para certificação de que houve transferência

das proteínas. Em seguida, as membranas foram lavadas em água deionizada e o bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos foi realizado pela incubação das membranas por 2 horas à temperatura ambiente em solução tampão salina tris e *Tween* 20 (TBS-T) contendo 5% de leite desnatado (molico) e 0,1% sob agitação contínua. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas três vezes com TBS-T por cinco minutos. Em seguida foram incubados *overnight* em solução TBS-T contendo 5% de leite, onde foram adicionados os anticorpos de interesse. Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos com TBS-T e em seguida incubadas com anticorpo conjugado à peroxidase, por uma hora, a temperatura ambiente. Após esta incubação, as membranas foram novamente lavadas três vezes com TBS-T por cinco minutos. Para a revelação as membranas foram incubadas com uma mistura de reagentes do kit de quimioluminescência (*ECL Western Blotting Systems, GE Healthcare*) como descrito no manual de instruções. As membranas foram reveladas no aparelho (*Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+ Bio Rad*).

Após a revelação, as membranas foram recuperadas pela incubação das mesmas por 30 minutos à 50 °C em tampão Tris-HCl 62,5 mM pH 6,7 contendo 2% de SDS e mercaptoetanol 100 mM. O procedimento de blot foi repetido, agora utilizando anticorpo GAPDH (1:20000).

3.7. Anticorpos utilizados

Anticorpo Ant-	Fabricante	Diluição WB	Diluição IF
AKT total	Cell <u>S</u> ignal	1:1000	
pAKT s473	Cell <u>S</u> ignal	1:1000	
GAPDH	Abcam	1:20000	
pS6	Cell <u>S</u> ignal	1:1000	
PARP	Cell <u>S</u> ignal	1:1000	-
Paxilina	BD		1:200
Secundário <i>Horseradishperoxidase- conjugated</i>	Cell <u>S</u> ignal	1:10000	-
alexa fluor 594 goat anti- mouse	Thermo Fisher Scientific	-	1:300
alexa fluor 488 goat anti- rabbit	Thermo Fisher Scientific	-	1:300

3.8. Ensaio de Migração (*wound-healing*)

Este ensaio avalia a capacidade da célula de migrar e refazer a “área lesada” por uma pipeta. Após as células serem plaqueadas (1×10^5 por poço) em placa de 48 poços, aguardou-se a chegada da confluência, e em uma área demarcada foi realizada uma lesão com uma ponteira de pipeta de 200µM para retirada das células, com o intuito de se verificar o fenômeno de migração. Esta área foi fotografada imediatamente após a lesão e depois de 20 horas, ou

realizado vídeos também após 20 horas, para a análise da migração. A análise da migração foi realizada utilizando o software Image J.

3.9. Ensaio clonogênico

Foram cultivadas 5×10^4 células em placas de 12 poços . Após 24h, as células já aderidas, foram tratadas com inibidores de mTOR (rapamicina, everolimus e torin1) nas concentrações de 50nM, 50nM e 100nM respectivamente. Após três dias o meio de cultura foi descartado, as placas lavadas com tampão salina fosfato (PBS) e as colônias formadas foram fixadas com solução de paraformaldeído (4%) e coradas com cristal violeta (0,5%) diluídos em metanol. As placas foram fotografadas para comparação do crescimento das colônias nos diferentes tratamentos em relação ao controle não tratado e após fotografados as colônias foram devolvidas em ácido acético (3%) para quantificação. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.10. Análise da adesão proliferação e viabilidade celular - xCELLigence

O xCELLigence System RTCA DP permite uma monitoração dinâmica e livre da proliferação e viabilidade celular em tempo real. Esse equipamento é capaz de quantificar a proliferação e viabilidade de células aderidas em tempo real utilizando um sistema eletrônico de leitura, denominado, impedância. As células foram plaqueadas em placas de 16 poços que contêm sensores microeletrônicos. A interação das células com esses biosensores eletrônicos geram uma resposta de impedância que não apenas indica o status de

viabilidade celular como também correlaciona com o número de células no poço.

A medição da impedância não é um processo invasivo, fazendo com que as células permaneçam em seu mais normal estado fisiológico durante o ensaio de proliferação e citotoxicidade. Resumidamente, esse software permite a avaliação da proliferação, viabilidade, morte e mudanças morfológicas nas células.

3.10.1. Procedimento experimental

As células HUVEC, HN12, HN26, HN30 e SCC25 foram plaqueadas nas E-plates de 16 ou 96 poços em concentrações que variaram de 5×10^3 a 8×10^4 células/poço em 200 μ L de meio de cultura. A aderência, a disposição e proliferação das células foi monitorada a cada 15 segundos utilizando o RTCA DP system.

3.11. Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) de 3-6 amostras por grupo. A análise dos resultados foi feita pelo teste de análise de variância (ANOVA ONE-WAY) seguido de Teste Dunnett's com o auxílio do programa *GraphPad Prism* (*GraphPad Software 5*). O nível de significância foi de $P < 0.05$.

4. Resultados

Resultados

4.1.A via da PI3K/mTOR está envolvida na proliferação de células de carcinoma epidermoide oral

A fim de avaliar o efeito do bloqueio da via PI3K/mTOR para a viabilidade celular (ensaio de MTT), utilizamos as linhagens de carcinoma epidermoide oral, HN12, HN26, HN30 e SCC25. Para determinar a especificidade dos tratamentos para células de carcinoma epidermoide, utilizamos células HUVEC como controle não canceroso.

Conforme a figura 1A (Fig. 1A), nenhum dos inibidores foi capaz de alterar proliferação das células HUVEC.

Porém, a maioria das linhagens de CEO foram sensíveis a inibição da via PI3K/mTOR. A inibição da via da PI3K com Ly294002 foi capaz de inibir as linhagens de CEO HN26, HN30 e SCC 25 (Fig. 1 C, D e E). Enquanto os inibidores de mTOR foram todos efetivos na linhagem de HN30 (Fig. 1 D, Tabela 1), somente o inibidor torin1 foi efetivo nas linhagens HN26 (Fig. 1C, Tabela 1) e SCC25 (Fig. 1E, Tabela 1). Nenhum dos tratamentos foi efetivo na linhagem HN12 (Fig. 1B). Todos os resultados são sumarizados na Tabela 1.

