



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

Carlos Henrique Viési do Nascimento Filho

**Efeito da hipóxia sobre o acúmulo de células-tronco
tumerais em câncer de cabeça e pescoço**

São José do Rio Preto

2018

Carlos Henrique Viési do Nascimento Filho

**Efeito da hipóxia sobre o acúmulo de células-tronco
tumoriais em câncer de cabeça e pescoço**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de São José do Rio Preto
para obtenção do Título de Doutor
no Curso de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Eny Maria Goloni-Bertollo

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto-FAMERP

Co-orientador: Prof. Dr. Rogério Moraes Castilho

Universidade de Michigan, Ann Arbor, EUA

São José do Rio Preto

2018

Nascimento-Filho, Carlos Henrique Viési do

Efeito da hipóxia sobre o acúmulo de células-tronco tumorais em câncer de cabeça e pescoço.

São José do Rio Preto, 2018.

66 p.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eny Maria Goloni Bertollo

Co-orientador: Prof. Dr. Rogério Moraes Castilho

1. Inibidor de angiogênese; 2. Hipóxia; 3. PTEN; 4. Transição Epitelial-Mesenquimal; 5. Células-Tronco Neoplásicas.

Carlos Henrique Viési do Nascimento Filho

**Efeito da hipóxia sobre o acúmulo de células-tronco tumorais
em câncer de cabeça e pescoço**

BANCA EXAMINADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientadora: Profª. Dra. Eny Maria Goloni Bertollo

2º Examinador: _____

3º Examinador: _____

4º Examinador: _____

5º Examinador: _____

Suplentes: _____

São José do Rio Preto, __/__/____

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	I
AGRADECIMENTOS.....	II
EPÍGRAFE.....	IV
LISTA DE FIGURAS.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	VI
RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	X
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 OBJETIVOS.....	4
2. MATERIAL E MÉTODOS:.....	5
2.1. CÂMARA DE HIPÓXIA.....	5
2.2. CULTIVO CELULAR.....	6
2.3. CITOMETRIA DE FLUXO.....	6
2.4. ENSAIO DE INVASÃO.....	6
2.5. WESTERN BLOTTING.....	7
2.6. FLUORESCÊNCIA.....	7
2.7. INIBIDOR DE PTEN – bPV(PIC).....	7
2.8. XENOENXERTO.....	7
2.9. LINHAGEM CELULAR shPTEN HN13.....	8
2.10. TRANSCRIÇÃO REVERSA POR PCR (RT-PCR).....	8
2.11. CICLO CELULAR.....	9
2.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	9
3. RESULTADOS.....	10
3.1. CÂMARA DE HIPÓXIA E COMPARAÇÃO COM OS MÉTODOS JÁ EXISTENTES DE GERAR CONDIÇÃO DE HIPÓXIA.....	10
3.2. CONDIÇÃO DE HIPÓXIA E MUDANÇA NA MORFOLOGIA.....	13
3.3. HIPÓXIA INDUZ BAIXA EXPRESSÃO DO SUPRESSOR TUMORAL PTEN EM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO.....	16
3.4. CÉLULAS DE CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO SOFREM EMT E AUMENTAM O COMPORTAMENTO INVASIVO EM CONDIÇÕES DE HIPÓXIA.....	21
3.5. INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DO POTENCIAL DO PTEN RECAPITULA O FENÓTIPO EMT AO LONGO DO AUMENTO DA EXPRESSÃO DOS GENES VIMENTINA E SNAIL.....	25
3.6. EXPRESSÃO DE HIF-1A ESTA DIRETAMENTE ASSOCIADA COM O DESEQUILÍBRIO DA EXPRESSÃO DE PTEN.....	27
3.7. HIPÓXIA INDUZ ACÚMULO DE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>	27
3.8. DESEQUILÍBRIO DE PTEN RESULTA NO ACÚMULO DE CTT.....	29
3.9. CICLO CELULAR.....	30
4. DISCUSSÃO.....	33
5. CONCLUSÕES.....	37

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
8. ANEXOS	43
ANEXO 1: ANATOMIA DA REGIÃO DA CABEÇA E PESCOÇO.....	43
ANEXO 2. ARTIGO CIENTÍFICO “HYPOXIA-INDUCED ACCUMULATION OF CANCER STEM CELLS AND ACTIVATION OF EMT IS MEDIATED BY DEREGULATED PTEN” A SER SUBMETIDO À REVISTA CANCER LETTER (FATOR DE IMPACTO: 6.3)	44
ANEXO 3: SECRETOMA DE VEGF EM DIFERENTES LINHAGENS CELULARES.	66
9. APÊNDICES.....	67
<i>Apêndice 1: Expressão gênica de NANOG em HN6. O primeiro gráfico representa a amplificação e o segundo o de dissociação.</i>	<i>67</i>
<i>Apêndice 2: Expressão gênica de SNAIL em HN6. O primeiro gráfico representa a amplificação e o segundo o de dissociação.</i>	<i>67</i>
<i>Apêndice 3: Expressão gênica de VIMENTINA em HN6. O primeiro gráfico representa a amplificação e o segundo o de dissociação.</i>	<i>68</i>
<i>Apêndice 4: Expressão gênica de SNAIL em HN12. O primeiro gráfico representa a amplificação e o segundo o de dissociação.</i>	<i>68</i>
<i>Apêndice 5: Expressão gênica de VIMENTINA em HN12. O primeiro gráfico representa a amplificação e o segundo o de dissociação.</i>	<i>68</i>
<i>Apêndice 6: Expressão gênica de NANOG em HN12. O primeiro gráfico representa a amplificação e o segundo o de dissociação.</i>	<i>69</i>
<i>Apêndice 7: Fluxograma apresentando a relação entre o tratamento antiangiogênico e o aumento da agressividade pelo aumento da heterogeneidade celular. Note que a hipóxia decorrente do tratamento causa redução nos níveis de PTEN que desencadeia a ativação da via mTOR/Akt e, esta ativação leva ao fenótipo EMT e ao acúmulo de CTT, o mesmo é observado com a inativação farmacológica de PTEN. Portanto, inibidores da via mTOR/Akt podem funcionar como bloqueador do aumento da agressividade tumoral.</i>	<i>69</i>

DEDICATÓRIA

Ao meu avô Eder, por ter me ensinado a importância do
conhecimento e o prazer de estar sempre aprendendo.
Além da sua grande amizade e carinho que me tornaram um ser humano melhor.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Zuleide e Carlos, que acima de tudo acreditaram e confiaram em mim. Sempre me deram apoio e estão comigo, mesmo que em pensamento, em todos os momentos. Não existem palavras que demonstrem a admiração que tenho por eles.

