



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

GABRIELL BONIFÁCIO BORGATO

**REDUÇÃO DE CÉLULAS TRONCO TUMORAIS INDEPENDENTE DO
STATUS DE PTEN EM LINHAGEM DE CARCINOMA
ESPINICELULAR DE LÍNGUA**

Piracicaba

2019

GABRIELL BONIFÁCIO BORGATO

**REDUÇÃO DE CÉLULAS TRONCO TUMORAIS INDEPENDENTE DO
STATUS DE PTEN EM LINHAGEM DE CARCINOMA
ESPINICELULAR DE LÍNGUA**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor Biologia Buco-Dental, na Área de Histologia e Embriologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Paula de Souza

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pelo aluno Gabriell Bonifácio Borgato e orientada pela Prof.^a Dr.^a Ana Paula de Souza.

Piracicaba

2019

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq; CAPES, 8881.132588/2016-1
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0798-2484>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

B644r Borgato, Gabriell Bonifácio, 1987-
Redução de células tronco tumorais independente do status de PTEN em linhagem de carcinoma espinocelular de língua / Gabriell Bonifácio Borgato. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Ana Paula de Souza.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Metilação de DNA. 2. Carcinoma de células escamosas oral. 3. Células-tronco neoplásicas. I. de Souza, Ana Paula, 1975-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Cancer stem cells decreases in a independent manner from PTEN status in oral carcinoma cell lines

Palavras-chave em inglês:

DNA methylation
Oral squamous cell carcinoma
Neoplastic stem cells

Área de concentração: Histologia e Embriologia

Titulação: Doutor em Biologia Buco-Dental

Banca examinadora:

Ana Paula de Souza [Orientador]
Rogério Moraes de Castilho
Sergio Roberto Peres Line
Aline Cristiane Planello
Nilva de Karla Cervigne Furlan

Data de defesa: 26-02-2019

Programa de Pós-Graduação: Biologia Buco-Dental

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/2767819021216749>
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0798-2484>



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 26 de fevereiro de 2019, considerou o candidato GABRIEL BONIFÁCIO BORGATO aprovado.

PROF^a. DR^a. ANA PAULA DE SOUZA

PROF. DR. ROGÉRIO MORAES DE CASTILHO

PROF^a. DR^a. NILVA DE KARLA CERVIGNE FURLAN

PROF. DR. SERGIO ROBERTO PERES LINE

PROF^a. DR^a. ALINE CRISTIANE PLANELLO

A Ata da defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

DEDICATÓRIA

Ao meus pais, por entenderem a não-linearidade das minhas escolhas e estarem sempre ao meu lado independente de tudo.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia-Buco Dental.

À Coordenação de Pós-Graduação da FOP/UNICAMP.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo 141012/2015-3.

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

À Prof.^a Dr.^a Ana Paula de Souza, pela orientação durante este doutorado. Não é fácil fazer um dentista virar um cientista, mas graças à sua paciência e confiança no trabalho isto foi possível. Agradeço também por sempre respeitar minha autonomia, fundamento que considero importantíssimo para o desenvolvimento acadêmico.

Ao Prof. Dr. Sérgio Line, por sempre compartilhar seu conhecimento (que não é pouco) e nos inspirar diariamente com suas poucas, porém sempre precisas palavras.

Ao Prof. Dr. Marcelo Marques, não somente pelas contribuições acadêmicas e discussões científicas, mas também pela amizade e exemplo de perseverança e paixão pela ciência.

À Prof.^a Dr.^a Aline Planello, pela disposição de sempre nos instruir em como trilhar o caminho árduo de um doutorado.

Ao Prof. Dr. Rogério Castilho, pelo acolhimento, paciência e confiança durante meu tempo na Universidade de Michigan. Além de ser um exemplo pelo lado científico, também o é pelo lado humano, inspirando todos aqueles a sua volta pela maneira humana de liderar seu grupo.

À Prof.^a Dr.^a Cristiane Squarize, também pelo acolhimento na Universidade de Michigan, sempre nos incentivando a fazermos o nosso melhor.

Os professores que me orientaram e permitiram que eu pudesse construir meu caminho até este doutorado.

Ao Dr. Gustavo Narvaes Guimarães, pela amizade que eu pude contar em todas as horas.

Aos meus colegas/amigos da Histologia, daqueles que começaram comigo e dos que já foram, foi uma honra trabalhar ao lado de vocês: Manuel, Zulieth, Eduardo, Ingrid, Guilherme e Dieila.

Aos colegas/amigos de laboratório na Universidade de Michigan, em especial Carlos, Liana, Marisol e Thamara, que além da amizade, me ensinaram o significado do que é trabalhar em grupo e confiar nos seus colegas de laboratório.

Ao Dr. Erick Coppini, por nunca ter recusado abrigo, desde os tempos do mestrado.

À Sociedade do Café, composta por Paulo, Abuna, Eduardo e Renato. Amigos que trilharam este caminho junto a mim, sempre energizados pelo café após o almoço, lanche da tarde e janta.

RESUMO

O carcinoma espinocelular oral é uma doença com elevada capacidade de invasão tecidual, levando os pacientes a um alto grau de morbidade e de prognóstico não favorável. A diminuição da expressão do gene supressor de tumor *PTEN* (Phosphatase and Tensin homologue) está associada ao seu desenvolvimento. Entre as funções de *PTEN* a mais estudada é a regulação negativa da via de sinalização PI3K-AKT, que no tumor é responsável pelo aumento da proliferação de populações de células denominada células tronco tumorais. Além da regulação de PI3K-AKT, a associação com a via de sinalização NF- κ B também é muito estudada, via responsável também pela proliferação e resistência a terapias quimioterápicas. Dentre os mecanismos estudados na formação e progressão tumoral estão as alterações epigenéticas, entre elas a metilação de DNA. O aumento da metilação de DNA na região promotora de genes supressores de tumor é um evento que tem sido constantemente relacionado à progressão tumoral, sendo o gene *PTEN* um candidato que pode ter sua expressão diminuída devido a este evento. No presente trabalho nós investigamos a função de *PTEN* como provável regulador de células tronco tumorais em uma linhagem de carcinoma espinocelular de língua, assim como o efeito do inibidor de metilação de DNA 5-AZA em condições de *PTEN* expresso e não-expresso. O silenciamento de *PTEN* aumentou a expressão do gene *TNF- α* e também das proteínas via PI3K-AKT. Nos ensaios celulares aumentou o número de formação de colônias e esferas tumorais, porém não foi capaz de aumentar a população de células tronco tumorais. 5-AZA foi capaz de diminuir a formação de colônias, esferas tumorais e da população de células tronco independente do status funcional de *PTEN*. Desta forma, concluímos que o silenciamento da expressão de *PTEN*, não foi o responsável direto pelo aumento da população de células tronco tumorais. A inibição de metilação de DNA impactou aspectos importantes da biologia do tumor e ocorreu de maneira independente de *PTEN*.

Palavras-chave: *PTEN*, Metilação de DNA, Células tronco neoplásicas, Carcinoma de células escamosas oral.

ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma is a disease with a high capacity for tissue invasion, leading patients to a high degree of morbidity and unfavorable prognosis. Decreased function of the PTEN (Phosphatase and Tensin homologue) tumor suppressor gene is associated with its development. Among the most studied PTEN functions is the negative regulation of the PI3K-AKT signaling pathway, which in the tumor is responsible for the increased proliferation of cell populations called tumor stem cells. In addition to the regulation of PI3K-AKT, the association with the NF- κ B signaling pathway is also well studied, also responsible for the proliferation and resistance to chemotherapeutic therapies. Among the mechanisms studied in tumor formation and progression are the epigenetic alterations, among them DNA methylation. The increase in DNA methylation in the promoter region of tumor suppressor genes is an event that has been constantly related to tumor progression, the PTEN gene being a candidate that may have its expression diminished due to this event. In the present work we investigated the PTEN function as a probable regulator of tumor stem cells in a line of squamous cell carcinoma of the tongue, as well as the effect of the 5-AZA DNA methylation inhibitor under conditions of expressed and non-expressed PTEN. The silencing of PTEN increased the expression of the TNF- α gene and of the proteins via PI3K-AKT. In cell assays the number of colonies and tumor spheres increased but was not able to increase the population of tumor stem cells. 5AZA was able to decrease the formation of colonies, tumor spheres and the stem cell population independent of the functional status of PTEN. Thus, we concluded that the silencing of PTEN expression was not directly responsible for the increase in the population of tumor stem cells. Inhibition of DNA methylation impacted important aspects of tumor biology and occurred independently of PTEN.

Keywords: PTEN; DNA methylation, Oral squamous cell carcinoma; Cancer stem cell.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 Carcinoma espinocelular	14
2.2 Células tronco tumorais	16
2.3 Via de sinalização PTEN	20
2.4 Via de sinalização NF-kB	23
2.5 Metilação de DNA	26
2.6 5-Aza-2'-Deoxicitidina	27
3 PROPOSIÇÃO	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
5 RESULTADOS	37
6 DISCUSSÃO	43
7 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXO 1 – RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE	55

1 INTRODUÇÃO

O tipo histológico de câncer oral mais comum é o carcinoma de células escamosas (Warnakulasuriya, 2009), considerado um tipo agressivo e de alta capacidade de invasão, comumente diagnosticado tardiamente, o que leva a um prognóstico desfavorável, procedimentos cirúrgicos que acarretam grandes mutilações ao paciente e elevado grau de morbidade. Alguns fatores de risco estão associados a esse câncer, sendo os principais o tabagismo, o etilismo e a infecção pelo papiloma vírus humano (HPV) no caso da região da orofaringe. O protocolo de tratamento inclui cirurgia, radioterapia, quimioterapia, ou a combinação de tratamentos (Vigneswaran e Williams, 2014).

Evidências vem sugerindo que alterações epigenéticas, tais como a metilação de DNA, modificações covalentes de histona, remodelação da cromatina e RNA não codificante estão frequentemente envolvidos na carcinogênese, progressão tumoral e resistência à terapia do carcinoma oral. Essas alterações epigenéticas contribuem com a plasticidade celular durante a progressão tumoral e a formação de um nicho celular específico, com capacidade de auto renovação, chamado de células tronco tumorais. Essas células estão envolvidas no desenvolvimento intrínseco ou adquirido de resistência à terapias e reincidência dos tumores. Entender as alterações epigenéticas envolvidas na biologia e caracterização das células tronco tumorais é um passo importante no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, assim como na possibilidade de sensibilizar tumores resistentes à terapia convencional. (Castilho et al., 2017).

O gene *PTEN* (phosphatase tensin homologue) é um supressor de tumor que atua negativamente na sinalização de PI3K, levando à diminuição da sinalização dos membros que estão atuando *downstream* nesta via, como AKT e mTOR. A diminuição da expressão e mutação de *PTEN* é um evento comum na carcinogênese e progressão do carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, assim como em outros tumores. A via de sinalização de mTOR controla diretamente a população de células tronco tumorais, sendo sugerido à proteína PTEN um papel regulador, inibindo a via PI3K-mTOR e, conseqüentemente, diminuindo a população de células tronco tumorais (Squarize et al., 2013).

A família de fatores de transcrição NF- κ B exerce um papel fundamental na inflamação e imunidade inata, além do crescente reconhecimento do seu papel nos estágios de iniciação e progressão de tumores. Durante esta progressão, a via NF- κ B pode cooperar com múltiplas outras vias de sinalização, como a PI3K, que pode regular NF- κ B positivamente ou afetar genes que estão *upstream* a ele. O aumento de NF- κ B está relacionado à resistência a terapias e regulação de células tronco tumorais (Hoesel e Schmid, 2013).

A metilação de DNA é uma das modificações genéticas mais estudadas em mamíferos. Em células normais, a metilação de DNA representa um dos mecanismos responsáveis pela manutenção da adequada expressão dos genes. A adição covalente de um radical metil ocorre geralmente em citosinas que precedem guaninas (dinucleotídeos CpG), sendo que esses dinucleotídeos não estão randomicamente distribuídos pelo genoma e se concentram em regiões que recebem o nome de ilhas CpG. As enzimas DNA methyltransferase (DNMT) são responsáveis por estabelecer e manter o padrão de metilação no genoma. É sabido que a inativação de genes supressores de tumor em consequência da hipermetilação de seus promotores é um evento comum no câncer e estudos vem mostrando uma variedade de genes silenciados por metilação de DNA em diferentes tumores, evento inclusive que parece ocorrer de forma específica com o tipo de tumor. Em contrapartida, a hipometilação global induz instabilidade genômica, o que também contribui para a transformação celular. Adicionalmente, temos a metilação de DNA como um fator capaz de regular a expressão de RNAs não-codificantes, como os microRNAs, o que também afeta toda a biologia molecular associada com a proteção/indução de tumores (Kulis e Esteller, 2010).

