



**Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto**  
**Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

---

**VILSON SERAFIM JUNIOR**

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS GENES  
E PROTEÍNAS *NTRK2-TRKB, KRAS* E *HIF1A*  
EM CÉLULA-TRONCO TUMORAL NAS  
LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE  
CABEÇA E PESCOÇO SCC-28 E FADU**

**São José do Rio Preto**  
**2020**

**Vilson Serafim Junior**

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS GENES  
E PROTEÍNAS *NTRK2-TRKB*, *KRAS* E *HIF1A*  
EM CÉLULA-TRONCO TUMORAL NAS  
LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE  
CABEÇA E PESCOÇO SCC-28 E FADU**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina de São José do Rio preto para  
obtenção do Título de Mestre no Curso de  
Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Eixo  
Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientadora: Profa. Dra. Eny Maria Goloni-Bertollo

São José do Rio Preto  
2020

## FICHA CATALOGRÁFICA

Serafim-Junior, Vilson

Expressão diferencial dos genes e proteínas *NTRK2-TrkB*, *KRAS* e *HIF1A* em célula-tronco tumoral nas linhagens celulares de câncer de cabeça e pescoço SCC-28 e FADU.

São José do Rio Preto, 2020.

92 p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientadora: Profa. Dra. Eny Maria Goloni-Bertollo

1. Biologia Molecular; 2. Câncer de Cabeça e Pescoço; 3. Células-Tronco Tumorais;

Este trabalho foi realizado na Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular – UPGEM, Departamento de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP. Recebeu apoio financeiro da CAPES (bolsa de mestrado código 001), FAPESP (Processos nº 2016/20087-1 e 2018/26166-6) e CNPq (Processo nº 310987/2018-0).

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS GENES E  
PROTEÍNAS *NTRK2-TRKB, KRAS E HIF1A*  
EM CÉLULA-TRONCO TUMORAL NAS  
LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE  
CABEÇA E PESCOÇO SCC-28 E FADU**

**BANCA EXAMINADORA**

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU  
DE MESTRE**

Presidente e Orientador: Dra Eny Maria Goloni-  
Bertollo

1º Examinador: Dra Ana Elizabete Silva

2º Examinador: Dra Débora Aparecida Pires de  
Campos Zuccari

1º Suplente: Dra Juliana Garcia de Oliveira Cucolo

2º Suplente: Dr Adriano Mondini

São José do Rio Preto  
2020

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA .....	i
AGRADECIMENTOS .....	iii
EPÍGRAFE .....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE QUADROS E TABELAS .....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	ix
RESUMO.....	xii
ABSTRACT .....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	25
3.1. Cultivo e manutenção de células tumorais de cabeça e pescoço.....	26
3.2. Separação celular por Citometria de Fluxo (FACS) .....	26
3.3. Cultivo de esferas tumorais.....	26
3.4. Ensaio do potencial de invasão celular .....	27
3.5. Ensaio do potencial de migração celular.....	27
3.6. Expressão diferencial dos genes <i>NTRK2</i> , <i>KRAS</i> e <i>HIF1A</i> .....	27
3.7. Expressão proteica de NTRK2, KRAS e HIF1A .....	28
3.8. Forma de análise e disseminação dos resultados .....	29
4. Resultados.....	31
4.1. Identificação e isolamento de Célula Tronco Tumoral de Câncer de Cabeça e Pescoço .....	31
4.2. Ensaio de avaliação de potencial tumorigênico: formação de esferas, invasão e migração. ....	31
4.3 Expressão dos Genes NTRK2, KRAS e HIF1A .....	33
4.4 Expressão das proteínas TrkB, KRAS e HIF1A .....	34
5. DISCUSSÃO .....	36
6. CONCLUSÕES .....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
8. ANEXOS .....	xlix
a. Anexo 1 .....	xlix
b. Anexo 2.....	l
c. Anexo 3.....	lxix

## **DEDICATÓRIA**

**Aos meus pais**, Neuza Grolla e Vilson Serafim por toda educação, carinho, dedicação e empenho para que eu fosse uma pessoa de bem, com índole e caráter .

**À minha irmã**, Andréia Patrícia Dias Ferrari de Oliveira pelo apoio e incentivo durante toda a vida.

**À minha amiga** Luana da Silva por todo o incentivo e apoio.

**Ao meu professor**, Leonardo Guizillini Plazas Ruiz por toda a paciência e dedicação durante o período da graduação, principalmente durante a elaboração do trabalho de conclusão de curso, por ter me incentivado a seguir carreira acadêmica e por ter sido a minha primeira inspiração na ciência.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Criador por ter me dado a vida, saúde e inteligência.

As Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eny Maria Goloni Bertollo e Prof<sup>a</sup> Dra. Érika Cristina Pavarino, pela oportunidade de participar do grupo de pesquisa e desenvolver o projeto, por toda a dedicação, paciência e por todo o conhecimento adquirido durante o período em que passamos juntos.

Aos professores da Pós-Graduação da FAMERP por compartilharem seus conhecimentos, coordenadores Prof. Dr. Mário Abbud Filho e Prof. Dr. Mauricio Lacerda Nogueira e secretários José Antônio, Luiz Henrique e Fabiana.

À FAMERP, FUNFARME por meio de seus diretores Dr. Dulcimar Donizeti de Souza, Dr. Horácio Ramalho e Dr. Jorge Fares.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro para desenvolver este projeto, a CAPES pela bolsa de mestrado.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosa Sayoko Kawasaki Oyama, pelo compartilhamento dos seus conhecimentos e apoio ao desenvolvimento desse trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia Maria Urbanin Castanhole Nunes, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Livia Silva Galbiati Dias e a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Juliana Garcia de Oliveira Cucolo por compartilharem seus conhecimentos e principalmente pela amizade e apoio.

Aos meus colegas de trabalhos e amigos da Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular, Caroline Isak Cuzziol, Lennon Pereira Caires, Marlon Fraga

Mattos, Olivia Borgi Nascimento, Daniel Ramos de Oliveira Santos, Maria Antônia dos Santos Bezerra, Gabriela Helena Rodrigues Fleming, Bianca Barbério Bogdan Tedeschi, Ludimila Leite Marzochi e Nathália Perpétua Peres.

A Dr<sup>a</sup> Glaucia Maria de Mendonça Fernandes, por toda a ajuda, paciência e dedicação em transmitir seus conhecimentos, contribuindo grandemente para o desenvolvimento do projeto e para a minha formação e crescimento profissional.

A Msc Letícia Antunez Muniz Ferreura, doutoranda da UPGEM que me ajudou logo após a minha chegada e me ensinou os procedimentos de cultivo celular, que foram importantes para o desenvolvimento do projeto e para meu crescimento profissional.

Aos pacientes com câncer de cabeça e pescoço que colaboraram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

A todos os meus amigos pelo incentivo, apoio e dedicação.

## EPÍGRAFE

*“Quando você quer alguma coisa, todo o universo conspira para que você realize o seu desejo.”*

*Paulo Coelho*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representação da cascata de proliferação envolvendo TrkB e KRAS.....	20
<b>Figura 2:</b> Esquema representando o processo de angiogênese a partir de vasos sanguíneos já existentes.....	22
<b>Figura 3:</b> Diagrama representando a metodologia utilizada para o desenvolvimento do trabalho.....	25
<b>Figura 4:</b> Resultados dos ensaios de avaliação de potencial tumorigênico das CTTs e não-CTTs das linhagens SCC-28 e FADU.....	32
<b>Figura 5:</b> Expressão gênica relativa de <i>NRTK2</i> , <i>KRAS</i> e <i>HIF1A</i> nas CTTs comparadas com a população de não-CTTs.....	33
<b>Figura 6:</b> Análise da expressão proteica de TrkB, KRAS e HIF1A das CTTs e não-CTTs das linhagens celulares SCC-28 e FADU.....	34

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>Tabela 1</b> Porcentagem de CTTs e não-CTTs das linhagens celulares após separação com o biomarcador ALDH1.....	31
--	----

**LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

AB	Antibiótico
AKT	Proteína quinase B
ALDH	Enzima aldeído desidrogenase
AM	Antimicótico
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro ( <i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i> )
CCP	Câncer de Cabeça e Pescoço
CD117	Fator de crescimento de células-tronco / mastócito
CD133	Antígeno Proeminina-1
CD44	Glicoproteína CD44
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar ( <i>complementary Deoxyribonucleic Acid</i> )
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo ( <i>São Paulo State Research Foundation</i> )
FUNFARME	Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto
GAPDH	Proteína <i>Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase</i>
GRB2	Proteína 2 Ligada a Receptor de Fator de Crescimento ( <i>Growth factor receptor-bound protein 2</i> )
<i>HIF1A</i>	Fator Induzido por Hipoxia 1 Alfa ( <i>Hypoxia Inducible Factor 1 alpha</i> )
<i>HIF1B</i>	Fator Induzido por Hipoxia 1 Beta ( <i>Hypoxia Inducible Factor 1 beta</i> )

---

<i>HRAS</i>	<i>Harvey Rat Sarcoma</i>
<i>KRAS</i>	<i>Kirsten Rat Sarcoma</i>
<i>MAPK</i>	Mitógeno Ativado por Proteína Quinase ( <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i> )
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro ( <i>Ribonucleic Acid meaning</i> )
<i>NRAS</i>	<i>Neuroblastoma Rat Sarcoma</i>
NT-3	Neurotrofina 3
NT-4	Neurotrofina 4
<i>NTRK2</i>	Receptor de Neurotrofina Tirosina Quinase 2 ( <i>Neurotrophin Tyrosine Kinase Receptor 2</i> )
<i>p14</i>	Gene supressor de tumor <i>p14</i>
<i>p16</i>	Gene supressor de tumor <i>p16</i>
<i>p21</i>	Gene supressor de tumor <i>p21</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<i>PI3K</i>	Fosfatidilinositol-3-quinase ( <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i> )
PKB	Proteína Quinase B (Protein Kinase B)
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno (polyvinylidene fluoride)
<i>RAS</i>	Rat Sarcoma
RNA	Ácido Ribonucleico (Ribonucleic Ácid)
RT-PCR	Transcriptase Reversa-Reação em Cadeia da Polimerase ( <i>Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction</i> )
SFB	Soro Fetal Bovino
SHC	Proteína 1 de transformação de SHC ( <i>SHC-transforming protein 1</i> )
SOS	Proteína SOS ( <i>son of sevenless</i> )

<i>SRC</i>	Proto-oncogene tirosina-proteína quinase Src
<i>STAT-3</i>	Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição ( <i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i> )
<i>TP53</i>	Proteína de Tumor 53 ( <i>Tumor protein 53</i> )
<i>TRK</i>	Tropomiosina Relacionada à Quinase ( <i>Tropomyosin Related Kinase</i> )
<i>TrkB</i>	Tropomiosina Relacionada à Quinase B ( <i>Tropomyosin Related Kinase B</i> )
UPGEM	Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular
<i>VEGF</i>	Fator de Crescimento Endotelial Vascular (Vascular Endothelial Growth Factor).

## RESUMO

**Introdução:** O câncer de cabeça e pescoço (CCP) é o sexto tipo tumoral mais incidente no mundo com aproximadamente 600.000 novos casos anualmente. Mesmo com avanços no tratamento, apresenta baixa taxa de sobrevida, que está relacionada com a presença de células-tronco tumorais (CTTs), uma subpopulação celular resistente à quimio e radioterapia, favorecendo a progressão tumoral. Uma proteína importante envolvida nesse processo é a Tropomiosina Relacionada à Quinase B (TrkB), capaz de ativar vias de proliferação como a do *Kirsten Rat Sarcoma* (*KRAS*). *KRAS* ativado por TrkB leva à sobrevivência celular, angiogênese e ativação do Fator Induzido por Hipóxia (*HIF1A*), uma subunidade capaz de estimular a transcrição de genes ligados a malignidade. **Objetivos:** Identificar e isolar CTTs de duas linhagens celulares de CCP (SCC-28- câncer de laringe e FADU-câncer de faringe); avaliar a expressão dos genes e proteínas *NTRK2*-TrkB, *KRAS* e *HIF1A* em CTTs e não-CTTs dessas linhagens. **Material e Métodos:** As linhagens celulares foram cultivadas em meio DMEM suplementado e posteriormente caracterizadas e separadas por citometria de fluxo utilizando o biomarcador Aldeído Desidrogenase (*ALDH*) pelo equipamento FacsAria. Os ensaios de invasão, migração e formação de esferas tumorais foram realizados para validar a separação das populações de CTTs e não-CTTs. A expressão gênica foi realizada pela técnica de Real-Time PCR e a expressão proteica pela técnica de Western Blotting. **Resultados:** O biomarcador *ALDH* foi eficiente para identificar e isolar CTTs das duas linhagens celulares avaliadas. As CTTs apresentaram maior capacidade de invadir (SCC-28  $p=0,0097$ , FADU  $p=0,0029$ ) e migrar (SCC-28  $p=0,0253$ , FADU  $p<0,0001$ ) quando comparadas com as não-CTTs. Também foi possível observar a maior capacidade de formação de esferas tumorais para as CTTs da linhagem celular SCC-28 ( $p=0,0030$ ) com relação as não CTTs, entretanto não houve diferença estatisticamente significativa para a FADU ( $p=0,5810$ ). Na linhagem SCC-28 demonstrou-se expressão gênica aumentada de *KRAS* ( $p=0,0002$ ) nas CTTs quando comparadas as não-CTTs, entretanto essa diferença estatisticamente significativa não ficou evidente para o gene *HIF1A* ( $p=0,0730$ ), e não foi possível detectar a expressão gênica do *NTRK2*. Na linhagem FADU, as CTTs apresentaram expressão gênica aumentada de *NTRK2*, *KRAS* e *HIF1A* ( $p<0,0001$ ,  $p=0,0005$  e  $p<0,0001$

respectivamente) comparadas as não-CTTs. Na análise de expressão proteica, observou-se aumento de expressão de TrkB, KRAS HIF1A nas CTTs das linhagens SCC-28 (p=0,0001, p=0,0004 e p=0,0007, respectivamente) e FADU (p=0,0064, p=0,0156 e p=0,0103, respectivamente) quando comparadas com não-CTTs. **Conclusão:** O biomarcador ALDH pode ser utilizado para identificar e isolar CTTs do CCP e esta população celular apresenta maior capacidade de invadir, migrar e formar esferas tumorais. Os genes e proteínas *NTRK2*, *KRAS* e *HIF1A* apresentam expressão aumentada nas CTTs quando comparadas com não-CTTs, podendo ser alvos promissores para o desenvolvimento de novas terapias contra o câncer.

## ABSTRACT

**Introduction:** Head and neck cancer (HNC) is the sixth most prevalent tumor type worldwide with approximately 600,000 new cases annually. Even with advances in treatment, it has a low survival rate, which can be explained by the presence of cancer stem cells (CSCs), a cell subpopulation resistant to chemo and radiotherapy, favoring tumor progression. Another important structure involved in this process is Tropomyosin Related Kinase B (TrkB), able of activating proliferation pathways such as Kirsten Rat Sarcoma (KRAS). TrkB-activated KRAS leads to cell survival, angiogenesis and activation of the Hypoxia-Induced Factor (HIF1A), a subunit capable of stimulating gene transcription. **Objectives:** To identify and sorting CSCs from two CCP cell lines (SCC-28- laryngeal cancer and FADU-pharyngeal cancer); to evaluate the expression of *NTRK2*-TrkB, *KRAS* and *HIF1A* genes and proteins in CSCs and non- CSCs of these both cell lines. **Material and Methods:** The cell lines were cultured in supplemented DMEM and later separated by flow cytometry using the biomarker Aldehyde Dehydrogenase (ALDH) by the FacsAria equipment. The invasion, migration and formation spheres assays were performed to confirm the effectiveness of sorting. Gene expression was performed using the Real-Time PCR technique and protein expression using the Western Blotting technique. **Results:** The ALDH biomarker was efficient to identify and isolate CSCs from the two cell lines evaluated. CSCs showed greater capacity to invade (SCC-28  $p=0.0097$ , FADU  $p=0.0029$ ) and to migrate (SCC-28  $p = 0.0253$ , FADU  $p <0.0001$ ) when compared with non-CSCs . It was also possible to observe the greater capacity of tumor spheres formation for CTTs of the SCC-28 cell line ( $p=0.0030$ ) compared to non-CTTs, however there was no statistically significant difference for FADU ( $p=0.5810$ ). In the SCC-28 cell line, increased KRAS gene expression ( $p=0.0002$ ) was shown in CSCs when compared to non- CSCs, however this statistically significant difference was not evident for the HIF1A gene ( $p=0.0730$ ) and it was not possible to detect NTRK2 gene expression. In the FADU cell line, CSCs showed increased gene expression of NTRK2, KRAS and HIF1A ( $p<0.0001$ ,  $p=0.0005$  and  $p<0.0001$  respectively) compared to non-CSCs. In protein expression analysis, increased expression of TrkB, KRAS HIF1A was observed in CSCs of SCC-28 cell line ( $p=0.0001$ ,  $p=0.0004$  and  $p=0.0007$ , respectively) and FADU ( $p=0.0064$ ,  $p=0.0156$  and  $p=0.0103$ , respectively) when compared with non-CSCs. **Conclusion:** The biomarcador

ALDH can be used to identify and isolate CSCs from the HNC and this sub-population has a greater capacity to invade, migrate and form tumor spheres. The *NTRK2*, *KRAS* and *HIF1A* genes show increased expression in CSCs when compared to non-CSCs, and can be promising targets for the development of new therapies against cancer.

# INTRODUÇÃO

## **1. INTRODUÇÃO**

O câncer de cabeça e pescoço (CCP) inclui tumores localizados na região dos lábios-cavidade oral, glândula salivar, orofaringe, nasofaringe, hipofaringe, laringe e tireoide (1) com aproximadamente 600.000 novos casos por ano (2). Somando todos os sítios anatômicos acometidos pelo CCP, este passa a ocupar o terceiro lugar em incidência mundial, sendo que 796.922 dos casos são em homens e 657.966 em mulheres (3). A taxa de mortalidade entre os homens é de 348.307 indivíduos, sendo os cânceres de lábios-cavidade oral e de laringe os de maior frequência; já entre as mulheres a taxa de mortalidade é de 138.071 indivíduos, sendo lábios-cavidade oral e glândula tireoide os mais frequentes (3).

No Brasil, os tumores de cabeça e pescoço mais incidentes na população masculina são o de lábios-cavidade oral e laringe, e representam também a maioria dos óbitos. Na população feminina, o câncer mais incidente é o de glândula tireoide, entretanto a maior taxa de mortalidade é representada pelo câncer de lábios-cavidade oral (4). Alguns dos principais fatores etiológicos do CCP são: radiação solar, má higiene bucal, excesso de gordura corporal, má alimentação, dietas ricas em gorduras e ferro ou pobres em vitaminas A, E, C, B2 e proteínas, mau uso da voz, infecções por fungos, infecção pelos vírus Papiloma Vírus Humano (HPV) e *Epstein Barr* (4-6).

No CCP, foi visto que há mutação de 50-100 genes que são considerados responsáveis por direcionar a tumorigênese, entretanto alguns deles estão mutados em uma frequência baixa e as consequências desta mutação ainda não são conhecidas (7). Os principais fatores genéticos e moleculares associados ao CCP envolvem a ativação de oncogenes e inativação de genes supressores de tumor como *H-Ras*, *c-myc*, *ciclina D1*, *EGFR*, *p14*, *p16*, *p21* e *TP53* (7, 8).

Apesar de avanços no tratamento para este tipo de câncer, não houve uma melhora significativa na taxa de sobrevida dos pacientes com essa doença nos últimos anos. A baixa taxa de sobrevida ocorre devido a recidiva loco-regional do tumor e a formação de metástases (9). Uma explicação é a existência de uma pequena população de células-tronco tumorais (CTTs) resistentes à radioterapia e quimioterapia, que torna o tratamento ineficaz e permite que o tumor reapareça (10). As CTTs são caracterizadas pela sua capacidade de autorrenovação, diferenciação e têm um importante papel na iniciação e progressão do câncer (11, 12). Essas células possuem inúmeros mecanismos intrínsecos de resistência aos quimioterápicos convencionais e a radioterapia, o que permite a resistência das CTTs aos tratamentos tradicionais, causando recidiva tumoral e metástases (13).

As CTTs podem ser identificadas utilizando alguns biomarcadores específicos como CD44, CD117, CD133 e Aldeído Desidrogenase (ALDH) (14, 15) e estão relacionadas a um prognóstico ruim. Os processos envolvidos com a autorrenovação dessas células encontram-se desregulados e promovem assim o crescimento do tumor (16). Entretanto, a importância carcinogênica e biológica das CTTs ainda não estão bem definidas em CCP, assim novos estudos com estas células podem levar a tratamentos mais eficazes para reduzir o potencial metastático no CCP (9).

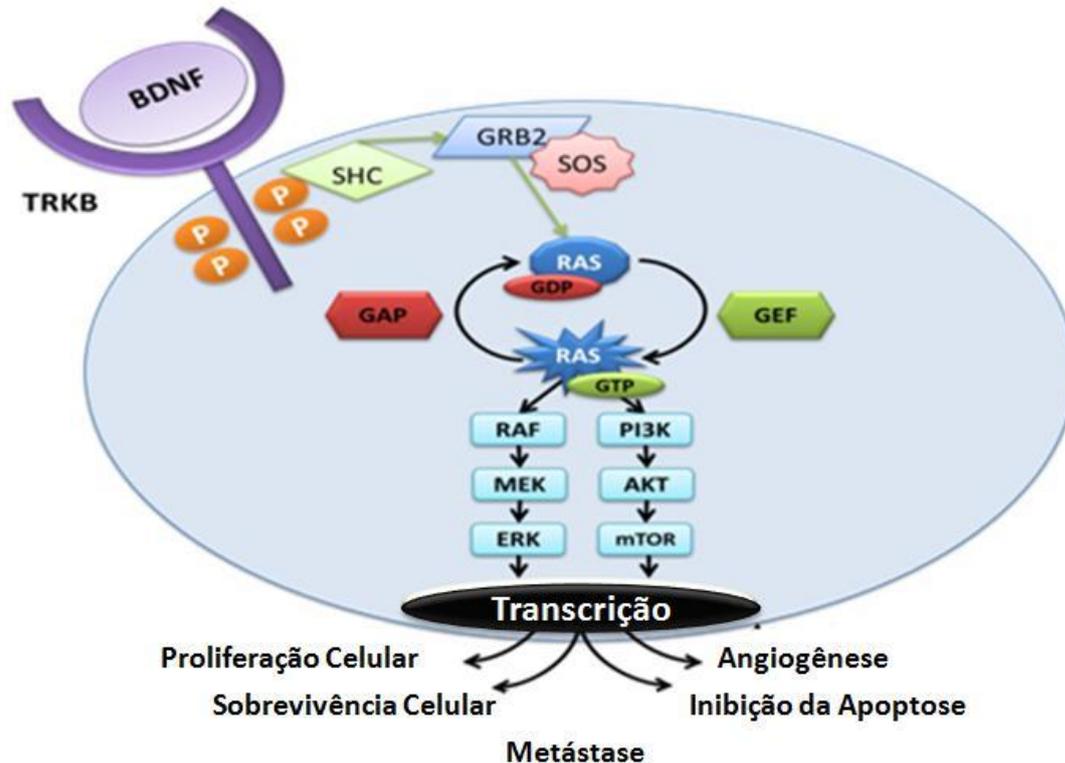
Uma importante proteína envolvida no processo de progressão tumoral é o receptor Tropomiosina Relacionado à Quinase B - *TrkB* (*Tropomyosin-Related Kinase B*), um membro da família de receptores da neurotrofina, que é ativado pelo fator neurotrófico derivado do cérebro – BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*) e, em menor grau, pelas neurotrofinas 3 e 4 (NT-3 e NT-4) (17). Como receptor de tirosina quinase, o TrkB ativa diversas cascatas de sinalização *downstream* que induzem a proliferação celular e mecanismos essenciais à sobrevivência, através das vias da

Protein kinase B (PKB), também conhecida como AKT, da via do transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3- *Signal transducer and activator of transcription 3*) e via mitógeno ativado por proteína quinase (MAPK -*Mitogen activated protein kinases*) (18).