Ao meu irmão, Rodrigo, que é um grande amigo e companheiro. Seus conselhos possuem um papel fundamental nas minhas atitudes.

Aos meus avós, Melvina e Eder, por estarem sempre comigo como meus maiores amigos, não há como transmitir tamanha a gratidão que tenho por eles. Além de serem meus anjos da guarda.

Aos meus avós, Maria e Francisco, por serem exemplos de valores como honestidade, determinação, trabalho entre outros.

A todos da minha família tios, primos e padrinhos por estarem sempre presentes nos momentos mais importantes da minha vida e pela dedicação que possuem comigo e com meu irmão.

Aos meus amigos de São Paulo e Rio Preto, o companheirismo deles é essencial para a minha formação profissional e pessoal.

À Professora Dra Eny Maria Goloni-Bertollo por ter concedido a oportunidade deste trabalho e por todo o esforço em me ajudar.

À Professora Dra Érika Cristina Pavarino que primeiramente permitiu que eu entrasse para a UPGEM e pelos conhecimentos que me transmite.

A todos da UPGEM, pelas dúvidas sanadas, pelas broncas, por tudo que me ensinaram e ajudaram.

Ao Professor Dr. Rogério M. Castilho e Professora Dra. Cristiane H. Squarize que além de pesquisadores excepcionais são pessoas ímpares. Obrigado por terem me recebido tão bem.

À toda equipe do Epithelial Biology Laboratory, da School of Dentistry da Universidade de Michigan, por toda ajuda e apoio.

Aos meus amigos de Michigan que fizeram dos EUA minha casa. Às meninas do sexto andar Veronica, Thâmara e Ana que ajudaram a fazer Ann Arbor mais brasileira.

Em especial à Liana Preto Webber que além de estar sempre pronta para ajudar, fez a imuno e tirou a melhor foto deste trabalho (Fig. 4E) e Gabriel Bonifácio Borgato companheiro das noites de laboratório e não mediu esforços para me ajudar neste trabalho.

Ao programa de Pós Graduação, seus professores, coordenadores e secretários (José Antônio, Luís Henrique e Fabiana) meu muito obrigado.

À Famerp, por meio de seu diretor Prof. Dr. Dulcimar Donizeti de Souza, e a Funfarme pelo apoio à UPGEM e a pesquisa.

Às agências de fomento à pesquisa FAPESP (processo 2015/047403-8), CAPES e CNPq (310582/2014-8) pelas bolsas de doutorado no Brasil e no exterior, o que possibilitou a realização deste trabalho.

A contribuição de todos foi indelével para a construção deste trabalho.

EPÍGRAFE

“Na vida, não existe nada a se temer, mas a ser compreendido.”

Marie Curie

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Itens da Câmara de hipóxia.....	5
Figura 2A: Efeito do número de absorventes de O₂.....	11
Figura 2B: Câmara de Hipóxia.....	12
Figura 2C: Câmara de Hipóxia com o clip central.....	12
Figura 3A: Mudança de fenótipo sob condições hipóxicas.....	13
Figura 3B: Aparecimento HIF-1α no núcleo celular de HN6.....	14
Figura 3C: Aparecimento HIF-1α no núcleo celular de HN12.....	15
Figura 4A: Expressão de PTEN nuclear (<i>Cell Signaling</i>).....	17
Figura 4B: Relação PTEN/pS6 em HN6.....	18
Figura 4C: Relação PTEN/pS6 em HN12.....	18
Figura 4D: Gráficos com a relação PTEN/pS6 em HN6 e HN12.....	19
Figura 4E: H&E com pérola de queratina e Expressão antagônica de HIF-1α e PTEN.....	20
Figura 5A: Expressão de Vimentina em HN6.....	21
Figura 5B: Expressão de Vimentina em HN14.....	22
Figura 5C: Ensaio de invasão para HN6 e HN12.....	22
Figura 6A: Inibição farmacológica de PTEN.....	23
Figura 6B: Exposição à diferentes concentrações de bpV(pic).....	24
Figura 6C: Fenótipo fusiforme após diminuição dos níveis de PTEN.....	24
Figura 6D: Expressão Vimentina após inibição de PTEN.....	24
Figura 7A: Expressão de HIF-1α em shPTEN HN13.....	25
Figura 7B: Expressão de PTEN em shPTEN e pGIPZ.....	25
Figura 8A: Acúmulo de CTT em hipóxia.....	26
Figura 8B: Animais xenoenxertados.....	26
Figura 8C: Expressão de ALDH1A1 em áreas hipóxicas.....	27
Figura 9: Aumento de CTT após inibição de PTEN.....	28
Figura 10A: Análise de ciclo celular em hipóxia para HN6.....	29
Figura 10B: Análise de ciclo celular em hipóxia para HN12.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- AB/AM *Antibiotic/Antimicotic*
- APC *Allophycocyanin*
- AKT *AKT serine/threonine kinase 1*
- ALDH1A1 *Aldehyde dehydrogenase*
- bpV(pic) *bisperoxovanadium inhibitor of protein phosphotyrosine phosphatases*
- CCP *Câncer de cabeça e pescoço*
- cDNA *complementary DNA*
- CO₂ *Carbon dioxide*
- CoCl₂ *Cobalt (II) chloride hexahydrate*
- CSC *Cancer stem cell*
- CTT *Célula-tronco tumoral*
- DFO *Deferoxamine*
- DMEM *Dubecco's Modified Eagle's medium*
- DNA *Deoxyribonucleic acid*
- EDTA *Ethylenediaminetetraacetic acid*
- EMT *Epithelial-Mesenchymal Transition*
- EUA *Estados Unidos da América*
- FBS *Fetal bovine serum*
- GAPDH *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*
- H&E *hematoxylin and eosin*
- HIF *Hypoxia-Inducible Factors*
- HNSCC *Head and neck squamous cell carcinoma*
- HPV *Human Papiloma Virus*
- hrs *horas*
- INCA *Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva*
- IRK *Insulin receptor kinase*
- miR *microRNA*
- mm³ *milímetro cúbico*
- mTOR *mammalian-Target of Rapamycin*
- NaCl *Sodium chloride*