Diferente das mutações, a metilação de DNA é um processo enzimático reversível, o que torna esse mecanismo um alvo interessante para o estudo de novas terapias. (Kulis e Esteller, 2010). Drogas epigenéticas, como inibidores de histona deacetilase (iHDAC) e agentes desmetilantes de DNA, como 5-azacitidina (5-aza-CdR) e 5-aza-2'-desoxicitidina (5-AZA) têm sido empregadas na tentativa de reversão do silenciamento de genes supressores de tumores e/ou genes que, de alguma forma, atuam no combate às células tumorais. O 5-AZA é um análogo de nucleosídeo que se incorpora ao DNA como um aduto e faz uma ligação irreversível com as enzimas DNA metiltransferases. Como consequência, a ligação leva à

degradação dessas enzimas e um efeito de desmetilação em cascata no DNA (Christman et al., 2002).

Desta forma, buscamos elucidar o potencial efeito de inibição da população de células tronco tumorais em um linhagem celular de carcinoma espinocelular de língua, além de evidenciar o papel do gene supressor de tumor PTEN na manutenção desta população de células, e finalmente o efeito da droga 5-AZA quando há a perda de função deste gene.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carcinoma espinocelular oral

O câncer é uma doença de desenvolvimento gradativo constituída de princípios biológicos organizados da seguinte maneira: capacidade de manter sinais proliferativos ativos, evasão de supressores de crescimento, resistência à morte celular, replicação ilimitada, indução de angiogênese e ativação de mecanismos de invasão tecidual e colonização de novos tecidos (metástase). De maneira intrínseca estão associados fatores como instabilidade genômica e inflamação. Recentemente, características como reprogramação do metabolismo celular e evasão do sistema imune também foram acrescentados a esta lista. Desta forma, o câncer tem com seu repertório a habilidade de recrutar ostensivamente células normais ao seu redor, manipulando-as para favorecer a manutenção da doença no que é chamado de microambiente tumoral (Hanahan e Weinberg, 2011).

O carcinoma espinocelular (CEC) é o mais frequente dos tumores sólidos e é o maior responsável pela estatística de mortalidade de câncer. É constitutivamente heterogêneo, com células em diferentes estágios de diferenciação, capazes de reverter seu atual estado de diferenciação para outro mais proliferativo, assim como entrar em quiescência, reduzindo o ciclo celular. Tem o surgimento a partir de uma população de células epiteliais com potencial proliferativo que mantém a renovação das camadas estratificadas do epitélio. O CEC também pode ocorrer em epitélio simples ou pseudoestratificado com ativação de células quiescentes ou alterações no cometimento celular. (Dotto e Rustgi, 2016).

O CEC oral é um tipo de câncer de células epiteliais da camada escamosa, tipicamente englobado pelo grupo maior de câncer de cabeça e pescoço, limitado pelos lábios e cavidade oral. Sua incidência é de aproximadamente 350.000 casos por ano e mortalidade próxima de 50% dos casos (Bray, 2018). Sua causa é relacionada principalmente ao consumo de tabaco e álcool, além da infecção de papiloma vírus humano (HPV) na região da orofaringe (Leemans, 2011). Seu desenvolvimento também pode ocorrer através de lesões pré-neoplásicas, como a leucoplasia, com células geneticamente alteradas (Napier e Speight, 2008). Várias

vias de sinalização aberrantes já foram identificadas no CEC oral, evidenciando uma característica heterogênea da doença (Leemans, 2011).

O consórcio “*The Cancer Genome Atlas*” mapeou o perfil molecular de 279 amostras de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (cavidade oral e orofaringe), fornecendo um amplo cenário compreensivo sobre as alterações genômicas somáticas. Neste, foi demonstrado que a associação de infecção por HPV (HPV positivo) é dominado por mutações no oncogene *PIK3CA*, alterações envolvendo a perda de função de *TRAF* e a amplificação do gene de ciclo celular *E2F1*, sendo molecularmente diferente do CEC sem associação de infecção por HPV (HPV negativo). Em pacientes fumantes (HPV negativo) ficou demonstrada a quase universal mutação com perda de função do gene *TP53* e inativação de *CDKN2A*. Um subgrupo de CEC oral com prognóstico clínico favorável demonstrou alterações infrequentes nas variações de cópias em conjunto com mutação de ativação de *HRAS* ou *PIK3CA*, juntamente com mutações de inativação de *CASP8*, *NOTCH1* e *TP53* (*The Cancer Genome Atlas*, 2015).

No CEC há um grupo de células quiescentes, responsáveis pela manutenção da heterogeneidade do tumor, frequentemente resistente à quimioterapia, que são denominadas células tronco tumorais (CTT). São células com capacidade de resistir a danos no DNA enquanto quiescentes, porém susceptíveis à apoptose quando estão em estado proliferativo. Tal quiescência é regulada pela via de sinalização TGF- β /SMAD, que regula diretamente a transcrição de genes do ciclo celular para controlar um estado G1 *arrest* reversível, independente da função de p21. (Brown, 2017).

As mutações de *TP53* podem ser classificadas como: disruptivas e não-disruptivas. A mutação disruptiva pode ser definida como mutação do tipo *nonsense* (inserindo um *stop* códon, o que leva à interrupção da proteína) ou uma mutação *missense* nos domínios de ligação ao DNA L2-L3, levando à troca do aminoácido por outro de diferente polaridade ou carga. Todas as outras mutações são definidas como não-disruptiva. Baseado nesta classificação, os tumores com mutação disruptiva se associaram a pior um prognóstico quando comparados aos tumores sem mutação ou carregando mutação não-disruptiva (Poeta, 2007).

Uma ferramenta para estudo do CEC são linhagens celulares, permitindo entender sua biologia e antes que estudos com animais e clínicos sejam realizados.

Com uma análise integrativa do perfil genômico e transcriptômico, comparando linhagens celulares HPV negativa e positiva com tumores do TCGA foi possível identificar amplificação recorrentes nos 3q22-29, 5p15, 11q13/22, e 8p11 que são responsáveis pelo aumento da expressão de mais de 100 genes nas linhagens celulares e tumores. Estas alterações, juntamente com mutações de deleção em genes supressores de tumor, convergem para vias de sinalização que recapitulam o *landscape* genômico do CEC. Entre essas associações, a amplificação de 3q26.3 e mutação de TP53 na maioria dos tumores HPV negativo refletem um prognóstico menos favorável. (Cheng, 2018).

Com o advento da imunoterapia, pesquisadores vêm otimizando a tecnologia de anticorpos para receptores de superfície celular envolvidos com a progressão do CEC oral. Apesar de muitas dessas terapias ter demonstrado resultados desapontadores em ensaios clínicos quando utilizados como monoterapia, os estudos estão avançando para combinações com terapias convencionais. Agentes como pembrolizumab e nivolumab fazem parte da nova geração de imunoterápicos, visando estimular o sistema imune contra o tumor no microambiente tumoral (Santuray, 2018).

2.2 Células tronco tumorais

Células tronco são um grupo de células dotadas de propriedades distintas: auto renovação (na divisão celular, uma ou as duas células filhas terão as mesmas propriedades biológicas da célula mãe), a capacidade de se desenvolver em diferentes linhagens e o potencial de proliferar extensivamente. A junção dessas habilidades faz a célula tronco única. Destas habilidades, a de auto renovação se faz mais notável, pois sua subversão é de grande relevância na oncogênese. O aumento da auto renovação aberrante, em combinação com o potencial intrínseco de crescimento das células tronco, pode ser o responsável pelo fenótipo do tumor maligno. Vários estudos nos últimos 50 anos, quando olhados de modo coletivo, vem mostrando que característica de sistemas de células tronco, principalmente como a descrita acima, são relevantes para várias formas de câncer. Populações relativamente raras e biologicamente distintas de “células iniciadoras de tumor”

foram identificadas em tumores do sistema hematopoiético, nervosa e mama. Células deste tipo tem capacidade de auto renovação, além da capacidade proliferativa de conduzir a expansão das células malignas. Consequentemente, as propriedades das células iniciadoras de tumor fazem um paralelo com as características que definem uma célula tronco normal. Células malignas que denotam essas propriedades recebem a denominação de células tronco tumorais (CTT) (Jordan, 2006).

De acordo com a teoria das CTT, apenas um pequeno grupo de células tumorais é capaz de formar um tumor. No CEC, células com o marcador de membrana CD44 foram isoladas e apresentaram a capacidade de formação de tumor. Estudos indicaram que a atividade da enzima aldeído desidrogenase (ALDH) pode representar um marcador de CTT mais específico. A porcentagem de células com alta atividade de ALDH no tumor primário é baixa (1% a 7,8%), no entanto essas células apresentam um potencial de formação de tumor em camundongos superior às células de baixa atividade de ALDH (Clay, 2010).

A concepção de terapias antitumorais mais eficientes tem como ponto crítico a determinação de quais células tumorais tem o potencial de contribuir para a propagação da doença. Com base na tese de que a maioria das células tumorais podem proliferar extensivamente e formar metástases, virtualmente todas as células devem ser eliminadas para curar a doença. Consistente com esta visão, as terapias tradicionais têm procurado eliminar a maioria das células tumorais possível. Em contraste com esta abordagem, o modelo de células tronco tumorais propõe que o crescimento e regressão de muitos tipos de câncer é conduzido por uma pequena subpopulação de CTTs (Dick, 2008, Reya, 2001). O modelo de células tronco tumorais não endereça à questão se o câncer surge de células tronco normais. Ao invés, ele sugere que independente da célula de origem, muitos tipos de câncer podem se organizar em hierarquia como um tecido normal. Assim como células tronco normais se diferenciam em uma variada progênie com limitado potencial proliferativo, é discutido que CTTs também passam por alterações epigenéticas análogas à diferenciação de células normais, formando um grupo fenotipicamente diverso de células não tumorigênicas que constituem o *bulk* tumoral. Essas alterações epigenéticas são propostas como associadas a uma perda irreversível

(ou raramente reversível) de capacidade tumorigênica tal que a maioria das células tumorais tem pouca contribuição na propagação da doença (Shackleton, 2009).

A metástase é promovida por células tumorais que se disseminam e recriam o tumor em tecidos não correspondentes, distantes do sítio primário. Como as células se movem do tumor para a circulação e como se infiltram em órgãos distantes para iniciar o crescimento da metástase é uma questão de interesse dentro da biologia do câncer. Estudos vêm definindo a origem, propriedades fenotípicas, nichos que hospedam a metástase e vias de sinalização que dão suporte à sobrevivência, auto renovação, dormência e reativação das células que iniciam a metástase. Tais células possuem características semelhantes às CTTs e explorar suas vulnerabilidades seria um importante passo para evitar que as metástases ocorram. (Oskarsson, 2014).

Análises genéticas vêm definindo o entendimento do câncer. Entretanto, tem ficado evidente que células tumorais apresentam características organizacionais de um tecido saudável, enquanto as CTTs conduzem o crescimento do tumor. Ainda que o modelo de CTTs seja considerado exclusivo para explicar a heterogeneidade tumoral, há a proposta de que a diversidade genética e fatores externos não gênicos também contribuam para a heterogeneidade tumoral (Kreso e Dick, 2014).

Assim, CTTs são consideradas *drivers* da progressão tumoral. No carcinoma mucoepidermóide de glândulas salivares, marcadores como ALDH, CD10, CD24 e CD44 foram utilizados para identificar as CTTs. Quando realizado o *sorting* das linhagens celulares de carcinoma mucoepidermóide UM-HMC-1, UM-HMC-3A e UM-HMC-3B com os marcadores para alta atividade de ALDH e CD44, as células tiveram elevado potencial de formar tumores em modelo animal quando comparadas com as de baixa atividade. Da mesma forma, quando realizado o *sorting* para os marcadores CD10/CD24 e CD10/CD44 os resultados foram inconsistentes, com formação de esferas tumorais *in vitro*, mas baixa capacidade tumorigênica no modelo animal. O mesmo ocorreu quando utilizados os marcadores CD24/CD44 (Adams, 2015).

Uma das formas de promover a heterogeneidade intratumoral se dá pela evolução de subclones geneticamente variados em mutações durante a progressão tumoral. Ao combinar o perfil de alteração de número de cópia com técnicas de sequenciamento e rastreamento de linhagem lentiviral, realizando passagens seriais

em um modelo xenográfico, foi possível concluir que clones distintos se mantêm estáveis após as passagens de transplantação. Entretanto, apesar desta estabilidade, a proliferação e resistência à quimioterapia foi variável entre os clones. A quimioterapia promoveu a dominância de linhagens dormentes. Portanto, na progressão tumoral, células que contribuem para o crescimento do tumor e resistência à terapia possuem uma variabilidade funcional inerente. Desta forma, o mesmo clone pode alternar seu estado para evadir a morte celular, se tornando dormente por longo período de tempo (Kreso, 2013; Plaks, 2015)

No câncer de mama, os marcadores CD44/CD24 e ALDH1 são usados extensivamente para identificar CTTs. Entretanto, a expressão deles não é sempre consistente, ainda que no mesmo subtipo de tumor. Com a investigação da expressão destes marcadores em diferentes subtipos de células de câncer de mama, definindo parâmetros para a relação entre os marcadores CD44/CD24 e ALDH1, foi encontrado que elevada expressão deles são indicadores de malignidade, porém com diferentes funções na progressão tumoral. A alta relação de CD44/CD24 está mais relacionada à proliferação celular e tumorigênese, confirmado pelos ensaios de formação de esferas tumorais e xenotransplante em camundongo. O marcador de alta atividade de ALDH1 é um forte indicador de migração celular e metástase. A supressão de CD44 e ALDH1 por siRNA foi capaz de diminuir a capacidade tumorigênica e de migração celular. A combinação destes marcadores seria uma forma mais confiável de caracterizar CTTs. Ademais, a combinação de alta expressão da relação CD44/ CD24 e alta atividade de ALDH1 foram conservadas durante a metástase, desde o tumor primário até as células tumorais circulantes e metástases distantes, sugerindo um importante significado destes marcadores de CTTs na assistência para detecção do câncer, avaliação de prognóstico e até estratégias para terapia (Li, 2017).