Figura 1 A. Efeito do bloqueio da via PI3K/mTOR na sobrevivência de células endoteliais, HUVEC. ($2,5 \times 10^3$ células/poço). As células foram tratadas com LY 294002, rapamicina, everolimus ou torin nas concentrações indicadas e a viabilidade celular foi avaliada após 24 horas por MTT. Dados expressos pela média $\pm$ E.P.M (n=3).

Figura 1 B. Efeito do bloqueio da via PI3K/mTOR na sobrevivência de células de linfonodo metastáticos provenientes de carcinoma epidermoide oral de língua, linhagem HN12. ($2,5 \times 10^3$ células/poço). As células foram tratadas com LY 294002, rapamicina, everolimus ou torin nas concentrações indicadas e a viabilidade celular foi avaliada após 24 horas por MTT. Dados expressos pela média $\pm$ E.P.M ($n=3$).

Figura 1 C. Efeito do bloqueio da via PI3K/mTOR na sobrevivência de células epidermóide de cavidade oral, linhagem HN26 ($2,5 \times 10^3$ células/poço). As células foram tratadas com LY 294002, rapamicina, everolimus ou torin1. As células foram tratadas com LY 294002, rapamicina, everolimus ou torin nas concentrações indicadas e a viabilidade celular foi avaliada após 24 horas por MTT. Dados expressos pela média $\pm$ E.P.M, * $p < 0,05$ vs controle ($n=3$).

Figura 1 D. Efeito do bloqueio da via PI3K/mTOR na sobrevivência de células de carcinoma epidermoide de faringe, linhagem HN30 ($2,5 \times 10^3$ células/poço). As células foram tratadas com LY 294002, rapamicina, everolimus ou torin nas concentrações indicadas e a viabilidade celular foi avaliada após 24 horas por MTT. Dados expressos pela média $\pm$ E.P.M, * $p < 0,05$ vs controle ($n=3$).

SCC25

Figura 1 E. Efeito do bloqueio da via PI3K/mTOR na sobrevivência de células de carcinoma epidermoide de língua, linhagem SCC25. ($2,5 \times 10^3$ células/poço). As células foram tratadas com LY 294002, rapamicina, everolimus ou torin nas concentrações indicadas e a viabilidade celular foi avaliada após 24 horas por MTT. Dados expressos pela média $\pm$ E.P.M, * $p < 0,05$ vs controle ($n=3$).

Tabela 1. Viabilidade celular, avaliado por MTT de diferentes tipos celulares em presença de inibidores. *P<0,05 vs Controle.

Inibidores Linhagens				
	Ly294002	Rapamicina	Everolimus	Torin 1
HUVEC	Não significativo	Não significativo	Não significativo	Não significativo
HN12	Não significativo	Não significativo	Não significativo	Não significativo
HN26	*	Não significativo	Não significativo	*
HN30	*	*	*	*
SCC25	*	Não significativo	Não significativo	*

4.2. Os inibidores de PI3K e mTOR não apresentam toxicidade celular

Visto que a inibição de PI3K/mTOR promoveu a diminuição da proliferação celular nas linhagens de CEO, fomos checar se as drogas apresentavam perfil tóxico para as células e também nas células HUVEC. Utilizando o ensaio xCELLigence, as células foram monitoradas em tempo real por 96 horas sob exposição contínua as drogas. Nos gráficos apresentados, o eixo “y” representa o número de células e o eixo “x” representa o tempo em horas. No caso de toxicidade se observa um declínio as linhas representativas no eixo “y”.

As células HUVEC permaneceram com perfil de crescimento similar entre os tratamentos e o controle (veículo), não havendo redução na quantidade de células após os tratamentos (Fig. 2A). As células das linhagens HN12 (Fig. 2B) e SCC25 (Fig. 2E) apresentaram um crescimento contínuo, mesmo após os tratamentos (Fig. 2B e 2E), enquanto as células das linhagens HN26 e HN30 (figura 2C e 2D respectivamente) apresentaram parada de crescimento, mas sem toxicidade.

Fig 2A. Potencial de toxicidade das drogas inibidoras da via PI3K/ mTOR em células HUVEC. As células HUVEC (2×10^4 células/poço) foram tratadas com LY 294002,

rapamicina, everolimus ou torin1 e veículo (controle). A toxicidade foi mensurada pela quantidade de célula (eixo y) no decorrer do tempo (eixo X)

Figura 2 B. Potencial de toxicidade das drogas inibidoras da via PI3K/ mTOR em células HN12. As células HN12 (2×10^4 células/poço) foram tratadas com LY 294002, rapamicina, everolimus ou torin1 e veículo (controle). A toxicidade foi mensurada pela quantidade de células (eixo y) no decorrer do tempo (eixo X).

Figura 2 C. Potencial de toxicidade das drogas inibidoras da via PI3K/ mTOR em células HN26. As células HN26 (2×10^4 células/poço) foram tratadas com LY 294002, rapamicina, everolimus ou torin1 e veículo (controle). A toxicidade foi mensurada pela quantidade de células (eixo y) no decorrer do tempo (eixo X).

Figura 2 D. Potencial de toxicidade das drogas inibidoras da via PI3K/ mTOR em células HN30. As células HN30 (2×10^4 células/poço) foram tratadas com LY 294002, rapamicina, everolimus ou torin1 e veículo (controle). A toxicidade foi mensurada pela quantidade de células (eixo y) no decorrer do tempo (eixo X).

Figura 2 E. Potencial de toxicidade das drogas inibidoras da via PI3K/ mTOR em células SCC25. As células SCC25 (2×10^4 células/poço) foram tratadas com LY 294002, rapamicina, everolimus ou torin1 e veículo (controle). A toxicidade foi mensurada pela quantidade de células (eixo y) no decorrer do tempo (eixo X).

4.3. Os inibidores de mTOR são seletivos as de CEO

Com intuito de analisar a possível toxicidade das drogas nas células não cancerosas, o próximo passo foi analisar a expressão de PARP. A integridade de PARP é relacionada a manutenção da viabilidade celular, sendo sua clivagem um marcador de células submetidas à apoptose. Uma vez que as células de CEO HN12 e SCC25 apresentaram perfil de crescimento no ensaio xCELLigence, a expressão de PARP foi determinada apenas nas células HUVEC (controle não canceroso) e de CEC HN26 e HN30.