NANOG *Nanog homeobox*
O₂ *Oxygen*
PBS *Phosphate buffered saline*
PCR *Polymerase chain reaction*
pH *Potencial of hydrogen*
PHDs *prolyl hydroxylase-domain*
PI3K *Phosphoinositide 3-kinase*
PTEN *Phosphatase and Tensin Homolog*
RNA *Ribonucleic acid*
RNAi *RNA interference*
RNase *Ribonuclease*
RT-qPCR *Reverse transcription-polymerase chain reaction
s second*
SDS-PAGE *Sodium docecul sulfate – polyacrylamide gel eletrophoresis*
SFB *Soro fetal bovino*
shRNA *Short hairpin RNA*
SNAIL *Snail family transcriptional repressor 1*
TIM *Treatment-Induced Metastasis*
TME *Tumor Microenviroment*
UCUCA *University Committee for the Use and Care of Animals*
VEGF *Vascular endothelial growth factor*
VEGFR *Vascular endothelial growth factor receptor*
VHL *von Hippel Lindau tumor supressor*

RESUMO

Introdução: O câncer de cabeça e pescoço (CCP) é a sexta neoplasia mais comum no mundo. Os fármacos antiangiogênicos constituem um tratamento efetivo na redução da massa tumoral, porém estimulam áreas de hipóxia no interior do tumor. O aumento de áreas em hipóxia tem sido associado às metástases e ao acúmulo de células-tronco tumorais (CTT) no câncer de mama. **Objetivos:** Com base nestas evidências, o presente estudo avaliou os efeitos da hipóxia no comportamento de células de CCP e verificou o acúmulo de CTT. **Material e métodos:** As linhagens celulares HN6, HN12 e HN13 foram cultivadas em condições de hipóxia por 6, 12 e 24 horas, sob uma concentração de O₂ menor que 2%. As CTT foram identificadas por meio da determinação de elevados níveis do conteúdo enzimático *aldehyde dehydrogenases* (ALDH1A1^{Bright}), utilizando o Kit Aldefluor, em combinação com elevados níveis de CD44, uma glicoproteína de superfície celular, conjugado com o fluoróforo *allophycocyanin* (APC). O ensaio de invasão tumoral sob condições de hipóxia foi realizado utilizando Millicell Cell Culture Inserts. Como controle foram utilizadas células tumorais mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico, em níveis de normóxia (~21% de O₂). O composto bisperoxovanadium (BPV), um inibidor de tirosina fosfatase, foi utilizado nas concentrações de 1nM, 5nM e 10 nM para reduzir os níveis celulares de PTEN. Complementar ao tratamento com BVP foi realizado o silenciamento gênico utilizando segmentação direcionada de PTEN (linhagem celular shPTEN HN13 e como controle pGIPZ). **Resultados:** Os resultados apontam uma menor expressão do PTEN durante condições de hipóxia. Demonstrou-se a expressão antagonista de PTEN e HIF-1 α por meio do silenciamento gênico com a segmentação direcionada, sugerindo, fortemente, que a perda de PTEN ativa a via PI3K/mTOR em associação com a alta expressão de HIF-1 α . Além da regulação negativa do PTEN pela hipóxia, foi identificado o desencadeamento do processo epitélio-mesênquimal (EMT) em combinação com o acúmulo de CTT. A validação dos resultados em modelos animais de xenoinxerto evidenciou a co-localização de células ALDH1A1 positivas em áreas de hipóxia juntamente com a perda da expressão nuclear de PTEN. **Conclusão:** Este trabalho mostrou que a regulação negativa do PTEN durante períodos de hipóxia desempenha um papel fundamental no acúmulo de CTT e aumento da agressividade tumoral. Os resultados indicam que o tratamento para CCP utilizando agentes

antiangiogênicos deve ser pareado com terapias voltadas à destruição de CTT, minimizando, assim, a aquisição de um fenótipo de resistência tumoral.

Palavras-chave: Inibidor de Angiogênese; Hipóxia; PTEN; Transição Epitelial-Mesenquimal; Células-Tronco Neoplásicas.

ABSTRACT

Introduction: Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is the sixth most common malignancies worldwide. Antiangiogenic drugs are a conventional treatment, although it has been shown to stimulate hypoxic areas inside the tumor, and hypoxia has been associated with metastasis as well as accumulation of cancer stem cell (CSC) in breast cancer. **Objective:** To study the effects of hypoxia on HNSCC behavior and accumulation of cancer stem cell. **Material and methods:** Culture of HN6, HN12 and HN13 tumor cells under hypoxic conditions was carried out for 6hrs, 12hrs, and 24hrs under an O₂ concentration of 1%. The content of cancer stem cell was determined using Aldefluor assay according to the manufacturer's (STEMCELL Technologies) to detect ALDH1A1^{Bright} cells in combination with APC mouse anti-human CD44. Tumor invasion under hypoxic conditions was carried out using Millicell Cell Culture Inserts (Millipore, Billerica, MA, USA). Control tumor cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS and 1% antibiotics at normoxia levels (~21% of O₂), while hypoxia group was maintained at 1% of O₂. We used a PTEN inhibitor (BPV) concentrations of 1nM, 5nM, and 10nM. **Results:** PTEN expression is downregulated under hypoxic conditions. Hypoxia-induced PTEN downregulation triggered an epithelial-mesenchyme transition (EMT) phenotype and accumulation of CSC. Plus, we showed antagonistic expression of PTEN and HIF-1 α when targeted disruption of PTEN (shPTEN HN13 cell line) strongly suggesting that loss of PTEN activates the PI3K/mTOR pathway in association with HIF-1 α upregulated. Validation of our results in xenograft animal models showed colocalization of ALDH1A1^{Bright} cells and hypoxic areas along with the loss of nuclear localization of PTEN. **Conclusion:** Thus, we show that hypoxia-driven downregulation of PTEN plays a crucial role in tumor aggressiveness and that the potential use of CSC-targeted therapies should be considered during the administration of anti-angiogenic drugs to minimize tumor resistance.

Keywords: Angiogenesis Inhibitors; Hypoxia; PTEN, Epithelial-Mesenchymal Transition; Cancer Stem Cells.

1. INTRODUÇÃO

Dentre os mais de 100 tipos de câncer existentes (<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home> INCA, 2018), o câncer de cabeça e pescoço (CCP) é o sexto tipo mais frequente, com uma estimativa de 500.000 novos casos ao ano no mundo (1). Este tipo de câncer atinge diversos sítios anatômicos, incluindo a cavidade oral, faringe, laringe, seios paranasais, cavidade nasal e glândulas salivares (<https://www.cancer.gov/types/head-and-neck/head-neck-fact-sheet> *National Cancer Institute: Comprehensive Cancer Information*, 2018) (ANEXO 1), sendo que 90 a 95% são do tipo carcinoma epidermóide (2).