Várias evidências sugerem que o TrkB atua como um regulador chave da oncogênese e da progressão de diversos modelos tumorais (19) como mama, pulmão, neuroblastoma, colorretal, leucemia, câncer cervical, de vesícula biliar, gástrico, renal, esôfago, sarcoma de Ewing e também o câncer de cabeça e pescoço (20-35).

Além disso, o TrkB está envolvido no processo de Transição Epitélio-Mesenquimal (EMT) (36) e sua alta expressão confere às células tumorais uma grande capacidade de invasão, migração e aumento das atividades proliferativas (23). A resistência às drogas (35) e resistência à morte celular por perda de adesão (*anoikis*) também é uma característica presente em tumores com alta expressão desse receptor (29).

O BDNF induz a dimerização do TrkB, ativando o domínio da tirosina quinase, levando à ativação de uma cascata de sinalização, que por sua vez, ativa as principais vias de sinalização reguladas por fatores de crescimento como a via MAPK e a via da Fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) por meio da ativação de membros da família *Rat Sarcoma* (RAS) (37) como demonstrada na Figura 1.



**Figura 1:** Visão esquemática da sinalização dos receptores TrkB. A fosforilação leva à ativação da cascata de sinalização da proteína quinase ativada por Ras-mitógeno (MAPK), que promove a diferenciação e crescimento de células através da MAPK / ERK quinase (MEK) e cinase regulada por sinal extracelular (ERK) e para a ativação da cascata de fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), que promove a sobrevivência e crescimento de células através do aglutinante associado a Ras, por meio do sítio da proteína adaptadora SHC. BDNF, fator neurotrófico derivado do cérebro; GRB2, fator de crescimento proteína 2 ligada ao receptor; MEK, proteína quinase ativada por mitógeno; PI3K, fosfatidilinositol-3-quinase; RAS, sarcoma quinase de rato; SHC, Src homologia 2 domínio contendo; SOS, “*Son of Sevenless*” (Adaptado de Minichiello, 2009 e Amatu, Sartore-Bianchi & Siena, 2016).

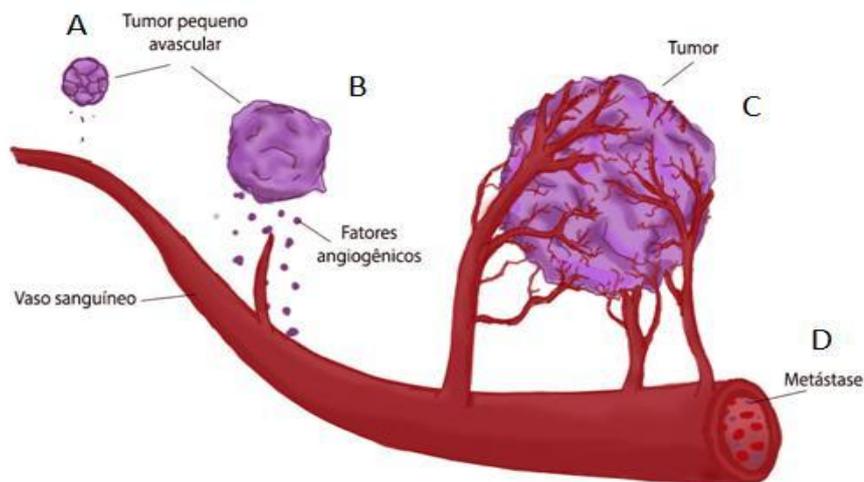
O gene *Ras* (*rat sarcoma*) compreende uma família de genes composta por três membros (isoformas), o *HRAS*, *NRAS* e *KRAS*, sendo este último o mais importante (38). Mesmo sem estímulo de fatores de crescimento, *KRAS*, quando mutado, é capaz de ativar vias que levam à sobrevivência e ao aumento da proliferação celular (39, 40).

Este gene codifica pequenas GTPases, ativadas indiretamente via estímulo externo, como por exemplo, por meio de ligação com receptores de tirosina quinases (41).

Todos os membros da família *RAS* estão envolvidos na formação e progressão do câncer e mutações levando à ativação do *RAS* são encontradas em cerca de 30% das neoplasias (42). Mutações no *KRAS* tem sido associada ao aumento da tumorigenicidade e a um prognóstico ruim, o que o torna um atrativo alvo terapêutico para diferentes tipos tumorais (43, 44).

Quando ocorre um aumento exacerbado na proliferação celular, uma maior demanda de oxigênio é necessária para garantir a sobrevivência das células, e em condições de hipóxia, há a ativação do fator induzido por hipóxia (*HIF1-Hypoxia Inducible Factor 1*). O *HIF-1* é um fator de transcrição heterodimérico composto por duas proteínas *basic helix-loop-helix*: *HIF1A* (Hypoxia Inducible Factor 1 A) e *HIF1B* (Hypoxia Inducible Factor 1 B). Acredita-se que a ativação deste gene pode promover a formação de novos vasos e afetar a invasão e metástase pela via *STAT3-p-STAT3-HIF-1A-VM* (45).

A alta expressão de *HIF1A* está associada ao grau de malignidade histológica do tumor, recorrência tumoral, metástase e também com o estágio clínico avançado de uma grande variedade de cânceres (46-48). *HIF1A* também pode levar aumento da expressão de proteínas como N-caderina, Vimentina e diminuição de E-caderina (proteínas envolvidas no processo de transição epitélio-mesenquimal), conferindo maior mobilidade as células do câncer, além de aumentar a expressão de CD44, ALDH (biomarcadores de CTTs) e a ativação do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (*VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor*), fator de crescimento responsável pela formação de novos vasos sanguíneos, processo denominado de angiogênese, podendo ocasionar metástase (49) como mostrado na Figura 2.



**Figura 2:** Demonstração do processo de formação de novos vasos através da produção de fatores angiogênicos. A) o tumor em estágio inicial, não vascularizado. B) Aumento da massa tumoral e maior necessidade de oxigênio. Em condição de hipóxia, há a ativação de vias que levam a produção e liberação de fatores angiogênicos. C) Formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos existentes nas regiões próximas ao tumor, levando oxigênio e nutrientes. D) Chegada de células tumorais na corrente sanguínea, possibilitando o surgimento de tumores secundários advindos de células do tumor inicial. Adaptado de Feron, 2018 (50).

Com base nos dados levantados, o presente estudo tem como objetivo avaliar a expressão dos genes e proteínas *NTRK2-TrkB*, *KRAS* e *HIF1A* em células-tronco tumorais do câncer de cabeça e pescoço. O entendimento dos fatores genéticos e moleculares das CTTs pode contribuir para o desenvolvimento de terapias mais eficazes no combate ao câncer, além da identificação de novos biomarcadores para este modelo tumoral, proporcionando uma melhor qualidade de vida aos pacientes acometidos por esta neoplasia.

## **2. OBJETIVOS**

- Identificar e isolar células-tronco tumorais (CTTs) e células tumorais não tronco (não-CTTs) de duas linhagens celulares (SCC-28 – carcinoma de laringe e FADU – câncer de faringe) utilizando o biomarcador ALDH;

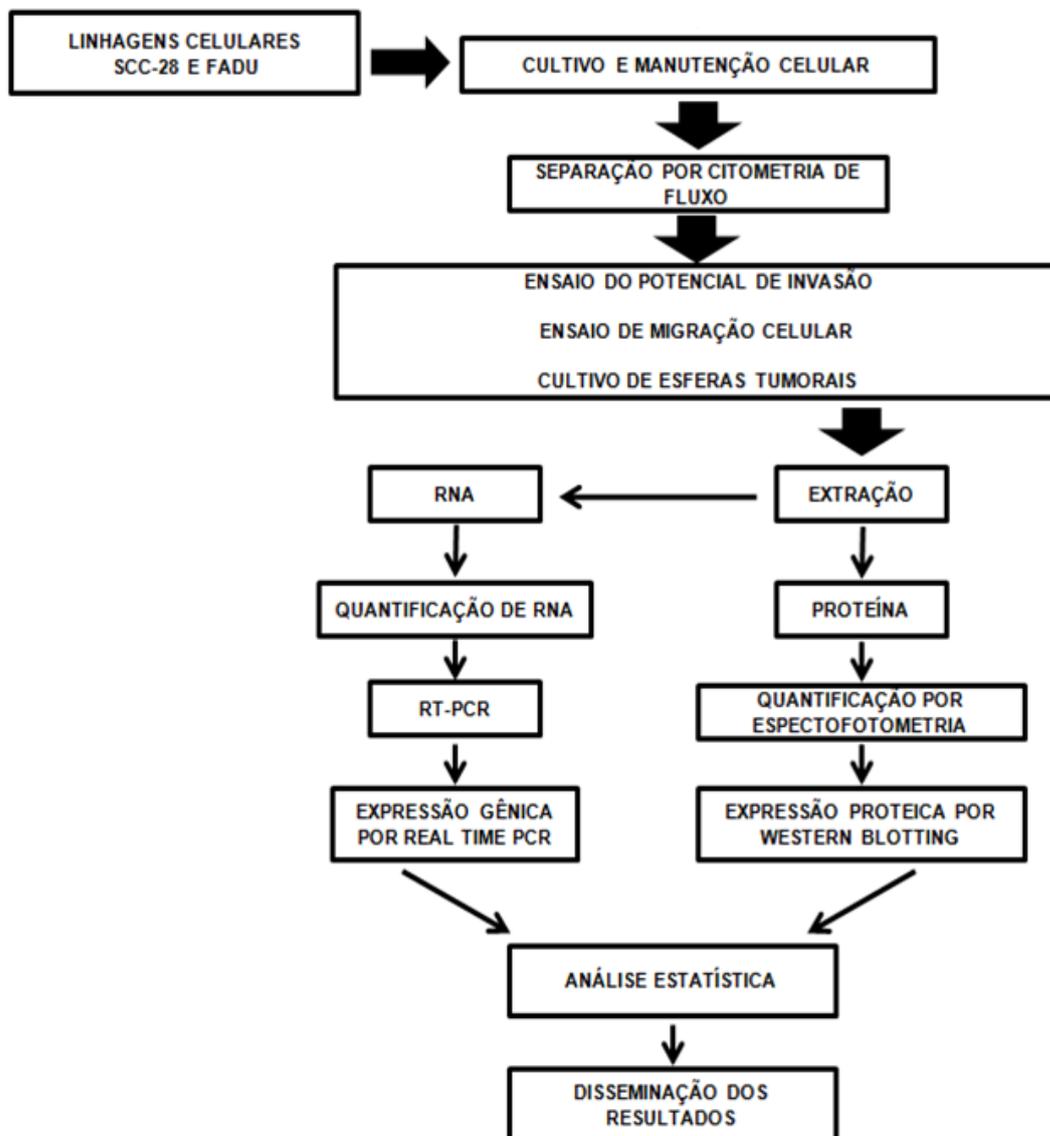
- Avaliar a expressão dos genes *NTRK2*, *KRAS* e *HIF1A* em células-tronco tumorais e em células tumorais não tronco de câncer de cabeça e pescoço;

- Avaliar a expressão das proteínas TrkB, KRAS e HIF1A em células-tronco tumorais e em células tumorais não tronco de câncer de cabeça e pescoço

# MATERIAL E MÉTODOS

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP, de acordo com as Normas Regulamentares de Pesquisa em Seres Humanos, Resolução 466/12 do Ministério da Saúde (Parecer nº 903.775 e CAAE nº 37632114.9.0000.5415). Foram avaliadas duas linhagens celulares de cabeça e pescoço (SCC-28 – câncer de laringe e FADU – câncer de faringe). As linhagens celulares já se encontravam armazenadas no laboratório. A metodologia utilizada no presente trabalho está detalhada na Figura 3.



**Figura 3:** Diagrama com o resumo da metodologia utilizada para a elaboração do presente estudo.

### **3.1. Cultivo e manutenção de células tumorais de cabeça e pescoço**

As células foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup> (T-25) contendo meio de cultura DMEM (dulbecco's modified eagle médium), suplementado com soro fetal bovino (SFB) (Bovine Calf Sera, Gibco™, Invitrogen Corporation, Burlington, Canada), Ham's Nutrient Mixture F12 (HAMF-12, Sigma-Aldrich Co.), Antibiótico/Antimicótico (AB/AM) - 1% de Penicilina, Streptomina e anfotericina B (Gibco™) e 1 mL L-Glutamina por tempo necessário para a multiplicação e obtenção de número suficiente de células para separação (aproximadamente 2,0x10<sup>6</sup>).

### **3.2. Separação celular por Citometria de Fluxo (FACS)**

Foram realizadas a identificação e isolamento das populações de células marcadas com ALDH<sup>+</sup> e ALDH<sup>-</sup> das duas linhagens celulares por meio de citometria de fluxo em equipamento Cell Sorting BD FACSAria Fusion (BD Biosciences).

### **3.3. Cultivo de esferas tumorais**

O potencial de formação de esferas tumorais das células ALDH<sup>+</sup> e ALDH<sup>-</sup> foi avaliado por meio do cultivo celular em frascos de baixa aderência (Ultra-low Attachment plates) (Corning) As linhagens foram plaqueadas a uma densidade de 1x10<sup>4</sup> células, incubadas em meio DMEM, sem SFB, suplementado com AB/AM 1%, a 37°C, com CO<sub>2</sub> à 5%, em atmosfera umidificada por 120 horas (5 dias). O ensaio foi fotografado logo após as células serem plaqueadas (0 horas) e após o término do período de incubação (120 horas). Ao final, as esferas tumorais foram contadas com a utilização do ImageJ (versão 4.0) e as análises estatísticas foram realizadas para comparação entre os grupos ALDH<sup>+</sup> e ALDH<sup>-</sup>.

### **3.4. Ensaio do potencial de invasão celular**

Neste ensaio foi utilizada uma câmara de invasão em Matrigel (Becton e Dickinson) para avaliação do potencial de invasão das CTTs e não-CTTs.  $1 \times 10^4$  células foram cultivadas sobre o inserto com 300  $\mu$ L de meio DMEM sem SFB e na parte inferior da câmara foram acrescentados 750  $\mu$ L meio DMEM suplementado com SFB 10%, em triplicata. As células plaqueadas nos insertos foram incubadas a 37°C por 24 horas e, as células que passaram pela matriz de gel foram fixadas com formaldeído 4% por 20 minutos, desidratadas com etanol 100%, coradas com Giemsa ou Violeta Cristal e fotografadas em quatro diferentes campos, utilizando-se microscópio invertido, em aumento de 100x. As células foram contadas com o auxílio do Software ImageJ (versão 4.0).

### **3.5. Ensaio do potencial de migração celular**

Os procedimentos seguidos para o ensaio do potencial de migração foram os mesmos descritos no ensaio de potencial de invasão, entretanto, a câmara de migração não possui matriz de gel.

### **3.6. Expressão diferencial dos genes *NTRK2*, *KRAS* e *HIF1A*.**

#### **a. Extração do RNA**

O RNA total das culturas celulares foi extraído utilizando-se o método de Trizol (Invitrogen) e, de acordo com instruções do fabricante. A concentração do RNA extraído foi obtida utilizando-se o kit Qubit™ RNA HS Assay Kit by Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies') de acordo com o protocolo do fabricante.

## **b. RT-PCR (Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction)**

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) em uma reação com volume de 10-20ul contendo 2-5ug de RNA total, conforme instruções do fabricante.

## **c. Análise da Expressão gênica.**

Foi realizada a técnica de PCR em tempo real para quantificar a expressão dos genes utilizando sondas específicas para o *NTRK2* (Hs00178811), *KRAS* (Hs00364284) e *HIF1A* (Hs00153153) (PCR Master Mix – Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Essas análises foram realizadas em triplicata. O número de cópias dos transcritos foi obtido de acordo com cada curva padrão. As reações foram realizadas em placas de 96 wells, no equipamento StepOne (Applied Biosystems).

Dois genes *housekeeping* (GAPDH e Beta-actina), frequentemente utilizados em estudos de câncer, foram utilizados para normalizar a expressão gênica relativa de *NTRK2*, *KRAS* e *HIF1A*, em relação as diferenças na quantidade, qualidade de RNA e eficiência da reação de transcrição reversa entre as amostras. Os genes normalizadores foram amplificados e detectados por sonda Taqman (Kit PCR Master Mix - Applied Biosystems), de acordo com instruções do fabricante.

## **3.7. Expressão proteica de TrkB, KRAS e HIF1A**

### **a. Extração e quantificação das proteínas pela Técnica de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)**

A proteína total foi extraída da cultura de  $1,0 \times 10^6$  com Tampão RIPA Sigma Aldrich® de acordo com instruções do fabricante. A quantificação proteica para encontrar as concentrações ideais nas reações, a fim de obter maior eficiência foi realizada com o Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) de acordo com orientação do fabricante. A leitura foi feita por espectrofotometria utilizando o

equipamento Multiskan (Thermo Scientific) e o software Skanlt Multiskan FC versão 3.1.

#### **b. Dosagem de proteínas específicas pela técnica de western blotting**

A expressão das proteínas TrkB, KRAS e HIF1A foi realizada através da técnica de western blotting. Utilizou-se gel de separação de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE- 4-12%) para separar as proteínas totais de acordo com o peso molecular. Após a separação, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF - iBlot® Gel Transfer Stacks PVDF, Regular (Invitrogen) utilizando iBlot™ Gel Transfer System (Invitrogen). As proteínas de interesse foram marcadas com anticorpos policlonais específicos - TrkB (Abcan), B-actina (Sigma) e HIF1A (Invitrogen) em diluição de 1:1000, KRAS (ANOVA) e em diluição 2,5:1000 - overnight. Os anticorpos secundários (anti-Rabbit ou anti-Mouse) foram utilizados nas concentrações 1:20.000 durante 1 hora. As bandas foram fotografadas e a quantificação foi realizada utilizando o software Image J versão 4.0.

#### **3.8. Forma de análise e disseminação dos resultados**

Foram realizadas análises estatísticas descritivas e específicas neste estudo. Os resultados obtidos foram inicialmente submetidos ao teste de verificação de normalidade pelo teste D'Agostino-Pearson omnibus, e em seguida as duas populações celulares CTTs e não-CTTs foram comparadas por meio dos testes Kolmogorov Smirnov ou teste T. Os valores de expressão gênica e proteica para CTTs e não CTTs foram apresentados como média e os valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. As análises estatísticas foram realizadas no Graphpad Prism (versão.6.0).

# RESULTADOS

## **4. Resultados**

### **4.1. Identificação e isolamento de Célula Tronco Tumoral de Câncer de Cabeça e Pescoço**

O biomarcador ALDH foi eficaz para identificar e isolar CTTs e não CTTs nas duas linhagens celulares avaliadas (Tabela 1).

Tabela 1: Porcentagem de CTTs e não-CTTs das linhagens celulares SCC-28 e FADU.

	<b>SCC-28</b>	<b>FADU</b>
<b>CTTs (ALDH<sup>+</sup>)</b>	15,8%	8,1%
<b>Não-CTTs (ALDH<sup>-</sup>)</b>	7,9%	57,6%

### **4.2. Ensaios de avaliação de potencial tumorigênico: formação de esferas, invasão e migração.**

As células ALDH<sup>+</sup> das duas linhagens, SCC-28 e FADU, apresentaram maior capacidade de invasão ( $p=0,0097$  e  $p=0,0029$ , respectivamente) e migração ( $p=0,0253$  e  $p<0,0001$ , respectivamente) quando comparadas com as células ALDH<sup>-</sup>, como mostrado na Figura 4 A e B. Quanto ao resultado da formação de esferas tumorais, a linhagem SCC-28 não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos CTT e não-CTT quanto a capacidade de formar esferas tumorais (Média= 17,00 esferas) e não-CTTs (Média= 12,0 esferas) ( $p=0,5810$ ). Na linhagem FADU houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos CTT e não-CTT quanto a capacidade de formar esferas tumorais (Média= 53,67 esferas) e não-CTTs (Média= 34,00 esferas),  $p=0,0030$ . Figura 4 C.

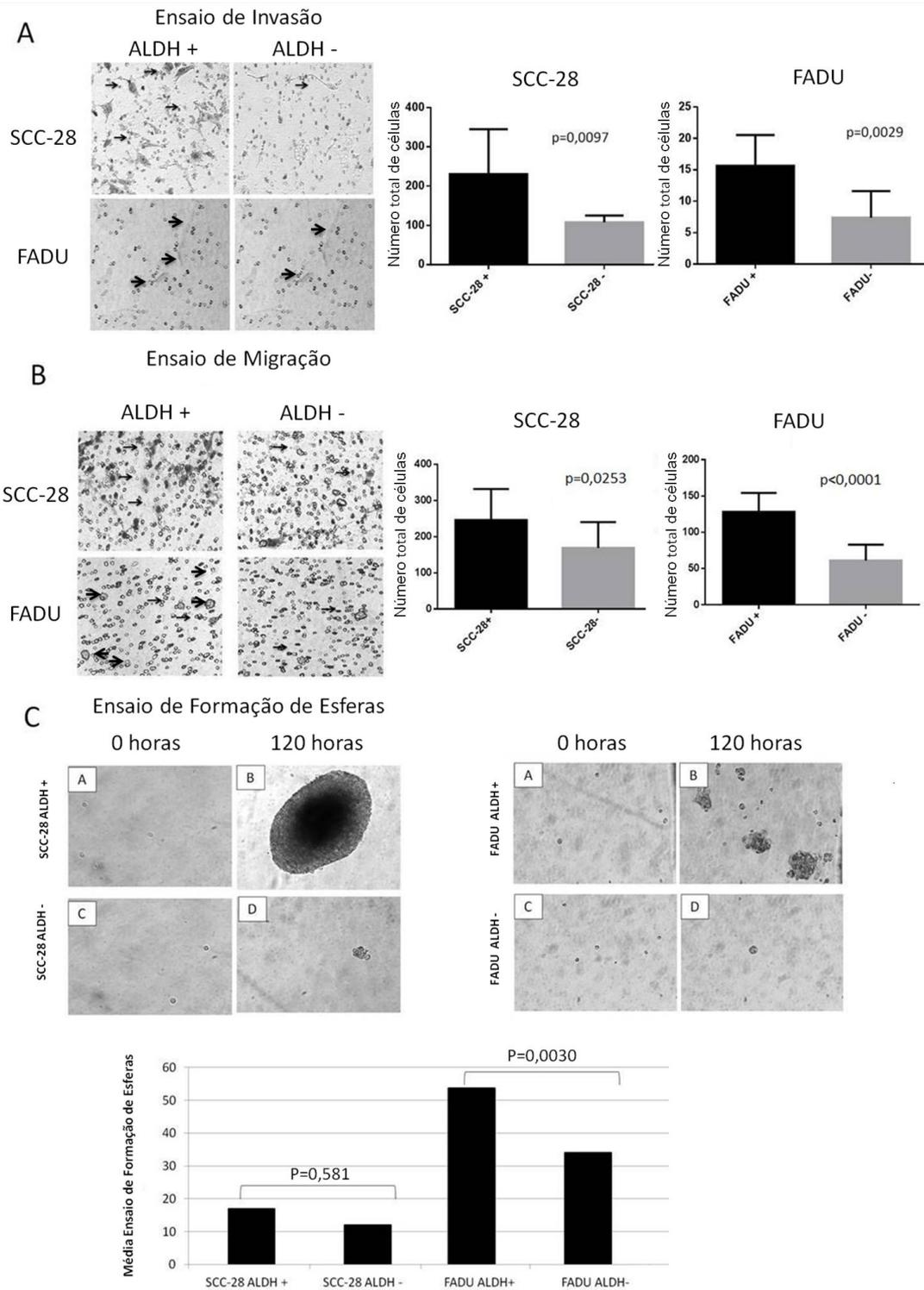


Figura 4. Resultados dos ensaios de avaliação de potencial tumorigênico das CTTs e não-CTTs das linhagens SCC-28 e FADU. 1A: ensaio de invasão CTTs. 1B: ensaios de migração. 1C: ensaio de formação de esferas tumorais, as células foram fotografadas no tempo de 0 horas e após 120 horas.