No CEC oral foi demonstrado o papel de TRAF6 (fator 6 associado ao receptor de TNF- α) na regulação de CTTs, associando o fenótipo celular de transição epitélio-mesênquima. Sua alta expressão em tecidos é associada à metástases em linfonodos. Nos ensaios *in vitro* foi observado que seu silenciamento inibiu a migração e invasão de diferentes linhagens de CEC oral. De forma interessante, a expressão de fatores associados à transição epitélio-mesênquima diminuiu após o silenciamento de TRAF6, porém tiveram seu resgate após indução

da expressão de TGF- β 1. Em adição, a atividade de ALDH1 e expressão de CD44 foram inibidas após o silenciamento de TRAF6, também reduzindo a capacidade das células de formar esferas tumorais. Desta forma, é sugerida uma conexão da ativação de TNF- α , e conseqüentemente a via NF- κ B, com a aquisição do fenótipo de transição epitélio-mesênquima, assim como na formação de CTTs e progressão tumoral. (Chen, 2018).

2.3 Via de sinalização PTEN

O gene *PTEN* é um supressor de tumor que possui sequência homóloga com fosfatase de dupla especificidade, capaz de desfosforilar resíduos de tirosina fosfato e serina/treonina fosfato em proteínas. Está localizado na região cromossômica 10q23-24 e a perda de sua função está relacionada com diversos tipos de câncer. (Li, 1997; Steck, 1997; Ali, 1999).

As funções atribuídas ao PTEN vêm se tornando diversa desde a sua descoberta. Além de desfosforilar lipídios e proteínas, também exerce funções independentes de fosfatase em condições normais e de doença. Além do mais, o controle da função de PTEN é bastante complexa. Ele é positivamente e negativamente regulado a nível transcricional, como também pós-traducional por fosforilação, ubiquitinação, oxidação e acetilação. Ainda que a maioria da sua atividade como supressor de tumor seja em decorrência da desfosforilação de lipídio na membrana plasmática, o PTEN também pode se localizar no citoplasma e núcleo, e sua distribuição na célula é de controle restrito. A desregulação de PTEN é implicada também em outras doenças, como diabetes e autismo (Tamguney e Stokoe, 2007; Wang e Jiang, 2008).

Um dos mecanismos mais estudados de PTEN é o de hidrólise de PIP3, gerando PIP2 e desta forma antagonizando a PI3K, que é dependente da mediação de PIP3 para sua ativação, levando a diminuição da expressão da via PI3K-AKT-mTOR. Esta função de PTEN é a mais representativa para sua atividade de supressor de tumor. (Zhang e Yu, 2010).

A perda de heterozigossidade na banda cromossômica 10q23 ocorre frequentemente em vários tipos tumorais. O gene supressor de tumor PTEN está

localizado neste locus e apresenta mutação em estágios avançados de diferentes tipos tumorais. Quando investigada a associação da perda de função de PTEN com o CEC oral, utilizando amostras de tumores de língua, foi identificado que aproximadamente 40% dos casos tinham perda de heterozigossidade, enquanto apenas 15% apresentavam mutação. Com a incidência de perda de heterozigossidade foi sugerida a relação de PTEN na tumorigênese do CEC oral (Shao, 1998).

Um dos mecanismos associados à diminuição de função de PTEN é o silenciamento epigenético de NDRG2, levando a um aumento das vias de sinalização PI3K-AKT e NF- κ B. O papel de NDRG2 está associado com a manutenção da função de PTEN através associação da fosfatase PP2A, impedindo a fosforilação de PTEN e consequentemente a perda de sua função. A ativação ectópica de NDRG2 em leucemia/linfoma de células T do adulto leva a supressão da via JAK-STAT e NF- κ B, evidenciando um papel como supressor de tumor (Nakahata, 2014).

Alterações nas vias de sinalização TGF- β e PI3K-AKT são eventos comuns no CEC oral. Ativação condicional de PI3K-AKT por deleção de PTEN no epitélio da cabeça e pescoço em camundongos levou a um aumento da proliferação deste tecido, mas apenas algumas lesões progrediram para um estado de malignidade. Entretanto, quando a deficiência de PTEN foi combinada com a deleção do receptor tipo 1 de TGF- β (TGFBR1) houve formação completa de CEC. A análise molecular revelou aumento da proliferação celular, diminuição da apoptose e aumento da expressão de CCND1 na lâmina basal do epitélio normal, assim como dos animais com duplo nocaute. Além do mais, a transformação de células neoplásicas envolve a evasão da senescência, e isso está associado a um aumento do número de CTTs putativas. Em adição, a ativação da via de sinalização NF- κ B, imunossupressão e angiogênese no microambiente tumoral, características do CEC em humanos, contribuíram significativamente para a carcinogênese nos animais duplo nocaute (Bian, 2012).

Os efeitos específicos no fenótipo celular causado pela perda de expressão de PTEN não são bem definidos, sem uma relação direta de causalidade entre a perda de sua função e a progressão tumoral no CEC oral. Com silenciamento *in vitro* foi demonstrado que a perda de expressão de PTEN está

associada ao decréscimo da adesão celular, redução na expressão de E-caderina, enquanto a migração celular foi elevada. Desta forma, uma das características adquiridas pelas células tumorais após uma deficiência na expressão de PTEN é o de transição epitélio-mesênquima. Mais ainda: a localização de PTEN na célula também esteve envolvida no fenótipo de transição epitélio-mesênquima além da diminuição da sua expressão, podendo este também ser um marcador preditivo de recorrência do CEC oral. (Mriouah, 2014).

Ainda se tem pouco entendimento sobre os mecanismos que levam à ativação desbalanceada de NF- κ B em vários tipos de tumores, inclusive o CEC oral, apesar da conhecida importância de NF- κ B na progressão tumoral. O gene *NDRG2* é um regulador negativo da via PI3K-AKT, promovendo a desfosforilação de PTEN na porção C-terminal através do recrutamento da fosfatase PP2A. Com a diminuição da expressão de *NDRG2* foi observado que PTEN se mantém na forma inativa, consequentemente aumentando a expressão da via PI3K-AKT. Da mesma forma, ao recrutar PP2A, *NDRG2* é capaz de inibir a quinase indutora de NF- κ B (NIK), reduzindo a expressão da via canônica de NF- κ B. Desta forma poderíamos concluir que *NDRG2* estaria agindo não somente na ativação não canônica de NF- κ B ao inibir PI3K-AKT pela ativação de PTEN, mas estaria também induzindo diretamente a inibição de NF- κ B ao desfosforilar NIK (Ichikawa, 2015).

A sinalização disfuncional de genes relacionados ao ciclo circadiano é um evento observado em uma variedade de condições patológicas. Vários membros da família desses genes têm sua expressão aumentada em células tumorais. Com a indução de estresse oxidativo em linhagens de células de CEC oral foi observada a perda de função de PTEN, ativando a sinalização de mTOR e de BMAL1. Com a administração de Rapamicina, um inibidor específico de mTOR, com a perda de função de PTEN, a expressão de BMAL1 foi normalizada. O acúmulo de BMAL1 pela deleção de *PER2* também foi resgatado *in vivo* com a administração de Rapamicina. Notavelmente, a regulação de BMAL1 requer a atividade das proteínas Raptor e Rictor, constituintes de mTOR. Desta forma, há indícios de que a sinalização da via PI3K tem conexão com a regulação do ciclo circadiano, podendo alterar a expressão de BAML1 em células tumorais. (Matsumoto, 2016).

Em situação de normalidade, PTEN também tem participação no controle de células tronco do folículo capilar (HFSCs) que se localizam no bulbo e mantém a

homeostase tecidual, respondendo a sinais de ativação a cada ciclo capilar ou respostas a injúrias. A deficiência de PTEN promove aumento da expressão de BMAL1 e interfere na quiescência das HFSC. Além disso, a inibição de PTEN leva à diminuição da expressão de BMI-1 que representa um marcador de renovação de células tronco adulta e aumento da senescência, sugerindo um sistema de proteção para prevenir a transformação dessas células. Assim, a inibição de PTEN contribui para o acúmulo de HFSC no bulbo capilar (Zagni, 2017).

2.4 Via de sinalização NF- κ B

A família de fatores de transcrição Rel/NF- κ B inclui uma coleção de diferentes proteínas, conservadas desde *Drosophila* até humanos. Dentre os modelos de organismos, esses fatores de transcrição são notavelmente ausentes em leveduras e *C. elegans*; em parte devido às suas funções primárias no controle da resposta imune e inflamatória. Esses fatores de transcrição são dímeros entre Rel/NF- κ B que fazem ligação em sítios de DA de 10 pares de base (sítios κ B). Em todos os vertebrados as proteínas Rel podem formar homodímeros ou heterodímeros, com exceção de RelB, o qual forma apenas heterodímeros. Essa diversidade de combinações contribui para a regulação de distintos, mas sobrepostos, grupos de genes, nos quais os dímeros individuais possuem distintos sítios de ligação específico ao DNA para uma coleção de sítios κ B. NF- κ B comumente se refere ao heterodímero p50-RelA, o qual é um dos dímeros mais frequentes dentro do complexo Rel na maioria das células (Gilmore, 1999).

A atividade de NF- κ B é regulada pela interação com as proteínas inibitórias I κ B. Da mesma forma que diferentes proteínas compõem a família Rel/NF- κ B, as proteínas I κ B também são variadas, com diferentes afinidades a complexos individuais de Rel/NF- κ B, regulando-os de maneira distinta, sendo expressas de modo tecido-específico. A interação destas proteínas mais estudada é a de I κ B α com NF- κ B, e esta interação bloqueia a habilidade de NF- κ B de transportar para o núcleo e se ligar ao DNA. Em estudos bioquímicos e de determinação direta de sua estrutura, ficou claro que I κ B α realiza múltiplos contatos com NF- κ B. Essas interações se sobrepõem às regiões de ligação de

NF- κ B ao DNA, interferindo com sua capacidade de ligação e promoção de transcrição gênica (Gilmore, 2006).

A cisplatina é o agente quimioterápico padrão para o tratamento do CEC oral. A eficiência da terapia baseada em derivados da platina é diretamente influenciada pela resistência do tumor. Múltiplas vias de sinalização estão ligadas à resistência tumoral, entre elas a NF- κ B. Explorando o mecanismo de resistência induzido por NF- κ B, com o uso de uma droga inibidora de histona deacetilase, foi possível aumentar a expressão de fatores de transcrição ligados ao reparo do DNA e outros mecanismos. Células de CEC oral resistentes à cisplatina possuem NF- κ B ativo, o qual responde ao quimioterápico reduzindo os níveis nucleares de BRCA1 e compactando a cromatina através da deacetilação das histonas. A ativação deste mecanismo resulta em um reparo do DNA ineficaz, acumulação de histona γ H2AX e instabilidade genômica. Com a indução farmacológica de acetilação de histona, a resistência à cisplatina promovida por NF- κ B foi inibida. Ademais, o silenciamento de NF- κ B nas linhagens de CEC oral induziu o aumento da acetilação de histonas de forma global, resultando em uma maior citotoxicidade após o tratamento com cisplatina. Desta forma, nota-se que alterações epigenéticas induzidas pela alta atividade da via NF- κ B é, aparentemente, um dos mecanismos responsáveis na aquisição de resistência a terapias do tumor, e a inibição da mesma pode ser um alvo para interrupção da resistência do tumor (Almeida, 2014).

Um agente quimioterápico ideal deveria ser de baixo custo, não tóxico e que tivesse como alvo as vias de sinalização importantes para o desenvolvimento do tumor. Vários agentes que possuam essas características vêm sendo estudados, em especial inibidores de NF- κ B. Os retinóides estão neste grupo, porém demonstraram eficiência limitada em ensaios clínicos. Inibidores de receptores EGF e de PI3K podem beneficiar um subconjunto de pacientes, e agentes como extrato de chá verde e cúrcuma possuem um apelo por seus baixos níveis de toxicidade. Outras drogas que tiveram seu uso redirecionado, como inibidores de ciclooxigenase ou antidiabéticos estão sendo alvos de novos estudos. Futuras pesquisas para desenvolver agentes com baixa toxicidade e alta especificidade para NF- κ B emergem como possibilidades para o tratamento do CEC oral (Vander Broek, 2014).