Nos últimos anos houve um avanço significativo no entendimento do perfil genético do CCP e dos mecanismos moleculares encontrados no HPV (*Human Papillomavirus*) positivo e HPV negativo nos cânceres oral e de faringe. No entanto, a taxa de sobrevida de cinco anos pouco melhorou nas últimas décadas (2007 a 2013, fonte: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/oralcav.html>). Mesmo com os avanços recentes nos tratamentos, a taxa de sobrevida destes pacientes continua semelhante à de 30 anos atrás. Os números são ainda piores quando há a reincidência tumoral ou os casos de metástases. Portanto, é mais do que necessária à criação de novos alvos terapêuticos (3) ou aumento da eficácia do tratamento em alvos já conhecidos.

Muitas estratégias terapêuticas contra o câncer vêm sendo estabelecidas, dentre elas podemos citar os agentes antiangiogênicos. Em 1971, Folkman propôs que o crescimento do tumor era dependente da angiogênese, ou seja, um tumor só conseguiria ultrapassar a fase inicial de desenvolvimento (denominada tumor *in situ*) em que o tamanho não ultrapassa 2 mm³, após a ativação da angiogênese, levando à formação de novos vasos sanguíneos (4-6). Portanto, ao impedir a angiogênese seria possível bloquear o crescimento tumoral, mantendo o tumor em sua fase *in situ* e assim, tratá-lo como uma doença crônica como o diabetes e doenças cardíacas (7-9).

O bloqueio da angiogênese pode ser obtido por meio da ação direta ou indireta sobre os genes ligados a este fenômeno (7-9). Inúmeros medicamentos antiangiogênicos já foram desenvolvidos e permitiram o tratamento de mais de 500 milhões de pessoas em todo o mundo (4, 5, 10). Entre estes, podemos citar o Bevacizumabe, que liga-se e neutraliza a ação do VEGF-A.

Este medicamento é utilizado desde 2004 para o tratamento do câncer colorretal (11), de células não pequenas de pulmão e câncer metastático renal (12, 13). No entanto, apenas 10% dos pacientes respondem ao tratamento e mesmo nesses pacientes a resposta ocorre por um período menor que três meses. Os tumores que apresentam resistência a este tratamento continuam apresentando angiogênese mesmo com o sequestro do *VEGF* (13-15). No momento, o quimioterápico encontra-se em estudo clínico fase III para CCP (Clinical trial: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00588770>).

Atualmente sabe-se o papel crucial do microambiente tumoral e de como este está relacionado ao tratamento induzindo a metástase (TIM - *treatment-induced metastasis*), portanto estudos dirigidos neste caminho podem oferecer terapias anti-tumorais mais eficazes (16). No momento, emergem trabalhos no qual apontam o tratamento antiangiogênico relacionado a um maior número de metástases e recidivas tumorais, um claro exemplo de tratamento induzindo a metástase (16, 17).

A natureza heterogênea do CCP reflete na baixa taxa de sucesso das monoterapias quando comparada com a administração de multi-drogas. Agentes antiangiogênicos, como Bevacizumabe estão atualmente em uso para diversos cânceres sólidos. Porém, os benefícios a longo prazo são restritos para moderado aumento na progressão da sobrevida livre da doença, enquanto baixo benefício é visto quando observado a taxa de sobrevida geral (18).

O alto número de mutações encontradas em CCP HPV negativo, e a presença de uma população celular recentemente descoberta de células que apresentam habilidade de auto-renovação e capacidade de se dividir em muitos outros tipos celulares, por isso reconstituindo a massa tumoral. Tais células são chamadas de células-tronco tumorais (CTT) (19).

O termo CTT leva a alguns enganos. Muitos interpretam o termo como uma célula que deriva de células-tronco originais do próprio tecido. Logo, células-tronco tumorais são células-tronco normais que sofreram mutações e, conseqüentemente tornaram-se cancerígenas. No entanto, isso de fato não deve ocorrer em todos os tumores (19).

Não somente os antiangiogênicos aumentam a chance de metástases, mas também podem modificar o microambiente tumoral (TME - *tumor microenvironment*) pela criação de nichos de hipóxia dentro da massa tumoral.

O desenvolvimento de nichos de hipóxia no câncer de mama tratado com antiangiogênico resulta no acúmulo de CTT (20). O mesmo trabalho propõe que a hipóxia local decorrente da utilização de drogas anti-angiogênicas é o gatilho para a multiplicação de CTT. Ainda, este mesmo estudo propõe o uso combinado de outras drogas que sejam capazes de combater as CTT (20).

As CTT também são chamadas também de células iniciadoras de tumor, portanto, podem repopular as células tumorais causando, deste modo, as recidivas tumorais e diminuindo a sobrevida dos pacientes (21).

A hipóxia poderia ter como efeito o aumento da agressividade tumoral. De acordo com Kohnoh *et al.*, a hipóxia seria responsável, no câncer de pulmão, pela perda do gene *PTEN*, um importante supressor tumoral relacionado a via mTOR/AKT (22).

Enquanto que, outros trabalhos relacionam a perda do *PTEN* com o aumento da malignidade. Foi observado em câncer de próstata que, quando há a expressão reduzida ou mesmo a perda de expressão do *PTEN*, existe um aumento considerável do caráter EMT (*epithelial mesenchymal transition*) bem como de CTT(23). Em um estudo realizado pelo grupo do Laboratório de Biologia Epitelial (Universidade de Michigan) foi mostrado que *PTEN* regula diretamente a população de células-tronco epidérmica (24) e a via PI3K/mTOR (25-27).

Assim, o presente trabalho sugere que áreas tumorais de hipóxia levam à rápida diminuição dos níveis proteicos de PTEN em CCP e, conseqüentemente, aumenta o fenótipo EMT, bem como as propriedades invasivas. Foi também mostrado que os nichos de hipóxia em camundongos xenoinxertados apresentam diminuição dos níveis de PTEN enquanto aumentam o número de CTT. A inibição farmacológica de PTEN recapitula os efeitos da hipóxia e resulta na acumulação de HIF-1 α , bem como, células-tronco tumorais concomitante ao aumento do fenótipo EMT.

1.1 OBJETIVOS

- Criar uma câmara que mimetize condições de hipóxia em experimentos *in vitro*, que seja capaz de reproduzir as consequências do tratamento antiangiogênico em câncer de cabeça e pescoço;
- Analisar a morfologia e a expressão gênica do fenótipo EMT (transição epitelial-mesenquimal) sob condições de hipóxia e após exposição farmacológica ao inibidor de PTEN;
- Verificar o acúmulo de células-tronco tumorais após cultivo sob hipóxia e em exposição farmacológica ao inibidor do supressor tumoral PTEN;

2. MATERIAL E MÉTODOS:

2.1. CÂMARA DE HIPÓXIA

A câmara de hipóxia (Fig. 1) é uma metodologia nova e ainda não publicada desenvolvida durante minha estadia no Laboratório de Biologia Epitelial em conjunto com o professor Dr. Rogério Moraes de Castilho, professor e pesquisador na Universidade de Michigan, EUA.