### 4.3 Expressão dos Genes *NTRK2*, *KRAS* e *HIF1A*

Para a linhagem SCC-28 a expressão do gene *KRAS* apresentou-se aumentada na população de CTTs (RQ=1,46) quando comparada as não-CTTs (RQ=1,00),  $p=0,0002$ . Entretanto, não se observou diferença estatisticamente significativa na expressão gênica do *HIF1A* na população de CTTs (RQ= 1,22) com relação as não-CTTs (RQ=1,00),  $p=0,0730$ . Por fim, não foi possível detectar níveis de expressão gênica do *NTRK2* para esta linhagem celular (Figura 5A).

Na análise realizada para a linhagem FADU demonstrou-se um aumento da expressão dos genes *NTRK2*, *KRAS* e *HIF1A* no grupo das CTTs (RQ= 8,68, RQ=3,75 e RQ=7,20) quando comparadas as não CTTs (RQ=1,00),  $p<0,0001$ ,  $p=0,0005$  e  $p<0,0001$ , respectivamente (Figura 5B).

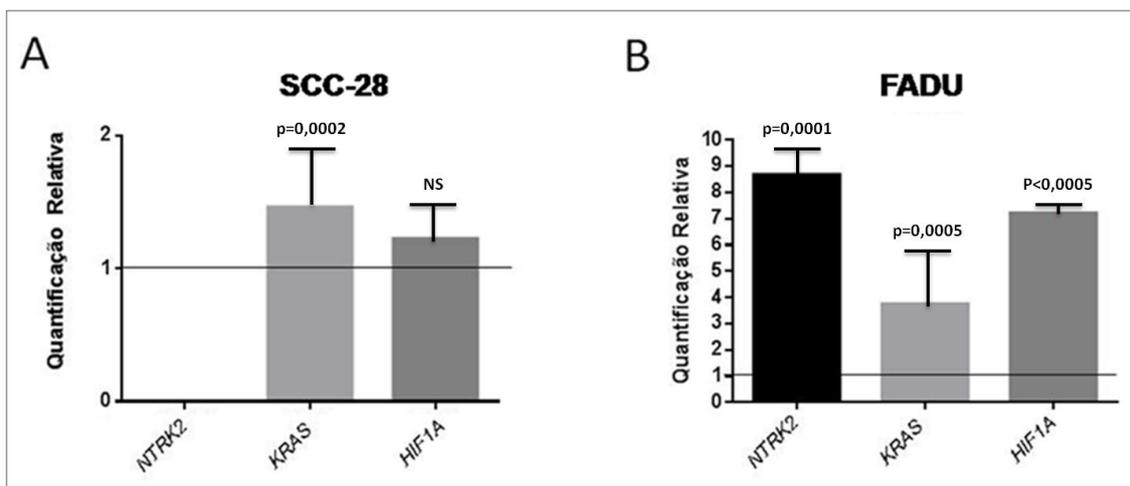


Figura 5: Expressão gênica relativa de *NTRK2*, *KRAS* e *HIF1A* nas CTTs comparadas com a população de não-CTTs. A) Na linhagem SCC-28 destaca-se a expressão gênica aumentada do *KRAS* nas CTTs (RQ=1,22) com relação as não-CTTs, ( $p=0,0002$ ). B) Na linhagem FADU observa-se um aumento da expressão de *NTRK2*, *KRAS* e *HIF1A* no grupo das CTTs (RQ= 8,68, RQ=3,75 e RQ=7,20) quando comparadas as não CTTs (RQ=1,00),  $p<0,0001$ ,  $p=0,0005$  e  $p<0,0001$ , respectivamente.

#### 4.4 Expressão das proteínas TrkB, KRAS e HIF1A

A linhagem SCC-28 apresentou expressão aumentada de TrkB, KRAS e HIF1A (RQ=1,41, RQ=1,14 e 1,32 respectivamente) com diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0,0001$ ,  $p=0,0004$  e  $p=0,0007$  respectivamente). O mesmo foi observado na linhagem FADU, com expressão elevada de TrkB, KRAS e HIF1A (RQ=1,78, RQ=1,10 e RQ=1,76 respectivamente) na subpopulação de CTTs quando comparada com não-CTTs ( $p=0,0064$ ,  $p=0,0156$  e  $p=0,0103$  respectivamente) como mostra a figura 6.

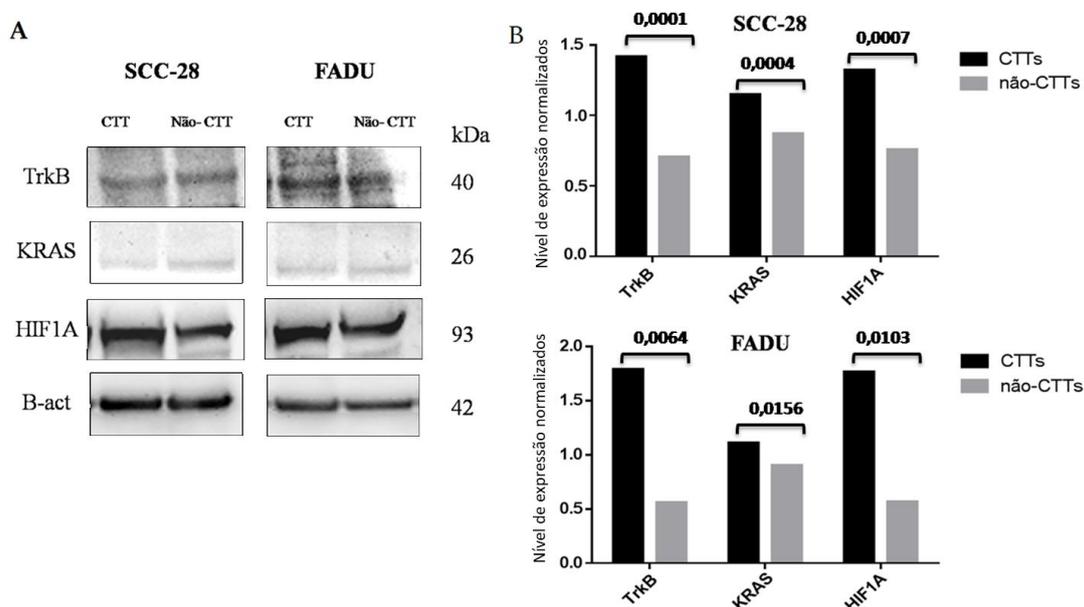


Figura 6: Análise da expressão proteica de TrkB, KRAS e HIF1A das CTTs e não-CTTs das linhagens celulares SCC-28 e FADU. A) Imagem das membranas de western blotting; B) Quantificação proteica relativa nas CTTs em comparação as não-CTTs nas linhagens SCC-28 e FADU. Foi utilizado o software Image J versão 4.0.

**DISCUSSÃO**

## **5. DISCUSSÃO**

Para o presente estudo foram utilizadas linhagens celulares de duas regiões anatômicas diferentes de câncer de cabeça e pescoço, a SCC-28 representativa de células de câncer de laringe e a FADU representativa de células do câncer de faringe. Na literatura, observa-se que dentre os tumores que acometem a região da cabeça e pescoço, o câncer de cavidade oral e o de laringe são os mais incidentes e com maior taxa de mortalidade na população masculina, enquanto que na população feminina câncer de cavidade oral é o que apresenta os maiores índices (4).

Foi possível também identificar e isolar as células-tronco tumorais das duas linhagens celulares de carcinoma de cabeça e pescoço utilizando-se o biomarcador ALDH, e as células marcadas positivamente apresentaram maior potencial tumorigênico, capacidade de invasão e migração em relação às células não marcadas. Estas características que confirmam a presença das CTTs podem estar relacionadas à maior agressividade tumoral, mau prognóstico e formação de metástase (11, 51, 52).

Estudos reportam que o uso individual dos biomarcadores é bem aceito como indicador de células-tronco (53-57). ALDH consiste em uma família de isoenzimas que atuam no processo de conversão do retinol em ácido retinóico, mas também tem papel na desintoxicação e diferenciação celular, além de atuar com papel na resistência às drogas (57-59). É um marcador intracelular largamente utilizado para identificar e isolar CTTs em diversos tipos tumorais e as populações celulares que apresentam característica de CTTs tem maior capacidade de invadir, migrar e formar esferas tumorais (60-63).

As CTTs desempenham um papel muito importante no tumor, e têm sido implicadas como responsáveis pela iniciação, manutenção, autorrenovação e diferenciação de vários tipos tumorais (11, 12, 56, 60, 61, 63-65). No CCP, as CTTs são

responsáveis pela resistência à quimio e radioterapia, estão relacionadas com a transição epitélio-mesenquimal, aumento do reparo de DNA, imortalidade celular e recidiva tumoral (66).

No presente estudo, também foi possível demonstrar que houve um aumento da expressão do gene *NTRK2* e da proteína TrkB no grupo das CTTs com relação as não-CTTs na linhagem FADU e que a expressão gênica para a linhagem SCC-28 não foi detectável. O receptor TrkB está super expresso em diversos tipos de câncer (21, 23, 67) e este aumento pode estar associado às características atribuídas as CTTs, como as já citadas, proliferação celular, invasão, migração, além de ter relação com o EMT, resistência à apoptose e resistência à morte celular por perda de adesão (25). Estudos mostram que TrkB está expresso entre 30-50% dos CCP, mas comumente não está expresso na mucosa normal (68, 69). Essa baixa taxa de expressão pode justificar os níveis de expressão encontrados de *NTRK2* e TrkB na linhagem SCC-28.

Até o momento, não há na literatura estudos avaliando o papel do TrkB em CTTs de CCP. Resultados discutidos em câncer de mama triplo negativo mostraram que CTTs que apresentavam alta expressão de TrkB eram responsáveis pelo reaparecimento do tumor após a quimioterapia, e que a retirada dessa subpopulação do tumor levou à prevenção da recidiva tumoral em modelos de camundongo (62). Estudos prévios ainda não publicados do nosso grupo de pesquisa (70) não conseguiu demonstrar níveis de expressão gênica detectáveis de *NTRK2* em outra linhagem celular de câncer de cabeça e pescoço, a HEp-2.

Lawn e colaboradores, 2015, em um estudo com glioma maligno humano, demonstraram que as CTTs com alta expressão de TrkB foram associadas à iniciação e progressão tumoral. A ativação de TrkB pelo seu principal ligante BDNF levou à ativação das vias ERK e Akt, ocasionando um aumento significativo na viabilidade das

CTTs. Após o bloqueio do TrkB por knockdown ou utilização de drogas, houve inibição da proliferação de CTTs. (71)

Também foi possível demonstrar uma expressão gênica e proteica aumentada para KRAS e HIF1A entre as CTTs nas duas linhagens celulares avaliadas. O microambiente em condições de hipóxia é comum em diversos tipos tumorais, incluindo o CCP, e está relacionado a uma neoplasia mais agressiva (49, 72-74). Assim, a hipóxia atuaria alterando a morfologia das células, além de induzir o EMT e a metástase tumoral (75). Um modelo utilizando cultura 3D em câncer de cabeça e pescoço demonstrou uma expressão aumentada de *HIF1A* nas células submetidas à hipóxia quando comparadas com células em condições de normoxia. Estes dados sugerem que as baixas taxas de oxigenação podem promover a angiogênese, indicando associação com a agressividade tumoral (49).

KRAS desempenha um papel crucial no processo de proliferação celular (44, 76) e sua mutação pode levar ao aumento da expressão da proteína HIF1A (77). Yoshikawa e colaboradores, 2017 (78) utilizaram uma droga inibidora de KRAS e viram que esta inibição levou a diminuição da expressão da proteína HIF1A, indicando que a alta expressão de KRAS pode estar diretamente relacionada com a expressão de HIF1A, como no presente estudo.

Além do receptor TrkB, outras tirosinas quinases são responsáveis pela ativação de HIF1A através das vias PI3K e MAPK, como o Fator de Crescimento de Fibroblasto e o Fator de Crescimento de Insulina (79-81), mostrando que a alta expressão de HIF1A na linhagem celular SCC-28 pode estar relacionada com alguma outra tirosina quinase não avaliada nesse estudo.

Tumores que apresentam CTTs mostraram ser mais resistentes à quimio e radioterapia devido à capacidade aumentada de reparo de DNA, que leva à imortalidade

celular (66). Além disso, CTTs tem alto grau de diferenciação e autorrenovação desempenhando papel crucial no desenvolvimento, manutenção do câncer e juntos estes efeitos levam a um pior prognóstico (9, 11, 12).

Nossos resultados demonstram que, o uso individual do biomarcador ALDH é eficaz na identificação de células-tronco tumorais de câncer de cabeça e pescoço, sendo que este subgrupo celular apresentou maior potencial de invasão, migração e formação de esferas. Além disso, evidenciou-se uma maior expressão gênica e proteica dos genes *NTRK2*, *KRAS* e *HIF1A* nas CTTs quando comparadas com não-CTTs, podendo ser alvos promissores para o desenvolvimento de novas terapias contra o câncer (75).

# CONCLUSÕES

## **6. CONCLUSÕES**

No presente estudo, considerando-se as linhagens celulares utilizadas e as técnicas empregadas, é possível obter-se as seguintes conclusões:

- O biomarcador ALDH é eficaz para isolar células-tronco tumorais do câncer de cabeça e pescoço e essa subpopulação tem grande capacidade de invasão, migração e formação de esferas tumorais.

- Células-tronco tumorais do câncer de cabeça e pescoço da linhagem FADU apresentam alta expressão de genes *NTRK2*, *KRAS* e *HIF1A* quando comparadas com células tumorais não tronco, enquanto que para a linhagem celular SCC-28 este aumento é evidente apenas para o gene *KRAS*.

- Nas duas linhagens celulares avaliadas de câncer de cabeça e pescoço, SCC-28 e FADU, as células-tronco tumorais demonstram aumento da expressão proteica de TrkB, *KRAS* e *HIF1A* quando comparados com células tumorais não tronco.

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rogers SN, Barber B. Using PROMs to guide patients and practitioners through the head and neck cancer journey. *Patient Relat Outcome Meas.* 2017;8:133-42.
2. Basak SK, Zinabadi A, Wu AW, Venkatesan N, Duarte VM, Kang JJ, et al. Liposome encapsulated curcumin-difluorinated (CDF) inhibits the growth of cisplatin resistant head and neck cancer stem cells. *Oncotarget.* 2015;6(21):18504-17.
3. O Câncer de Cabeça e Pescoço no GLOBOCAN 2018 [Internet]. 2018. Available from: <http://www.gbc.org.br/o-cancer-de-cabeca-e-pescoco-no-globocan-2018/>.
4. INCA. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - CÂNCER DE BOCA 2020
5. RBAC. Fatores de risco e principais alterações citopatológicas do câncer bucal. 2020.
6. Sírio-Libanês. Conteúdos para Você: Câncer de cabeça e pescoço é um dos tumores mais frequentes em homens 2020.
7. Colombo J, Rahal P. Alterações Genéticas em Câncer de Cabeça e Pescoço 2009.
8. **Galbiatti ALS, Padovani-Junior JA, Maniglia JV, Rodrigues CDS, Pavarino EC, Goloni-Bertollo EM. Câncer de cabeça e pescoço: causas, prevenção e tratamento.** *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology* [Internet]. 2013.
9. Shrivastava S, Steele R, Sowadski M, Crawford SE, Varvares M, Ray RB. Identification of molecular signature of head and neck cancer stem-like cells. *Sci Rep.* 2015;5:7819.
10. Colvin H, Mori M. Getting to the heart of the matter in cancer: Novel approaches to targeting cancer stem cells. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2017;93(3):146-54.
11. Atashzar MR, Baharlou R, Karami J, Abdollahi H, Rezaei R, Pourramezan F, et al. Cancer stem cells: A review from origin to therapeutic implications. *J Cell Physiol.* 2020;235(2):790-803.
12. Papaccio F, Paino F, Regad T, Papaccio G, Desiderio V, Tirino V. Concise Review: Cancer Cells, Cancer Stem Cells, and Mesenchymal Stem Cells: Influence in Cancer Development. *Stem Cells Transl Med.* 2017;6(12):2115-25.
13. Ciurea ME, Georgescu AM, Purcaru SO, Artene SA, Emami GH, Boldeanu MV, et al. Cancer stem cells: biological functions and therapeutically targeting. *Int J Mol Sci.* 2014;15(5):8169-85.
14. Curtarelli RB, Gonçalves JM, Dos Santos LGP, Savi MG, Nör JE, Mezzomo LAM, et al. Expression of Cancer Stem Cell Biomarkers in Human Head and Neck Carcinomas: a Systematic Review. *Stem Cell Rev.* 2018;14(6):769-84.
15. Miettinen M, Lasota J. KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2005;13(3):205-20.
16. Lathia JD, Liu H. Overview of Cancer Stem Cells and Stemness for Community Oncologists. *Target Oncol.* 2017;12(4):387-99.
17. Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2006;361(1473):1545-64.
18. Yilmaz T, Jiffar T, de la Garza G, Lin H, Milas Z, Takahashi Y, et al. Therapeutic targeting of Trk suppresses tumor proliferation and enhances cisplatin activity in HNSCC. *Cancer Biol Ther.* 2010;10(6):644-53.
19. Eggert A, Grotzer MA, Ikegaki N, Zhao H, Cnaan A, Brodeur GM, et al. Expression of the neurotrophin receptor TrkB is associated with unfavorable outcome in Wilms' tumor. *J Clin Oncol.* 2001;19(3):689-96.

20. Choy C, Ansari KI, Neman J, Hsu S, Duenas MJ, Li H, et al. Cooperation of neurotrophin receptor TrkB and Her2 in breast cancer cells facilitates brain metastases. *Breast Cancer Res.* 2017;19(1):51.
21. Tsai YF, Tseng LM, Hsu CY, Yang MH, Chiu JH, Shyr YM. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) -TrkB signaling modulates cancer-endothelial cells interaction and affects the outcomes of triple negative breast cancer. *PLoS One.* 2017;12(6):e0178173.
22. Kimura S, Harada T, Ijichi K, Tanaka K, Liu R, Shibahara D, et al. Expression of brain-derived neurotrophic factor and its receptor TrkB is associated with poor prognosis and a malignant phenotype in small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2018;120:98-107.
23. Ozono K, Ohishi Y, Onishi H, Nakamura K, Motoshita J, Kato M, et al. Brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin-related kinase B signaling pathway contributes to the aggressive behavior of lung squamous cell carcinoma. *Lab Invest.* 2017;97(11):1332-42.
24. Croucher JL, Iyer R, Li N, Molteni V, Loren J, Gordon WP, et al. TrkB inhibition by GNF-4256 slows growth and enhances chemotherapeutic efficacy in neuroblastoma xenografts. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2015;75(1):131-41.
25. Akil H, Perraud A, Jauberteau MO, Mathonnet M. Tropomyosin-related kinase B/brain derived-neurotrophic factor signaling pathway as a potential therapeutic target for colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2016;22(2):490-500.
26. Tanaka K, Okugawa Y, Toiyama Y, Inoue Y, Saigusa S, Kawamura M, et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-induced tropomyosin-related kinase B (Trk B) signaling is a potential therapeutic target for peritoneal carcinomatosis arising from colorectal cancer. *PLoS One.* 2014;9(5):e96410.
27. Abbaci A, Talbot H, Saada S, Gachard N, Abraham J, Jaccard A, et al. Neurotensin receptor type 2 protects B-cell chronic lymphocytic leukemia cells from apoptosis. *Oncogene.* 2018;37(6):756-67.
28. Polakowski N, Terol M, Hoang K, Nash I, Laverdure S, Gazon H, et al. HBZ stimulates brain-derived neurotrophic factor/TrkB autocrine/paracrine signaling to promote survival of human T-cell leukemia virus type 1-Infected T cells. *J Virol.* 2014;88(22):13482-94.
29. Yuan Y, Ye HQ, Ren QC. Proliferative role of BDNF/TrkB signaling is associated with anoikis resistance in cervical cancer. *Oncol Rep.* 2018;40(2):621-34.
30. Choi B, Lee EJ, Shin MK, Park YS, Ryu MH, Kim SM, et al. Upregulation of brain-derived neurotrophic factor in advanced gastric cancer contributes to bone metastatic osteolysis by inducing long pentraxin 3. *Oncotarget.* 2016;7(34):55506-17.
31. De la Cruz-Morcillo MA, Berger J, Sánchez-Prieto R, Saada S, Naves T, Guillaudeau A, et al. p75 neurotrophin receptor and pro-BDNF promote cell survival and migration in clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget.* 2016;7(23):34480-97.
32. Tanaka K, Mohri Y, Nishioka J, Ohi M, Yokoe T, Miki C, et al. Neurotrophic receptor, tropomyosin-related kinase B, as a chemoresistant marker in oesophageal cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2009;21(4):362-3.
33. Heinen TE, Dos Santos RP, da Rocha A, Dos Santos MP, Lopez PL, Silva Filho MA, et al. Trk inhibition reduces cell proliferation and potentiates the effects of chemotherapeutic agents in Ewing sarcoma. *Oncotarget.* 2016;7(23):34860-80.
34. Kupferman ME, Jiffar T, El-Naggar A, Yilmaz T, Zhou G, Xie T, et al. TrkB induces EMT and has a key role in invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene.* 2010;29(14):2047-59.