A ativação transiente do fator de transcrição NF- κ B pode conferir as células propriedades essenciais para invasão e potencial para o início da formação tumoral. Em contraste, a maioria dos oncogenes são caracterizados com base em suas mutações ou por sua expressão constitutiva. O estudo da via NF- κ B leva a uma perspectiva mais dinâmica sobre o câncer: tumores causados por diversos oncogenes aparentemente progridem após a perda dos mecanismos de *feedback* negativo que regulam NF- κ B. Este evento altera o fenótipo celular e a expressão de hormônios mediadores, modificando a sinalização entre diversos tipos celulares e tecidos. O resultado é a disrupção da hierarquia das células tronco e alterações generalizadas no microambiente e resposta imune contra as células malignas. (Vlahopoulos, 2015).

Pacientes com carcinoma mucoepidermóide tendem a apresentar baixa taxa de sobrevivência e alto grau de morbidade após o tratamento. Baixas doses de radiação ionizante ativa NF- κ B em linhagens celulares resistentes a terapia. Ademais, a resistência foi significativamente maior quando a via NF- κ B foi estimulada. A inibição farmacológica de NF- κ B utilizando baixas doses de droga Ementina levou a sensibilização das células para a radiação ionizante, além da redução de população de células tronco tumorais. (Wagner, 2016). Interessantemente, quando a inibição farmacológica de NF- κ B foi associada a droga epigenética que aumenta a acetilação de histonas de forma global, os resultados foram ainda mais promissores, com grande redução de células tronco tumorais (Wagner, 2018).

Um evento que é frequentemente associado com as células tronco tumorais é a transição epitélio-mesênquima, no qual a capacidade de invasão celular e metástase é aumentada. O fator de transcrição SLUG está geralmente com sua expressão aumentada neste evento. Entretanto, mutações neste gene são raras, e um dos mecanismos propostos para este desbalanço está no aumento da via de sinalização NF- κ B. Em linhagens de CEC oral foi observado o papel da citocina inflamatória TNF- α na estabilização de SLUG, inibindo sua ubiquitinação. Com o silenciamento de *p65* a estabilização de SLUG por TNF- α foi inibida, e o silenciamento de SLUG inibiu a migração celular em ensaio *in vitro*. Além do mais, alta expressão de SLUG foi correlacionada com metástases em linfonodos de pacientes com CEC oral, predizendo um pior prognóstico. Desta

forma, é evidente que a ativação de NF- κ B favorece a invasão celular e metástase controlando fatores associados a células tronco tumorais no CEC oral (Liu, 2018).

2.5 Metilação de DNA

A metilação do DNA ocorre com a adição de um radical metil em uma citosina que precede uma guanina (CpG). Em vertebrados, as sequências CpG estão majoritariamente metiladas, e sequências não metiladas estão reduzidas a sequências curtas e que se concentram de forma não randômica em regiões chamadas de ilhas CpG. (Bird, 2002, Bird, 1987). As ilhas CpG geralmente tendem a incluir os sítios de início de transcrição, mas também surgem em regiões regulatórias de longa distância. A desmetilação das citosinas localizadas nas ilhas CpG promove empobrecimento de nucleossomos na região, o que atrai proteínas e cria um estado permissivo para que a transcrição gênica ocorra. Já a hipermetilação das ilhas CpG no promotor promove diminuição da expressão ou o completo silenciamento do gene. Assim, a presença/ausência de metilação nas ilhas CpG influencia a estrutura local da cromatina, o que contribui com a regulação da atividade gênica (Deaton e Bird, 2011).

Vários processos biológicos são regulados pela metilação do DNA, entre eles estão o silenciamento de elementos de transposição, regulação da expressão genômica, *imprinting* genômico e inativação do cromossomo X. Em mamíferos, as marcas de metilação de DNA são copiadas a partir da fita de DNA mãe para a fita de DNA filha durante o processo de replicação pela enzima DNMT1 (responsável pela manutenção do padrão de metilação do DNA após a replicação) e DNMT3A/B (responsáveis pela indução de novas citosinas metiladas, um processo chamado metilação *de novo*). As marcas de metilação de DNA podem ser removidas por um processo de desmetilação, que envolve a participação de enzimas da família das hidroxilases de DNA, enzimas conhecidas como Ten Eleven Translocases (TET), ou de forma passiva através da inibição de DNMT1 durante a divisão celular. (Li e Zhang, 2014).

No câncer, os padrões de metilação de DNA e estrutura da cromatina estão profundamente alterados, ocorrendo uma perda global de metilação de DNA,

enquanto há o ganho de metilação em regiões específicas. Essas alterações, em especial a hipermetilação aberrante de promotores de genes supressores de tumor, estão presentes em virtualmente todos os passos da progressão tumoral. (Jones e Baylin, 2002). A detecção do status de metilação de DNA na região de promotores em amostras de margens cirúrgicas e saliva proporciona um interessante recurso para prever prognósticos relacionados a de progressão da doença e sensibilidade à terapia (Ha e Califano, 2006).

Em estudo que analisou o status de metilação de DNA na região promotora de genes individualmente em amostras de CEC oral foi possível usar estas marcas de metilação de DNA como marcadores para detecção de células de câncer em amostras séricas. A hipermetilação de DNA também esteve associada com o envolvimento de linfonodos e estágio avançado da doença, evidenciando que a hipermetilação de DNA de genes chave também pode ser um marcador para acompanhar o desenvolvimento da doença. (Sanchez-Cespedes, 2000). Com o advento de novos métodos para detecção de metilação de DNA, além dos dados obtidos pelo TCGA, novos marcadores foram estabelecidos, evidenciando a relevância do status de metilação de DNA no prognóstico, progressão da doença e estratégias de terapia (Stephen, 2012, Zhou, 2018).

2.6 5-Aza-2'-Deoxicitidina

A droga 5-Azactidina é um análogo de nucleosídeo e foi inicialmente sintetizada no final da década de 1950. Foi demonstrado um potencial de inibição metabólica quando testado em cultura de células tumorais e mostrou ser um agente quimioterápico efetivo no tratamento da leucemia mieloide aguda. Entretanto, devido a sua toxicidade, outros análogos de nucleosídeos foram favorecidos como agentes terapêuticos. A descoberta da sua incorporação ao DNA como aduto e, consequente inibição da metilação do DNA por meio de uma ligação covalente com as enzimas DNMT, aguçou o interesse pelo uso dessa droga como um potencial agente terapêutico contra diversos tipos de câncer nos quais o silenciamento epigenético de genes regulatórios se faz presente. (Christman, 2002).

A reativação da expressão de genes supressores de tumor pode, portanto, ser mediada pela atividade da droga 5-AZA, induzindo a desmetilação do DNA nestas regiões específicas. O mecanismo de ação do 5-AZA envolve a ligação covalente à enzima DNMT1 e sua posterior degradação. A degradação de DNMT1 pode ocorrer inclusive quando não há replicação do DNA. Mutações da cisteína no sítio catalítico da DNMT1 (envolvido na formação de uma ligação covalente com a citidina no DNA) não impede a indução à degradação provocado pelo 5-AZA. Mutações no KEN box, alvo de sinal para degradação proteossômica, aumenta o nível basal de DNMT1 e é capaz de bloquear a degradação induzida por 5-AZA. A deleção do domínio catalítico aumenta a expressão de DNMT1, mas não é capaz de conferir resistência ao 5-AZA. Os sinais de localização nuclear e o domínio homólogo bromo-adjacente são essenciais para a degradação de DNMT1 mediada por 5-AZA (Ghoshal, 2005).

É aceito que o mecanismo de toxicidade do 5-AZA é devido à ligação covalente com a DNMT1. Entretanto, em um modelo utilizando células tronco embrionárias com mutações que silenciaram individualmente as enzimas DNMT1, DNMT3A e DNMT3B, além de duplo silenciamento para DNMT3A/DNMT3B foi demonstrando que com o duplo silenciamento as células se tornaram altamente resistentes ao 5-AZA. Quando DNMT3A e DNMT3B exógenos foram introduzidos nas células com duplo silenciamento, a sensibilidade ao 5-AZA foi parcialmente restaurada. Tal resultado sugere que o efeito citotóxico do 5-AZA pode ser primariamente induzido pelas metiltransferases *de novo*. (Oka, 2005).

O desenvolvimento das CTTs, frequentemente associado ao fenótipo agressivo das células tumorais, é controlado em parte por mecanismos epigenéticos como a metilação de DNA, levando ao aumento da capacidade de auto renovação e diminuição da apoptose. Terapias epigenéticas que tem como alvo a inibição da metilação de DNA, principalmente com a droga 5-AZA, se mostraram eficiente no tratamento de neoplasmas sanguíneos. Tal sucesso se dá, possivelmente, pela capacidade de erradicar as CTTs ao ter como alvo a maquinaria de manutenção e indução da metilação do DNA, interferindo na memória epigenéticas destas células. (Wongtrakoongate, 2015).

Em um modelo de células de câncer colorretal, combinando análises de bioinformática e dados experimentais, foi demonstrado que uma baixa e transiente

dose de 5-AZA tem como alvo células com capacidade de iniciar tumores, mimetizando uma indução de infecção viral. Tal efeito está associado com a indução de transcrição de RNA de dupla fita, derivados em parte, de elementos retrovirais endógenos. Como efeito, há a ativação de MDA5/MAVS, via responsável pelo reconhecimento de RNA dupla fita, e ativação subsequente de IRF7. Quando há inibição desta via, causada por silenciamento individual de MDA5, MAVS ou IRF7, a habilidade do 5-AZA de regular este grupo de células foi comprometido. A transfecção de RNA dupla fita nas células iniciadoras de tumor foi capaz de induzir efeitos semelhantes ao 5-AZA. Desta forma, paralelo ao mecanismo de reativação de genes supressores de tumor, a droga 5-AZA se mostrou um agente interessante na diminuição de células com características que se sobrepõe às das CTTs. (Roulois, 2015).

A resistência à cisplatina no CEC oral é um evento que pode ser mediado pelo silenciamento de genes chave por metilação de DNA. Com a droga 5-AZA, em uma linhagem de CEC de língua resistente à cisplatina, houve o resgate dos efeitos antiproliferativos e de indução à apoptose da cisplatina. A dose de cisplatina necessária para produzir efeito apoptótico também foi reduzida após a exposição das células ao 5-AZA. Num modelo xenográfico, a combinação das duas drogas resultou numa redução significativa do tumor. Para estabelecer uma classificação de genes relacionados a resistência à cisplatina e seu perfil de metilação, amostras de pacientes foram analisadas. Quando estes genes foram analisados no modelo *in vitro*, o tratamento com 5-AZA nas células resistentes à cisplatina foi capaz de reverter o estado destes genes, alterando seu padrão para o de células sensíveis à cisplatina. Assim, a metilação de DNA se mostrou um possível biomarcador para a resistência à cisplatina. A droga 5-AZA poderia ser utilizada como coadjuvante à cisplatina no tratamento do CEC oral. (Viet, 2014).

3 PROPOSIÇÃO

A hipótese deste trabalho propõe que a função de PTEN é essencial para a redução da população de células tronco tumorais no CEC oral, através da regulação das vias de sinalização PI3K e NF- κ B. Assim, a regulação destas vias seria dependente de PTEN e o efeito da desmetilação do DNA de forma global seria incapaz de induzir alteração nestas vias quando há perda de função de PTEN.

Desta forma, os objetivos deste trabalho foram o de investigar o efeito da manutenção da população de células tronco tumorais e expressão de genes associados a esse fenótipo quando há perda de função de PTEN, o efeito da droga inibidora de metilação de DNA 5-AZA-CdR sobre esta população celular e genes associados, assim como a capacidade da droga em continuar tendo algum efeito após a perda de função de PTEN.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultura de células

Foi utilizada a linhagem celular de carcinoma espinocelular de língua WSU-HN13 (RRID:CVCL_5519), cultivada em DMEM (Hyclone Laboratories Inc) e suplementada com 10% de soro feral bovino (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), Penicilina (100 U/ml) - Estreptomicina (100 µg/ml) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e incubadas a 37 °C e 5% de CO₂. A concentração de células utilizada para os experimentos foi de 10⁴ células/ml. Os detalhes da linhagem celular estão descritos na tabela 1:

Tabela 1 - Descrição da linhagem celular de carcinoma espinocelular de língua HN13.

Linhagem celular	WSU-HN13
Sinônimos	HN13; Wayne State University-Head and Neck 13
Código de acesso	CVCL_5519
Mutações	TP53 p.Val173Leu (c.517G>T)
Doença	CEC de língua
Espécie	Homo sapiens
Sexo	Feminino
Idade	Não especificado

4.2 Tratamento com 5-AZA

As células foram semeadas em placas de Petri de 100mm para os ensaios de formação de colônia e esferas tumorais, placas de 6 poços para os ensaios de expressão gênica e 24 poços para inibição de PTEN com RNA de interferência e atividade ALDH. Após 24h as células foram expostas à 1µM de 5-AZA-2'-deoxycitidina (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) por 48h sem troca de meio.