A técnica se resume em colocar a cultura celular dentro de um recipiente de plástico vedado junto de um absorvente de oxigênio em combinação com um sensor de oxigênio usado para definir o nível da hipóxia (abaixo de 2% de O_2). Quando a hipóxia é alcançada, um clipe é usado para separar hermeticamente as células em cultura do absorvente de O_2 , desta forma mantendo a concentração de O_2 dentro da área desejada. A técnica desenvolvida é simples, de fácil manuseio, relativamente de baixo custo e extremamente eficiente na manutenção da hipóxia, especialmente quando comparada às técnicas existentes.



Figura 1: Itens da Câmara de hipóxia. 1. Clipe que impede entrada e saída de gases. 2. Sensor de O_2 . 3. Absorvente de O_2 . 4. Placa de cultivo. 5. Recipiente de plástico.

2.2. CULTIVO CELULAR

As células foram semeadas contendo meio de cultura completo (meio DMEM, suplementado com GlutaMAX™-I 1x (Gibco), SFB 10% e AB/AM 1%). As culturas foram mantidas em incubadora a 37°C, em atmosfera umidificada e CO₂ 5%. Ao atingirem confluência de 70% as culturas foram lavadas duas vezes com PBS e submetidas a tratamento enzimático com tripsina 0,125%/ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) 0,05% (Gibco), para desprendimento das células do frasco. A reação foi interrompida com a adição de meio de cultura completo. Foram utilizadas as linhagens celulares de CCP HN6, HN12 e HN13.

Linhagens de Câncer de Cabeça e Pescoço:

HN6 (Carcinoma de língua proveniente de paciente do sexo masculino);

HN12 (Carcinoma de língua derivado de sítio metastático paciente do sexo feminino);

HN13 (Carcinoma de língua proveniente de paciente do sexo feminino).

<https://www.expasy.org/>

2.3 CITOMETRIA DE FLUXO

As análises foram realizadas em citômetro de fluxo Accuri C6 (BD Ann Arbor, MI) utilizando-se o *software* CFlow Plus 1.0.264.0. A atividade da ALDH1A1 foi detectada utilizando-se o kit de ensaio Aldefluor (Stem Cell Technologies), de acordo com as instruções do fabricante.

2.4 ENSAIO DE INVASÃO

O potencial de invasão foi avaliado em câmara de invasão em Matrigel (Becton e Dickinson), em placas de 12 poços com insertos de 10,5 mm de diâmetro, contendo uma membrana de policarbonato de 8 µm de porosidade (*BD BioCoat™ Migration™ Invasion Chamber*). Foram semeadas 4x10⁴ células/300 µL de meio DMEM 2% SFB e na parte inferior da câmara foi acrescentado 750 µL meio DMEM suplementado com SFB 10%. As células foram incubadas por 24 horas a 37°C com e sem hipóxia.

2.5 WESTERN BLOTTING

As células tumorais foram lisadas com tampão de lise celular contendo inibidor de protease, e brevemente sonicadas. A proteína PTEN total foi dissolvida em 10-15% de SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate-polycrylamide gel eletrophoresis*) e transferida para *Immobilon-FL polyvinyl difluoride membrane* (Milipore, Billerica, MA, USA). As membranas foram bloqueadas com 5% de leite em pó desnatado contendo 0.1 MTris (pH 7.5), 0.9% NaCl e 0.05% Tween-20 por 1 hora a temperatura ambiente. As membranas foram incubadas com o anticorpo primário (PTEN) a 4°C *overnight*. Posteriormente, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com *horseadish peroxidase* (Santa Cruz Biotechnology, Sta Cruz, CA, USA) por 2 hrs a temperatura ambiente. O GAPDH foi utilizado como controle (1:20.000, Calbiochem, Gibbstown, NJ, USA).

2.6 FLUORESCÊNCIA

As reações de imunofluorescência foram realizadas para as proteínas PTEN, pS6, Vimentina, Faloídina para observação do citosqueleto e para visualização do material genético, foi utilizado o corante HOECHST 33342 (Invitrogen) e as lâminas foram fotografadas utilizando câmara digital *Qimaging exiaqa monochrome*, Nikon eclipse 80i (Nikon, Melville, NY) anexada ao microscópio. As imagens foram visualizadas no *software* QCapturePro.

2.7 INIBIDOR DE PTEN – bpV(pic)

O composto Bisperoxovanadium, inibidor de proteína fosfatase fosfotirosina, foi utilizado para inibir o PTEN, um supressor tumoral envolvido na regulação do ciclo celular. Este composto também pode agir como um mimetizador de insulina e ativar o receptor de insulina quinase (IRK) (<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/sml0885?lang=en®ion=US>).

2.8 XENOENXERTO

O estudo *in vivo* foi realizado de acordo com o protocolo aprovado pela Universidade de Michigan sobre Uso e Cuidados de Animais (UCUCA) e em conformidade com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório. Os

tumores de HN12 foram enxertados em camundongos NUDE/SCID e cirurgicamente retirados quando eles atingiram o tamanho de 2000 mm³. Fixados *overnight* em 10% de formol a 4°C embebidos em parafina. Posteriormente, seccionados a 3 µm de espessura.

2.9 LINHAGEM CELULAR shPTEN HN13

A deficiência de PTEN na linhagem celular HN13 foi gerada por meio da transfecção de vetores retrovirais com a sequência nucleotídica para o *short hairpin* RNA (shRNA) (24). Como controle da reação foi utilizada a linhagem transfectada pGIPZ HN13. O shRNA GIPZ é baseado no transcrito nativo miR-30 capaz de ser processado por vias de RNAi.

2.10 TRANSCRIÇÃO REVERSA POR PCR (RT-PCR)

As linhagens HN6 e HN12 foram cultivadas como descrito anteriormente em uma placa de 24 poços. O grupo tratado foi exposto a 5nM de bpV(pic) por 24hrs. Em seguida, foi realizada a extração do RNA por meio de kit. Os fragmentos de cDNA foram amplificados com a sequência de primers:

Sequência (5' → 3')

GAPDH

Forward ACCCACTCCTCCACCTTTGAC

Reverse CCACCACCCTGTTGCTGTAG

SNAI1

Forward GCGTGTGCTCGGACCTTCT

Reverse ATCCTGAGCAGCCGGACTCT

VIMENTINA

Forward GACGCCATCAACACCGAGTT

Reverse CTTTGTCGTTGGTTAGCTGGT

NANOG

Forward CCCCAGCCTTTACTCTTCCTA

Reverse CCAGGTTGAATTGTTCCAGGTC

A PCR foi realizada no *GeneAmp PCR system 9700 (PE Applied Biosystems)* por 30 ciclos (exceção do GAPDH – 25 ciclos) com temperatura de desnaturação 95°C

por 40s, temperatura de anelamento 56°C por 40s, temperatura de extensão 72°C por 1 minuto com extensão final de 7 minutos a 72°C.