Como observado na figura 3A (Figura 3A), após os tratamentos não ocorreu mudança na expressão de PARP em células HUVEC.

Porém nas linhagens de CEO HN26 somente os inibidores everolimus e torin (Figura 3B) foram efetivos, enquanto em HN30 (Figura 3C) todos inibidores de mTOR reduziram a expressão de PARP.

Figura 3 A. Análise por Western blot da expressão de PARP em células HUVEC. Células HUVECs (1×10^6 células/poço) foram tratadas com rapamicina, everolimus e torin, por 12 horas e veículo (controle).

Figura 3 B. Análise por Western blot da expressão de PARP em células HN26. Células HN26 (1×10^6 células/poço) foram tratadas com rapamicina, everolimus e torin, por 12 horas e veículo (controle).

Figura 3 C: Análise por Western blot da expressão de PARP em células HN30. Células HN26 (1×10^6 células/poço) foram tratadas com rapamicina, everolimus e torin, por 12 horas e veículo (controle).

4.4.A inibição de mTOR reduz a fosforilação de S6 e AKT

A ativação de S6 ocorre via fosforilação em células de mamíferos, e é catalisada pela proteína quinase RPS6KB1, também reconhecida como p70 S6. Sua ativação resulta em ativação do ciclo celular e proliferação.

Observamos então que nas células HN26 os inibidores LY294002, rapamicina, everolimus e torin, reduziram a fosforilação de S6, enquanto apenas o inibidor de mTOR, torin reduziu a fosforilação de AKT (Figura 4A). O mesmo perfil de resposta foi encontrado nas células HN30 (Figura 4B).

Figura 4 A. Influência da inibição de PI3K/mTOR na fosforilação de proteínas AKT e S6. Células HN26 foram plaqueadas (1×10^6 células/poço) e expostas aos inibidores por 2 horas.

Figura 4 B. Influência da inibição de PI3K/mTOR na fosforilação de proteínas AKT e S6. Células HN26 foram plaqueadas (1×10^6 células/poço) e expostas aos inibidores por 2 horas.

4.5. mTOR influencia a capacidade das CEO em formar clones

A capacidade das células de CEO formarem clones se mostra importante para a progressão da doença. Nesse sentido fomos avaliar a capacidade de formação de clones das células HN26 e HN30, e o efeito dos inibidores de mTOR sobre essa característica.

Observamos que todos os inibidores de mTOR foram efetivos em reduzir a produção de clones em ambas linhagens de células HN26 e HN30 comparado ao controle (Fig. 5).

Figura 5. Participação da via mTOR na produção de clones em células HN26 e HN30. Células HN26 e HN30 (5×10^4 células/poço), foram ou não tratadas com os inibidores rapamicina, everolimus ou torin 1 e as placas foram verificadas diariamente. A produção de clones foi quantificada após o controle produzir clones que mantivessem o poço em confluência, 4 dias. Dados expressos pela média $\pm$ E.P.M, * $p < 0,05$ vs controle ($n=3$). I

4.6.A inibição do mTOR em células de CEO libera fatores que favorecem a capacidade de adesão celular de HUVECs

Nosso próximo passo foi analisar a adesão das células endoteliais HUVEC na presença de meio condicionado (MC) a partir de células CEC tratadas ou não com os inibidores de mTOR.

Observamos que HUVECs cultivadas com MC providas de HUVECs (controle não canceroso), submetidas ao tratamento, mantiveram o mesmo padrão de adesão celular que o controle sendo o pico de adesão observado em 2 horas (Figura 6 A).

No entanto, HUVECs cultivadas com MC coletados a partir de células HN26 expostas aos inibidores de mTOR, apresentaram aumento da taxa de adesão quando comparadas ao MC controle (Figura 6B). HUVECs cultivadas em MC de células HN30 tiveram aumento de adesão apenas no grupo exposto ao inibidor everolimus (Fig. 6C) Para ambas condições os picos de adesão ocorreram em 2 horas de cultivo.

Figura 6 A. Efeito do MC de células expostas a inibidores de mTOR na adesão celular de HUVECS. Células HUVEC (1×10^4 células/poço) foram expostas ao MC proveniente de outras células HUVECs. Previamente expostas ou não aos inibidores de mTOR rapamicina, everolimus e torin 1. Gráfico representa número de células aderidas (eixo y), pelo tempo em horas (eixo x).

Figura 6 B. Efeito do MC de células expostas a inibidores de mTOR na adesão celular de HUVECS. Células HUVEC (1×10^4 células/poço) foram expostas ao MC proveniente de células HN26 previamente expostas ou não aos inibidores de mTOR rapamicina, everolimus e torin1. Gráfico representa número de células aderidas (eixo y), pelo tempo em horas (eixo x).

Figura 6 C. Efeito do MC de células expostas a inibidores de mTOR na adesão celular de HUVECS. Células HUVEC (1×10^4 células/poço) foram expostas ao MC proveniente de células HN30 previamente expostas ou não aos inibidores de mTOR rapamicina, everolimus e torin1. Gráfico representa número de células aderidas (eixo y), pelo tempo em horas (eixo x).

4.7.A inibição de mTOR aumenta a capacidade de células do CEO em liberar substâncias que interferem na mudança de morfologia das células HUVECs

Para análise morfológica das células endoteliais HUVECs, as mesmas foram cultivadas com MC proveniente de células HN26 e HN30 submetidas ao tratamento com inibidores de mTOR. Como observamos um pico de adesão em 2 horas no ensaio xCELLigence, realizamos também um *time course* de 15, 30 e 60 minutos para determinar se haveria distinção morfológica previamente a 2 horas. Conforme as figuras 7A (Fig. 7A), as morfologias das células HUVECs não apresentaram diferenças importantes quando submetidas ao tratamento com MC de células HN26 expostas aos inibidores de mTOR.

A seguir realizamos o mesmo experimento expondo as células HUVECs na presença de MC proveniente de células HN26 ou HN30. Inicialmente testamos o efeito dos inibidores de mTOR diretamente nas células HUVECs (Fig. 7B), e após 2 horas não encontramos diferenças importantes na morfologia dessas células. No entanto, ao adicionarmos MC proveniente de

células HN26 e HN30 submetidas ao tratamento com inibidores de mTOR às células HUVECs, observamos importantes mudanças em sua morfologia (Fig. 7C).