4.3 siRNA, plasmídeo e adenovírus

A perda de função de PTEN foi realizada através de ensaios de siRNA e shRNA. As células foram transfectadas com 12,5 nM de oligonucleotídeos de RNA dupla-fita contra PTEN humano (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A concentração ótima foi determinada através de curva de concentração de oligo e avaliação da expressão de PTEN por imunoblotting. O silenciamento por siRNA foi realizado exclusivamente para o ensaio de detecção de CTTs por citometria de fluxo. Foi utilizado adenovírus para transduzir shRNA PTEN ou controle shRNA (pGIPZ) nas células. A sequência de oligonucleotídeos segue descrita na tabela 2:

Tabela 2 - Sequência de oligonucleotídeos utilizadas para silenciamento da expressão de PTEN nos ensaios de siRNA e shRNA.

	Forward 5' ->3'	Reverse 5' ->3'
PTEN	CCAAUGGCUAAGUGAAGAU GACAAU[dT][dT]	AUUGUCAUCUUCACUUAGCC AUUGG[dT][dT]
SCRAMBLE	UUCUCCGAACGUGUCACGU [dT][dT]	ACGUGACACGUUCGGAGAA[dT][dT]

4.4 Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA das células foi extraído utilizando o kit Quick-RNA MicroPrep Kit (Zymo, Irvine, CA, USA), que possui um passo extra de digestão de DNA genômico.

Após a extração o RNA foi quantificado por fluorometria com o aparelho Qubit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) com 1µg de RNA.

4.5 PCR quantitativa (qPCR)

Para a quantificação de expressão dos genes relacionados à via NF-κB (TNF-α, IL6, IL1β, IL10, IRAK3 e MAVS), status de célula tronco tumoral (SNAIL e c-MYC), NDRG2 e PTEN foi utilizado o sistema SYBR green Mastermix (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) com o termociclador a 7900 HT Real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Foi utilizado 250 nM de cada primer e 2µl de cDNA para um volume final de 10µl por reação. As condições da PCR foram: 95°C por 10 min, 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, 60°C por 20 segundos e 72°C por 30 segundos. Após obtenção dos resultados de amplificação, os níveis de expressão gênica relativa foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001). Inicialmente, os valores de amplificação dos gene-alvo de cada grupo foram normalizados pelo gene de referência (GAPDH), e então, foram comparados os valores normalizados de cada grupo experimental, com os valores do grupo controle. As sequências do primer foram coletadas da base de dados Primer Bank (Spandidos, 2010) e estão descritos na tabela 3:

Tabela 3 - Lista de primers utilizados no ensaio de RT-qPCR. Todos os primers foram coletados da base de dados Primer Bank.

Gene	Forward 5' -> 3'	Reverse 5' -> 3'
GAPDH	ACCCACTCCTCCACCTTTGAC	CCACCACCCTGTTGCTGTAG
TNF-α	GAGGCCAAGCCCTGGTATG	CGGGCCGATTGATCTCAGC
IL-6	ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG	CCATCTTTGGAAGGTTTCAGGTTG
IL-1B	TTCGACACATGGGATAACGAGG	TTTTTGCTGTGAGTCCCGGAG

IL-10	TCAAGGCGCATGTGAACTCC	GATGTCAAACACTCACTCATGGCT
IRAK3	CAGCCAGTCTGAGGTTATGTTT	TTGGGAACCAACTTTCTTCACA
MAVS	TTCTAATGCGCTCACCAATCC	CCATGCTAGTAGGCACTTTGGA
SNAI1	GCGTGTGCTCGGACCTTCT	ATCCTGAGCAGCCGGACTCT
c-MYC	GGCTCCTGGCAAAGGTCA	CTGCGTAGTTGTGCTGATGT
NDRG2	CTGGAACAGCTACAACAACC	TCAACAGGAGACCTCCATGG
PTEN	TGGATTGACTTAGACTTGACCT	GCGGTGTCATAATGTCTCTCAG

4.6 Western blotting

Os poços foram lavados e aplicado o tampão de lise celular (TRIS 62.5 mM, 2% SDS, 1%β-mercaptoethanol, H₂O₂) e inibidor de protease. Com o auxílio do destacamento mecânico as células foram lisadas, recolhidas em microtubos de 1,5ml (eppendorf) e submetidas à sonicação (três vezes por 10 segundos cada, com intervalos em gelo entre cada sonicação). As amostras foram armazenadas a -80°C até a utilização. As amostras foram preparadas (25µL de amostra + 4,2µL de tampão de amostra) e as proteínas desnaturadas a uma temperatura de 100°C por 5 minutos e aplicadas em um gel de acrilamida 10%. Em seguida, foram aplicados 26µL de amostra em cada poço e o sistema submetido a uma corrente de 200V por aproximadamente 1,5 hora, para a devida separação das proteínas de acordo com o peso molecular. Após a corrida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF a uma corrente de 100V por 3 horas. A membrana foi submetida a bloqueio com solução bloqueadora (leite desnatado a 5%) por 1 hora e então incubada overnight a 4°C, na presença dos anticorpos primários para PTEN (Cell Signaling, 9559S, 1:1000), phospho-S6 (Cell Signaling, 4857S, 1:1000), NDRG2 (Cell Signaling, 5667S, 1:1000), DNMT1 (Santa Cruz, 20701, 1:500), phospho-AKT (Cell Signaling, 9271S, 1:1000) ou GAPDH (Millipore, CB1001, 1:20000). Depois das lavagens com tampão Tris-salina e 0,01% Tween 20 [TBST], as membranas foram

incubadas durante 2h em temperatura ambiente com anticorpo secundário. Após novas lavagens, foi aplicado Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) sobre as membranas durante 5 minutos e em seguida uma folha de filme radiográfico HyBlot CL (Denville Scientific, Holliston, MA, USA) foi exposta à luminescência das bandas por variados tempos de exposição.

4.7 Citometria de fluxo

As células tronco tumorais foram identificadas pela atividade de ALDH e expressão de CD44 por citometria de fluxo. O kit Aldefluor (StemCell Technologies, Durham, NC, USA) foi utilizado para identificar alta atividade enzimática de ALDH. Como controle negativo foi utilizado um inibidor específico de ALDH (dimetilamino benzaldeído). O protocolo seguiu de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram analisadas utilizando o citômetro de fluxo Accuri C6 (BD Biosciences, USA). A atividade de ALDH foi analisada no canal FITC e de CD44 no canal APC. Foram consideradas células tronco tumorais as que eram positivas para ALDH e CD44.

4.8 Ensaio de formação de colônias

Para formação de colônia as células foram semeadas 400 células por poço (n=12) e foram mantidas por 7 dias. Após este período as células foram lavadas, fixadas com metanol/ácido acético e coradas com violeta cristal. As placas foram escaneadas e as colônias foram contadas com o software Image J. Um mínimo de 50 células era necessário para que fosse considerado uma colônia formada por um clone.

4.9 Ensaio de formação de esferas tumorais

Para formação de esferas tumorais foram semeadas 2500 células por poço (n=12) em placas de 6 poços de baixa aderência e foram mantidas por 5 dias. Após este período as esferas tumorais foram contadas com o auxílio de microscópio invertido de acordo com as classificações holoclone, meroclone e paraclone.

4.10 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software GraphPad Prism, versão 8. Os testes estatísticos utilizados foram o teste F (one-way ANOVA) e teste *t* de Student. Os resultados estão representados pela média \pm SEM. Asteriscos denotam diferença estatística significativa (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$ e ns $p > 0.05$).

5 RESULTADOS

As células com perda de função de PTEN (shPTEN) tiveram um aumento da expressão do gene TNF- α , diretamente associado com a atividade da via NF- κ B, assim como o aumento da expressão de SNAIL, gene relacionado a transição epitélio-mesênquima e status de célula tronco tumoral, quando comparado às células com o vetor vazio (pGIPZ) (figura 1A). Após o tratamento com 5-AZA, as células shPTEN tiveram diminuição da expressão dos genes TNF- α e SNAIL, enquanto as células pGIPZ tiveram aumento da expressão gênica.

Na quantificação de expressão proteica, nota-se que o ensaio de perda de função de PTEN por siRNA foi efetivo (Figura 2A), assim como por shRNA, no qual se observa que com o silenciamento de PTEN há o aumento de p-S6 e p-AKT, portanto ativação da via PI3K-AKT. Houve aumento da expressão de NDRG2 com o silenciamento de PTEN, assim como também há aumento de sua expressão com a aplicação de 5-AZA. No grupo pGIPZ houve aumento de p-S6 e p-AKT quando aplicado o 5-AZA. Interessantemente, DNMT1 aumenta após o silenciamento de PTEN. Houve redução de DNMT1 após a exposição ao 5-AZA, mostrando que a droga foi efetiva na sua degradação (figura 2B).

Figura 1: gráfico de heatmap representando a variação de expressão gênica normalizados ao gene GAPDH no experimento de RT-qPCR. (A) Variação da expressão gênica das células HN13 shPTEN em relação as células HN13 pGIPZ. (B) Variação da expressão gênica das células HN13 shPTEN e H13 pGIPZ após o tratamento com 5-AZA em relação aos seus respectivos controle sem a droga.

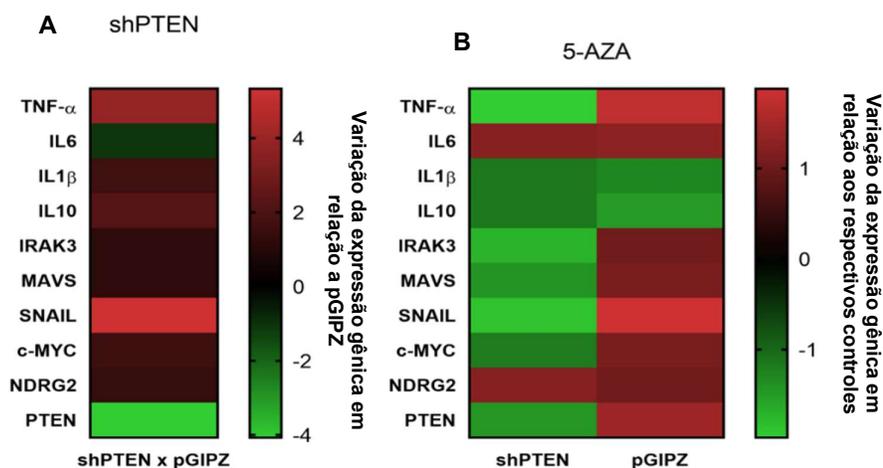
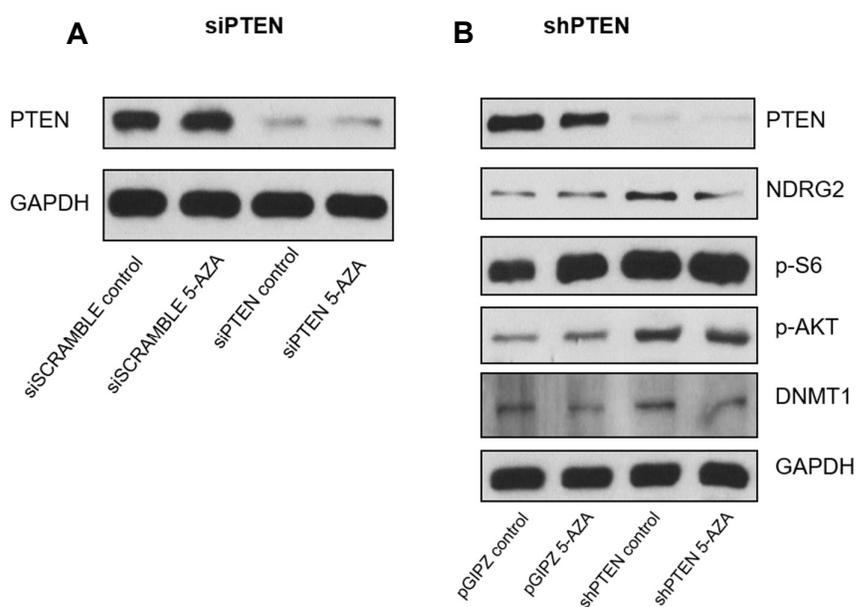
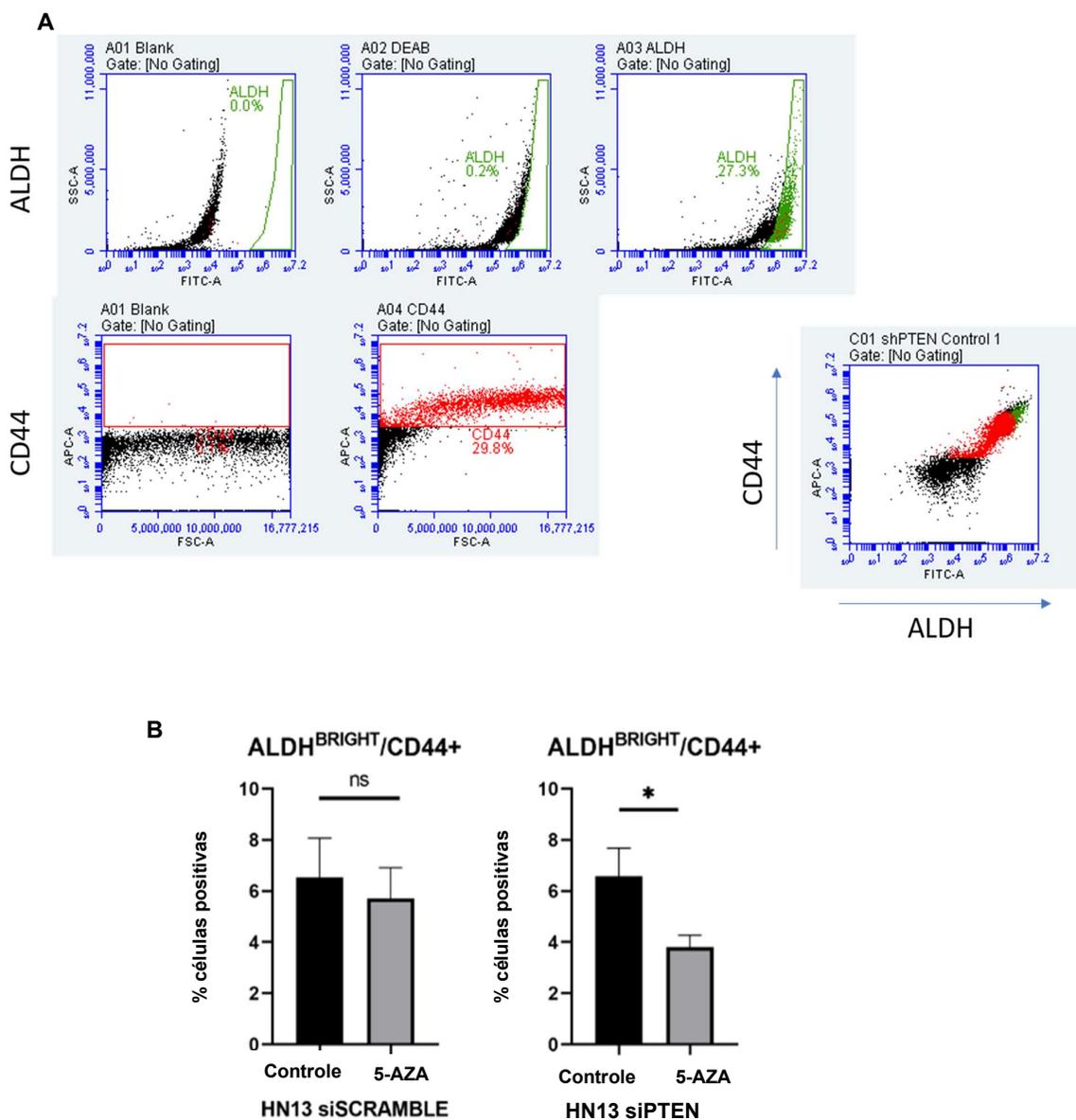