2.11 CICLO CELULAR

A análise da distribuição do ciclo celular foi realizada por iodeto de propídio. Após a exposição a condições de hipóxia, as células foram coletadas e fixadas em etanol 70% no gelo por 2 horas. O *pellet* de células foi ressuspendido em 0,5 mL PBS contendo 0.25% Triton X-100 para permeabilização, por 15 minutos no gelo. Em seguida, as células foram incubadas em PBS contendo iodeto de propídio (Sigma-Aldrich; 50 µg/mL) e RNase (Sigma-Aldrich; 100 µg/mL) por 30 minutos à temperatura ambiente. O número relativo de células em diferentes fases do ciclo celular foi verificado por citometria de fluxo, e as porcentagens de células em G₁, S e G₂ foram calculadas.

2.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram realizadas usando *Graphpad Prism* (*Graphpad Software*, San Diego, CA). Os testes estatísticos utilizados foram uma análise de variância unidirecional (ANOVA) e teste t de Student. Os asteriscos denotam significância estatística (* p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001 e ns p > 0,05).

3. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho gerou um artigo que se encontra no Anexo 2.

3.1. CÂMARA DE HIPÓXIA E COMPARAÇÃO COM OS MÉTODOS JÁ EXISTENTES DE GERAR CONDIÇÃO DE HIPÓXIA

Hipóxia refere-se a uma diminuição dos níveis normais de oxigênio nas células e tecidos. A resposta celular para a hipóxia tem sido de grande interesse para pesquisadores, pois está inegavelmente envolvida em diversos processos biológicos incluindo angiogênese, sobrevivência celular, proliferação, metabolismo energético, regulação do pH, resistência a diversas drogas, propriedades de células-tronco, entre outros. O fator primário de transcrição responsável por dirigir a resposta celular é chamado de *hypoxia-inducible factor* (HIF-1 α). O HIF existe em mamíferos como HIF-1 α com duas subunidades adicionais: HIF-2 α e HIF-3 α . Sob normóxia, HIF-1 α é hidroxilado por enzimas de domínio prolin-hidroxilase (PHDs). Essa reação de hidroxilação faz com que HIF-1 α se ligue no complexo proteico von Hippel Lindal (VHL) E3 ligase resultando assim na ubiquitinação de HIF-1 α e na sua degradação protossomal. A hipóxia, bem como os inibidores de hidroxilase (DFO – Deferoxamina, CoCl₂ – hexahidratado clorido cobalto (II)) impedem a degradação de HIF-1 α permitindo seu acúmulo/translocação para o núcleo celular (28, 29).

A concentração de gás oxigênio encontrada na atmosfera está em torno de 20%. Utilizando nosso próprio sensor de O₂, constatamos a média de 20,5% de O₂ na sala de laboratório. Para *physoxia*, concentração fisiológica, ou seja, a concentração de O₂ nos tecidos encontra-se em torno de 5%. Já para as áreas de hipóxia dentro dos tumores esta concentração cai para 2%. Em situações de elevada hipóxia, a concentração de O₂ cai para menos de 1% (30). Com a câmara de hipóxia desenvolvida neste estudo conseguimos alcançar níveis de hipóxia em 0,5%.

Além da criação da câmara de hipóxia, foi preciso determinar o tempo necessário para se chegar a hipóxia. A Figura 2A traz a relação do número de absorventes de O₂ e a concentração de gás oxigênio obtida em determinado tempo. As Figuras 2B e 2C apresentam dois modos de funcionamento da câmara de hipóxia: o primeiro com um único clipe para garantir a vedação e segundo com dois cliques. O

primeiro modelo garante a vedação, já o segundo divide o absorvente de O_2 da cultura celular e do sensor, assim é possível manter as concentrações desejadas.

Os métodos convencionais de induzir a hipóxia são basicamente dois. O primeiro conhecido como DFO é uma incubadora capaz de modular os gases. No entanto, apresenta problemas na regulação da porcentagem da concentração dos gases ministrados. Desse modo, além de ser um método mais caro é pouco eficaz no controle dos gases (31).

O segundo método é por hexahidratado clorido cobalto (II) ($CoCl_2$). Um método de indução química a hipóxia, que não reproduz de forma fidedigna todos os efeitos observados na real falta de O_2 . Além do fato deste químico ter efeito sobre outros compostos que podem modular outras vias mascarando os reais efeitos da hipóxia (31).

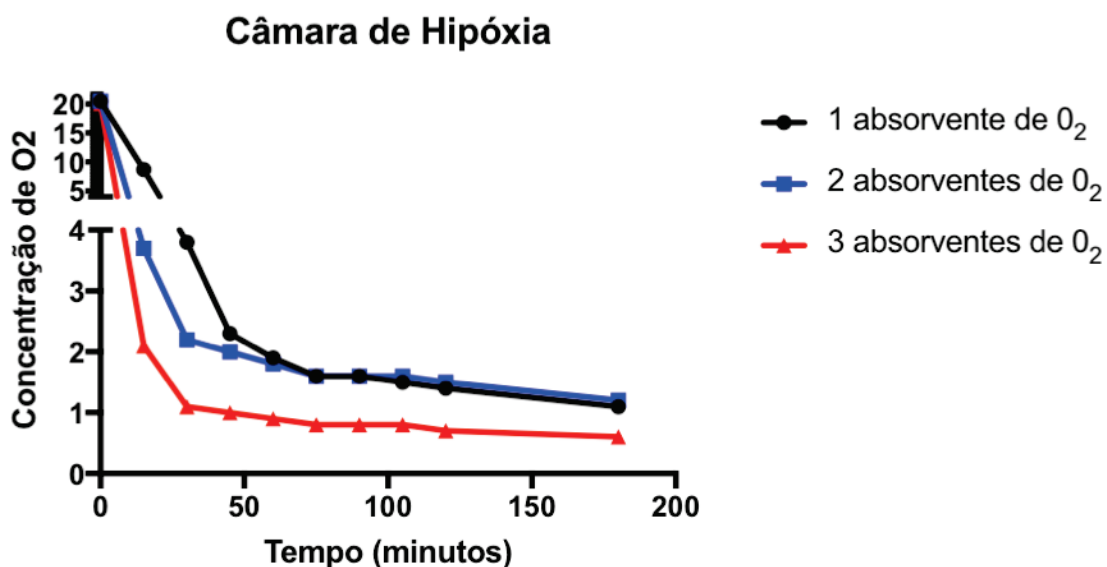


Figura 2A: Efeito do número de absorventes de O_2 : Relação da concentração de gás oxigênio x tempo entre os diferentes números de absorventes de O_2 .