35. Lee J, Jiffar T, Kupferman ME. A novel role for BDNF-TrkB in the regulation of chemotherapy resistance in head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2012;7(1):e30246.
36. Kim MS, Lee WS, Jin W. TrkB Promotes Breast Cancer Metastasis via Suppression of Runx3 and Keap1 Expression. *Mol Cells*. 2016;39(3):258-65.
37. Thiele CJ, Li Z, McKee AE. On Trk--the TrkB signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology. *Clin Cancer Res*. 2009;15(19):5962-7.
38. Bahrami A, Hassanian SM, ShahidSales S, Farjami Z, Hasanzadeh M, Anvari K, et al. Targeting RAS signaling pathway as a potential therapeutic target in the treatment of colorectal cancer. *J Cell Physiol*. 2018;233(3):2058-66.
39. Samatar AA, Poulidakos PI. Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges. *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(12):928-42.
40. Manchado E, Weissmueller S, Morris JP, Chen CC, Wullenkord R, Lujambio A, et al. A combinatorial strategy for treating KRAS-mutant lung cancer. *Nature*. 2016;534(7609):647-51.
41. Montagut C, Settleman J. Targeting the RAF-MEK-ERK pathway in cancer therapy. *Cancer Lett*. 2009;283(2):125-34.
42. Zhou B, Der CJ, Cox AD. The role of wild type RAS isoforms in cancer. *Semin Cell Dev Biol*. 2016;58:60-9.
43. Wang Y, Kaiser CE, Frett B, Li HY. Targeting mutant KRAS for anticancer therapeutics: a review of novel small molecule modulators. *J Med Chem*. 2013;56(13):5219-30.
44. Drosten M, Barbacid M. Targeting the MAPK Pathway in KRAS-Driven Tumors. *Cancer Cell*. 2020;37(4):543-50.
45. Hendrix MJ, Seftor EA, Seftor RE, Chao JT, Chien DS, Chu YW. Tumor cell vascular mimicry: Novel targeting opportunity in melanoma. *Pharmacol Ther*. 2016;159:83-92.
46. Eckert AW, Schutze A, Lautner MH, Taubert H, Schubert J, Bilkenroth U. HIF-1alpha is a prognostic marker in oral squamous cell carcinomas. *Int J Biol Markers*. 2010;25(2):87-92.
47. Liang X, Zheng M, Jiang J, Zhu G, Yang J, Tang Y. Hypoxia-inducible factor-1 alpha, in association with TWIST2 and SNIP1, is a critical prognostic factor in patients with tongue squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2011;47(2):92-7.
48. Gong L, Zhang W, Zhou J, Lu J, Xiong H, Shi X, et al. Prognostic value of HIFs expression in head and neck cancer: a systematic review. *PLoS One*. 2013;8(9):e75094.
49. Wang HF, Wang SS, Zheng M, Dai LL, Wang K, Gao XL, et al. Hypoxia promotes vasculogenic mimicry formation by vascular endothelial growth factor A mediating epithelial-mesenchymal transition in salivary adenoid cystic carcinoma. *Cell Prolif*. 2019;52(3):e12600.
50. Feron MR. Angiogênese 2018 [Available from: <https://archive.org/details/angio2>].
51. Tirino V, Desiderio V, Paino F, De Rosa A, Papaccio F, La Noce M, et al. Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization. *FASEB J*. 2013;27(1):13-24.
52. Wiechec E, Hansson KT, Alexandersson L, Jönsson JI, Roberg K. Hypoxia Mediates Differential Response to Anti-EGFR Therapy in HNSCC Cells. *Int J Mol Sci*. 2017;18(5).
53. Li X, Cao Y, Gong X, Li H. Long noncoding RNAs in head and neck cancer. *Oncotarget*. 2017;8(6):10726-40.

54. Mannelli G, Magnelli L, Deganello A, Busoni M, Meccariello G, Parrinello G, et al. Detection of putative stem cell markers, CD44/CD133, in primary and lymph node metastases in head and neck squamous cell carcinomas. A preliminary immunohistochemical and in vitro study. *Clin Otolaryngol.* 2015;40(4):312-20.
55. Prince ME, Ailles LE. Cancer stem cells in head and neck squamous cell cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26(17):2871-5.
56. Silva Galbiatti-Dias AL, Fernandes GMM, Castanhole-Nunes MMU, Hidalgo LF, Nascimento Filho CHV, Kawasaki-Oyama RS, et al. Relationship between CD44. *Am J Cancer Res.* 2018;8(8):1633-41.
57. Toledo-Guzmán ME, Hernández MI, Gómez-Gallegos Á, Ortiz-Sánchez E. ALDH as a Stem Cell Marker in Solid Tumors. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2019;14(5):375-88.
58. Chen YC, Chen YW, Hsu HS, Tseng LM, Huang PI, Lu KH, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;385(3):307-13.
59. Krishnamurthy S, Dong Z, Vodopyanov D, Imai A, Helman JI, Prince ME, et al. Endothelial cell-initiated signaling promotes the survival and self-renewal of cancer stem cells. *Cancer Res.* 2010;70(23):9969-78.
60. Baillie R, Tan ST, Itinteang T. Cancer Stem Cells in Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma: A Review. *Front Oncol.* 2017;7:112.
61. Qian Y, Wu X, Yokoyama Y, Okuzaki D, Taguchi M, Hirose H, et al. E-cadherin-Fc chimera protein matrix enhances cancer stem-like properties and induces mesenchymal features in colon cancer cells. *Cancer Sci.* 2019;110(11):3520-32.
62. Yin B, Ma ZY, Zhou ZW, Gao WC, Du ZG, Zhao ZH, et al. The TrkB+ cancer stem cells contribute to post-chemotherapy recurrence of triple-negative breast cancers in an orthotopic mouse model. *Oncogene.* 2015;34(6):761-70.
63. Liu X, Wang L, Cui W, Yuan X, Lin L, Cao Q, et al. Targeting ALDH1A1 by disulfiram/copper complex inhibits non-small cell lung cancer recurrence driven by ALDH-positive cancer stem cells. *Oncotarget.* 2016;7(36):58516-30.
64. Maiuthed A, Chantarawong W, Chanvorachote P. Lung Cancer Stem Cells and Cancer Stem Cell-targeting Natural Compounds. *Anticancer Res.* 2018;38(7):3797-809.
65. Shimokawa M, Ohta Y, Nishikori S, Matano M, Takano A, Fujii M, et al. Visualization and targeting of LGR5. *Nature.* 2017;545(7653):187-92.
66. Reid PA, Wilson P, Li Y, Marcu LG, Bezak E. Current understanding of cancer stem cells: Review of their radiobiology and role in head and neck cancers. *Head Neck.* 2017;39(9):1920-32.
67. Xiong X, Li Y, Liu L, Qi K, Zhang C, Chen Y, et al. Arsenic trioxide induces cell cycle arrest and affects Trk receptor expression in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Biol Res.* 2018;51(1):18.
68. Li L, Zhu L. Expression and clinical significance of TrkB in sinonasal squamous cell carcinoma: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2017;46(2):144-50.
69. de Moraes JK, Wagner VP, Fonseca FP, Vargas PA, de Farias CB, Roesler R, et al. Uncovering the role of brain-derived neurotrophic factor/tyrosine kinase receptor B signaling in head and neck malignancies. *J Oral Pathol Med.* 2018;47(3):221-7.
70. Fernandes G, Goloni-Bertollo. Identificação e expressão gênica de células tronco tumorais no câncer de cabeça e pescoço e a resposta à quimioterápicos. não publicado.
71. Lawn S, Krishna N, Pisklakova A, Qu X, Fenstermacher DA, Fournier M, et al. Neurotrophin signaling via TrkB and TrkC receptors promotes the growth of brain tumor-initiating cells. *J Biol Chem.* 2015;290(6):3814-24.

72. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. 2007;445(7123):106-10.
73. Wu Y, Yun D, Zhao Y, Wang Y, Sun R, Yan Q, et al. Down regulation of RNA binding motif, single-stranded interacting protein 3, along with up regulation of nuclear HIF1A correlates with poor prognosis in patients with gastric cancer. *Oncotarget*. 2017;8(1):1262-77.
74. Cai FF, Xu C, Pan X, Cai L, Lin XY, Chen S, et al. Prognostic value of plasma levels of HIF-1a and PGC-1a in breast cancer. *Oncotarget*. 2016;7(47):77793-806.
75. Battle E, Clevers H. Cancer stem cells revisited. *Nat Med*. 2017;23(10):1124-34.
76. Karnoub AE, Weinberg RA. Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(7):517-31.
77. Kikuchi H, Pino MS, Zeng M, Shirasawa S, Chung DC. Oncogenic KRAS and BRAF differentially regulate hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha in colon cancer. *Cancer Res*. 2009;69(21):8499-506.
78. Yoshikawa Y, Takano O, Kato I, Takahashi Y, Shima F, Kataoka T. Ras inhibitors display an anti-metastatic effect by downregulation of lysyl oxidase through inhibition of the Ras-PI3K-Akt-HIF-1 $\alpha$  pathway. *Cancer Lett*. 2017;410:82-91.
79. Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, Semenza GL. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res*. 1999;59(16):3915-8.
80. Fukuda R, Hirota K, Fan F, Jung YD, Ellis LM, Semenza GL. Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J Biol Chem*. 2002;277(41):38205-11.
81. Jiang BH, Jiang G, Zheng JZ, Lu Z, Hunter T, Vogt PK. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. *Cell Growth Differ*. 2001;12(7):363-9.

**ANEXOS**

## 8. ANEXOS

### a. Anexo 1



Comitê de Ética em  
Pesquisa em Seres Humanos  
**CEP/FAMERP**

Parecer n.º 903.775

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

O projeto de pesquisa CAAE 37632114.9.0000.5415 sob a responsabilidade de **Ana Livia Silva Galbiatti** com o título "Identificação de células tronco tumorais em câncer de cabeça e pescoço: Expressão gênica, quantificação de proteínas e resposta a quimioterapia" está de acordo com a resolução do CNS 466/12 e foi aprovado por esse CEP.

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) deverá **receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo**, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos para conhecimento deste Comitê. **Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.**

São José do Rio Preto, 09 de dezembro de 2014.

*Luciano Garcia Lourenção*  
Prof. Dr. Luciano Garcia Lourenção  
Presidente do CEP/FAMERP

17 3201 5813  
cepfamerp@famerp.br  
Av. Brigadeiro Faria Lima 5416 | Vila São Pedro  
15090-000 | São José do Rio Preto, SP  
www.famerp.br/cep

**b. Anexo 2****Caracterização das Vias TrkB e EGFR em Células-tronco Tumorais do Câncer de Faringe e a resposta ao tratamento****Artigo Original**

Vilson Serafim Junior<sup>1</sup>, Glaucia Maria de Mendonça Fernandes<sup>1</sup>, Bianca Barbério Bogdan Tedeschi<sup>1</sup>, Letícia Antunes Muniz Ferreira<sup>1</sup>, Gabriela Helena Rodrigues-Fleming<sup>1</sup>, Juliana Garcia de Oliveira-Cucolo<sup>1</sup>, Maria Antonia dos Santos Bezerra<sup>1</sup>, Rosa Sayoko Kawasaki-Oyama<sup>1</sup>, Erika Cristina Pavarino<sup>1</sup>, Eny Maria Goloni-Bertollo<sup>1</sup>

*1. Genetics and Molecular Biology Research Unit (UPGEM), São José do Rio Preto Medical School (FAMERP), São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil*

**Address correspondence to:** Eny Maria Goloni-Bertollo, Genetics and Molecular Biology Research Unit (UPGEM), São José do Rio Preto Medical School (FAMERP), SP, Brazil. E-mail: eny.bertollo@famerp.br; juniorgrolla21@gmail.com.

**Resumo**

A Tropomiosina Relacionada à Quinase B (TrkB) e o Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) são frequentemente associadas à um mau prognóstico de diversos modelos tumorais. TrkB e EGFR ativam vias de proliferação celular como a do Kirsten Rat Sarcoma (Kras), que induz a ativação de fatores de transcrição como Fator Induzido por Hipóxia 1-alpha (HIF1 $\alpha$ ). Esses eventos levam a imortalidade celular, angiogênese e resistência a drogas. Outro fator relacionado a um mau prognóstico são as células-tronco tumorais (CTTs), uma subpopulação celular presentes no tumor, responsável pela ineficácia do tratamento em diversos modelos tumorais, incluindo o câncer de faringe (CF). CF é o terceiro tipo tumoral mais incidente dentre os tumores de cabeça e pescoço, com aproximadamente 315 mil novos casos e 165 mil mortes anuais. Dentre as linhas de tratamento para o CF estão Cetuximabe e Paclitaxel, drogas que atuam inibindo diferentes etapas da proliferação celular. Com base neste levantamento, o presente trabalho objetivou-se em: identificar CTTs do CF utilizando-se o biomarcador ALDH; avaliar a expressão diferencial de genes e proteínas *NTRK2*-TrkB, EGFR, Kras e HIF1 $\alpha$  em CTTs do CF bem como a resposta ao tratamento com Cetuximabe, Paclitaxel tanto em monoterapia quanto em combinação. ALDH foi eficiente no isolamento de CTTs do CF e essas células apresentam maior habilidade de invasão, migração, formação de esferas tumorais, expressão aumentada de genes e proteínas *NTRK2*-TrkB, Kras e HIF1 $\alpha$ , quando comparadas com não-CTTs. A população de CTTs apresentou resistência ao tratamento com cetuximabe em

monoterapia, mas foi sensível ao tratamento com paclitaxel tanto em monoterapia quanto em combinação com cetuximabe, indicando que este medicamento pode ser utilizado no tratamento de CF, entretanto, outros estudos com tumores primários precisam ser feitos, pois estes seriam mais representativos dos aspectos fisiológicos e moleculares encontrados na população em geral.

## **Introdução**

Tirosinas Quinases (TQ) são proteínas presentes na membrana das células e estão envolvidas no processo de crescimento celular. Essas proteínas possuem um domínio extracelular onde se ligam fatores de crescimento, um domínio transmembranar e um domínio intracelular (1). Após a ligação do fator de crescimento com a TQ, inicia-se uma cascata de proliferação jusante, levando a eventos como proliferação celular (2). Essas proteínas desenvolvem um papel importante no câncer, sendo responsáveis por ativação permanente de vias de proliferação e esse evento leva à sobrevivência celular, migração, adesão e diferenciação celular (3).

A Tropomiosin Related Kinase B (TrkB) é um membro da família de Tropomiosina Relacionada à Quinase (Trk), codificada pelo gene *NTRK2*. Possui um domínio de ligação extracelular, um domínio transmembranar e outro intracelular, desempenhando papel crucial na iniciação, progressão e desenvolvimento de vários tipos de câncer (1, 4, 5). Após a ligação de TrkB com seu ligante, Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF), inicia-se uma cascata de proliferação ativando Growth Factor Receptor-Bound Protein 2 (GRB2), Son of Sevenless (SOS) que posteriormente levará a ativação de membros da Família Rat Sarcoma (RAS). Essa ativação levará à proliferação celular, inibição de apoptose, angiogênese (2) transição epitélio-mesenquimal (6), resistência a drogas (7), e inibição da morte celular por perda de adesão (Anokis) (8).

Outra TQ que desempenha papel importante no desenvolvimento do câncer é o Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) (9). EGFR é membro da família ErbB-1 e seu ligante é o Epidermal Growth Factor (EGF) (3). Assim como TrkB, EGFR tem habilidade de ativar vias de proliferação celular como GRB2/SOS e membros da família RAS (10). Mutações no EGFR levando à ativação constitutiva do domínio de tirosina quinase, a superexpressão desse receptor ou de seu ligante tem sido reportada em vários

modelos tumorais (9, 11). Anticorpos monoclonais com maior afinidade pelo receptor EGFR do que seu ligante endógeno EGF são utilizados no tratamento de diversos tipos de câncer (3, 12). Além disso, EGFR também pode ativar outras TKs como TrkB através de *crosstalk* (4).

Além de TrkB e EGFR, uma outra proteína importante envolvida no processo de progressão tumoral é a Kirsten Rat Sarcoma (Kras) (13). Kras é um membro da família RAS, e acredita-se que esta seja a isoforma mais importante, (14) porque pode ativar cascatas que levarão à proliferação celular sem o estímulo de fatores de crescimento e sem fosforilação das TQ, além de ser responsável pela manutenção do tumor (15, 16). Quando ativado, Kras leva ao aumento da proliferação celular e conseqüentemente ao aumento da quantidade de células, fazendo com que a demanda necessária de oxigênio seja maior, e essas células, quando submetidas a baixos níveis de oxigênio, ativam o Hypoxia Inducible Factor 1 alpha (*HIF-1 $\alpha$* ) por meio das vias Phosphatidilinositol-3-Kinase (PI3K) (17) ou Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) (18).

*HIF-1 $\alpha$*  tem a capacidade de estimular a transcrição gênica (19) e sob condições de hipóxia é translocado para o núcleo onde ativa o fator de transcrição Hypoxia Inducible Factor 1 beta (*HIF1-b*) (20). A superexpressão de *HIF-1 $\alpha$*  está relacionada com o processo de EMT que ocorre através diminuição da expressão de E-Caderina e aumento de N-Caderina, Vimentina, Aldeído Desidrogenase (ALDH) e CD44 (21). ALDH é uma família de isoenzimas responsáveis por converter o retinol em ácido retinóico, participa do processo de desintoxicação celular e resistência as drogas (22), além de ser largamente utilizado para identificar células-tronco tumorais (CTTs) (23).

CTTs são uma pequena subpopulação de células com alto potencial de invasão e habilidades metastáticas e também responsáveis pela iniciação e manutenção do câncer (24) estando associadas a um mau prognóstico de uma grande variedade de tumores (25-27), incluindo o câncer de cabeça e pescoço (CCP) (10). A presença de CTTs no CCP pode levar a quimo e rádio resistência, aumento do reparo de DNA, transição epitélio-mesenquimal (EMT), imortalidade celular e recidiva tumoral (28).

CCP é o sexto tipo de neoplasia maligna mais incidente no mundo com mais de 600.000 novos casos e cerca de 300.000 mortes por ano (29). Dentre os sítios anatômicos afetados pelo CCP estão: lábios e cavidade oral, laringe e faringe, sendo este último sítio subdividido em três regiões (hipo, naso e orofaringe) (30). Espera-se para

o ano de 2020, que o câncer de faringe (CF) acometa 316.522 indivíduos e ocasione 167.011 mortes em todo o mundo, sendo o tumor de nasofaringe o mais incidente e com maior taxa de mortalidade, seguido pelos cânceres de orofaringe e hipofaringe (31, 32). Dentre as drogas utilizadas para o tratamento de CCP estão o Paclitaxel, uma droga que atua inibindo a divisão celular (33) e o Cetuximabe, um anticorpo monoclonal que se liga ao EGFR bloqueando a cascata de proliferação jusante (34). O presente estudo tem como objetivo identificar e isolar CTTs da linhagem celular FADU de CF utilizando o biomarcador ALDH; avaliar a expressão gênica e proteica das TQ TrkB e EGFR, bem como de Kras e HIF1A, que atuam nestas vias de proliferação celular; e avaliar a resposta ao tratamento das CTTs com Paclitaxel e Cetuximabe tanto em monoterapia quanto em combinação.

## **Materiais e Métodos**

### ***Cultura de Linhagem Celular***

A linhagem celular FADU de CF foi cultivada em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM Sigma-Aldrich Co.), suplementado com Soro Fetal Bovino a 10% (Gibco™), Ham's Nutrient Mixture F12 (HAMF-12, Sigma-Aldrich Co.) a 20%, 1% de Penicilina, Streptomicina e anfotericina B (Gibco™) e de L-Glutamina (Gibco™) a 5% de CO<sub>2</sub> na temperatura de 37°C. Quando a quantidade de células desejada foi obtida, a linhagem celular passou pelo processo de separação de CTTs e não-CTTs.

### ***Identificação e Separação de Células-Tronco Tumorais***

A linhagem celular foi separada em CTTs e não-CTTs utilizando o biomarcador específico ALDH pelo equipamento Cell Sorting BD FACSAria Fusion (BD Biosciences). As células marcadas positivamente para ALDH foram consideradas CTTs e as que foram marcadas negativamente foram consideradas não-CTTs. As análises subsequentes foram realizadas após recultivo e obtenção da quantidade necessária de células de ambas as subpopulações.

### ***Ensaio para confirmação de Células-Tronco Tumorais***

Para validar o processo de separação, as células de ambas as subpopulações foram submetidas aos testes de invasão, migração e formação de esferas. O teste de invasão foi realizado utilizando-se a quantidade de  $2 \times 10^4$  células por poço e foi realizado em duplicata. CTTs e não-CTTs foram plaqueadas em BD BioCoat Matrigel Invasion Chambers (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Sobre o inserto, foi utilizado meio DMEM não suplementado e na parte inferior do inserto foi utilizado meio DMEM suplementado apenas com soro fetal bovino, que serviu de quimioatrativo. As placas foram cultivadas por 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . Depois do período de incubação, as células foram fixadas no inserto com 4% de formaldeído, desidratadas utilizando-se metanol durante 20 minutos e em seguida coradas com Giemsa ou Violeta Cristal durante 15 minutos. O próximo passo foi fotografar os insertos em microscópio óptico no aumento de 100x. A quantidade de CTTs e não-CTTs que invadiram foram contadas com o auxílio do Image J versão 4.0.

O ensaio de migração foi realizado utilizando-se  $2 \times 10^4$  de células no inserto sem a matrix de gel em triplicata e os procedimentos foram iguais ao ensaio de invasão.

O ensaio de formação de esferas tumorais foi realizado em triplicata. CTTs e não-CTTs foram plaqueadas em placa de 6 poços na densidade de  $2 \times 10^4$  por poço. As células foram passadas por uma malha que garantiu que as células dentro dos poços estivessem individualizadas. As CTTs e não-CTTs foram fotografadas no tempo de 0 horas (logo após serem plaqueadas), cultivadas em meio DMEM completo, à 37% e 5% de  $\text{CO}_2$  por 120 horas. Após esse período, os poços foram fotografados novamente e a quantidade de esferas foi mensurada.

### ***Expressão Gênica***

O RNA total de  $1 \times 10^6$  células foi extraída utilizando TRIzol reagent (Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação do RNA extraído foi realizada utilizando o kit Qubit™ RNA HS Assay Kit by Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies). Para a síntese do cDNA foi utilizado o kit High Capacity cDNA Archive Kit (Life Technologies) nas concentrações de 2-5µg em 20µl de RNA total. Para cada amostra foi utilizado 1µL de cDNA para a expressão dos genes *NTRK2*, *EGFR*, *KRAS* e *HIF-1α* utilizando TaqMan Universal Master Mix e as sondas da companhia Life Technologies. Os controles endógenos utilizados foram β-actina e

GAPDH. Quantificação relativa foi feita utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  e a subpopulação de não-CTTs foi utilizada como calibrador da reação (RQ=1.0)

### ***Expressão Proteica***

As proteínas foram extraídas utilizando RIPA Sigma Aldrich®, ou TRIzol reagente (Life Technologies). A quantificação foi realizada através de espectrofotômetro através do kit ELISA eBioscience®. Todos os procedimentos foram feitos de acordo com as instruções do fabricante. A expressão proteica foi realizada através da técnica de Western Blot. As proteínas totais foram separadas utilizando gel de separação de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE- 4-12%). Após a separação, as proteínas foram transferidas para membrana utilizando imunoblot e as proteínas de interesse foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-mouse TrkB (Abcan) em diluição de 1:1000, Kras (ANOVA) e  $\beta$ -actina (Sigma) em diluição 1:1000 e anticorpos monoclonais anti-rabbit HIF-1 $\alpha$  (Invitrogen) na concentração de 1:1000.

### ***Tratamento com Cetuximabe e Paclitaxel***

As subpopulações da linhagem celular FADU foram plaqueadas em placa de 96 poços e tratadas utilizando 0.06mg/mL de Cetuximabe e 0.05mg/mL de Paclitaxel tanto em monoterapia quanto em combinação por 24 horas para avaliar seus efeitos. Após o período de tratamento, foi realizado o ensaio de MTS de acordo com (Fernandes et al, 2020) para analisar a viabilidade celular. Células sem tratamento foram utilizadas como controle.

### ***Análises estatísticas***

A distribuição continua dos dados foram avaliados usando o teste de normalidade D'Agostino-Pearson omnibus. Os testes Wilcoxon's signed rank foram usados para comparação entre os grupos CTTs e não-CTTs para os genes *EGFR*, *NTRK2*, *KRAS* e *HIF-1 $\alpha$* . Os dados de viabilidade celular foram avaliados por one-way RM analysis of variance (ANOVA) com correção de Bonferroni para verificação da eficácia dos tratamentos cetuximabe, paclitaxel e associação de ambos. As análises estatísticas foram realizadas no Bioestat software programa versão 5.3. Resultados com  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## Resultados

### ***Separação das linhagens celulares - células positivamente marcadas com ALDH***

A linhagem FADU foi separada utilizando o biomarcador ALDH e a quantidade de células obtidas foi 8.1% de CTTs e 57.6% de não-CTTs.