Figura 7 A. Efeito temporal de MC proveniente de células HN26 (6×10^4 células/poço) expostas aos inibidores de mTOR na morfologia de células HUVECs. Células HUVECs foram plaqueadas e expostas ao MC e a morfologia celular checada após 15, 30 e 60 minutos de cultivo. Azul=coloração do núcleo/Vermelho=coloração actina.

Figura 7 B. Efeito dos inibidores de mTOR na morfologia de células HUVECs. Células HUVECs (6×10^4 células/poço) foram expostas aos inibidores de mTOR e a morfologia celular avaliada após 2 h após. Azul=coloração do núcleo/Vermelho=coloração actina.

Figura 7 C. Efeito de MC proveniente de células HN26 (6×10^4 células/poço) e HN30 expostas aos inibidores de mTOR na morfologia de células HUVECs. Células HUVECs foram plaqueadas e expostas aos diferentes MC e a morfologia celular avaliada após 2 horas. Azul=coloração do núcleo/Vermelho=coloração actina.

4.8.A inibição de mTOR reduz a capacidade de células CEO em liberar substâncias que interferem na adesão focal das células HUVECs

Para verificar o se o MC provenientes de células HN26 e HN30 expostas aos inibidores de mTOR poderia alterar as características de adesão das linhagens HUVECs, realizamos microscopia confocal para proteína paxilina. Observamos então que células HUVECs cultivadas por 2 horas com MC proveniente de células HN26 e HN30 expostas aos inibidores de mTOR apresentaram maiores sítios de aderência (Fig. 8). Pontos de adesão mostrados na seta amarela.

Figura 8. Efeito de MC proveniente de células HN26 (6×10^4 células/poço) e HN30 expostas aos inibidores de mTOR na aderência células HUVECs. Células HUVECs foram plaqueadas e expostas aos diferentes MC por 2 h e os pontos de aderência visualizados por microscopia confocal. Azul=coloração do núcleo/verde=coloração paxilina. Setas amarelas representam os pontos de adesão.

4.9.A inibição de mTOR por everolimus e torin 1 aumenta a capacidade de células CEO em liberar substâncias que interferem na migração das células HUVECs

O tratamento de células HUVEC com MC contendo everolimus ou torin 1 levou ao aumento da migração celular (figura 9), o que relacionaria um possível aumento a angiogênese, visto que utilizamos células endoteliais.

Para verificar o se o MC provenientes de células HN26 e HN30 expostas aos inibidores de mTOR poderia alterar migração das linhagens HUVECs, realizamos ensaio de migração por *wound healing*. Observamos então que células HUVECs cultivadas com MC proveniente de células HN26 e HN30 expostas aos inibidores de mTOR apresentaram maior migração (Fig. 9A e 9B).

Figura 9 A. A inibição de mTOR por everolimos e torin 1, em células de carcinoma epidermoide da cavidade oral, HN26, produz mediadores os quais irão elevar o poder migratório das células endoteliais, HUVEC. O ensaio de *scratch* foi realizado com HUVEC cultivada em MC provenientes de células tumorais HN26.

Figura 9 B. A inibição de mTOR por everolimos e torin 1, em células de carcinoma epidermoide da cavidade faringe, HN30, produz mediadores os quais irão elevar o poder migratório das células endoteliais, HUVEC. O ensaio de *scratch* foi realizado com HUVEC cultivada em MC provenientes de células tumorais HN30.

4.10. O aumento da migração das HUVECS cultivadas em MC provenientes de HN26 e HN30 contendo inibidor de mTOR é via VEGF.

Com objetivo de esclarecer por qual mecanismo o a inibição do mTOR aumenta a migração celular, investigamos a presença de VEGF nos MC por ELISA, e podemos verificar que os níveis de VEGF estão elevados nos MC contendo everolimos e torin1 em ambas linhagens tumorais, HN26 e HN30 (Fig 10A e Fig 10B).

CM HN 26

Figura 10 A. A inibição de mTOR por everolimos e torin 1 , eleva a expressão de VEGF pelas células de carcinoma epidermoide da cavidade oral, HN26. O ensaio de Elisa foi realizado com MC provenientes de células tumorais.

CM HN 30

Figura 10 B: A inibição de mTOR por everolimos e torin 1 , eleva a expressão de VEGF pelas células de carcinoma epidermoide de faringe oral, HN30. O ensaio de Elisa foi realizado com MC provenientes de células tumorais.

5. Discussão

Discussão

O câncer é um problema de saúde pública com crescimento exponencial, sendo o carcinoma epidermoide oral (CEO) o sétimo tipo de câncer mais comum no Brasil (INCA, 2017). Dentre os carcinomas orais a maioria é classificada como CEO. Dados da literatura demonstram a importância da PI3K e do mTOR na sobrevivência e proliferação celular (Hay & Sonenberg, 2004). No entanto, o quanto e de que maneira a PI3K e o mTOR estão envolvidos no ambiente tumoral, e o efeito em células adjacentes ao tumor, ainda permanece por ser elucidado.

No presente trabalho observamos que a via de PI3K/mTOR parece possuir grande impacto no ambiente tumoral, estando envolvida em aspectos de proliferação, adesão, formação de clones, sendo esses efeitos específicos para células de CEO. Ainda, observamos que sob os tratamentos com inibidores da via de mTOR, células CEO liberam fatores que podem agir em células endoteliais alterando suas características normais, favorecendo a uma maior adesão e estímulo à angiogênese via VEGF.

As vias de sinalização que regulam a atividade do mTOR são frequentemente ativadas nos cânceres humanos. Por exemplo, as mutações de perda de função do supressor de tumores PTEN em cânceres humanos ocorrem com uma frequência quase semelhante à do supressor de tumor p53 (Cantley & Neel, 1999; Simpson & Parsons, 2001). Além disso, os genes que codificam a subunidade catalítica de PI3K e AKT são amplificados em subconjuntos de câncer humano (Sawyers, 2003; Vivanco & Sawyers, 2002). Ras, que liga e ativa a subunidade catalítica de PI3K, é ativado em

aproximadamente 30% de tumores epiteliais (Downward, 2003). Essas alterações nas vias de sinalização que regulam a atividade mTOR, podem também afetar outros efetores *downstream*.