Figura 2B: Câmara de hipóxia. Câmara em funcionamento. Nota-se que o clipe é utilizado neste caso para garantir a vedação do plástico.



Figura 2C: Câmara de hipóxia com o clipe central. Deste modo é possível regular a quantidade de O_2 em que as células serão cultivadas. Alcançando a concentração de O_2 desejada, veda-se o clipe central e segue-se observando a concentração pelo sensor.

3.2. CONDIÇÃO DE HIPÓXIA E MUDANÇA NA MORFOLOGIA

Induzimos as linhagens celulares HN6 e HN12 à hipóxia por meio da câmara de hipóxia descrita anteriormente. Uma técnica inovadora e custo-efetiva de atingir condições hipóxicas em experimentos “*in vitro*” (manuscrito em preparo). A técnica foi desenvolvida por meio da parceria com o Professor Dr. Rogério Moraes Castilho do Laboratório de Biologia Epitelial, da Universidade de Michigan (EUA).

Nota-se que após a hipóxia, a célula adquire o formato mais fusiforme típico de células com comportamento mais invasivo (Fig. 3A). As imagens de imunofluorescência sugerem fortemente o aparecimento de HIF-1 α no núcleo das células após 6 (seis) horas de cultivo com concentração de oxigênio menor que 2% (Fig. 3B e 3C), indicando que as células responderam de fato a situação de hipóxia como pretendíamos. A morfologia celular foi observada por meio da faloídina (Fig. 3B e 3C), um importante reagente para a visualização da F-actina e, conseqüentemente, do citoesqueleto.

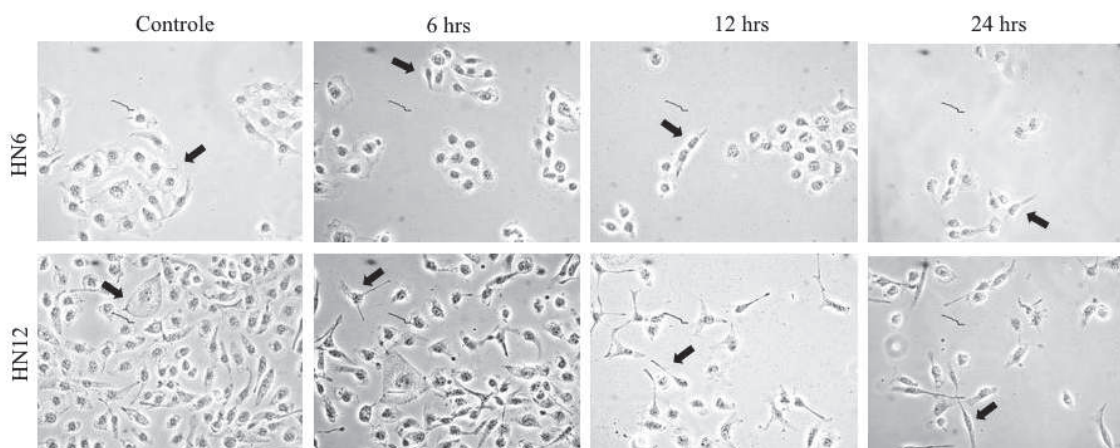


Figura 3A: Mudança de fenótipo sob condições de hipóxia. Observa-se a mudança na morfologia celular em ambas as linhagens, sendo mais evidente na HN12. As células adquiriram um formato fusiforme característico de células em processo de transição epitelial-mesenquimal (aumento 10X).

HN6

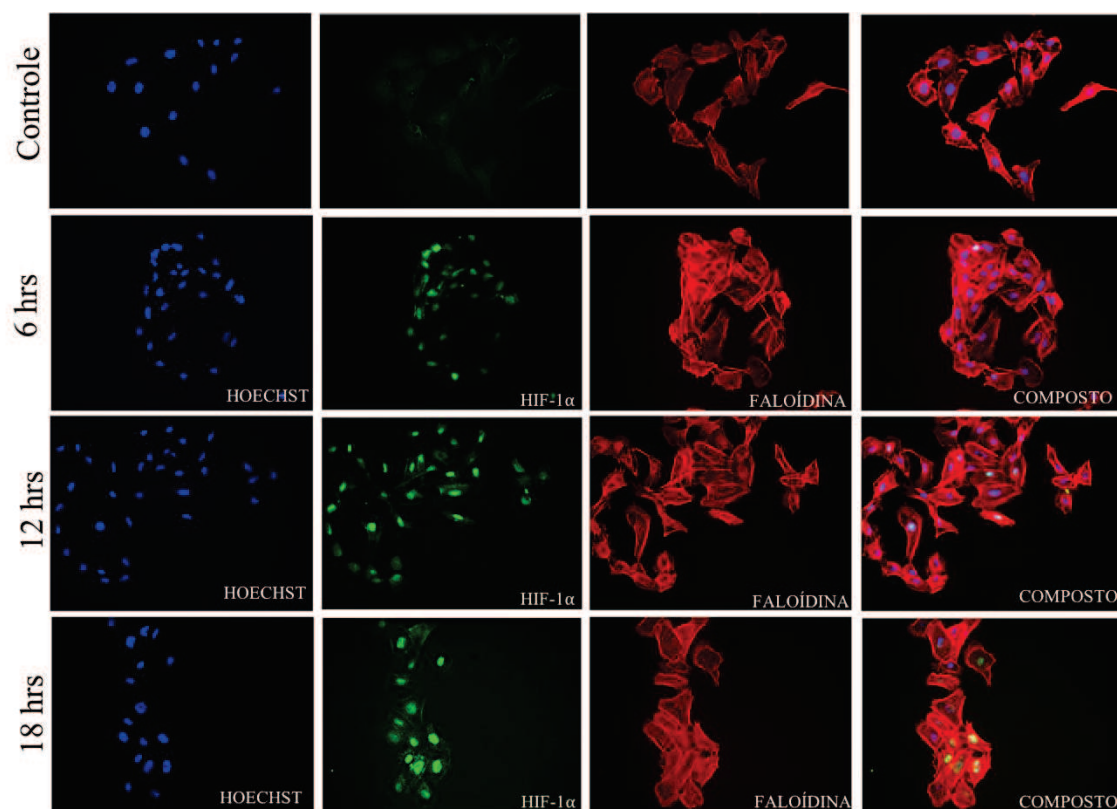


Figura 3B: Aparecimento HIF-1 α no núcleo celular de HN6. Imunofluorescência com o aparecimento gradativo de HIF-1 α no núcleo celular após o cultivo das células na câmara de hipóxia. Nota-se também, por meio da faloidina, a mudança na morfologia celular (aumento 20x).