### ***Confirmação da stemness properties***

As CTTs da linhagem celular avaliada demonstraram maior capacidade de invadir ( $p=0.0029$ ) quando comparadas com as não-CTTs (figura 1A). O mesmo foi notado para o ensaio de migração ( $p<0.0001$ ) (figura 1B). No ensaio de formação de esferas também se evidenciou diferença estatisticamente significativa entre as subpopulações na linhagem FADU ( $p=0.0030$ ) (figura 1C)

### ***Expressão dos genes EGFR, NTRK2, KRAS e HIF-1 $\alpha$***

A expressão gênica relativa dos genes *EGFR*, *NTRK*, *KRAS* e *HIF-1 $\alpha$*  para a linhagem celular FADU está demonstradas na Figura 2. A subpopulação de não-CTTs foi utilizada como calibrador (RQ=1.0). Nós observamos que as CTTs da linhagem FADU apresentaram expressão gênica aumentada para todos os genes *NTRK* (RQ=8.68), *EGFR* (RQ=5.33), *KRAS* (RQ=3.75) e *HIF-1 $\alpha$*  (RQ=7.20).

### ***Expressão proteica de TrkB, EGFR, KRAS e HIF-1 $\alpha$***

A expressão proteica relativa das proteínas EGFR, TrkB, KRAS e HIF1A para a linhagem está demonstrada na Figura 3. Na linhagem FADU as proteínas TrkB, EGFR, KRAS e HIF1A apresentaram expressão aumentada nas CTTs em relação as não-CTTs ( $p=0.0001$   $p<0.01$ ,  $p=0.0463$ ,  $p>0.0500$  e  $p=0.0370$  respectivamente). Nesta linhagem celular, apenas KRAS não apresentou diferença estatisticamente significativa.

### ***Associação de Cetuximabe e Paclitaxel pode ser utilizada para o tratamento de CCP***

Na linhagem FADU, o tratamento com Cetuximabe não apresentou eficácia na eliminação de CTTs (viabilidade=140%) e não-CTTs (viabilidade=101%) quando comparada com o controle ( $p<0.0500$ ). Já o Paclitaxel foi eficaz como tratamento de ambas as populações CTTs (viabilidade=34%) não-CTTs (viabilidade=18%)

( $p < 0.0001$ ), sendo que a associação de Cetuximabe e Paclitaxel demonstrou maior eficácia na eliminação das CTTs (viabilidade=15%) e não-CTTs (viabilidade=12%) para esta linhagem celular, ( $p < 0.0001$ ). (Figura 4A). Quando se comparou a eficácia das terapias em eliminar CTTs e não-CTTs, pôde-se notar que a eliminação de CTTs é menor do que de não-CTTs em todos os tratamentos, entretanto só houve diferença estatisticamente significativa para o tratamento com Cetuximabe ( $p < 0.0010$ ), mostrando que CTTs são mais resistentes ao tratamento com Cetuximab quando comparadas com não-CTTs (Figura 4B). Esses dados podem sugerir que o tratamento com Cetuximabe pode não ser eficiente para tumores com alta concentração de CTTs.

### **Discussão**

Para o presente estudo foi utilizada uma linhagem celular de CF. Segundo o último levantamento da WHO, o CF representa o 17º tipo tumoral em incidência mundial, e dentre os tumores que atingem a região da cabeça e pescoço ocupa o 3º lugar, ficando atrás apenas do câncer de glândula tireoide e lábios-cavidade oral (35).

O presente estudo mostrou que a utilização do biomarcador intracelular ALDH foi eficiente na identificação e isolamento de CTTs da linhagem celular FADU. Estudos presentes na literatura mostram que o uso individual de biomarcadores é bem aceito como indicativo de células tronco (10, 36). Foi possível notar que células positivamente marcadas com ALDH apresentam maior potencial tumorigênico quando comparadas com células marcadas negativamente para este biomarcador. CTTs possuem maior capacidade de invadir, migrar e formar esferas tumorais em diversos modelos tumorais e dados obtidos no presente estudo corroboram os dados publicados na literatura (37, 38). As CTTs desempenham um papel muito importante no tumor, e têm sido implicadas como responsáveis pela iniciação, manutenção, autorrenovação e diferenciação de vários tipos tumorais (37, 39, 40).

No CCP, as CTTs são responsáveis pela resistência à quimio e radioterapia, estão relacionadas com a transição epitélio-mesenquimal, aumento do reparo de DNA, imortalidade celular e recidiva tumoral (28). Essas características indicam que a presença das CTTs podem estar relacionada à maior agressividade tumoral, mau prognóstico e formação de metástase (24, 40).

No presente estudo foi visto que, na linhagem FADU, as CTTs apresentaram

expressão aumentada dos genes *NTRK2*, *EGFR*, *Kras* e *HIF-1 $\alpha$*  bem como das proteínas codificadas por estes genes. *EGFR* e *TrkB* são responsáveis pela ativação de *Kras* e este por sua vez pode ativar o *HIF-1 $\alpha$*  através das vias PI3K e/ou MAPK como já descrito por Yoshikawa et al, 2017 (17) e Kikuchi et al, 2017 (18).

Um estudo realizado anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa mostrou que *EGFR* estava subexpresso em CTTs da linhagem de câncer de cavidade oral HN13, mas na linhagem de câncer de laringe HEP-2 apresentou-se aumentado (10) e esses dados indicam que a expressão deste receptor pode variar de acordo com o modelo tumoral avaliado. *EGFR* e *TrkB* podem ser transativados pelo mecanismo chamado de crosstalk (4). Por estarem co-expressos e com expressão aumentada nas CTTs, *TrkB* pode estar desempenhando papel na resistência ao Cetuximabe. Um estudo realizado com câncer de mama mostrou que a heterodimerização dos receptores *TrkB* e *Her2* (membro da família *ErbB*, assim como *EGFR*) confere uma vantagem de sobrevivência para células metastáticas deste modelo tumoral (41).

*TrkB* está superexpresso em diversos tipos de câncer e tem sido relacionado a eventos como aumento da sobrevivência celular, angiogênese, metástase e resistência à drogas (42, 43). A alta expressão do gene *NTRK2* está diretamente relacionada com uma baixa taxa de sobrevida por levar ao aumento da capacidade de invasão e migração de células do câncer de pulmão (44). No carcinoma sinonasal, *TrkB* foi visto expresso em 87.7% e essa expressão está relacionada com diferenciação de células escamosas, estágio clínico avançado, recorrência loco-regional, baixa sobrevida e baixa sobrevida livre de doença (45). No câncer de cabeça e pescoço de células escamosas, 50% das células apresentaram expressão de *TrkB*, porém não houve expressão na mucosa normal e esse receptor foi diretamente associado com o processo de EMT (46). Um estudo realizado pelo no nosso grupo de pesquisa mostrou que tanto *NTRK2* quanto *TrkB* não foram detectados em ensaios de expressão gênica e proteica na linhagem de câncer de laringe HEP-2 (dados não publicados), indicando que, assim como *EGFR*, pode haver variação na expressão de *TrkB* dependendo do sítio tumoral avaliado.

No presente estudo foi possível avaliar que as CTTs do CF apresentaram expressão gênica e proteica aumentada de *Kras*. *Kras* é um proto-oncogene que desempenha um importante papel na proliferação e diferenciação celular (47). Quando superexpresso, *Kras* selvagem teve relação com um prognóstico adverso em leucemia

mielóide aguda (48) e foi visto que sua superexpressão pode causar resistência ao tratamento com Cetuximabe no CCP (49). Esses dados indicam que a alta expressão do gene e da proteína Kras nas CTTs do CF pode ser a responsável pela resistência ao Cetuximabe, observada no presente estudo.

Uma limitação do nosso estudo foi avaliar apenas expressão gênica e proteica e não avaliar mutação do gene *Kras*. Trabalhos da literatura mostram que mutações nos códons 12, 13 e 61 do gene *Kras* podem levar a alterações na função da proteína Kras (14, 50) e essa mutação pode levar a ativação de vias de proliferação celular sem o estímulo de fatores de crescimento (14). Mutações de *Kras* também podem levar ao aumento da expressão da proteína HIF-1 $\alpha$  como mostrado por Kikuchi e colaboradores, 2009 (18). A superexpressão de *Kras* utilizando o micro RNA miR-19a provocou uma redução significativa da angiogênese do câncer colorretal (51), mostrando que a alta expressão de *Kras* pode ser utilizada como indicador de prognóstico. Um estudo avaliando o uso de droga inibidora de Kras levou à diminuição da expressão de proteínas HIF-1 $\alpha$ , entretanto esse bloqueio não reduziu a quantidade de mRNA (17). Esses dados sugerem fortemente que a alta expressão de Kras pode ter ligação direta com o aumento da expressão de HIF-1 $\alpha$  nesse estudo.

Também se pode observar que a expressão gênica e proteica de *HIF-1 $\alpha$*  se mostrou aumentada nas CTTs do CF em relação as não-CTTs. Em outros modelos tumorais, a condição de hipóxia é comum e esta característica tem relação com o nível de agressividade desses tumores (21, 52). No CCP, um estudo utilizando cultura 3D mostrou que células submetidas a hipóxia tem maior expressão de *HIF-1 $\alpha$*  quando comparadas com células em condições de normóxia (49). O microambiente tumoral em condições de hipóxia também induz o processo de EMT, eleva a capacidade de angiogênese, além de alterar a morfologia das células tumorais (53). Dados ainda não publicados do nosso grupo de pesquisa mostraram que CTTs do CCP apresentam expressão elevada de *HIF-1 $\alpha$*  e de Vascular Endothelial Growth Factor (*VEGF*), indicando que a expressão de *HIF-1 $\alpha$*  tem relação direta com o processo de angiogênese por meio da ativação desta via. Estes dados indicam que a agressividade das CTTs pode ter relação direta com a alta expressão de *HIF-1 $\alpha$* .

Segundo o Ministério da Saúde (54), Cetuximabe é indicado para o tratamento de câncer colorretal com alta expressão de EGFR e sem mutação de RAS, assim, as

CTTs e não-CTTs da linhagem celular FADU foram tratadas durante 24 horas com Cetuximabe. As CTTs apresentaram resistência ao tratamento com Cetuximabe em monoterapia enquanto que as não-CTTs se mostraram possivelmente resistentes. Já o tratamento com Paclitaxel foi eficaz na eliminação de CTTs e não-CTTs tanto em monoterapia quanto em combinação com o Cetuximab. Cetuximabe é um anticorpo monoclonal do isotipo IgG1 e tem maior afinidade com o receptor EGFR do que o seu ligante endógeno (EGF) e pode ser utilizado para o tratamento de CCP (34). Entretanto, os mecanismos de resistência ao Cetuximabe ainda não são completamente claros e podem depender de outros fatores como alta expressão de CD44 (55, 56), e células que apresentam alta expressão de CD44 tem características de CTTs (57). O micro-ambiente tumoral também pode influenciar na resistência ao tratamento (24). A expressão do TrkB também pode influenciar na resposta ao tratamento com Cetuximabe impedindo que esta droga bloqueie o EGFR e a associação de drogas inibidoras de TrkB com Cetuximabe podem diminuir a proliferação celular (58). Como o gene *NTRK2* está superexpresso nas CTTs quando comparado com não-CTTs, bem como o receptor TrkB, codificado por este gene, o que também pode justificar a resistência a este tratamento.

Paclitaxel é um taxano responsável por inibir a formação do fuso mitótico impedindo assim a proliferação celular (34). Um estudo realizado por Mori et al, 2019 (59) mostrou que células de câncer de endométrio que apresentaram alta expressão de ALDH são resistentes ao Paclitaxel. Contudo, a utilização de inibidor de ALDH foi eficiente para sensibilizar células ao fármaco, levando à redução do tumor. Galbiatti-Dias (10) também relatou em seu estudo que CTTs da linhagem celular de câncer de cavidade oral HN13 apresentam resistência ao Paclitaxel quando comparadas com não-CTTs. Por não apresentar diferença estaticamente significativa entre CTTs e não-CTTs tratadas com Paclitaxel em monoterapia, não pôde-se afirmar que houve resistência, entretanto a viabilidade celular de CTTs é maior do que a viabilidade de não-CTTs nas mesmas condições, mostrando que Paclitaxel é mais eficaz na eliminação de não-CTTs, corroborando com os estudos citados acima.

Segundo Vermorken et al, 2008 (60) a combinação de Cetuximabe e Paclitaxel é bem aceita, tolerada e apresentou efeitos em pacientes com câncer de cabeça e pescoço resistente ou com intolerância à platina. Nosso estudo mostrou que a combinação das

duas drogas foi mais eficaz em diminuir a viabilidade celular das CTTs e não-CTTs quando comparada com o controle, assim como em monoterapia. Quando se comparou CTTs e não-CTTs tratadas com a combinação de fármacos não houve diferença estaticamente significativa, mostrando que essa associação pode ser utilizada para tratar CCP, independente da presença ou ausência de CTTs.

Em conclusão, podemos dizer que o biomarcador ALDH é eficaz na identificação e isolamento de CTTs do CF e as células positivamente marcadas com este biomarcador tem característica de CTTs por apresentar maior capacidade de invadir, migrar e formar esferas tumorais. CTTs do CF também apresentarem expressão gênica e protéica aumentada de *NTRK2*-TrkB, EGFR, Kras e *HIF-1 $\alpha$* . Acredita-se que a expressão aumentada, bem como a presença de CTTs, estão ligadas a maior agressividade tumoral e podem ser usadas como biomarcadores de prognóstico, auxiliando no direcionamento da terapia, pois indicam ter relação com a resistência ao tratamento com Cetuximabe. O uso do taxano Paclitaxel se mostrou eficaz na inibição da proliferação celular de CTTs, tanto em monoterapia quanto em combinação com Cetuximabe, podendo ser utilizado para o tratamento do CF independente da presença ou ausência de CTTs. Entretanto, para melhor entendimento desses achados, torna-se importante a ampliação dos estudos com tumores primários, pois estes seriam mais representativos dos aspectos fisiológicos e moleculares encontrados na população em geral.

## Referências

1. Tajbakhsh A, Mokhtari-Zaer A, Rezaee M, Afzaljavan F, Rivandi M, Hassanian SM, et al. Therapeutic Potentials of BDNF/TrkB in Breast Cancer; Current Status and Perspectives. *J Cell Biochem.* 2017;118(9):2502-15.
2. Amatu A, Sartore-Bianchi A, Siena S. gene fusions as novel targets of cancer therapy across multiple tumour types. *ESMO Open.* 2016;1(2):e000023.
3. Leite CAVG, Costa JVG, Callado RB, Torres JNL, Lima RCP, Júnior, et al. Receptor tyrosine kinases: therapeutic implications in cancer. *Revista Brasileira de Oncologia Clínica [Internet].* 2012; 8, nº 29.
4. Götz R, Sendtner M. Cooperation of tyrosine kinase receptor TrkB and epidermal growth factor receptor signaling enhances migration and dispersal of lung tumor cells. *PLoS One.* 2014;9(6):e100944.
5. Kawamoto M, Onishi H, Ozono K, Yamasaki A, Imaizumi A, Kamakura S, et al. Tropomyosin-related kinase B mediated signaling contributes to the induction of malignant phenotype of gallbladder cancer. *Oncotarget.* 2017;8(22):36211-24.
6. Kim MS, Lee WS, Jeong J, Kim SJ, Jin W. Induction of metastatic potential by TrkB via activation of IL6/JAK2/STAT3 and PI3K/AKT signaling in breast cancer. *Oncotarget.* 2015;6(37):40158-71.
7. Tanaka K, Mohri Y, Nishioka J, Kobayashi M, Ohi M, Miki C, et al. Neurotrophic receptor, tropomyosin-related kinase B as an independent prognostic marker in gastric cancer patients. *J Surg Oncol.* 2009;99(5):307-10.
8. Yuan Y, Ye HQ, Ren QC. Proliferative role of BDNF/TrkB signaling is associated with anoikis resistance in cervical cancer. *Oncol Rep.* 2018;40(2):621-34.
9. Binder ZA, Thorne AH, Bakas S, Wileyto EP, Bilello M, Akbari H, et al. Epidermal Growth Factor Receptor Extracellular Domain Mutations in Glioblastoma Present Opportunities for Clinical Imaging and Therapeutic Development. *Cancer Cell.* 2018;34(1):163-77.e7.
10. Silva Galbiatti-Dias AL, Fernandes GMM, Castanhole-Nunes MMU, Hidalgo LF, Nascimento Filho CHV, Kawasaki-Oyama RS, et al. Relationship between CD44. *Am J Cancer Res.* 2018;8(8):1633-41.
11. Chu Q, Agha A, Devost N, Walton RN, Ghosh S, Ho C. Biopsy on progression in patients with. *Curr Oncol.* 2020;27(1):27-33.
12. Yang CH, Chou HC, Fu YN, Yeh CL, Cheng HW, Chang IC, et al. EGFR over-expression in non-small cell lung cancers harboring EGFR mutations is associated with marked down-regulation of CD82. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852(7):1540-9.
13. Drost M, Barbacid M. Targeting the MAPK Pathway in KRAS-Driven Tumors. *Cancer Cell.* 2020;37(4):543-50.
14. Bahrami A, Hassanian SM, ShahidSales S, Farjami Z, Hasanzadeh M, Anvari K, et al. Targeting RAS signaling pathway as a potential therapeutic target in the treatment of colorectal cancer. *J Cell Physiol.* 2018;233(3):2058-66.
15. Samatar AA, Poulikakos PI. Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(12):928-42.
16. Manchado E, Weissmueller S, Morris JP, Chen CC, Wullenkord R, Lujambio A, et al. A combinatorial strategy for treating KRAS-mutant lung cancer. *Nature.* 2016;534(7609):647-51.
17. Yoshikawa Y, Takano O, Kato I, Takahashi Y, Shima F, Kataoka T. Ras inhibitors display an anti-metastatic effect by downregulation of lysyl oxidase through inhibition of the Ras-PI3K-Akt-HIF-1 $\alpha$  pathway. *Cancer Lett.* 2017;410:82-91.

18. Kikuchi H, Pino MS, Zeng M, Shirasawa S, Chung DC. Oncogenic KRAS and BRAF differentially regulate hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha in colon cancer. *Cancer Res.* 2009;69(21):8499-506.
19. Paduch R. The role of lymphangiogenesis and angiogenesis in tumor metastasis. *Cell Oncol (Dordr).* 2016;39(5):397-410.
20. Liang X, Zheng M, Jiang J, Zhu G, Yang J, Tang Y. Hypoxia-inducible factor-1 alpha, in association with TWIST2 and SNIP1, is a critical prognostic factor in patients with tongue squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2011;47(2):92-7.
21. Wang HF, Wang SS, Zheng M, Dai LL, Wang K, Gao XL, et al. Hypoxia promotes vasculogenic mimicry formation by vascular endothelial growth factor A mediating epithelial-mesenchymal transition in salivary adenoid cystic carcinoma. *Cell Prolif.* 2019;52(3):e12600.
22. Silva Galbiatti-Dias AL, Pavarino É, Kawasaki-Oyama RS, Maniglia JV, Maniglia EJ, Goloni Bertollo EM. Cancer stem cells in head and neck cancer: A Mini Review. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2015;61(6):39-43.
23. Curtarelli RB, Gonçalves JM, Dos Santos LGP, Savi MG, Nör JE, Mezzomo LAM, et al. Expression of Cancer Stem Cell Biomarkers in Human Head and Neck Carcinomas: a Systematic Review. *Stem Cell Rev.* 2018;14(6):769-84.
24. Wiechec E, Hansson KT, Alexandersson L, Jönsson JI, Roberg K. Hypoxia Mediates Differential Response to Anti-EGFR Therapy in HNSCC Cells. *Int J Mol Sci.* 2017;18(5).
25. Krishnamurthy S, Dong Z, Vodopyanov D, Imai A, Helman JI, Prince ME, et al. Endothelial cell-initiated signaling promotes the survival and self-renewal of cancer stem cells. *Cancer Res.* 2010;70(23):9969-78.
26. Williams K, Motiani K, Giridhar PV, Kasper S. CD44 integrates signaling in normal stem cell, cancer stem cell and (pre)metastatic niches. *Exp Biol Med (Maywood).* 2013;238(3):324-38.
27. Li W, Xu H, Qian C. c-Kit-Positive Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Promote the Growth and Angiogenesis of Breast Cancer. *Biomed Res Int.* 2017;2017:7407168.
28. Reid PA, Wilson P, Li Y, Marcu LG, Bezak E. Current understanding of cancer stem cells: Review of their radiobiology and role in head and neck cancers. *Head Neck.* 2017;39(9):1920-32.
29. Syrjänen S, Syrjänen K. HPV in Head and Neck Carcinomas: Different HPV Profiles in Oropharyngeal Carcinomas - Why? *Acta Cytol.* 2019;63(2):124-42.
30. 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.
31. Globocan. Cancer incidence and mortality statistics worldwide. 2018.
32. WHO. Cancer tomorrow. 2020.
33. Cabeça e Pescoço metastático e recorrente [Internet]. Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica (SBOC). 2017. Available from: [https://www.sbec.org.br/images/diretrizes/diretrizes\\_pdfs/Cabe%C3%A7a\\_e\\_pescoço\\_meta\\_vf\\_2017.pdf](https://www.sbec.org.br/images/diretrizes/diretrizes_pdfs/Cabe%C3%A7a_e_pescoço_meta_vf_2017.pdf).
34. Parikh P, Patil V, Agarwal JP, Chaturvedi P, Vaidya A, Rathod S, et al. Guidelines for treatment of recurrent or metastatic head and neck cancer. *Indian J Cancer.* 2014;51(2):89-94.