Nossos dados demonstram que em células CEO HN30, a administração de inibidor de PI3K, Ly 294002 inibe a viabilidade celular, assim como os inibidores de mTOR, rapamicina, everolimus e torin 1. Nossos dados vão de encontro aos dados da literatura, pois previamente foi descrito que o derivado de rapamicina CCI-779 inibe a hiperproliferação de células deficientes em PTEN (Neshat et al., 2001). Além disso, a administração de CCI-779 em camundongos deficientes de PTEN, que desenvolvem neoplasia múltipla, atenua o desenvolvimento do tumor (Podsypanina et al., 2001). A superexpressão de AKT na próstata do camundongo induz a neoplasia intraepitelial da próstata (PIN), que é revertida após a administração do derivado de rapamicina RAD001 (Majumder et al., 2004). No presente trabalho todos os inibidores Ly294002, rapamicina, everolimus e torin 1 foram testados em células endoteliais HUVEC e não apresentaram diminuição da viabilidade celular das mesmas. Isso sugere que as drogas tem uma seletividade para células de câncer.

Visto a importância de utilizarmos uma dose segura das drogas inibidoras, e sabendo que as drogas utilizadas diminuem a viabilidade de algumas linhagens utilizadas, nós realizamos um monitoramento em tempo real das células tratadas. O recentemente desenvolvido, analisador de células em tempo real xCELLigence™ (RTCA) pode ser usado para o monitoramento em tempo real, e analisa viabilidade, toxicidade, morfologia e migração celular. O sistema RTCA usa placas de microtitulação de 16 poços com uma matriz de

biossensor de microeletrodos de ouro que mede a impedância quando as células aderem aos microeletrodos causando uma corrente alternada (Turker Sener, Albeniz, Dinc, & Albeniz, 2017). E ao realizarmos a análise de toxicidade, observamos que a administração dos inibidores na célula HUVEC não altera o progresso proliferativo das células, assim como nas linhagens HN12 e SCC12. Em relação à linhagem de célula endotelial, HUVEC, apenas foi confirmado a não toxicidade dos inibidores as células adjacentes, pois as células continuam a proliferar após a administração de inibidores assim como o controle. A linhagem de carcinoma de células escamosas de língua (SCC25), assim como a linhagem de linfonodo metastático derivada de carcinoma de células escamosas de língua (HN12), apresentam um pequeno decréscimo na proliferação celular após a administração dos inibidores, porém sua proliferação não cessou. Essas duas linhagens podem apresentar um mesmo perfil de resposta devido uma ser o tumor primário, SCC25, e a outra o metastático do mesmo local, HN12. Quanto à linhagem celular de carcinoma de células escamosas da cavidade oral (HN26) e a linhagem celular de carcinoma de célula escamosa da faringe (HN30), ambas apresentaram bloqueio na proliferação celular em relação ao controle, sem toxicidade. Juntos os dados acima demonstram a grande importância da investigação dos locais específicos em um mesmo tipo de câncer, pois pode haver respostas distintas frente a um fármaco ou a um tratamento direcionado.

PARP é uma polimerase de poli (ADP-ribose) nuclear de 116 kDa, está envolvida no reparo do DNA (Sato & Lindahl, 1992). A integridade de PARP ajuda as células a manterem sua viabilidade, sendo sua clivagem um marcador de células submetidas a apoptose (Oliver et al., 1998). Complementando os

dados acima, foi demonstrado que o mTOR possui grande importância para sobrevivência de células cancerígenas e que após sua inibição ocorre o processo de apoptose celular, sendo esse mecanismo específico para as células cancerígenas, confirmando mais uma vez o potencial seletivo dos inibidores, rapamicina, everolimus e torin 1.

A fosforilação de S6 em células de mamífero é catalisada pela proteína quinase RPS6KB1, também chamada p70 S6 (Magnuson, Ekim, & Fingar, 2012), que por sua vez é ativada por fosforilação sequencial pelo complexo mTOR1 e PDPK1 (Alessi, Kozlowski, Weng, Morrice, & Avruch, 1998; Isotani et al., 1999). A rapamicina, com baixas concentrações é capaz de inibir fortemente a fosforilação de S6KB1 (Thr389), a atividade da quinase e a fosforilação de S6 de forma altamente seletiva (Price, Grove, Calvo, Avruch, & Bierer, 1992). Nossos dados indicam o mesmo fenômeno, pois após a inibição do mTOR com rapamicina, everolimus ou torin 1 e também da PI3K com Ly294004, observamos uma diminuição na expressão da S6 fosforilada.

No presente trabalho também avaliamos a capacidade das linhagens HN26 e HN30 gerarem clones após a administração de inibidores de mTOR, rapamicina, everolimus, torin1. Esses dados nos ajudam esclarecer como as células se comportam frente a um tratamento com tempo longo. Observamos que após a administração de rapamicina, everolimus ou torin1, houve uma diminuição expressiva da formação de clones em relação ao controle. Os cânceres surgem da proliferação e disseminação descontroladas de clones de células geneticamente transformadas. Esses resultados sugerem eficácia das drogas frente às células de câncer em reduzir a produção de clones.

Após a verificação da ação dos inibidores diretamente nas células cancerígenas o próximo passo foi investigar de que forma a inibição do mTOR influenciaria o ambiente tumoral. Para isso, utilizamos meio condicionado a partir de células tumorais tratadas ou não com inibidores de mTOR, e a seguir esses meios foram utilizados para cultivo de células endoteliais HUVECs

A adesão celular é de extrema importância no processo da carcinogênese (Liu et al., 2017a). Isso pois as células cancerosas podem liberar mediadores os quais poderão estimular a adesão das células adjacentes, e ainda afetar o remodelamento do meio extra celular. Desse modo as células endoteliais podem responder com neovasculogênese. De modo oposto as nossas expectativas as células HUVECs responderam com grande aumento na adesão quando cultivada em MC proveniente de células HN26 que foram tratadas com inibidores de mTOR, rapamicina, everolimus e torin1.

A seguir investigamos se houve aumento na quantidade de células que aderiram após o cultivo com MC ou se houve aumento de adesão ou tamanho da celular. Ao checarmos a morfologia celular observamos grandes diferenças morfológicas, mas sem alterações expressivas no tamanho celular entres os grupos.