Figura 2: Ativação da via PI3K-AKT após o silenciamento de PTEN e redução de DNMT1 após aplicação de 5-AZA. (A) Expressão proteica de PTEN e GAPDH no ensaio de siRNA. O silenciamento da expressão de PTEN foi efetivo nas condições controle e de exposição ao 5-AZA. **(B)** O silenciamento de PTEN também foi efetivo nas células com shRNA. O aumento da expressão de p-S6 e p-AKT nas células shPTEN em relação à pGIPZ confirma a ativação da via PI3K-AKT após a perda de função de PTEN. NDRG2 e DNMT1 também aumentaram a expressão após o silenciamento de PTEN.



Na avaliação da manutenção de células tronco tumorais, através da atividade da enzima ALDH e expressão de CD44, não houve diferença entre as células HN13 shPTEN e HN13 pGIPZ. Após o tratamento com 5-AZA, apenas as células HN13 shPTEN demonstraram diminuição da população de células tronco tumorais, sem diferença nas células HN13 pGIPZ.

Figura 3: Redução de CTTs independente do status de PTEN. Os gráficos representam a média \pm erro padrão da porcentagem de eventos positivos em intersecção para ALDH e CD44 na contagem total de 10.000 eventos por citometria de fluxo. **(A)** Estratégia de *gates* utilizada para definir as células com alta atividade de ALDH e expressão de CD44. **(B)** A perda de função de PTEN não foi significativa na manutenção desta população, enquanto a droga 5-AZA foi capaz de reduzi-la após a perda de função de PTEN ($p \leq 0.05$).



A inibição de PTEN aumentou a capacidade de formação de colônia das células, (figura 4A). Com a droga 5-AZA apenas as células HN13 pGIPZ tiveram redução significativa desta capacidade, enquanto que nas células HN13 shPTEN há apenas uma tendência de diminuição, mas sem diferença estatística (figura 4B).

A figura 5 ilustra os diferentes tipos de esferas tumorais e suas classificações: o tipo **holoclone** é considerado o mais agressivo, com maior capacidade proliferativa, de invasão e resistência a quimioterápico; o tipo **meroclone** é considerado um tipo de agressividade intermediária; o tipo **paraclone** é considerado um tipo de baixo grau de agressividade.

Figura 4: Perda de função de PTEN aumenta o número de colônias formadas, com redução após a exposição com 5-AZA quando há expressão de PTEN. Os gráficos representam a média \pm erro padrão do número de colônias formadas após 7 dias de incubação, com tratamento prévio com 5-AZA. **(A)** Formação de colônias nas linhagens HN13 pGIPZ e shPTEN. **(B)** Houve aumento do número de colônias com perda de função de PTEN ($p \leq 0.05$) e diminuição da formação de colônias com a droga 5-AZA nas células HN13 pGIPZ ($p \leq 0.05$).

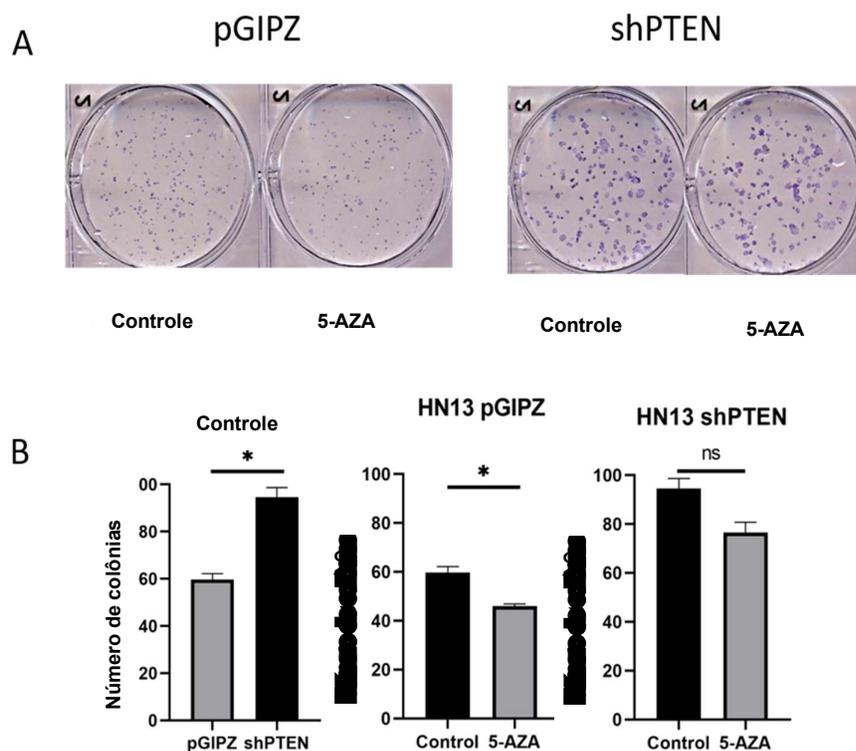
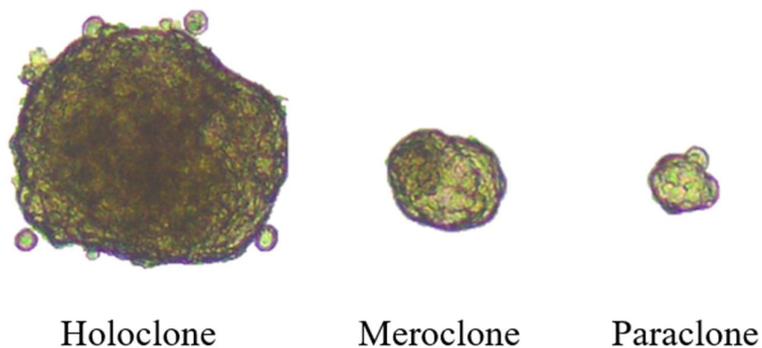
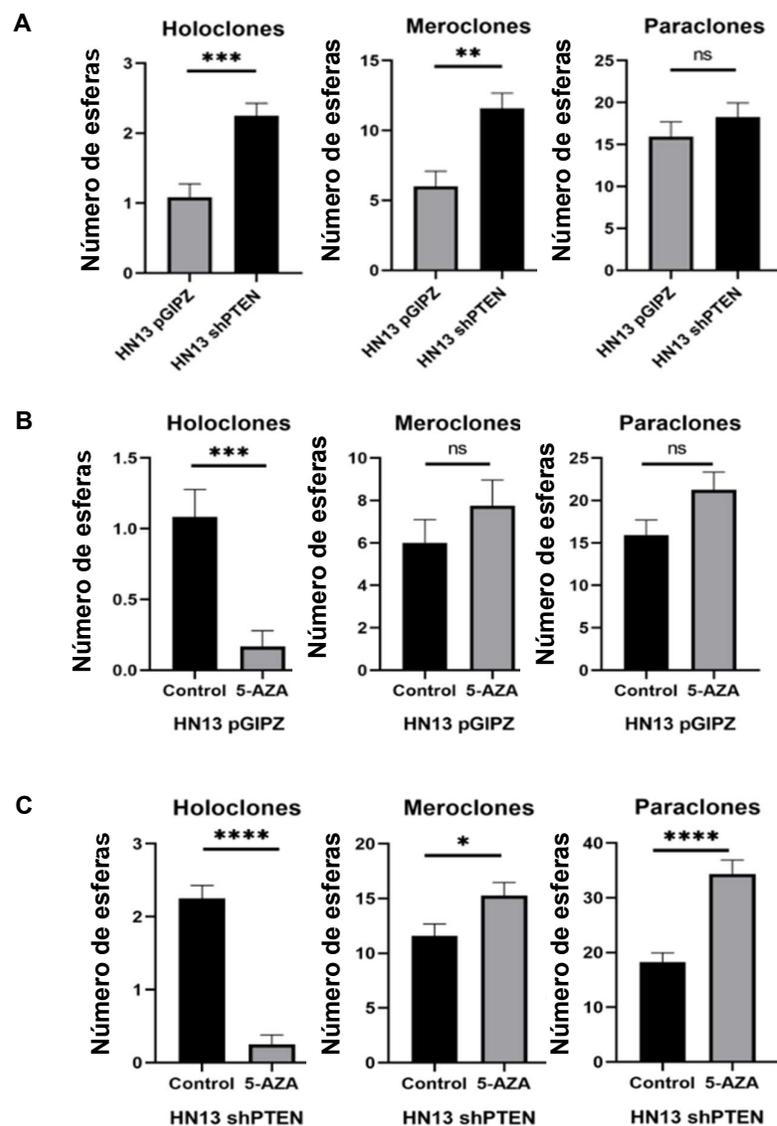


Figura 5: Ilustração dos diferentes tipos de esferas tumorais obtidos nas placas de baixa adesão. Os fenótipos estão associados a diferentes graus de agressividade do tumor e não há diferença em suas morfologias quando há perda de função de PTEN ou tratamento com 5-AZA (Imagem obtida em microscópio invertido, 10x de magnificação).



Com a perda de função de PTEN, houve o aumento de esferas tumorais do tipo holoclone, considerada a forma de clone mais agressiva, enquanto não houve aumento nos tipos meroclone e paraclone (figura 6A). Com o tratamento prévio com 5-AZA, houve redução no tipo holoclone e aumento dos tipos meroclone e paraclone nas células HN13 shPTEN (figura 6B), enquanto nas células HN13 pGIPZ também houve diminuição do tipo holoclone, porém sem aumento dos outros tipos (figura 6C).

Figura 6: Efeitos da perda de função de PTEN e exposição ao 5-AZA nas células HN13 no ensaio de formação de esferas tumorais. gráficos em barra representando média \pm erro padrão dos diferentes tipos de clone e gráficos pizza representando as proporções dos tipos de clone para cada condição. **(A)** A perda de função de PTEN aumentou os tipos holoclone ($p \leq 0.001$) e meroclone ($p \leq 0.005$), impactando na agressividade do tumor. **(B)** Nas células HN13 pGIPZ o pré-tratamento com 5-AZA foi capaz de inibir a formação de esferas tumorais holoclone ($p \leq 0.005$), porém sem aumento significativo nos tipos meroclone e paraclone. **(C)** Nas células HN13 shPTEN o tratamento prévio com 5-AZA foi capaz de inibir a formação de esferas tumorais holoclone ($p \leq 0.0001$), enquanto houve aumento de meroclone ($p \leq 0.05$) e paraclone ($p \leq 0.0001$).



6 DISCUSSÃO

No presente trabalho buscamos elucidar a importância de PTEN como potencial regulador de CTTs no CEC oral. Além disso, nós também investigamos a ação da droga inibidora de metilação de DNA 5-AZA sobre a regulação desta população de células sem a presença de PTEN.