35. WHO. Estimated number of new cases in 2018, worldwide, both sexes, all ages. 2018.
36. Toledo-Guzmán ME, Hernández MI, Gómez-Gallegos Á, Ortiz-Sánchez E. ALDH as a Stem Cell Marker in Solid Tumors. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2019;14(5):375-88.
37. Baillie R, Tan ST, Itinteang T. Cancer Stem Cells in Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma: A Review. *Front Oncol.* 2017;7:112.
38. Qian Y, Wu X, Yokoyama Y, Okuzaki D, Taguchi M, Hirose H, et al. E-cadherin-Fc chimera protein matrix enhances cancer stem-like properties and induces mesenchymal features in colon cancer cells. *Cancer Sci.* 2019;110(11):3520-32.
39. Maiuthed A, Chantarawong W, Chanvorachote P. Lung Cancer Stem Cells and Cancer Stem Cell-targeting Natural Compounds. *Anticancer Res.* 2018;38(7):3797-809.
40. Atashzar MR, Baharlou R, Karami J, Abdollahi H, Rezaei R, Pourramezan F, et al. Cancer stem cells: A review from origin to therapeutic implications. *J Cell Physiol.* 2020;235(2):790-803.
41. Choy C, Ansari KI, Neman J, Hsu S, Duenas MJ, Li H, et al. Cooperation of neurotrophin receptor TrkB and Her2 in breast cancer cells facilitates brain metastases. *Breast Cancer Res.* 2017;19(1):51.
42. Heinen TE, Dos Santos RP, da Rocha A, Dos Santos MP, Lopez PL, Silva Filho MA, et al. Trk inhibition reduces cell proliferation and potentiates the effects of chemotherapeutic agents in Ewing sarcoma. *Oncotarget.* 2016;7(23):34860-80.
43. Yin B, Ma ZY, Zhou ZW, Gao WC, Du ZG, Zhao ZH, et al. The TrkB+ cancer stem cells contribute to post-chemotherapy recurrence of triple-negative breast cancers in an orthotopic mouse model. *Oncogene.* 2015;34(6):761-70.
44. Ozono K, Ohishi Y, Onishi H, Nakamura K, Motoshita J, Kato M, et al. Brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin-related kinase B signaling pathway contributes to the aggressive behavior of lung squamous cell carcinoma. *Lab Invest.* 2017;97(11):1332-42.
45. Li L, Zhu L. Expression and clinical significance of TrkB in sinonasal squamous cell carcinoma: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2017;46(2):144-50.
46. Kupferman ME, Jiffar T, El-Naggar A, Yilmaz T, Zhou G, Xie T, et al. TrkB induces EMT and has a key role in invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene.* 2010;29(14):2047-59.
47. Karnoub AE, Weinberg RA. Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(7):517-31.
48. Zhou JD, Yao DM, Li XX, Zhang TJ, Zhang W, Ma JC, et al. overexpression independent of. *Oncotarget.* 2017;8(39):66087-97.
49. Saki M, Toulany M, Rodemann HP. Acquired resistance to cetuximab is associated with the overexpression of Ras family members and the loss of radiosensitization in head and neck cancer cells. *Radiother Oncol.* 2013;108(3):473-8.
50. Ferrer I, Zugazagoitia J, Herbertz S, John W, Paz-Ares L, Schmid-Bindert G. KRAS-Mutant non-small cell lung cancer: From biology to therapy. *Lung Cancer.* 2018;124:53-64.
51. Chen M, Lin M, Wang X. Overexpression of miR-19a inhibits colorectal cancer angiogenesis by suppressing KRAS expression. *Oncol Rep.* 2018;39(2):619-26.
52. Wu Y, Yun D, Zhao Y, Wang Y, Sun R, Yan Q, et al. Down regulation of RNA binding motif, single-stranded interacting protein 3, along with up regulation of nuclear

- HIF1A correlates with poor prognosis in patients with gastric cancer. *Oncotarget*. 2017;8(1):1262-77.
53. Batlle E, Clevers H. Cancer stem cells revisited. *Nat Med*. 2017;23(10):1124-34.
54. Saúde Md. 2015.
55. La Fleur L, Johansson AC, Roberg K. A CD44<sup>high</sup>/EGFR<sup>low</sup> subpopulation within head and neck cancer cell lines shows an epithelial-mesenchymal transition phenotype and resistance to treatment. *PLoS One*. 2012;7(9):e44071.
56. Grau JJ, Mesía R, de la Iglesia-Vicente M, Williams ES, Taberna M, Caballero M, et al. Enrichment of Cells with Cancer Stem Cell-Like Markers in Relapses of Chemoresistant Patients with Locally Advanced Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Oncology*. 2016;90(5):267-72.
57. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(3):973-8.
58. de Farias CB, Heinen TE, dos Santos RP, Abujamra AL, Schwartzmann G, Roesler R. BDNF/TrkB signaling protects HT-29 human colon cancer cells from EGFR inhibition. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;425(2):328-32.
59. Mori Y, Yamawaki K, Ishiguro T, Yoshihara K, Ueda H, Sato A, et al. ALDH-Dependent Glycolytic Activation Mediates Stemness and Paclitaxel Resistance in Patient-Derived Spheroid Models of Uterine Endometrial Cancer. *Stem Cell Reports*. 2019;13(4):730-46.
60. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kawecki A, Rottey S, et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med*. 2008;359(11):1116-27.

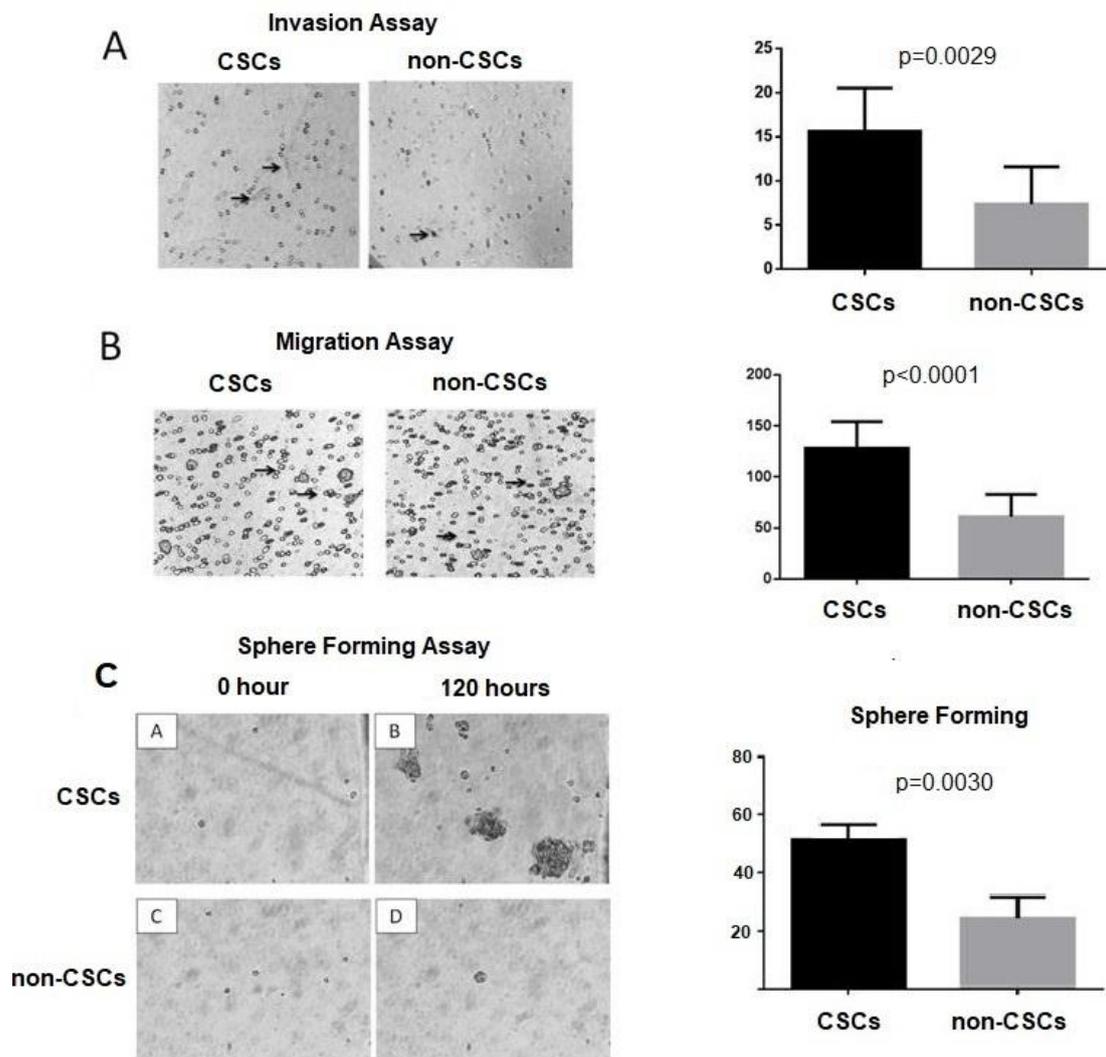


Figura 1. Ensaios de confirmação de CTTs da linhagem FADU. 1A: Ensaio de potencial de invasão das CTTs e não-CTTs com o respectivo gráfico e valores de p. As células positivamente marcadas com ALDH apresentaram maior capacidade de invadir quando comparadas com as células marcadas negativamente. 1B: Ensaio de migração com respectivo gráfico e valor de p. As CTTs apresentaram maior capacidade de invasão quando comparadas com não CTTs. 1C: Ensaio de formação de esferas tumorais com gráfico e respectivo valor de p. As células foram fotografadas no tempo de 0 horas e novamente fotografadas após 120 horas. A CTTs da linhagem celular FADU apresentaram diferença estatisticamente significantes quando comparadas com as não-CTTs.

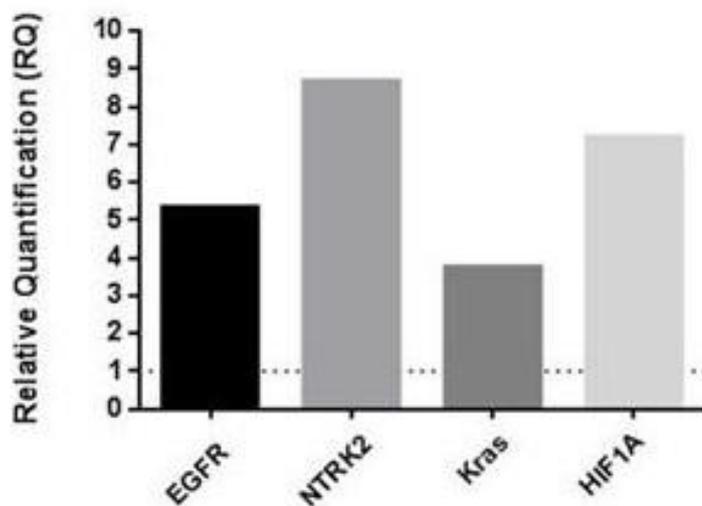


Figura 2: Resultado da expressão gênica para a linhagem FADU. As não-CTTs foram utilizadas como controle. A quantificação Relativa de EGFR, NTRK2, Kras e HIF1A foram: RQ=5.33, RQ=8.68, RQ=3.75 e RQ=7.20, respectivamente.

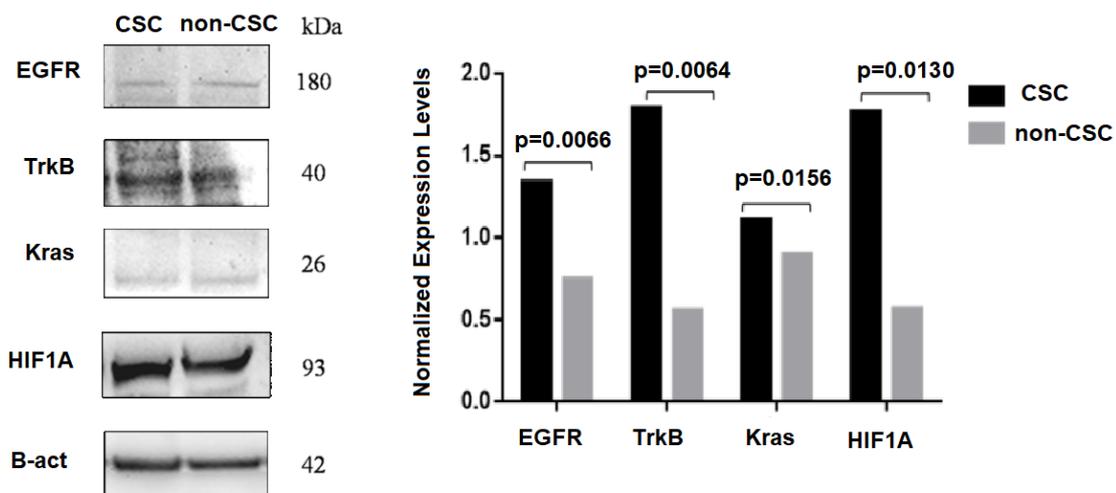


Figura 3: Expressão proteica de EGFR, TrkB, KRAS e HIF1A com respectivo gráfico e valores de p. A linhagem FADU apresentou expressão aumentada de EGFR, TrkB, KRAS e HIF1A, e todas apresentaram diferença estatisticamente significante entre os grupos.

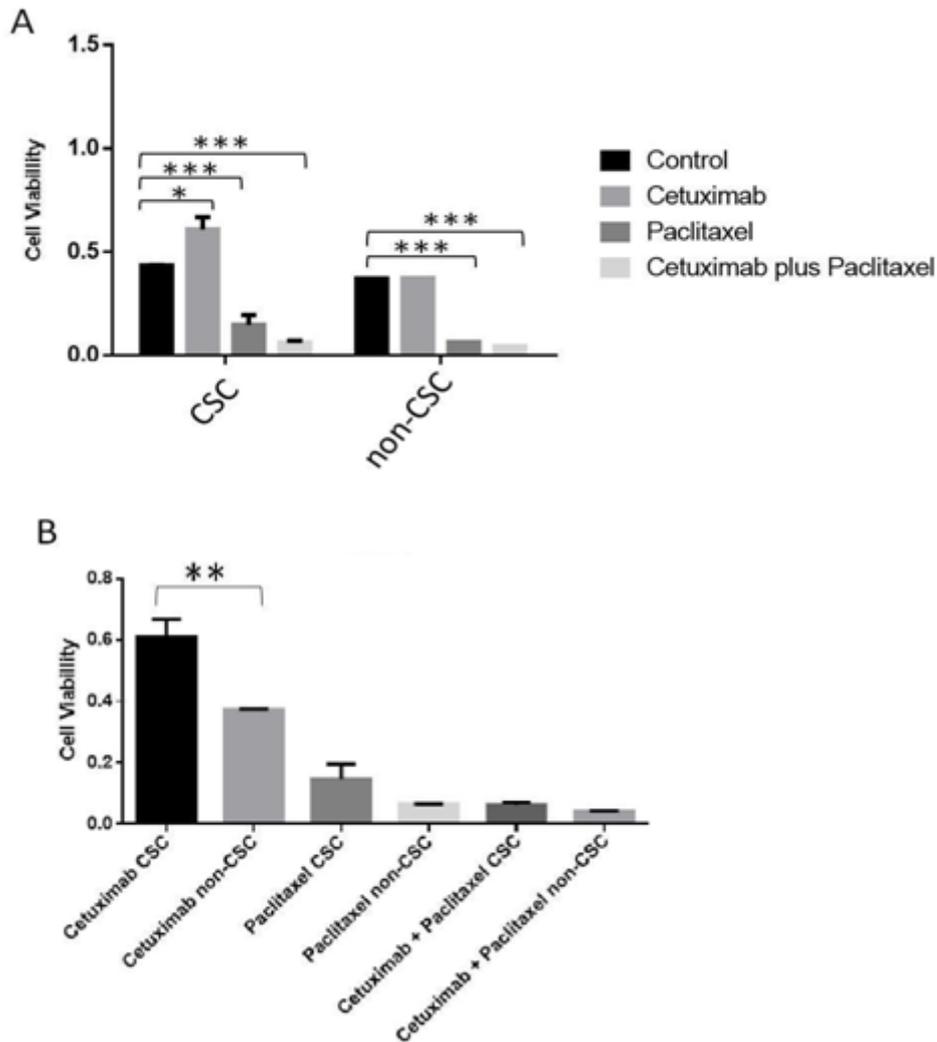


Figura 3: Imagem com os resultados do tratamento com Cetuximabe, Paclitaxel e Cetuximabe + Paclitaxel em relação às não tratadas (controle) e comparação entre CTTs e não-CTTs das linhagens FADU. 3A) Comparação de cada tratamento nas CTTs e nas não-CTTs. As CTTs foram resistentes ao Cetuximabe e sensíveis às demais terapias quando comparadas com o controle. A combinação de Cetuximabe+Paclitaxel mostrou-se mais eficaz quando comparadas às demais terapias. Cetuximabe não foi eficaz na eliminação das não-CTTs da linhagem FADU, entretanto o uso de paclitaxel foi eficaz eliminação de células. A combinação de Cetuximabe + Paclitaxel foi a terapia que apresentou maior efeito na eliminação tanto de CTTs quanto de não-CTTs. 3B) Comparação de cada tratamento nas CTTs e não-CTTs da linhagem FADU. As CTTs foram mais resistentes ao Cetuximab, Paclitaxel e a combinação de Cetuximabe+Paclitaxel, entretanto só houve diferença estatística entre os grupos no tratamento com Cetuximabe.

*c. Anexo 3*

**O papel da Tropomiosina Relacionada à Quinase B (TrkB) e do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) no Câncer**

Vilson Serafim Junior<sup>1</sup>, Glauca Maria de Mendonça Fernandes<sup>1</sup>, Juliana Garcia de Oliveira-Cucolo<sup>1</sup>, Erika Cristina Pavarino<sup>1</sup>, Eny Maria Goloni-Bertollo<sup>1</sup>

*1. Genetics and Molecular Biology Research Unit (UPGEM), São José do Rio Preto Medical School (FAMERP), São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil*

**Address correspondence to:** Eny Maria Goloni-Bertollo, Genetics and Molecular Biology Research Unit (UPGEM), São José do Rio Preto Medical School (FAMERP), SP, Brazil. E-mail: eny.bertollo@famerp.br; juniorgrolla21@gmail.com.

**Resumo**

O receptor de Tropomiosina Relacionada à Quinase B (TrkB) é um membro da família de receptores neurotróficos de tirosina quinase e juntamente com Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) desempenha um papel importante no desenvolvimento de câncer de mama, câncer de pulmão, neuroblastoma, câncer colorretal, leucemias, câncer cervical, câncer de vesícula biliar, câncer gástrico, câncer renal, sarcoma de ewing, câncer de esôfago e câncer de cabeça e pescoço. A superexpressão destes dois fatores têm sido associada ao aumento de processos envolvidos na carcinogênese, como invasão, migração, transição epitélio-mesenquimal (EMT), angiogênese, metástase, proliferação celular, resistência à apoptose, resistência à morte celular por perda de adesão (Anoiks), ativação e vias de proliferação celular, regulação de genes supressores de tumor, resistência à drogas e está relacionado com estágio clínico avançado. A inibição do eixo TrkB/BDNF usando drogas em estudos de fase 1, drogas aprovadas e Small Interfering RNA (siRNA) são estratégias promissoras para o tratamento de vários tumores malignos além de aumentar a sensibilidade de células resistentes à quimioterapia, melhorando a eficácia das drogas sem aumentar a toxicidade. Outro fator relacionado com mau prognóstico do câncer é a presença das células-tronco tumorais (CTTs), que conferem ao câncer efeitos similares a alta expressão do eixo TrkB/BDNF. O objetivo dessa revisão é mostrar o papel do eixo TrkB/BDNF em diversos tipos de câncer, seu possível uso como biomarcador prognóstico, os efeitos da inibição desse eixo bem como o seu papel nas células tronco-tumorais.

## 1. Introdução

O receptor de Tropomiosina Relacionada à Quinase B(TrkB) é um membro da família de Receptor Neurotrófico de Tirosina Quinase (NTRK) codificado pelo gene *NTRK2* e tem um importante papel na diferenciação, sobrevivência e proliferação de células neurais. O principal ligante do TrkB é o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF)(1), mas TrkB também pode se ligar à Neurotrofina 3 (NT3) e Neurotrofina 4 (NT4) (2).

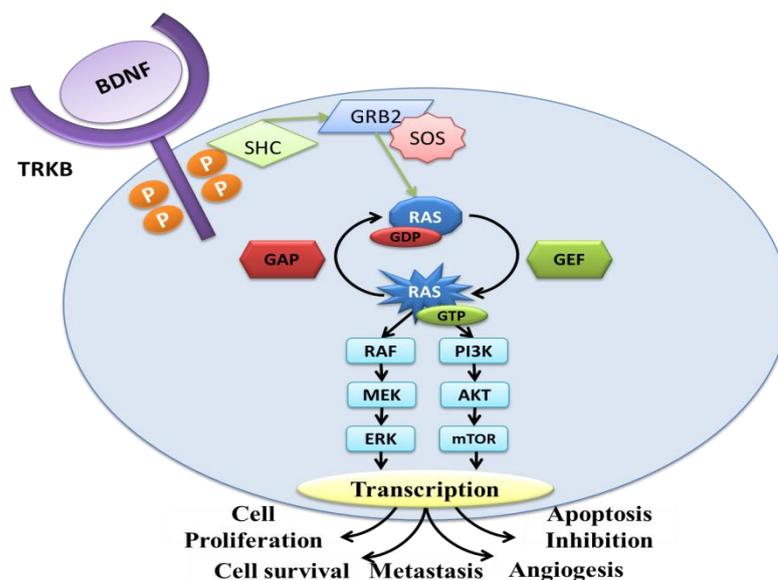
A família NTRK também é constituída por outras duas proteínas quinase: TrkA codificada pelo gene *NTRK1* e TrkC, codificada pelo gene *NTRK3*. O receptor TrkB é constituído por um domínio de ligação extracelular, um domínio transmembrana e outro domínio intracelular (3). Após a ligação do fator de crescimento com o TrkB, este receptor se autofosforila iniciando uma cascata a jusante levando à proliferação, diferenciação e crescimento celular como observado na figura 1 (4).

Alguns estudos mostram que a família NTRK pode atuar como oncogene em diversos tumores malignos humanos (5, 6) e o receptor TrkB tem sido associado com neuroblastoma (7), tumor de Wilm's (8), câncer de próstata (9), carcinoma hepatocelular (10) câncer de pâncreas (11), câncer de ovário (12), câncer gástrico (13, 14), câncer de cabeça e pescoço de células escamosas (15), câncer de cólon (16-18), carcinoma oral de células escamosas (19) e câncer de mama (20).

A alta expressão do TrkB e do BDNF está associada com um mau prognóstico no câncer por desempenhar papel na formação de metástase e transição epitélio mesenquimal (EMT) (21, 22), invasão, migração e nas atividades proliferativas(23). Além disso, essa alta expressão também está associada com a transativação do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) um proto-oncogene, aumentando a capacidade migratória das células de câncer de pulmão(24), promovendo resistência à drogas (25, 26) e inibição da apoptose após perda de aderência à matriz extracelular (Anoikis)(27). O uso de algumas drogas que são capazes de inibir o TrkB podem levar a diminuição desses efeitos (23, 28-37).

Outro fator relacionado com comportamento invasivo e metastático do câncer é a presença das células-tronco tumorais (CTT), uma pequena população de células presentes em alguns tipos tumorais. Essa população celular é responsável pela iniciação e manutenção do tumor além de ter capacidade de autorenovação e diferenciação celular

(38, 39), conseqüentemente sendo também associada a um mau prognóstico em diversos tipos tumorais (40-46). Baseado nesses achados da literatura, o objetivo dessa revisão é demonstrar o papel do receptor TrkB e do BDNF na progressão tumoral, EMT, surgimento de metástase, e que o uso de inibidores do eixo TrkB/BDNF são capazes de bloquear esses efeitos, bem com o papel deste receptor e seu ligante nas células-tronco tumorais..



**Figura 1:** Papel do TrkB e BDNF na proliferação e sobrevivência celular, formação de metástase, angiogênese e inibição da apoptose: a ligação do BDNF no TrkB inicia a auto-fosforilação deste receptor levando a ativação da cascata de proliferação jusante. Quando fosforilado, TrkB ativa a proteína SHC-transforming (SHC) que promove, por sua vez a ativação do complexo Growth factor receptor-bound protein 2/Son of Sevenless (GRB2-SOS) que irá promover a ativação de Rat Sarcoma (RAS) levado à proliferação e sobrevivência celular, formação de metástase, angiogênese e inibição da apoptose através das vias Mitogen Activate Protein Kinase (MAPK) e Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-. **Adaptado de:** Amatu A et al, 2016 (4) e Minichello L, 2009 (47).

## 2. Métodos

Uma pesquisa foi realizada na base de dados PUBMED usando as palavras-chave "Receptor, TrkB"[Mesh] AND "Brain-Derived Neurotrophic Factor"[Mesh] AND "Neoplasms"[Mesh]" e "Receptor TrkB"[Mesh] AND "Cancer stem cell". Foram incluídos artigos publicados na língua inglesa entre os períodos de Janeiro de 2014 e Agosto de 2019. Pelo fato de não haverem publicações nesse período com o câncer de esôfago, a busca para esse tipo tumoral foi ampliada para 10 anos. A busca para o câncer de cabeça e pescoço também foi ampliada para 10 anos por se tratar do tipo

tumoral abordado pelo nosso grupo de pesquisa. Os critérios de inclusão foram: artigos sobre o receptor TrkB e/ou fator de crescimento BDNF. Os critérios de exclusão foram: Artigos específicos sobre os receptores TrkA e TrkC.