A adesão focal da célula também é um parâmetro importante frente ao ambiente tumoral (Liu et al., 2017a). Paxilina é uma proteína que localiza principalmente em locais de adesão focal na matriz extracelular e ela é fosforilada por outro componente de adesão focal, quinase de adesão focal (FAK). Observamos decréscimo de paxilina em locais de adesão focal principalmente em MC contendo rapamicina e torin1.

A terapia com drogas para inibir a neovascularização do tumor é utilizada clinicamente como um adjuvante em cânceres resistentes à quimioterapia, incluindo carcinoma de células renais, glioblastoma recorrente e câncer de intestino (Kapoor & Figlin, 2009). Em alguns tratamentos, os inibidores de mTOR são utilizados após a falha de inibidores de tirosina quinase pró-receptor angiogênicos do receptor e, em alguns casos, como terapia de primeira linha (Kapoor & Figlin, 2009). A inibição do mTOR diminui a produção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) pelo tumor (Guba et al., 2002; Hutson et al., 2014; Kundu & Nestor, 2012; Machiels & Schmitz, 2011).

Observamos que após o bloqueio com everolimus e torin 1, as células tumorais liberaram mais fatores envolvidos na migração de células endoteliais HUVECs, apresentando maior migração celular dessas últimas.

Uma vez que VEGF é importante na migração celular (Islam, Jones, Macluskey, & Ellis, 2014), o próximo passo foi checar a expressão de VEGF nos MC. Determinamos que havia um aumento da produção de VEGF após bloqueio de mTOR com everolimus e torin 1. A discrepância dos dados com dados da literatura pode ser explicada pelo fato de usarmos meio condicionado e estudarmos o meio tumoral e a célula endotelial envolvida na manutenção da nutrição tumoral e da formação de novos vasos, e não diretamente o tumor. Outro fato importante é a diferença no sítio tumoral, o qual pode influenciar a resposta.

Embora os tratamentos foquem em impedir a angiogênese e bloquear o aporte de substâncias necessárias à sustentabilidade de células tumorais,

nossos dados demonstram que mesmo o bloqueio da via de mTOR sendo eficaz em reduzir a viabilidade celular de células de câncer, essas, podem liberar efetores que favorecem a vascularização do tumor. Esse fato talvez possa ser interpretado como um dos possíveis mecanismos que criam dificuldade em eliminação de tumores mesmo quando utilizados em terapias direcionadas as células cancerígenas.

Conclusão

Conclusão

Com base nos resultados apresentados, pode-se sugerir que a ativação da via da PI3K/mTOR está envolvida na proliferação de células do carcinoma epidermoide oral e na expressão das proteínas pS6 e pAKT *downstream* da via do mTOR.

Nossos resultados demonstram a participação do mTOR no processo de manutenção da morfologia das células endoteliais. E demonstramos também que a ausência de mTOR propicia o aumento da adesão de HUVECs e colabora no processo angiogênico (Imagem 2)

Por fim, nossos resultados indicam que o bloqueio do mTOR pode ser um alvo interessante para o controle da proliferação das células tumorais. Por outro lado, as células submetidas ao tratamento com os inibidores de mTOR liberam fatores angiogênicos que favorecer a vascularização. Esse mecanismo pode ser uma das explicações à resistência ao tratamento do CEO por inibidores de mTOR.

Imagem 2: Esquematização da via PI3K/mTOR agindo na célula de CEO.

6. Referências Bibliográficas

Referencias Bibliográficas

- Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B., & Cohen, P. 1997. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. ***Curr Biol***, 7(4): 261-269.
- Alessi, D. R., Kozlowski, M. T., Weng, Q. P., Morrice, N., & Avruch, J. 1998. 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates the p70 S6 kinase in vivo and in vitro. ***Curr Biol***, 8(2): 69-81.
- Benjamin, D., Colombi, M., Moroni, C., & Hall, M. N. 2011. Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. ***Nat Rev Drug Discov***, 10(11): 868-880.
- Bissler, J. J., Kingswood, J. C., Radzikowska, E., Zonnenberg, B. A., Frost, M., Belousova, E., Sauter, M., Nonomura, N., Brakemeier, S., de Vries, P. J., Whittemore, V. H., Chen, D., Sahmoud, T., Shah, G., Lincy, J., Lebwohl, D., & Budde, K. 2013. Everolimus for angiomyolipoma associated with tuberous sclerosis complex or sporadic lymphangioleiomyomatosis (EXIST-2): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. ***Lancet***, 381(9869): 817-824.
- Cantley, L. C., & Neel, B. G. 1999. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. ***Proc Natl Acad Sci U S A***, 96(8): 4240-4245.
- Courtney, K. D., Corcoran, R. B., & Engelman, J. A. 2010. The PI3K pathway as drug target in human cancer. ***J Clin Oncol***, 28(6): 1075-1083.

- Dibble, C. C., & Cantley, L. C. 2015. Regulation of mTORC1 by PI3K signaling. ***Trends Cell Biol***, 25(9): 545-555.
- Downward, J. 2003. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. ***Nat Rev Cancer***, 3(1): 11-22.
- Dwyer, J., Hebda, J. K., Le Guelte, A., Galan-Moya, E. M., Smith, S. S., Azzi, S., Bidere, N., & Gavard, J. 2012. Glioblastoma cell-secreted interleukin-8 induces brain endothelial cell permeability via CXCR2. ***PLoS One***, 7(9): e45562.
- Efeyan, A., & Sabatini, D. M. 2010. mTOR and cancer: many loops in one pathway. ***Curr Opin Cell Biol***, 22(2): 169-176.
- Engelman, J. A. 2009. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. ***Nat Rev Cancer***, 9(8): 550-562.
- Feller, L., & Lemmer, J. 2012. New 'second primary' cancers. ***SADJ***, 67(4): 175-178.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., & Bray, F. 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. ***International Journal of Cancer***, 136(5): E359-E386.
- Ghantous, Y., Yaffi, V., & Abu-Elnaaj, I. 2015. [Oral cavity cancer: epidemiology and early diagnosis]. ***Refuat Hapeh Vehashinayim (1993)***, 32(3): 55-63, 71.
- Glazer, C. A., Chang, S. S., Ha, P. K., & Califano, J. A. 2009. Applying the molecular biology and epigenetics of head and neck cancer in everyday clinical practice. ***Oral oncology***, 45(4-5): 440-446.