A escolha da linhagem celular HN13 se fez por alguns aspectos intrínsecos da mesma, como a alta expressão de NF- κ B e resistência à cisplatina, e a expressão constitutiva de PTEN (Almeida, 2014), ainda que também expressa a via PI3K-AKT. Por conta disto, é uma célula de alta capacidade de divisão, formação de colônias e esferas tumorais.

Durante a fase piloto do estudo, observamos que a população de CTTs diminuiu na linhagem HN13 quando as células foram expostas à 5-AZA, além de redução da expressão de p65 em ensaio de imunofluorescência, evidenciando um possível alvo para a compreensão dos mecanismos que regulam as CTTs no CEC oral.

Estudos vêm demonstrando a importância da regulação de CTTs por PTEN, especialmente por seu coadjuvante NDRG2. NDRG2 promove a ativação de PTEN por meio da ligação da fosfatase PP2A, impedindo a fosforilação de PTEN. Desta forma, PTEN estaria funcionalmente disponível por período de tempo mais longo e, conseqüentemente, atuaria de maneira a modular negativamente a via de sinalização regida por PI3K-AKT. Esta poderia ser uma das hipóteses que explicariam a diminuição da população de CTTs e, conseqüente, o desenvolvimento tumoral. Com o mesmo mecanismo de recrutamento de PP2A, NDRG2 é capaz de regular negativamente a via NF- κ B, tornando-se um agente de conexão entre as vias reguladas direta e indiretamente por PTEN. Recentemente um estudo reportou que o gene *NDRG2* tem seu promotor silenciado por metilação de DNA em algumas linhagens de CEC oral, e o tratamento com 5-AZA foi capaz de reativar a expressão de PTEN (Tamura, 2017).

A população de CTTs também pode ser reduzida pela reorganização da cromatina. Utilizando uma droga inibidora de HDAC, que promove o aumento da

acetilação de histona de forma global no genoma, um estudo mostrou que a expressão de p65 foi inibida, assim como houve sensibilização da linhagem HN13 ao tratamento com cisplatina (Almeida, 2014). Em outros modelos de tumores, como o colorretal, a inibição das enzimas que promovem a metilação de DNA (DNMT3B e DNMT1) também foi capaz de inibir NF- κ B com a ativação de IRAK3, que faz um feedback negativo à ativação de NF- κ B, o que levou ao aumento de apoptose nas células e diminuição de CTTs (De Carvalho, 2012).

De forma interessante, o silenciamento de PTEN foi capaz de aumentar a expressão da via de sinalização PI3K-AKT, assim como de genes relacionados à via NF- κ B e de propriedades atribuídas à invasividade e metástase, porém não foi capaz de induzir o aumento da população de CTTs na linhagem HN13, diferentemente do que é relatado em outros tipos de tumores (Ciuffreda, 2014, Hill e Wu, 2009).

Com o silenciamento de PTEN utilizando shRNA houve um aumento de expressão gênica de *TNF- α* e *SNAI1*, enquanto os outros genes analisados não tiveram mudanças significativas em sua expressão. O aumento de expressão de TNF- α pode se traduzir em uma maior ativação da via NF- κ B, uma vez que esta citocina é uma de seus principais efetores (Schutze, 1995). Assim, as células tiveram um aumento na proliferação observada na rotina de laboratório (dado não mostrado). O aumento de SNAI1 acarreta às células uma maior mobilidade, uma vez que esse gene é descrito como regulador da transição epitélio-mesênquima, o que aumentaria a capacidade de invasão tecidual e metástase após o silenciamento de PTEN (Mani, 2008, Mriouah, 2014).

Quando avaliada a expressão proteica, o silenciamento de PTEN promoveu o aumento da via PI3K-AKT, o que é evidenciado pelo aumento da expressão de AKT fosforilado e S6 fosforilado. Desta forma, o silenciamento de PTEN se mostrou efetivo tanto pela inibição de expressão da sua proteína como pelo aumento de expressão da via regulada por ele (Hollander, 2011). Interessantemente, houve também o aumento da expressão de NDRG2, provavelmente devido a um mecanismo de *feedback* para compensar a diminuição de expressão de PTEN.

No ensaio de formação de colônias houve um aumento significativo do número de células (e tamanho) nas colônias com PTEN silenciado. A formação de

esferas tumorais foi aumentada com o silenciamento de PTEN, tanto em número total como quando observados os tipos holoclone e meroclone. Não houve diferença no número de esferas do tipo paraclone. Isso está de acordo com o fenótipo adquirido com o aumento de PI3K-AKT, uma vez que as esferas do tipo holoclone são consideradas de um tipo agressivo, altamente proliferativa e resistente à terapia, com alto nível de expressão de NF- κ B quando considerada com as outras esferas, em especial a paraclone. O tipo meroclone, considerado um nível intermediário entre a holoclone e paraclone, ainda possui níveis de expressão de NF- κ B maiores que a paraclone. As esferas holoclones também possuem um maior nível de atividade de ALDH quando comparada aos outros clones, indicando a possível existência de uma população de CTTs (Almeida, 2016).

Apesar de PTEN ter tido sua importância demonstrada como regulador de CTTs em outras linhagens celulares (Hill e Wu, 2009, Tamura, 2017), o mesmo não ocorreu para a linhagem HN13. Não houve diferença estatística nos ensaios de atividade de ALDH e expressão de CD44 quando as células que expressam PTEN foram comparadas às células contendo PTEN silenciado. Tal resultado contraria a hipótese de que PTEN seria estritamente necessário para a modulação de CTTs. Apesar de diferenças no padrão de expressão gênica e proteica, além de um fenótipo mais agressivo, capaz de formar mais colônias e esferas tumorais, a população de CTTs não se alterou. Isso nos leva a concluir que PTEN, apesar do evidente papel na progressão tumoral, necessita de outros fatores (provavelmente não presentes na linhagem HN13) para regular as CTTs. Outra hipótese a ser testada em trabalhos futuros é a diferença na biologia das células com o silenciamento de PTEN transiente, como é no ensaio de siRNA, com o silenciamento perpétuo, como é no ensaio por shRNA. Desta forma, células aptas ao silenciamento de PTEN de forma permanente podem apresentar formas distintas de manutenção de CTTs que as células que perdem PTEN de forma transitória.

Os ensaios utilizando 5-AZA mostraram que as células pGIPZ responderam com aumento na expressão gênica de forma geral. Da mesma forma que genes que contribuem para a progressão tumoral, como *TNF- α* , *IL-6*, *SNAI1* e *c-MYC* aumentaram sua expressão, genes que fazem o balanço negativo, como *IRAK3* e o próprio *PTEN* também tiveram o aumento da expressão. Tal efeito era esperado pela forma como a droga 5-AZA age, promovendo o aumento da

expressão gênica de forma global, e normalizando a expressão de genes que tiveram o aumento aberrante da expressão (Yang, 2014).

Os ensaios de expressão proteica de DNMT1 evidenciaram a redução da enzima após a exposição transiente de 5-AZA. A consequência da degradação de DNMT1 é a diminuição da metilação de DNA global, incluindo regiões promotoras de genes supressores de tumor (Liu, 2016, Takai, 2005) e regiões de retrovírus endógeno, que são silenciadas por metilação de DNA no genoma humano. A transcrição de retrovírus endógeno leva a um estado que imita uma infecção viral nas células tumorais, aumentando a apoptose e diminuição de CTTs. O gene *MAVS* teve o aumento da expressão após a exposição à 5-AZA nas células pGIPZ, se relacionando com estudos que observaram a ativação de via de sinalização que reconhece RNA de dupla fita nas células (Roulois, 2015). Também houve o aumento de AKT fosforilado e S6 fosforilado após a exposição ao 5-AZA nas células pGIPZ, seguindo a tendência de aumento de expressão gênica de *TNF- α* , sugerindo ativação das vias NF- κ B e PI3K-AKT (Gu, 2004). Os ensaios de formação de colônias mostraram que a droga 5-AZA foi capaz de reduzir a formação das mesmas. Houve redução na formação de esferas tumorais do tipo holoclone, porém sem diferença estatística para os tipos meroclone e paraclone.

As células shPTEN, quando expostas à droga 5-AZA, sofreram de forma geral uma diminuição da expressão dos genes avaliados, com exceção de *IL-6* e *NDRG2*. A expressão gênica de *IL-6* pode ser regulada pela via PI3K-AKT no CEC oral, e com o silenciamento de PTEN a mesma se tornou mais ativa (Choudhary, 2016). O aumento da expressão de *NDRG2* pode ser decorrente ao efeito de diminuição da metilação de DNA no seu promotor, assim como ocorreu nas células pGIPZ. A diminuição de expressão gênica de *TNF- α* também é notável, uma vez que a via NF- κ B tem o aumento da sua expressão após o silenciamento de PTEN (Gu, 2004, Vasudevan, 2004).

A diminuição da formação de colônias não foi significativa após a exposição da droga 5-AZA nas células shPTEN. Porém, no ensaio de esferas tumorais houve uma diminuição de esferas do tipo holoclone e um interessante aumento de esferas meroclone e paraclone. Apesar da droga 5-AZA inibir a expressão de *TNF- α* , e conseqüentemente da via NF- κ B, a via PI3K se manteve ativa, o que poderia induzir o aumento de IL-6. Desta forma, nota-se que a formação

de esferas do tipo holoclone necessita de uma maior ativação da via NF- κ B do que de PI3K-AKT, sugerindo um papel de manutenção de CTTs para a via NF- κ B e de progressão tumoral para a via PI3K-AKT (Rinkenbaugh e Baldwin, 2016; Zakaria et al., 2018).

Interessantemente, no ensaio de ALDH/CD44 a droga 5-AZA foi capaz de reduzir a população de CTTs nas células siPTEN, enquanto o mesmo não foi observado nas células siSCRAMBLE. Este resultado contraria a hipótese de que PTEN é estritamente necessário para a manutenção de CTTs, e sugere que vias paralelas participem desta regulação com PTEN em outras linhagens celulares. Apesar de 5-AZA induzir a redução de expressão de *TNF- α* nas células shPTEN, também inibindo a formação de esferas tumorais, a redução de CTTs exclusivamente pela redução da via NF- κ B é de difícil correlação, uma vez que a mesma via aumenta sua expressão quando PTEN está silenciado, e ainda assim não há diferença entre o número de CTTs.

7 CONCLUSÃO

Concluimos que o silenciamento de PTEN aumentou a formação de colônias e de esferas tumorais dos tipos holoclone e paraclone, apesar de não ter aumentado a população de células tronco tumorais pelo ensaio de ALDH/CD44. Nas células shPTEN a expressão de TNF- α e SNAIL foi aumentada em relação as células com expressão de PTEN. O tratamento com 5-AZA não diminuiu a expressão da via PI3K-AKT em nenhuma das condições de expressão de PTEN, porém a droga foi capaz de inibir a formação de colônias e esferas tumorais do tipo holoclone, assim como diminuiu a população de células tronco tumorais independente das condições de expressão de PTEN. Desta forma, na linhagem de CEC oral HN13 outras vias paralelas à PTEN, como NF- κ B, sugerem um maior impacto na manutenção de células tronco tumorais, apesar do aumento da agressividade das células quando PTEN foi silenciado e não haver o aumento de CTTs quando a via NF- κ B teve o aumento de sua expressão. A droga 5-AZA se mostra uma opção para casos nos quais há perda da função de PTEN.

REFERÊNCIAS

- Adams A, Warner K, Pearson AT, Zhang Z, Kim HS, Mochizuki D, et al. ALDH/CD44 identifies uniquely tumorigenic cancer stem cells in salivary gland mucoepidermoid carcinomas. *Oncotarget*. 2015;6(29):26633-50.
- Ali IU, Schriml LM, Dean M. Mutational spectra of PTEN/MMAC1 gene: a tumor suppressor with lipid phosphatase activity. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91(22):1922-32.
- Almeida LO, Abrahao AC, Rosselli-Murai LK, Giudice FS, Zagni C, Leopoldino AM, et al. NFkappaB mediates cisplatin resistance through histone modifications in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *FEBS open bio*. 2014;4:96-104.
- Almeida LO, Guimaraes DM, Squarize CH, Castilho RM. Profiling the Behavior of Distinct Populations of Head and Neck Cancer Stem Cells. *Cancers (Basel)*. 2016;8(1):7.
- Bian Y, Hall B, Sun ZJ, Molinolo A, Chen W, Gutkind JS, et al. Loss of TGF-beta signaling and PTEN promotes head and neck squamous cell carcinoma through cellular senescence evasion and cancer-related inflammation. *Oncogene*. 2012;31(28):3322-32.
- Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & development*. 2002;16(1):6-21.
- Bird AP. CpG Islands as Gene Markers in the Vertebrate Nucleus. *Trends in Genetics*. 1987;3(12):342-7.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.
- Brown JA, Yonekubo Y, Hanson N, Sastre-Perona A, Basin A, Rytlewski JA, et al. TGF-beta-Induced Quiescence Mediates Chemoresistance of Tumor-Propagating Cells in Squamous Cell Carcinoma. *Cell stem cell*. 2017;21(5):650-64 e8.
- Castilho RM, Squarize CH, Almeida LO. Epigenetic Modifications and Head and Neck Cancer: Implications for Tumor Progression and Resistance to Therapy. *Int J Mol Sci*. 2017;18(7).
- Chen L, Li YC, Wu L, Yu GT, Zhang WF, Huang CF, et al. TRAF6 regulates tumour metastasis through EMT and CSC phenotypes in head and neck squamous cell carcinoma. *J Cell Mol Med*. 2018;22(2):1337-49.
- Cheng H, Yang X, Si H, Saleh AD, Xiao W, Coupar J, et al. Genomic and Transcriptomic Characterization Links Cell Lines with Aggressive Head and Neck Cancers. *Cell Rep*. 2018;25(5):1332-45 e5.