### **3. Papel do receptor de tropomiosina relacionado à quinase B em diversos modelos de câncer**

#### **3.1 Câncer de Mama**

A ativação da via do TrkB pelo BDNF neste modelo tumoral pode estar relacionada ao crescimento celular e o comportamento metastático (3). TrkB é também um regulador chave das vias PI3K/Akte Janus kinase 2/Signal transducer and activator of transcription 3 (JAK/STAT3) sendo responsável por mediar a EMT. TrkB superexpresso também pode levar ao aumento da proliferação celular pela ligação direta ao receptor Proto-oncogene tyrosine-protein kinase (c-Src). A ativação das vias JAK2/STAT3 pelo TrkB pode levar ao aumento da expressão das proteínas Twist-related protein 1 and 2 (Twist-1 and 2) através da formação do complexo c-Src/JAK2 (21).

TrkB também desempenha papel chave na regulação de genes supressores de tumor como Runt-related transcription factor 3 (Runx3) and Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1). Após o knockdown do TrkB, usando small interfering RNA (siRNA), houve uma diminuição da expressão desses genes supressores de tumor. Esses dados sugerem que TrkB está diretamente relacionado com o surgimento de metástase através da supressão de Runx2 e Keap1 (22).

Além disso, BDNF superexpresso pode estar relacionado com recorrência tumoral, desempenhando um papel importante nas habilidades metastáticas do câncer de mama triplo negativo (ausência dos receptores Human Epithelia Growth Factor Receptor (Her2), e também dos receptores de estrogênio e progesterona) (48). O BDNF presente no micro-ambiente das células tumorais também foi capaz de induzir a regulação autócrina e parácrina do TrkB. Esses eventos aumentaram as habilidades migratórias das células de câncer de mama (49).

Um estudo demonstrou que a hetero-dimerização dos receptores TrkB e Her2 podem conferir às células metastáticas do câncer de mama maior capacidade de sobrevivência no cérebro. O knockdown do TrkB pode levar à diminuição desses

eventos, mostrando que a inibição desses receptores pode ser usada como uma potencial estratégia terapêutica para tratar o câncer de mama (50).

### **3.2 Câncer de Pulmão**

No câncer de pulmão (CP), foi visto que TrkB e BDNF estavam co-expressos em 54,4% de todos os casos e que BDNF foi responsável por ativar a via de proliferação STAT3, entretanto quando foi feito o bloqueio do TrkB com o uso de drogas em estudo clínico de fase 1, houve diminuição da ativação dessa via (51). Já no câncer de pulmão de células não pequenas (CPCNP), TrkB foi visto super expresso em 33% dos tumores enquanto BDNF foi positivo em 65,5% dos casos e a sobrevida global de pacientes submetidos a ressecção cirúrgica não mostrou diferença entre pacientes que apresentaram ou não expressão aumentada do TrkB ou BDNF e dados indicam que essa via pode estar relacionada com mau prognóstico neste tipo tumoral (52). A alta expressão do TrkB também levou ao aumento da capacidade migratória da células de CPCNP. Além disso, TrkB pode ser transativado pelo receptor EGFR. Isso indica que essa superexpressão pode ser um passo inicial para a disseminação do tumor e que a inibição deste receptor representa um potencial alvo para o desenvolvimento de terapias de tratamento (24)

Outro estudo que utilizou células transfectadas com Zincfinger protein GLI1 (GLI1) siRNA demonstrou superexpressão do TrkB. O knockdown individual de GLI1 ou do TrkB mostraram redução significativa na proliferação celular, mas o knockdown de ambos (GLI1 e TrkB) levou ao bloqueio da proliferação celular. O knockdown de GLI1 não levou a redução das capacidades invasiva e migratórias das células, porém o knockdown do TrkB foi capaz de diminuir a capacidade invasiva e migratória das células do câncer de pulmão (53). Outro fator importante é que a alta expressão do gene *NTRK2* está relacionada com baixa sobrevida dos pacientes por conferir ao tumor habilidades invasivas e migratórias (54) e o uso de siRNA ou drogas inibidoras do eixo TrkB/BDNF foram capazes de diminuir essas características e também as atividades proliferativas (23).

### 3.3 Neuroblastoma

TrkB e BDNF estão expressos em 50-60% dos neuroblastomas de alto risco e ambos podem ativar vias autócrinas aumentando a invasão, metástase, sobrevivência celular, angiogênese e resistência à drogas. Estudos demonstram que o uso de inibidores de TrkB associados a drogas como Etoposido, Irinotecano e Temozolomida tem aumentado a eficácia da quimioterapia sem aumentar a sua toxicidade, indicando que a inibição dessa via aumenta a sensibilidade do câncer a essas drogas(28, 29, 32).

A alta expressão do TrkB também foi vista em células de neuroblastoma que apresentaram baixa regulação de Pleckstrin homology-like domain family A member 1 (PHLDA1), consequentemente também aumentando a expressão de Aurora kinase A (AURORA A), proteína que participa do processo de proliferação celular. Juntas, essas proteínas são consideradas biomarcadores de mau prognóstico para neuroblastoma(55). N-mycproto-oncogene protein (MYCN) superexpresso também levou ao aumento na expressão do TrkB em neuroblastoma (56).

TrkB ativado por BDNF levou à super regulação de Galectina-1 (Gal-1) e o bloqueio desse receptor diminuiu a invasão celular mediada por BDNF. Isso sugere que Gal-1 é um importante efector na invasão celular mediada por BDNF (57).

O uso de Entrectinib foi capaz de diminuir a expressão do TrkB em modelos *in vivo* e *in vitro*, bem como o crescimento celular de células de neuroblastoma que expressam TrkB. Esses achados sugerem que Entrectinib é um potencial inibidor de TrkB capaz de melhorar a eficácia das terapias convencionais em modelos *in vivo*(30) dados confirmados posteriormente por Drilon et al,2017 (58). De modo contrário, o uso de trióxido de arsênio (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) foi capaz de aumentar a expressão de TrkB, porém devido à seus efeitos apoptóticos, essa droga ainda pode ser utilizada como adjuvante na terapia medicamentosa (32).

### 3.4 Câncer Colorretal

No câncer colorretal (CCR), os tecidos que apresentaram alta expressão de BDNF e TrkB foram associados com aumento das habilidades invasivas e migratórias, destacando invasão peritoneal, metástase local, de fígado e linfonodos. Por esta razão, a expressão desse receptor e seu ligante estão associados a um mau prognóstico (36, 59).

Entretanto análises *in vivo* e *in vitro* mostraram que quando o TrkB é bloqueado através do uso de drogas há uma diminuição desses efeitos. Com isso, há indícios de que o bloqueio do eixo TrkB/BDNF pode ser uma emergente estratégia terapêutica para tratar carcinomatose peritoneal advinda do câncer colorretal (36).

Dados da literatura sugerem que a via BDNF/TrkB aumenta significativamente a proliferação celular, migração, invasão, EMT, resistência à anoikis e à apoptose do CCR. Entretanto o uso de drogas capazes de inibir essa via, tanto em monoterapia quanto em combinação, pode melhorar a sobrevida de pacientes acometidos por esse tipo de câncer (59). Além disso, TrkB pode ser uma importante via para o desenvolvimento de terapias customizadas para tratar o CCR(60).

Outro estudo notou que mesmo durante o uso de drogas inibidoras do TrkB esse receptor e seu ligante BDNF foram vistos co-localizados. Isso sugere que mesmo com a inibição de TrkB há uma interação entre ele e seu ligante. Entretanto o aumento da expressão do eixo TrkB/BDNF não foi capaz de ativar a cascata de proliferação celular. Após o uso de drogas houve uma diminuição dos níveis de TrkB, Akt e mTOR fosforilados, confirmando a inibição da via de proliferação celular. Em adição, a inibição de TrkB associada com inibição de autofagia mostrou maior eficácia comparada com a inibição apenas do TrkB. Esses dados evidenciam que a combinação desses dois métodos (inibição de TrkB + inibição da autofagia) também pode ser uma via promissora para o tratamento do câncer colorretal(61).

### **3.5 Câncer de Vesícula Biliar**

No câncer de vesícula biliar (CVB), foi visto que TrkB está superexpresso em 91.3% dos tumores primários. Pacientes que apresentam tumores com alta expressão desse receptor tem baixa sobrevida global comparados com pacientes que apresentam baixa expressão (62).

Modelos *in vitro* que apresentam alta expressão de TrkB, contendo ou não mutação de *Kras*, tem grandes habilidades invasiva e migratória e também indução de EMT. O uso de inibidores do TrkB levou à diminuição da fosforilação de MEK e também diminuiu a proliferação celular em células de CVB com *Kras* selvagem. Em linhagens celulares contendo *Kras* mutado, o bloqueio de TrkB não foi capaz de inibir a fosforilação de MEK e nem diminuiu a proliferação celular. Esses dados indicam que a

inibição de TrkB é capaz de diminuir a capacidade invasiva e migratória, levar à baixa expressão de Hypoxia Inducible Factor 1 alpha -*HIF1α* e Vascular Endothelial Growth Factor- *VEGFA*, C e D e pode ser utilizada como uma via promissora para o tratamento de CVB com Kras selvagem (62, 63)

*In vivo* o crescimento tumoral e a tumorigenicidade estão diminuídas em amostras tratadas com inibidor de TrkB. Esses dados mostram que TrkB desempenha um papel importante na angiogênese, linfangiogênese, proliferação, invasão e tumorigênese, podendo ser uma emergente via terapêutica sem depender do status de mutação de Kras(63).

### **3.6 Câncer Renal**

Células do Câncer Renal (CR) são resistentes a morte celular programada e apresentam alta expressão de TrkB bem como alto potencial proliferativo e habilidade agressiva de invasão quando comparadas as células do mesmo tecido sem expressão de TrkB. O silenciamento do TrkB, permitiu diminuição destes mecanismos e melhora da ação do medicamento Sorafenib nas células resistentes a Anoikis por meio da inibição das vias PI3K/Akt e MEK/ERK (64).

Embora BDNF tenha uma alta afinidade pelo receptor TrkB, no câncer renal (CR) ele também pode se ligar a outro receptor como p75NTR, um membro da família de necrose tumoral. A super expressão de p75NTR ativada por BDNF foi identificada em tecidos de CR. Análises realizadas utilizando duas linhagens celulares (ACHN e 786-O) mostraram que p75NTR ativado por BDNF induz a sobrevivência celular e as habilidades migratórias. Essas habilidades independem do TrkB porque ocorreram mesmo durante o uso de drogas inibidoras desse receptor(35). Com isso, conclui-se que a inibição do TrkB pode ser uma via promissora para o tratamento de CR (35, 64).

### **3.7 Outros Modelos Tumorais**

Os modelos tumorais abaixo ainda são pouco estudados e por este motivo não há grande quantidade de dados na literatura. São eles: Leucemia de células T do adulto (ALT), Leucemia linfocítica crônica de células B (B-CLL), câncer cervical (CC), câncer gástrico (CG), sarcoma de Ewing (SE) e carcinoma de células escamosas de esôfago (CCEE).

Em leucemia de células T do adulto a proteína HTLV-I bZIP (HBZ) codificada pelo vírus linfotrófico de células T humanas do tipo I (HTLV-1) tem capacidade de ativar a expressão do BDNF. Esses dados foram confirmados pela análise que mostrou uma alta expressão de BDNF em linhagens de células T infectadas pelo vírus HTLV-1 quando comparadas com linhagens de células T não infectadas. Essas linhagens infectadas também apresentam uma expressão elevada de TrkB quando comparadas com linhagens não infectadas. Células mononucleadas do sangue periférico de pacientes com ALT apresentavam altos níveis de mRNA de TrkB e BDNF quando comparadas com células de pacientes não infectados. A terapia utilizando inibidores de TrkB aumentou os efeitos apoptóticos de células T infectadas pelo HTLV-1 e isso sugere que a proteína HBZ induz a ativação de TrkB/BDNF aumentando a sobrevivência das células-T (65). A interação entre o Receptor de Neurotensina Tipo 2 (NTSR2) e TrkB dependente de BDNF pode atuar dirigindo a oncogenicidade e foi visto altamente expresso em leucemia linfocítica crônica de células B. Essa interação aumentou a expressão de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 e Bcl-xL. Essa interação também induziu a ativação autócrina e parácrina de vias de sinalização como Scr e Akt, levando à sobrevivência celular. Esses dados são evidenciados quando TrkB perdeu a habilidade de proteger as células da apoptose após baixa regulação do NTSR2. Isso sugere que a inibição de NTSR2 pode ser uma emergente via para tratamento de B-CLL (66).

No câncer cervical, BDNF e TrkB foram vistos superexpressos quando comparados com células do tecido normal. O silenciamento do TrkB diminuiu a EMT através da baixa regulação de N-caderina, Vimentina, matrix metaloproteinase 2 e 9 também alta regulação de E-caderina. Esses resultados diminuíram a proliferação, migração e invasão celular. A superexpressão das vias ERK e Akt também foi observada no CC, porém o knockdown do TrkB levou a baixa regulação das vias ERK e Akt (67). As taxas de TrkB/BDNF foram positivamente associadas com metástase de linfonodos do CC e a superexpressão do TrkB foi associada com mau prognóstico e baixa sobrevida. Análises realizadas *in vitro* usando cinco linhagens celulares de CC (HeLa, SiHa, CASKI, C4-1 e C-33a) mostraram que BDNF e TrkB estão também relacionados com tolerância à Anoikis e células que apresentam essa característica tem maior atividade proliferativa quando comparadas com outras linhagens celulares. Essas células resistentes a Anoikis também apresentaram superexpressão de Bcl-2 e baixa

expressão de Caspase-3. Quando foi realizado o knockdown do TrkB, esses eventos foram revertidos em células resistentes a Anoikis. Além disso, foi mostrado também que BDNF/TrkB pode ativar a via PI3K/Akt, induzindo a proliferação de células resistentes à Anoikis no CC. A inibição do eixo BDNF/TrkB pode também ser uma via emergente para tratar esse tipo tumoral (27).

No câncer gástrico foi encontrado apenas um estudo na literatura. A alta expressão do eixo BDNF/TrkB foi associada com a formação de metástase óssea proveniente de CG. O eixo BDNF/TrkB elevou os níveis de Pentraxina3 (PTX3), uma proteína envolvida no aumento da interação entre as células do CG e os osteoblastos. Quando foi realizado knockdown da PTX3 usando small interfering RNA (siRNA), houve uma diminuição da interação entre as células do CG e os osteoclastos. Esses dados sugerem que a interação entre o eixo BDNF/TrkB e a proteína PTX3 aumenta a osteólise e está diretamente relacionada com a formação de metástase óssea advinda de CG avançado (68).

No sarcoma de Ewing, TrkB e BDNF também foram vistos superexpressos. Um estudo que utilizou uma droga inibidora de TrkB (Ana-12) foi capaz de diminuir a proliferação celular. Quando Ana-12 foi associada uma droga inibidora de TrkA (GW-441756) foi visto um sinergismo desses efeitos. O uso combinado da droga inibidora de TrkB com doses sub efetivas de quimioterapia citotóxica (vincristina, etoposido e doxorubicina) levou à redução da proliferação celular mesmo em células resistentes à quimioterapia convencional. Esses achados destacam a eficácia do uso de inibidores de TrkB para o tratamento de SE (34).

Em carcinoma de células escamosas de esôfago a alta expressão do TrkB está diretamente relacionada à resistência à cisplatina e 5-fluorouracil. Duas linhagens celulares de CCEE que apresentavam alta expressão do TrkB (TE2 e TE3) foram relacionadas com resistência aos dois quimioterápicos em concentrações de relevância clínica. Outras duas linhagens celulares de CCEE que apresentavam baixa expressão do receptor (KYSE30 e KYSE70) não apresentaram resistência aos quimioterápicos. A expressão de TrkB também foi avaliada em tumores primários do CCEE e foi observado que essa alta expressão está relacionada com invasão de estruturas adjacentes. De acordo com esses achados, a superexpressão de TrkB foi associada com resistência à

quimioterapia *in vitro* e com um fenótipo altamente invasivo *in vivo*, levando assim ao surgimento de metástase (25).

### **3.8 TrkB no Câncer de Cabeça e Pescoço**

A alta expressão do TrkB foi observada em tumores primários de carcinoma nasofaríngeo (CN), destacando-se esse aumento em cerca de 66.7% dos Carcinomas Sinonasais de Células Escamosas (CSCE). Esta porcentagem sobe para 85.7% em pacientes com metástase de linfonodos. Essa alta expressão foi co-relacionada com recorrência locorregional, estágio clínico avançado e diferenciação de células escamosas, tendo como consequência, baixa sobrevida e baixa sobrevida livre de doença(69, 70).

Além disso, o eixo BDNF/TrkB também foi responsável pela migração e resistência à Anoikis em linhagens celulares de CN. Após a inibição do TrkB através do uso de drogas, esses efeitos foram reduzidos, mostrando que o uso de drogas capazes de inibir esse eixo podem ser usadas como sensibilizador de Anoikis, reduzindo o potencial metastático do CN (37).

Em tumores primários de adenoide cístico de glândula salivar (ASGS) o eixo BDNF/TrkB conferiu às células grande habilidade de invasão por levar à diminuição de E-caderina. O uso de BDNF recombinante humano (rhBDNF) na cultura de ASGS aumentou a EMT, entretanto após o bloqueio do eixo BDNF/TrkB houve diminuição desse efeito. Isso mostra que a inibição desse eixo pode ser uma potencial estratégia para tratar ASGS (33). Em uma co-cultura de ASGS com células de Schwann (CS) (responsáveis pela produção da bainha de mielina) as altas taxas do eixo TrkB/BDNF aumentaram a expressão de N-Caderina, Vimentina e diminuíram a expressão de E-Caderina. A alta expressão desse eixo pode ter relação com as atividades invasivas e migratórias, podendo estar associada à invasão perineural. O uso de drogas bloqueadoras de TrkB foram capazes de reverter esses efeitos. Também foi possível ver que as CS desempenham um papel importante na EMT mediada pelo eixo BDNF/TrkB(71).

O eixo BDNF/TrkB foi visto superexpresso em 50% dos cânceres de cabeça e pescoço de células escamosas (CCPCE), mas estava sub expresso na mucosa normal. Essa expressão reduziu a expressão de E-caderina, e aumentou a expressão de Twist,

levando ao EMT. A estimulação de CCPCE usando BDNF aumentou as habilidades invasivas e migratórias em modelo animal. A sub expressão do TrkB levou também à diminuição do crescimento tumoral, mostrando que o eixo BDNF/TrkB pode ser um componente do multi-passo da progressão tumoral, o que o torna uma via terapêutica promissora para tratar CCPCE (15). A resistência a drogas relacionada com a alta expressão de TrkB também foi relatada em CCPCE. Nesse tipo tumoral, o TrkB ativou X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP) levando a inibição das caspases. TrkB super expresso também ativou MultiDrug Resistance 1 protein (MDR1) e juntos, esses eventos tornaram as células resistentes à cisplatina. Esse receptor desempenhou papel na regulação de agentes citotóxicos e sua modulação induziu a sensibilidade à cisplatina por diminuir a expressão de XIAP e MDR1. A inibição da via Akt também foi capaz de reduzir os efeitos de TrkB na ativação de XIAP e MDR1, mostrando que o eixo BDNF/TrkB desempenha um papel crucial no desenvolvimento de resistência à cisplatina através da via de sinalização Akt (26).

Além disso, outras drogas podem ser utilizadas como alternativa para a resistência a cisplatina através da inibição do TrkB. Em linhagens celulares de CCPCE, a inibição de TrkB usando drogas sensibilizadoras de cisplatina diminuiu a proliferação de células que anteriormente eram resistentes à cisplatina. Essa inibição dependia do tempo de proliferação celular. Isso mostra que a inibição de membros da família Trk pode ser um promissor adjuvante no tratamento de tumores resistentes à cisplatina dependentes de TrkB(31).

A alta expressão do receptor TrkB, bem como do seu ligante BDNF conferem às células características importantes para o desenvolvimento e manutenção de diversos tipos de câncer, como pode ser visto na tabela 1.

Tabela 1: Características conferidas pela alta expressão do eixo BDNF/TrkB as células.(X) representa presença da característica.

CancerType	Invasion	Migration	EMT	Angiogenesis	Metastasis	CellProliferation	Apoptosisresistance	Anoikisresistance	Advancedclinicalstage	ActivationofPI3K/Akt	ActivationofJAK/STAT3	ActivationofTwist1andTwist2	RegulationofSuppressorofTumorGenes	DrugResistance	AutorofStudy
Breast			X		X	X				X	X	X			Kim et al., 2015 (21)
					X								X		Kim et al., 2016 (22)
		X			X										Tsai et al., 2017 (49)
		X			X										Choy et al., 2017 (50)
Lung					X					X	X				Gotz and Sandtner, 2014 (24)
						X									Chen et al, 2016(51)
	X	X				X									Onishi et al., 2017(53); Kimura et al., 2018 (52)
	X	X													Rolf and Raez, 2017(54); Ozono et al., 2017(23)
Neuroblastoma														X	Li et al., 2015(29)
	X	X		X										X	Croucher et al. 2015 (28)
	X					X									Batzke et al., 2018(57)
						X									Iyer et al., 2016 (30)
Colorrectal					X	X									Xiong et al., 2018(32)
	X	X			X			X							Tanaka et al., 2014 (36)
	X	X	X		X	X	X	X	X						Akil et al., 2016(59)
										X					Mazouffre et al., 2017(61)
Leukemia							X							Polakowski et al., 2014 (65)	
Cervical			X			X				X					Abbaci et al., 2018 (66)
					X	X	X	X		X					Yuan et al., 2018a(27)
Gallbladder			X	X		X									Kawamoto et al., 2017 (63)
	X	X	X			X									Kawamoto et al., 2018 (62)
Gastric					X										Choi et al., 2016 (68)
Renal		X						X							De La Cruz-Morcilloet al., 2016 (35)
Ewing Sarcoma						X								X	Heinenet al., 2016 (34)
Esophageal	X				X		X							X	Tanaka et al., 2009 (25)
Head andNeck					X										Li and Zhu, 2017 (69)
		X		X	X		X								Jia et al., 2015(33)
		X	X	X											Shan et al., 2016 (71)
					X				X						Li et al., 2014(70)
			X						X						Ng et al., 2012 (37)
		X	X	X		X									Kupferman et al., 2010 (15)
									X				X	Lee et al., 2012(26)	
					X								X	Yilmazet al., 2010 (31)	

#### **4. TrkB em Célula-Tronco Tumoral**

Células-tronco tumorais (CTT) são uma subpopulação celular presente em alguns tipos de câncer (39). CTTs apresentam habilidades de diferenciação e auto renovação, sendo crucial para a iniciação e progressão do câncer (40). Alguns biomarcadores de superfície celular podem ser utilizados para identificar as CTTs como Aldeído Desidrogenase I (ALDH1), CD44, CD117 e CD133 (72, 73) e tumores que apresentam CTTs tem alta expressão desses biomarcadores (44, 74).

No câncer de mama triplo negativo (CMTN), CTTs foram responsáveis pela recorrência tumoral, porém os mecanismos responsáveis por esse evento ainda são inexplicados. CTTs derivadas de CMTN recorrente tiveram maior capacidade de auto renovação quando comparadas com CTTs de tumores primários. O fator de transcrição Kruppel-like factor 4 (KLF4) leva à uma potencial auto-renovação das CTTs que apresentam superexpressão de TrkB ativado por BDNF (CTT+TrkB). As CTT+TrkB foram relacionadas como responsáveis pela recorrência de CMTN. Em uma análise realizada com modelos de camundongo, a remoção da população CTT+TrkB levou à prevenção da recidiva tumoral nesses animais (75).