- Guba, M., von Breitenbuch, P., Steinbauer, M., Koehl, G., Flegel, S., Hornung, M., Bruns, C. J., Zuelke, C., Farkas, S., Anthuber, M., Jauch, K. W., & Geissler, E. K. 2002. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. **Nat Med**, 8(2): 128-135.
- Hay, N., & Sonenberg, N. 2004. Upstream and downstream of mTOR. **Genes Dev**, 18(16): 1926-1945.
- Hudes, G., Carducci, M., Tomczak, P., Dutcher, J., Figlin, R., Kapoor, A., Staroslawska, E., Sosman, J., McDermott, D., Bodrogi, I., Kovacevic, Z., Lesovoy, V., Schmidt-Wolf, I. G., Barbarash, O., Gokmen, E., O'Toole, T., Lustgarten, S., Moore, L., Motzer, R. J., & Global, A. T. 2007. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. **N Engl J Med**, 356(22): 2271-2281.
- Hutson, T. E., Escudier, B., Esteban, E., Bjarnason, G. A., Lim, H. Y., Pittman, K. B., Senico, P., Niethammer, A., Lu, D. R., Hariharan, S., & Motzer, R. J. 2014. Randomized phase III trial of temsirolimus versus sorafenib as second-line therapy after sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. **J Clin Oncol**, 32(8): 760-767.
- Iglesias-Bartolome, R., Martin, D., & Gutkind, J. S. 2013. Exploiting the head and neck cancer oncogenome: widespread PI3K-mTOR pathway alterations and novel molecular targets. **Cancer Discov**, 3(7): 722-725.
- Ilagan, E., & Manning, B. D. 2016. Emerging role of mTOR in the response to cancer therapeutics. **Trends Cancer**, 2(5): 241-251.

- Islam, M. R., Jones, S. J., Macluskey, M., & Ellis, I. R. 2014. Is there a pAkt between VEGF and oral cancer cell migration? ***Cellular Signalling***, 26(6): 1294-1302.
- Isotani, S., Hara, K., Tokunaga, C., Inoue, H., Avruch, J., & Yonezawa, K. 1999. Immunopurified mammalian target of rapamycin phosphorylates and activates p70 S6 kinase alpha in vitro. ***J Biol Chem***, 274(48): 34493-34498.
- Kapoor, A., & Figlin, R. A. 2009. Targeted inhibition of mammalian target of rapamycin for the treatment of advanced renal cell carcinoma. ***Cancer***, 115(16): 3618-3630.
- Kundu, S. K., & Nestor, M. 2012. Targeted therapy in head and neck cancer. ***Tumour Biol***, 33(3): 707-721.
- Lane, H. A., Wood, J. M., McSheehy, P. M., Allegrini, P. R., Boulay, A., Brueggen, J., Littlewood-Evans, A., Maira, S. M., Martiny-Baron, G., Schnell, C. R., Sini, P., & O'Reilly, T. 2009. mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) has antiangiogenic/vascular properties distinct from a VEGFR tyrosine kinase inhibitor. ***Clin Cancer Res***, 15(5): 1612-1622.
- Leemans, C. R., Braakhuis, B. J., & Brakenhoff, R. H. 2011. The molecular biology of head and neck cancer. ***Nat Rev Cancer***, 11(1): 9-22.
- Liko, D., & Hall, M. N. 2015. mTOR in health and in sickness. ***J Mol Med (Berl)***, 93(10): 1061-1073.
- Liu, H., Wu, B., Ge, Y., Huang, J., Song, S., Wang, C., Yao, J., Liu, K., Li, Y., Li, Y., & Ma, X. 2017a. Phosphamide-containing diphenylpyrimidine analogues (PA-DPPYs) as potent focal adhesion kinase (FAK) inhibitors

with enhanced activity against pancreatic cancer cell lines. **Bioorg Med Chem.**

Liu, J., Li, H. Q., Zhou, F. X., Yu, J. W., Sun, L., & Han, Z. H. 2017b. Targeting the mTOR pathway in breast cancer. **Tumour Biol**, 39(6): 1010428317710825.

Liu, Q., Chang, J. W., Wang, J., Kang, S. A., Thoreen, C. C., Markhard, A., Hur, W., Zhang, J., Sim, T., Sabatini, D. M., & Gray, N. S. 2010. Discovery of 1-(4-(4-propionylpiperazin-1-yl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)-9-(quinolin-3-yl)benz o[h][1,6]naphthyridin-2(1H)-one as a highly potent, selective mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor for the treatment of cancer. **J Med Chem**, 53(19): 7146-7155.

Long, X., Lin, Y., Ortiz-Vega, S., Yonezawa, K., & Avruch, J. 2005. Rheb binds and regulates the mTOR kinase. **Curr Biol**, 15(8): 702-713.

Machiels, J. P., & Schmitz, S. 2011. New advances in targeted therapies for squamous cell carcinoma of the head and neck. **Anticancer Drugs**, 22(7): 626-633.

Magnuson, B., Ekim, B., & Fingar, D. C. 2012. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. **Biochem J**, 441(1): 1-21.

Majumder, P. K., Febbo, P. G., Bikoff, R., Berger, R., Xue, Q., McMahon, L. M., Manola, J., Brugarolas, J., McDonnell, T. J., Golub, T. R., Loda, M., Lane, H. A., & Sellers, W. R. 2004. mTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and HIF-1-dependent pathways. **Nat Med**, 10(6): 594-601.