Choudhary MM, France TJ, Teknos TN, Kumar P. Interleukin-6 role in head and neck squamous cell carcinoma progression. *World J Otorhinolaryngol Head Neck Surg.* 2016;2(2):90-7.

Christman JK. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene.* 2002;21(35):5483-95.

Ciuffreda L, Falcone I, Incani UC, Del Curatolo A, Conciatori F, Matteoni S, et al. PTEN expression and function in adult cancer stem cells and prospects for therapeutic targeting. *Adv Biol Regul.* 2014;56:66-80.

Clay MR, Tabor M, Owen JH, Carey TE, Bradford CR, Wolf GT, et al. Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase. *Head Neck.* 2010;32(9):1195-201.

De Carvalho DD, Sharma S, You JS, Su SF, Taberlay PC, Kelly TK, et al. DNA methylation screening identifies driver epigenetic events of cancer cell survival. *Cancer Cell.* 2012;21(5):655-67.

Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & development.* 2011;25(10):1010-22.

Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood.* 2008;112(13):4793-807.

Dotto GP, Rustgi AK. Squamous Cell Cancers: A Unified Perspective on Biology and Genetics. *Cancer Cell.* 2016;29(5):622-37.

Ghoshal K, Datta J, Majumder S, Bai S, Kutay H, Motiwala T, et al. 5-Aza-deoxycytidine induces selective degradation of DNA methyltransferase 1 by a proteasomal pathway that requires the KEN box, bromo-adjacent homology domain, and nuclear localization signal. *Mol Cell Biol.* 2005;25(11):4727-41.

Gilmore TD. The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction. *Oncogene.* 1999;18(49):6842-4.

Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene.* 2006;25(51):6680-4.

Gu L, Zhu N, Findley HW, Zhou M. Loss of PTEN Expression Induces NF-kB Via PI3K/Akt Pathway Involving Resistance to Chemotherapy in Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Lines. *Blood.* 2004;104(11):4438.

Ha PK, Califano JA. Promoter methylation and inactivation of tumour-suppressor genes in oral squamous-cell carcinoma. *Lancet Oncol.* 2006;7(1):77-82.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.

Hill R, Wu H. PTEN, stem cells, and cancer stem cells. *J Biol Chem*. 2009;284(18):11755-9.

Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Molecular cancer*. 2013;12:86.

Hollander MC, Blumenthal GM, Dennis PA. PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(4):289-301.

Ichikawa T, Nakahata S, Fujii M, Iha H, Morishita K. Loss of NDRG2 enhanced activation of the NF-kappaB pathway by PTEN and NIK phosphorylation for ATL and other cancer development. *Sci Rep*. 2015;5:12841.

Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature reviews Genetics*. 2002;3(6):415-28.

Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. *N Engl J Med*. 2006;355(12):1253-61.

Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell stem cell*. 2014;14(3):275-91.

Kreso A, O'Brien CA, van Galen P, Gan OI, Notta F, Brown AM, et al. Variable clonal repopulation dynamics influence chemotherapy response in colorectal cancer. *Science*. 2013;339(6119):543-8.

Kulis M, Esteller M. 2 - DNA Methylation and Cancer. In: Herceg Z, Ushijima T, editors. *Advances in Genetics*. 70: Academic Press; 2010. p. 27-56.

Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(1):9-22.

Li E, Zhang Y. DNA methylation in mammals. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6(5):a019133.

Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*. 1997;275(5308):1943-7.

Li W, Ma H, Zhang J, Zhu L, Wang C, Yang Y. Unraveling the roles of CD44/CD24 and ALDH1 as cancer stem cell markers in tumorigenesis and metastasis. *Sci Rep*. 2017;7(1):13856.

Liu B, Song J, Luan J, Sun X, Bai J, Wang H, et al. Promoter methylation status of tumor suppressor genes and inhibition of expression of DNA methyltransferase 1 in non-small cell lung cancer. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2016;241(14):1531-9.

Liu S, Shi L, Wang Y, Ye D, Ju H, Ma H, et al. Stabilization of Slug by NF-kappaB is Essential for TNF-alpha -Induced Migration and Epithelial-Mesenchymal Transition in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells. *Cellular physiology and*

biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology. 2018;47(2):567-78.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif)*. 2001;25(4):402-8.

Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008;133(4):704-15.

Matsumoto CS, Almeida LO, Guimaraes DM, Martins MD, Papagerakis P, Papagerakis S, et al. PI3K-PTEN dysregulation leads to mTOR-driven upregulation of the core clock gene BMAL1 in normal and malignant epithelial cells. *Oncotarget*. 2016;7(27):42393-407.

Mriouah J, Boura C, Gargouri M, Plenat F, Faivre B. PTEN expression is involved in the invasive properties of HNSCC: a key protein to consider in locoregional recurrence. *Int J Oncol*. 2014;44(3):709-16.

Nakahata S, Ichikawa T, Maneesaay P, Saito Y, Nagai K, Tamura T, et al. Loss of NDRG2 expression activates PI3K-AKT signalling via PTEN phosphorylation in ATLL and other cancers. *Nat Commun*. 2014;5:3393.

Napier SS, Speight PM. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. *J Oral Pathol Med*. 2008;37(1):1-10.

Oka M, Meacham AM, Hamazaki T, Rodic N, Chang LJ, Terada N. De novo DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b primarily mediate the cytotoxic effect of 5-aza-2'-deoxycytidine. *Oncogene*. 2005;24(19):3091-9.

Oskarsson T, Batlle E, Massague J. Metastatic stem cells: sources, niches, and vital pathways. *Cell stem cell*. 2014;14(3):306-21.

Plaks V, Kong N, Werb Z. The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? *Cell stem cell*. 2015;16(3):225-38.

Poeta ML, Manola J, Goldwasser MA, Forastiere A, Benoit N, Califano JA, et al. TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 2007;357(25):2552-61.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414(6859):105-11.

Rinkenbaugh AL, Baldwin AS. The NF-kappaB Pathway and Cancer Stem Cells. *Cells*. 2016;5(2):16.

Roulois D, Loo Yau H, Singhanian R, Wang Y, Danesh A, Shen SY, et al. DNA-Demethylating Agents Target Colorectal Cancer Cells by Inducing Viral Mimicry by Endogenous Transcripts. *Cell*. 2015;162(5):961-73.

Sanchez-Cespedes M, Esteller M, Wu L, Nawroz-Danish H, Yoo GH, Koch WM, et al. Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. *Cancer Res.* 2000;60(4):892-5.

Santuray RT, Johnson DE, Grandis JR. New Therapies in Head and Neck Cancer. *Trends Cancer.* 2018;4(5):385-96.

Schutze S, Wiegmann K, Machleidt T, Kronke M. TNF-A-induced activation of NF-kappa B. *Immunobiology.* 1995;193(2-4):193-203.

Shackleton M, Quintana E, Fearon ER, Morrison SJ. Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell.* 2009;138(5):822-9.

Shao X, Tandon R, Samara G, Kanki H, Yano H, Close LG, et al. Mutational analysis of the PTEN gene in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 1998;77(5):684-8.

Spandidos A, Wang X, Wang H, Seed B. PrimerBank: a resource of human and mouse PCR primer pairs for gene expression detection and quantification. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(Database issue):D792-9.

Squarize CH, Castilho RM, Abrahao AC, Molinolo A, Lingen MW, Gutkind JS. PTEN deficiency contributes to the development and progression of head and neck cancer. *Neoplasia.* 2013;15(5):461-71.

Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet.* 1997;15(4):356-62.

Stephen JK, Chen KM, Havard S, Harris G, Worsham MJ. Promoter methylation in head and neck tumorigenesis. *Methods Mol Biol.* 2012;863:187-206.

Takai N, Kawamata N, Walsh CS, Gery S, Desmond JC, Whittaker S, et al. Discovery of epigenetically masked tumor suppressor genes in endometrial cancer. *Mol Cancer Res.* 2005;3(5):261-9.

Tamguney T, Stokoe D. New insights into PTEN. *J Cell Sci.* 2007;120(Pt 23):4071-9.

Tamura T, Ichikawa T, Nakahata S, Kondo Y, Tagawa Y, Yamamoto K, et al. Loss of NDRG2 Expression Confers Oral Squamous Cell Carcinoma with Enhanced Metastatic Potential. *Cancer Res.* 2017;77(9):2363-74.

The Cancer Genome Atlas N, Lawrence MS, Sougnez C, Lichtenstein L, Cibulskis K, Lander E, et al. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature.* 2015;517:576.

Vander Broek R, Snow GE, Chen Z, Van Waes C. Chemoprevention of head and neck squamous cell carcinoma through inhibition of NF-kappaB signaling. *Oral Oncol.* 2014;50(10):930-41.

Vasudevan KM, Gurumurthy S, Rangnekar VM. Suppression of PTEN expression by NF-kappa B prevents apoptosis. *Mol Cell Biol.* 2004;24(3):1007-21.

Viet CT, Dang D, Achdjian S, Ye Y, Katz SG, Schmidt BL. Decitabine rescues cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS One.* 2014;9(11):e112880.

Vigneswaran N, Williams MD. Epidemiologic trends in head and neck cancer and aids in diagnosis. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2014;26(2):123-41.

Vlahopoulos SA, Cen O, Hengen N, Agan J, Moschovi M, Critselis E, et al. Dynamic aberrant NF-kappaB spurs tumorigenesis: a new model encompassing the microenvironment. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015;26(4):389-403.

Wagner VP, Martins MA, Martins MD, Warner KA, Webber LP, Squarize CH, et al. Overcoming adaptive resistance in mucoepidermoid carcinoma through inhibition of the IKK-beta/IkappaBalpha/NFkappaB axis. *Oncotarget.* 2016;7(45):73032-44.

Wagner VP, Martins MD, Martins MAT, Almeida LO, Warner KA, Nor JE, et al. Targeting histone deacetylase and NFkappaB signaling as a novel therapy for Mucoepidermoid Carcinomas. *Sci Rep.* 2018;8(1):2065.

Wang X, Jiang X. Post-translational regulation of PTEN. *Oncogene.* 2008;27(41):5454-63.

Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.* 2009;45(4-5):309-16.

Wongtrakoongate P. Epigenetic therapy of cancer stem and progenitor cells by targeting DNA methylation machineries. *World J Stem Cells.* 2015;7(1):137-48.

Yang X, Han H, De Carvalho DD, Lay FD, Jones PA, Liang G. Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer. *Cancer Cell.* 2014;26(4):577-90.

Zagni C, Almeida LO, Balan T, Martins MT, Rosselli-Murai LK, Papagerakis P, et al. PTEN Mediates Activation of Core Clock Protein BMAL1 and Accumulation of Epidermal Stem Cells. *Stem cell reports.* 2017;9(1):304-14.

Zakaria N, Mohd Yusoff N, Zakaria Z, Widera D, Yahaya BH. Inhibition of NF-kappaB Signaling Reduces the Stemness Characteristics of Lung Cancer Stem Cells. *Front Oncol.* 2018;8:166.

Zhang S, Yu D. PI(3)king apart PTEN's role in cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16(17):4325-30.

Zhou C, Ye M, Ni S, Li Q, Ye D, Li J, et al. DNA methylation biomarkers for head and neck squamous cell carcinoma. *Epigenetics.* 2018;13(4):398-409.

ANEXO 1 – RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE

REDUÇÃO DE CÉLULAS TRONCO TUMORAIS
INDEPENDENTE DO STATUS DE PTEN EM LINHAGEM DE
CARCINOMA ESPINICELULAR DE LÍNGUA

RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE

7 %	6 %	4 %	2 %
ÍNDICE DE SEMELHANÇA	FONTES DA INTERNET	PUBLICAÇÕES	DOCUMENTOS DOS ALUNOS

FONTES PRIMÁRIAS

1	Submitted to Universidade Estadual de Campinas Documento do Aluno	1 %
2	repositorio.unicamp.br Fonte da Internet	1 %
3	bddd.famerp.br Fonte da Internet	<1 %
4	repositorio.ufpa.br Fonte da Internet	<1 %
5	www.lume.ufrgs.br Fonte da Internet	<1 %
6	repositorio.unifesp.br Fonte da Internet	<1 %
7	estudogeral.sib.uc.pt Fonte da Internet	<1 %
8	arca.icict.fiocruz.br	