No modelo tumoral de glioma humano, as CTTs que apresentaram TrkB superexpresso bem como BDNF e NT3, foram responsáveis pela iniciação e progressão maligna. TrkB ativado por BDNF ou por NT3 levou à ativação das vias ERK e Akt, aumentando a viabilidade das CTTs. O uso de pan-inibidor de Trk (droga capaz de inibir os três membros da família Trk) ou knockdown dessas estruturas foi capaz de diminuir o crescimento das CTTs. A inibição das vias ERK e Akt foi capaz de bloquear a sobrevivência das CTTs mediada por BDNF e NT3 (76).

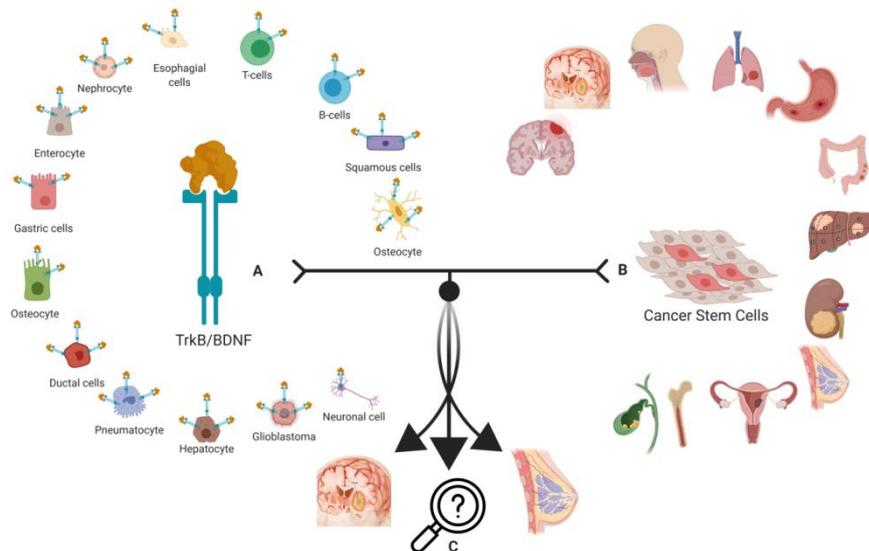


Figura 2: A: Representação de todos os tipos celulares de câncer reportados nesse estudo que apresentam BDNF e TrkB superexpressos. B: mostra a presença de CTTs in todos esses cânceres. C: relata os tipos de câncer que apresentam ambas as características (BDNF/TrkB superexpressos e CTTs). BDNF e TrkB estão expressos em CTTs de mais algum tipo de câncer? Mais estudos são necessários para responder esta questão.

### 5. Drogas Inibidoras de TrkB

Além do uso de siRNA, algumas drogas estão em testes clínicos de fase 1 para avaliar seu efeito como inibidor da família Trk. Drogas como AZ64 (31), AZD6918 (29) GNF4256 (28), Ana-12 (34, 77), K252a (34), CEP-701 (3), MGCD516, PLX7486, DS-6051b, TSR-011 (78) podem atuar melhorando a resposta terapêutica de diversos modelos tumorais como descrito na tabela 2. (3)

Tabela 2: Drogas em estudos clínicos de fase 1 e seus efeitos em diversos modelos tumorais.

Droga	Modelo tumoral	Efeito da utilização	Referência
AZ64	HNSCC	Inibição da proliferação celular	(31)
AZD6918	Neuroblastoma	Sensibilização de células tumorais ao Etoposido	(29)
GNF4256	Neuroblastoma	Inibição do crescimento celular e sensibilização à associação de irinotecano associado à temozolomida	(28)
Ana-12	Carcinoma oral e Sarcoma de Ewing	Reversão dos comportamentos semelhantes à dor induzidos pelo tumor oral/ diminuição da proliferação celular	(34, 77)
K252a	Sarcoma de Ewing	Associado com dose sub efetiva de quimioterapia citotóxica, diminuição da proliferação celular e da formação de colônia	(34)
MGCD516 PLX7486 DS-6051b	Tumores Sólidos	Não descrito	(78)
TSR-011	Câncer de pulmão de células não pequenas	Não descrito	(78)
<i>CEP-701</i>	Câncer de mama	Indução da morte celular e regressão tumoral	(3)

## 6. Conclusão

O eixo BDNF/TrkB pode desempenhar papéis importantes em diversos tipos de câncer, sendo responsável pela proliferação celular, resistência à apoptose, resistência à Anoikis, estágio clínico avançado, ativação das vias PI3K/Akt e JAK/STAT3, ativação das proteínas Twist 1 e 2, regulação de genes supressores de tumor e de resistência à drogas, invasão, migração, transição epitélio-mesenquimal, angiogênese e metástase. Portanto, o eixo BDNF/TrkB está associado com mau prognóstico e pode ser utilizado como biomarcador para diversos tipos de câncer. As células-tronco tumorais conferem ao tumor comportamento similar e também estão associadas a um mau prognóstico. Quando associados, TrkB e CTTs conferem maior viabilidade e podem levar a recorrência tumoral. É a superexpressão de TrkB quem confere às CTTs essas habilidades? Ainda não se sabe. O que se sabe é que ambos representam vias promissoras para o desenvolvimento de novas estratégias, capazes de melhorar a atual terapia do câncer e são alvos potenciais para o desenvolvimento de terapias customizadas, porém ainda são necessários mais estudos avaliando a relação entre essas duas estruturas para elucidar os mecanismos subjacentes.

## 7. Referências

1. Chao MV, Bothwell M. Neurotrophins: to cleave or not to cleave. *Neuron*. 2002;33(1):9-12.
2. Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2006;361(1473):1545-64.
3. Tajbakhsh A, Mokhtari-Zaer A, Rezaee M, Afzaljavan F, Rivandi M, Hassanian SM, et al. Therapeutic Potentials of BDNF/TrkB in Breast Cancer; Current Status and Perspectives. *J Cell Biochem*. 2017;118(9):2502-15.
4. Amatu A, Sartore-Bianchi A, Siena S. gene fusions as novel targets of cancer therapy across multiple tumour types. *ESMO Open*. 2016;1(2):e000023.
5. McGregor LM, McCune BK, Graff JR, McDowell PR, Romans KE, Yancopoulos GD, et al. Roles of trk family neurotrophin receptors in medullary thyroid carcinoma development and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(8):4540-5.
6. Perez-Pinera P, Hernandez T, García-Suárez O, de Carlos F, Germana A, Del Valle M, et al. The Trk tyrosine kinase inhibitor K252a regulates growth of lung adenocarcinomas. *Mol Cell Biochem*. 2007;295(1-2):19-26.
7. Nakagawara A, Azar CG, Scavarda NJ, Brodeur GM. Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol Cell Biol*. 1994;14(1):759-67.
8. Eggert A, Grotzer MA, Ikegaki N, Zhao H, Cnaan A, Brodeur GM, et al. Expression of the neurotrophin receptor TrkB is associated with unfavorable outcome in Wilms' tumor. *J Clin Oncol*. 2001;19(3):689-96.
9. Satoh F, Mimata H, Nomura T, Fujita Y, Shin T, Sakamoto S, et al. Autocrine expression of neurotrophins and their receptors in prostate cancer. *Int J Urol*. 2001;8(7):S28-34.
10. Yang ZF, Ho DW, Lam CT, Luk JM, Lum CT, Yu WC, et al. Identification of brain-derived neurotrophic factor as a novel functional protein in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2005;65(1):219-25.
11. Scwab GM, Fujioka S, Schmidt C, Li Z, Frederick WA, Yang W, et al. Overexpression of tropomyosin-related kinase B in metastatic human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2005;11(2 Pt 1):440-9.
12. Yu X, Liu L, Cai B, He Y, Wan X. Suppression of anoikis by the neurotrophic receptor TrkB in human ovarian cancer. *Cancer Sci*. 2008;99(3):543-52.
13. Tanaka K, Mohri Y, Nishioka J, Kobayashi M, Ohi M, Miki C, et al. Neurotrophic receptor, tropomyosin-related kinase B as an independent prognostic marker in gastric cancer patients. *J Surg Oncol*. 2009;99(5):307-10.
14. Okugawa Y, Tanaka K, Inoue Y, Kawamura M, Kawamoto A, Hiro J, et al. Brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin-related kinase B pathway in gastric cancer. *Br J Cancer*. 2013;108(1):121-30.
15. Kupferman ME, Jiffar T, El-Naggar A, Yilmaz T, Zhou G, Xie T, et al. TrkB induces EMT and has a key role in invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene*. 2010;29(14):2047-59.
16. Yu Y, Zhang S, Wang X, Yang Z, Ou G. Overexpression of TrkB promotes the progression of colon cancer. *APMIS*. 2010;118(3):188-95.
17. Fujikawa H, Tanaka K, Toiyama Y, Saigusa S, Inoue Y, Uchida K, et al. High TrkB expression levels are associated with poor prognosis and EMT induction in colorectal cancer cells. *J Gastroenterol*. 2012;47(7):775-84.

18. Sasahira T, Ueda N, Kurihara M, Matsushima S, Ohmori H, Fujii K, et al. Tropomyosin receptor kinases B and C are tumor progressive and metastatic marker in colorectal carcinoma. *Hum Pathol.* 2013;44(6):1098-106.
19. Dudás J, Bitsche M, Schartinger V, Falkeis C, Sprinzl GM, Riechelmann H. Fibroblasts produce brain-derived neurotrophic factor and induce mesenchymal transition of oral tumor cells. *Oral Oncol.* 2011;47(2):98-103.
20. Patani N, Jiang WG, Mokbel K. Brain-derived neurotrophic factor expression predicts adverse pathological & clinical outcomes in human breast cancer. *Cancer Cell Int.* 2011;11(1):23.
21. Kim MS, Lee WS, Jeong J, Kim SJ, Jin W. Induction of metastatic potential by TrkB via activation of IL6/JAK2/STAT3 and PI3K/AKT signaling in breast cancer. *Oncotarget.* 2015;6(37):40158-71.
22. Kim MS, Lee WS, Jin W. TrkB Promotes Breast Cancer Metastasis via Suppression of Runx3 and Keap1 Expression. *Mol Cells.* 2016;39(3):258-65.
23. Ozono K, Ohishi Y, Onishi H, Nakamura K, Motoshita J, Kato M, et al. Brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin-related kinase B signaling pathway contributes to the aggressive behavior of lung squamous cell carcinoma. *Lab Invest.* 2017;97(11):1332-42.
24. Götz R, Sendtner M. Cooperation of tyrosine kinase receptor TrkB and epidermal growth factor receptor signaling enhances migration and dispersal of lung tumor cells. *PLoS One.* 2014;9(6):e100944.
25. Tanaka K, Mohri Y, Nishioka J, Ohi M, Yokoe T, Miki C, et al. Neurotrophic receptor, tropomyosin-related kinase B, as a chemoresistant marker in oesophageal cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2009;21(4):362-3.
26. Lee J, Jiffar T, Kupferman ME. A novel role for BDNF-TrkB in the regulation of chemotherapy resistance in head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS One.* 2012;7(1):e30246.
27. Yuan Y, Ye HQ, Ren QC. Proliferative role of BDNF/TrkB signaling is associated with anoikis resistance in cervical cancer. *Oncol Rep.* 2018;40(2):621-34.
28. Croucher JL, Iyer R, Li N, Molteni V, Loren J, Gordon WP, et al. TrkB inhibition by GNF-4256 slows growth and enhances chemotherapeutic efficacy in neuroblastoma xenografts. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2015;75(1):131-41.
29. Li Z, Zhang Y, Tong Y, Tong J, Thiele CJ. Trk inhibitor attenuates the BDNF/TrkB-induced protection of neuroblastoma cells from etoposide in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther.* 2015;16(3):477-83.
30. Iyer R, Wehrmann L, Golden RL, Naraparaju K, Croucher JL, MacFarland SP, et al. Entrectinib is a potent inhibitor of Trk-driven neuroblastomas in a xenograft mouse model. *Cancer Lett.* 2016;372(2):179-86.
31. Yilmaz T, Jiffar T, de la Garza G, Lin H, Milas Z, Takahashi Y, et al. Therapeutic targeting of Trk suppresses tumor proliferation and enhances cisplatin activity in HNSCC. *Cancer Biol Ther.* 2010;10(6):644-53.
32. Xiong X, Li Y, Liu L, Qi K, Zhang C, Chen Y, et al. Arsenic trioxide induces cell cycle arrest and affects Trk receptor expression in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Biol Res.* 2018;51(1):18.
33. Jia S, Wang W, Hu Z, Shan C, Wang L, Wu B, et al. BDNF mediated TrkB activation contributes to the EMT progression and the poor prognosis in human salivary adenoid cystic carcinoma. *Oral Oncol.* 2015;51(1):64-70.

34. Heinen TE, Dos Santos RP, da Rocha A, Dos Santos MP, Lopez PL, Silva Filho MA, et al. Trk inhibition reduces cell proliferation and potentiates the effects of chemotherapeutic agents in Ewing sarcoma. *Oncotarget*. 2016;7(23):34860-80.
35. De la Cruz-Morcillo MA, Berger J, Sánchez-Prieto R, Saada S, Naves T, Guillaudeau A, et al. p75 neurotrophin receptor and pro-BDNF promote cell survival and migration in clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2016;7(23):34480-97.
36. Tanaka K, Okugawa Y, Toiyama Y, Inoue Y, Saigusa S, Kawamura M, et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-induced tropomyosin-related kinase B (Trk B) signaling is a potential therapeutic target for peritoneal carcinomatosis arising from colorectal cancer. *PLoS One*. 2014;9(5):e96410.
37. Ng YK, Wong EY, Lau CP, Chan JP, Wong SC, Chan AS, et al. K252a induces anoikis-sensitization with suppression of cellular migration in Epstein-Barr virus (EBV)--associated nasopharyngeal carcinoma cells. *Invest New Drugs*. 2012;30(1):48-58.
38. Tirino V, Desiderio V, Paino F, De Rosa A, Papaccio F, La Noce M, et al. Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization. *FASEB J*. 2013;27(1):13-24.
39. Wiechec E, Hansson KT, Alexandersson L, Jönsson JI, Roberg K. Hypoxia Mediates Differential Response to Anti-EGFR Therapy in HNSCC Cells. *Int J Mol Sci*. 2017;18(5).
40. Papaccio F, Paino F, Regad T, Papaccio G, Desiderio V, Tirino V. Concise Review: Cancer Cells, Cancer Stem Cells, and Mesenchymal Stem Cells: Influence in Cancer Development. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(12):2115-25.
41. Maiuthed A, Chantarawong W, Chanvorachote P. Lung Cancer Stem Cells and Cancer Stem Cell-targeting Natural Compounds. *Anticancer Res*. 2018;38(7):3797-809.
42. Shimokawa M, Ohta Y, Nishikori S, Matano M, Takano A, Fujii M, et al. Visualization and targeting of LGR5. *Nature*. 2017;545(7653):187-92.
43. Silva Galbiatti-Dias AL, Fernandes GMM, Castanhole-Nunes MMU, Hidalgo LF, Nascimento Filho CHV, Kawasaki-Oyama RS, et al. Relationship between CD44. *Am J Cancer Res*. 2018;8(8):1633-41.
44. Baillie R, Tan ST, Itinteang T. Cancer Stem Cells in Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma: A Review. *Front Oncol*. 2017;7:112.
45. Qian Y, Wu X, Yokoyama Y, Okuzaki D, Taguchi M, Hirose H, et al. E-cadherin-Fc chimera protein matrix enhances cancer stem-like properties and induces mesenchymal features in colon cancer cells. *Cancer Sci*. 2019;110(11):3520-32.
46. Liu X, Wang L, Cui W, Yuan X, Lin L, Cao Q, et al. Targeting ALDH1A1 by disulfiram/copper complex inhibits non-small cell lung cancer recurrence driven by ALDH-positive cancer stem cells. *Oncotarget*. 2016;7(36):58516-30.
47. Minichiello L. TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(12):850-60.
48. Chiu JH, Chen FP, Tsai YF, Lin MT, Tseng LM, Shyr YM. Effects of Chinese medicinal herbs on expression of brain-derived Neurotrophic factor (BDNF) and its interaction with human breast cancer MDA-MB-231 cells and endothelial HUVECs. *BMC Complement Altern Med*. 2017;17(1):401.
49. Tsai YF, Tseng LM, Hsu CY, Yang MH, Chiu JH, Shyr YM. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) -TrkB signaling modulates cancer-endothelial cells interaction and affects the outcomes of triple negative breast cancer. *PLoS One*. 2017;12(6):e0178173.

50. Choy C, Ansari KI, Neman J, Hsu S, Duenas MJ, Li H, et al. Cooperation of neurotrophin receptor TrkB and Her2 in breast cancer cells facilitates brain metastases. *Breast Cancer Res.* 2017;19(1):51.
51. Chen B, Liang Y, He Z, An Y, Zhao W, Wu J. Autocrine activity of BDNF induced by the STAT3 signaling pathway causes prolonged TrkB activation and promotes human non-small-cell lung cancer proliferation. *Sci Rep.* 2016;6:30404.
52. Kimura S, Harada T, Ijichi K, Tanaka K, Liu R, Shibahara D, et al. Expression of brain-derived neurotrophic factor and its receptor TrkB is associated with poor prognosis and a malignant phenotype in small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2018;120:98-107.
53. Onishi H, Nakamura K, Nagai S, Yanai K, Yamasaki A, Kawamoto M, et al. Hedgehog Inhibition Upregulates TRK Expression to Antagonize Tumor Suppression in Small Cell Lung Cancer Cells. *Anticancer Res.* 2017;37(9):4987-92.
54. Rolfo C, Raez L. New targets bring hope in squamous cell lung cancer: neurotrophic tyrosine kinase gene fusions. *Lab Invest.* 2017;97(11):1268-70.
55. Durbas M, Horwacik I, Boratyn E, Rokita H. Downregulation of the PHLDA1 gene in IMR-32 neuroblastoma cells increases levels of Aurora A, TRKB and affects proteins involved in apoptosis and autophagy pathways. *Int J Oncol.* 2016;49(2):823-37.
56. Newman EA, Chukkapalli S, Bashllari D, Thomas TT, Van Noord RA, Lawlor ER, et al. Alternative NHEJ pathway proteins as components of MYCN oncogenic activity in human neural crest stem cell differentiation: implications for neuroblastoma initiation. *Cell Death Dis.* 2017;8(12):3208.
57. Batzke K, Büchel G, Hansen W, Schramm A. TrkB-Target Galectin-1 Impairs Immune Activation and Radiation Responses in Neuroblastoma: Implications for Tumour Therapy. *Int J Mol Sci.* 2018;19(3).
58. Drilon A, Siena S, Ou SI, Patel M, Ahn MJ, Lee J, et al. Safety and Antitumor Activity of the Multitargeted Pan-TRK, ROS1, and ALK Inhibitor Entrectinib: Combined Results from Two Phase I Trials (ALKA-372-001 and STARTRK-1). *Cancer Discov.* 2017;7(4):400-9.
59. Akil H, Perraud A, Jauberteau MO, Mathonnet M. Tropomyosin-related kinase B/brain derived-neurotrophic factor signaling pathway as a potential therapeutic target for colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2016;22(2):490-500.
60. Dawson H, Grundmann S, Koelzer VH, Galván JA, Kirsch R, Karamitopoulou E, et al. Tyrosine kinase receptor B (TrkB) expression in colorectal cancers highlights anoikis resistance as a survival mechanism of tumour budding cells. *Histopathology.* 2015;66(5):715-25.
61. Mazouffre C, Geyl S, Perraud A, Blondy S, Jauberteau MO, Mathonnet M, et al. Dual inhibition of BDNF/TrkB and autophagy: a promising therapeutic approach for colorectal cancer. *J Cell Mol Med.* 2017;21(10):2610-22.
62. Kawamoto M, Ozono K, Oyama Y, Yamasaki A, Oda Y, Onishi H. The Novel Selective Pan-TRK Inhibitor ONO-7579 Exhibits Antitumor Efficacy Against Human Gallbladder Cancer. *Anticancer Res.* 2018;38(4):1979-86.
63. Kawamoto M, Onishi H, Ozono K, Yamasaki A, Imaizumi A, Kamakura S, et al. Tropomyosin-related kinase B mediated signaling contributes to the induction of malignant phenotype of gallbladder cancer. *Oncotarget.* 2017;8(22):36211-24.
64. Zhang P, Xing Z, Li X, Song Y, Zhao J, Xiao Y, et al. Tyrosine receptor kinase B silencing inhibits anoikis- resistance and improves anticancer efficiency of sorafenib in human renal cancer cells. *Int J Oncol.* 2016;48(4):1417-25.

65. Polakowski N, Terol M, Hoang K, Nash I, Laverdure S, Gazon H, et al. HBZ stimulates brain-derived neurotrophic factor/TrkB autocrine/paracrine signaling to promote survival of human T-cell leukemia virus type 1-Infected T cells. *J Virol*. 2014;88(22):13482-94.
66. Abbaci A, Talbot H, Saada S, Gachard N, Abraham J, Jaccard A, et al. Neurotensin receptor type 2 protects B-cell chronic lymphocytic leukemia cells from apoptosis. *Oncogene*. 2018;37(6):756-67.
67. Yuan Y, Ye HQ, Ren QC. Upregulation of the BDNF/TrkB pathway promotes epithelial-mesenchymal transition, as well as the migration and invasion of cervical cancer. *Int J Oncol*. 2018;52(2):461-72.
68. Choi B, Lee EJ, Shin MK, Park YS, Ryu MH, Kim SM, et al. Upregulation of brain-derived neurotrophic factor in advanced gastric cancer contributes to bone metastatic osteolysis by inducing long pentraxin 3. *Oncotarget*. 2016;7(34):55506-17.
69. Li L, Zhu L. Expression and clinical significance of TrkB in sinonasal squamous cell carcinoma: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2017;46(2):144-50.
70. Li SS, Liu JJ, Wang S, Tang QL, Liu BB, Yang XM. Clinical significance of TrkB expression in nasopharyngeal carcinoma. *Oncol Rep*. 2014;31(2):665-72.
71. Shan C, Wei J, Hou R, Wu B, Yang Z, Wang L, et al. Schwann cells promote EMT and the Schwann-like differentiation of salivary adenoid cystic carcinoma cells via the BDNF/TrkB axis. *Oncol Rep*. 2016;35(1):427-35.
72. Miettinen M, Lasota J. KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2005;13(3):205-20.
73. Curtarelli RB, Gonçalves JM, Dos Santos LGP, Savi MG, Nör JE, Mezzomo LAM, et al. Expression of Cancer Stem Cell Biomarkers in Human Head and Neck Carcinomas: a Systematic Review. *Stem Cell Rev*. 2018;14(6):769-84.
74. Wang L, Zuo X, Xie K, Wei D. The Role of CD44 and Cancer Stem Cells. *Methods Mol Biol*. 2018;1692:31-42.
75. Yin B, Ma ZY, Zhou ZW, Gao WC, Du ZG, Zhao ZH, et al. The TrkB+ cancer stem cells contribute to post-chemotherapy recurrence of triple-negative breast cancers in an orthotopic mouse model. *Oncogene*. 2015;34(6):761-70.
76. Lawn S, Krishna N, Pisklakova A, Qu X, Fenstermacher DA, Fournier M, et al. Neurotrophin signaling via TrkB and TrkC receptors promotes the growth of brain tumor-initiating cells. *J Biol Chem*. 2015;290(6):3814-24.
77. Chodroff L, Bendele M, Valenzuela V, Henry M, Ruparel S. EXPRESS: BDNF Signaling Contributes to Oral Cancer Pain in a Preclinical Orthotopic Rodent Model. *Mol Pain*. 2016;12.
78. Khotskaya YB, Holla VR, Farago AF, Mills Shaw KR, Meric-Bernstam F, Hong DS. Targeting TRK family proteins in cancer. *Pharmacol Ther*. 2017;173:58-66.