- Mamane, Y., Petroulakis, E., LeBacquer, O., & Sonenberg, N. 2006. mTOR, translation initiation and cancer. ***Oncogene***, 25(48): 6416-6422.
- Menon, S., Dibble, C. C., Talbott, G., Hoxhaj, G., Valvezan, A. J., Takahashi, H., Cantley, L. C., & Manning, B. D. 2014. Spatial control of the TSC complex integrates insulin and nutrient regulation of mTORC1 at the lysosome. ***Cell***, 156(4): 771-785.
- Neshat, M. S., Mellinghoff, I. K., Tran, C., Stiles, B., Thomas, G., Petersen, R., Frost, P., Gibbons, J. J., Wu, H., & Sawyers, C. L. 2001. Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR. ***Proc Natl Acad Sci U S A***, 98(18): 10314-10319.
- Oliver, F. J., de la Rubia, G., Rolli, V., Ruiz-Ruiz, M. C., de Murcia, G., & Murcia, J. M. 1998. Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. ***J Biol Chem***, 273(50): 33533-33539.
- Paoli, P., Giannoni, E., & Chiarugi, P. 2013. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. ***Biochim Biophys Acta***, 1833(12): 3481-3498.
- Pearce, L. R., Komander, D., & Alessi, D. R. 2010. The nuts and bolts of AGC protein kinases. ***Nat Rev Mol Cell Biol***, 11(1): 9-22.
- Podsypanina, K., Lee, R. T., Politis, C., Hennessey, I., Crane, A., Puc, J., Neshat, M., Wang, H., Yang, L., Gibbons, J., Frost, P., Dreisbach, V., Blenis, J., Gaciong, Z., Fisher, P., Sawyers, C., Hedrick-Ellenson, L., & Parsons, R. 2001. An inhibitor of mTOR reduces neoplasia and normalizes p70/S6 kinase activity in Pten+/- mice. ***Proc Natl Acad Sci U S A***, 98(18): 10320-10325.

- Price, D. J., Grove, J. R., Calvo, V., Avruch, J., & Bierer, B. E. 1992. Rapamycin-induced inhibition of the 70-kilodalton S6 protein kinase. **Science**, 257(5072): 973-977.
- Satoh, M. S., & Lindahl, T. 1992. Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair. **Nature**, 356(6367): 356-358.
- Sawyers, C. L. 2003. Will mTOR inhibitors make it as cancer drugs? **Cancer Cell**, 4(5): 343-348.
- Semba, S., Itoh, N., Ito, M., Harada, M., & Yamakawa, M. 2002. The in vitro and in vivo effects of 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-chromone (LY294002), a specific inhibitor of phosphatidylinositol 3'-kinase, in human colon cancer cells. **Clin Cancer Res**, 8(6): 1957-1963.
- Simpson, L., & Parsons, R. 2001. PTEN: life as a tumor suppressor. **Exp Cell Res**, 264(1): 29-41.
- Syrjanen, S. 2005. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. **J Clin Virol**, 32 Suppl 1: S59-66.
- Thoreen, C. C., Kang, S. A., Chang, J. W., Liu, Q., Zhang, J., Gao, Y., Reichling, L. J., Sim, T., Sabatini, D. M., & Gray, N. S. 2009. An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. **J Biol Chem**, 284(12): 8023-8032.
- Turker Sener, L., Albeniz, G., Dinc, B., & Albeniz, I. 2017. iCELLigence real-time cell analysis system for examining the cytotoxicity of drugs to cancer cell lines. **Exp Ther Med**, 14(3): 1866-1870.
- Utermark, T., Rao, T., Cheng, H., Wang, Q., Lee, S. H., Wang, Z. C., Iglehart, J. D., Roberts, T. M., Muller, W. J., & Zhao, J. J. 2012. The p110alpha and p110beta isoforms of PI3K play divergent roles in mammary gland

- development and tumorigenesis. **Genes & development**, 26(14): 1573-1586.
- Vermorken, J. B., Mesia, R., Rivera, F., Remenar, E., Kawecki, A., Rottey, S., Erfan, J., Zabolotnyy, D., Kienzer, H. R., Cupissol, D., Peyrade, F., Benasso, M., Vynnychenko, I., De Raucourt, D., Bokemeyer, C., Schueler, A., Amellal, N., & Hitt, R. 2008. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. **N Engl J Med**, 359(11): 1116-1127.
- Vivanco, I., & Sawyers, C. L. 2002. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. **Nat Rev Cancer**, 2(7): 489-501.
- Wymann, M. P., & Pirola, L. 1998. Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. **Biochimica et biophysica acta**, 1436(1-2): 127-150.
- Young, D., Xiao, C. C., Murphy, B., Moore, M., Fakhry, C., & Day, T. A. 2015. Increase in head and neck cancer in younger patients due to human papillomavirus (HPV). **Oral Oncol**, 51(8): 727-730.

7. Anexo

Anexo A: Certificado de dispensa do Comitê de Ética para utilização de linhagem celular adquirida de banco de célula.

03-10-2015-14389 *Márcia*

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL

Ribeirão preto 22 de outubro de 2015

À Coordenadora do Comitê de Ética
Marcia Guimarães Villanova

Eu, Andressa Duarte aluna de doutorado do Departamento de Patologia e Medicina Legal, sob orientação do Prof. Dr. Alfredo Ribeiro-Silva solicito dispensa ao Comitê de Ética para o Projeto intitulado "A participação da via Fosfatidilinositol3-quinase (PI3K) no carcinoma epidermóide oral", o qual tem o objetivo de estudar a via da PI3K/AKT e sua relação com a apoptose de linhagem de células de carcinoma epidermóide, visando analisar qual gene possa estar mais envolvido nesse carcinoma, sugerindo assim um futuro possível alvo farmacológico para o tratamento e diagnóstico de carcinoma epidermóide. No projeto será utilizada apenas uma linhagem celular de carcinoma epidermóide oral (SCC25) adquirida comercialmente da empresa "Banco de Células do Rio de Janeiro".

Atenciosamente

Andressa Duarte

Andressa Duarte
Doutoranda do Departamento de Patologia e Medicina legal
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP

Não há necessidade de submissão ao CEP
26/10/2015
Marcia Villanova

Alfredo Ribeiro-Silva

Professor Doutor Alfredo Ribeiro-Silva
Orientador e Coordenador do Programa de Pós-graduação
Departamento de Patologia e Medicina legal
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP

lúcia e de acordo
3/11/15

Av. Bandeirantes, 3900 - RIBEIRÃO PRETO - SP - BRASIL - CEP 14049-900 - FONE (16) 3602-3075 - FAX (16) 635-1068 - e-mail: patologia@fmrp.usp.br

Alfredo Ribeiro-Silva

Prof. Dr. Alfredo Ribeiro-Silva
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Patologia

DR. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
do HCFMRP-USP e da FMRP-USP