HN12

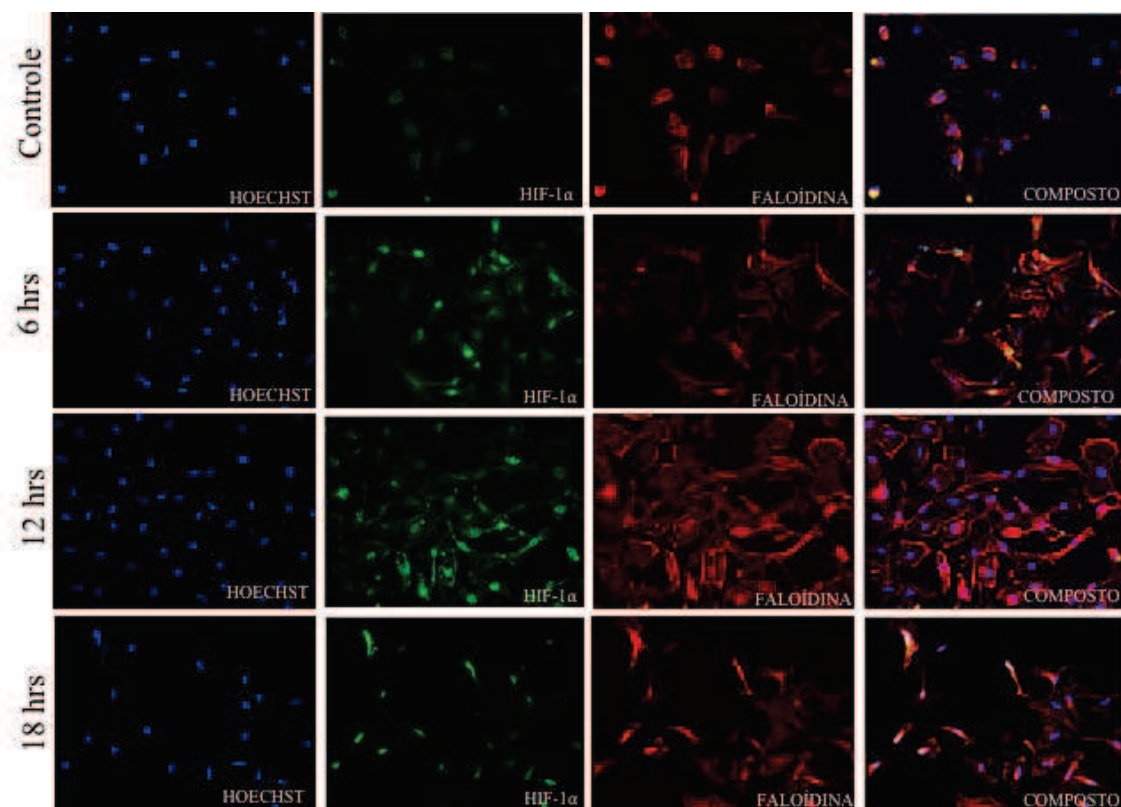


Figura 3C: Aparecimento HIF-1 α no núcleo celular de HN12. Imunofluorescência com o aparecimento gradativo de HIF-1 α no núcleo celular após o cultivo das células de HN12 na câmara de hipóxia. Nota-se também, por meio da faloídina, a mudança na morfologia celular mais evidente em HN12 que na linhagem celular anterior (HN6). As células adquirem, morfológicamente, a forma fusiforme, típica de células com características invasoras (aumento 20x).

3.3. HIPÓXIA INDUZ BAIXA EXPRESSÃO DO SUPRESSOR TUMORAL PTEN EM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO

Tumores sólidos, incluindo o CCP, são caracterizados pelo seu rápido crescimento e propriedades de invasão local. Durante a rápida divisão celular e crescimento da massa tumoral, tumores sólidos frequentemente sofrem hipóxia. Os efeitos da hipóxia sobre tumores sólidos são de interesse de pesquisadores na área de cancerologia. Recentes estudos sugerem que estes efeitos aumentam a agressividade do câncer e o desenvolvimento do fenótipo de resistência para quimio e radioterapia. Assim, no presente estudo investigou-se os efeitos da hipóxia sobre a biologia do CCP e sua potencial interação com *PTEN*, um importante gene supressor tumoral conhecido por controlar negativamente a via de sinalização PI3K comumente com alta expressão em tumores sólidos.

Utilizando duas linhagens celulares (HN6 e HN12), avaliamos os níveis de expressão de *PTEN* nas células expostas às condições de hipóxia. Deste modo, foi encontrado que *PTEN*, em níveis proteicos, diminuiu sob hipóxia (concentração menor que 2% de O₂) (Fig. 4A, ns $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$).

Além de ter sido observado que células de CCP em condições de hipóxia mudam o fenótipo de epitelíóide para fusiforme com alongação das extensões lembrando a ativação do fenótipo de transição epitelial-mesenquimal (Fig. 3), ao explorar se a hipóxia teria impacto na ativação da via PI3K/mTOR como um evento comum observado durante o desequilíbrio gênico de *PTEN*, utilizamos a proteína pS6 (S6 fosforilada) como leitura da via mTOR. Foi observado que a hipóxia induz a acumulação de pS6 em células cancerígenas (Fig. 4B, 4C e 4D, ns $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$).

Áreas contendo queratina ou áreas de necrose são frequentemente observadas em biópsias de tumores sólidos. Estas áreas estão associadas com a redução dos níveis de oxigênio e podem levar a ativação de programas de diferenciação e por último, a morte celular. Este trabalho procurou explorar, *in vivo*, a correlação entre a presença de áreas de hipóxia e os níveis de expressão do supressor tumoral *PTEN*. Utilizando camundongos xenoinxertados (n= 5) de CCP foi possível recapitular o rápido crescimento tumoral observado em câncer de cabeça e pescoço, que resulta na formação de pérolas de queratina e áreas de necrose (Fig. 4E; seta amarela). Para tal, foi utilizado

a técnica de imunofluorescência na qual foi observado que as áreas tumorais localizadas ao redor da queratina expressavam altos níveis de HIF-1 α . Ainda, os resultados mostraram que células positivas para HIF-1 α são negativas para a expressão de PTEN, enquanto que para células positivas para PTEN eram áreas negativas para HIF-1 α (Fig. 4E, vermelho: HIF-1 α , verde: PTEN).

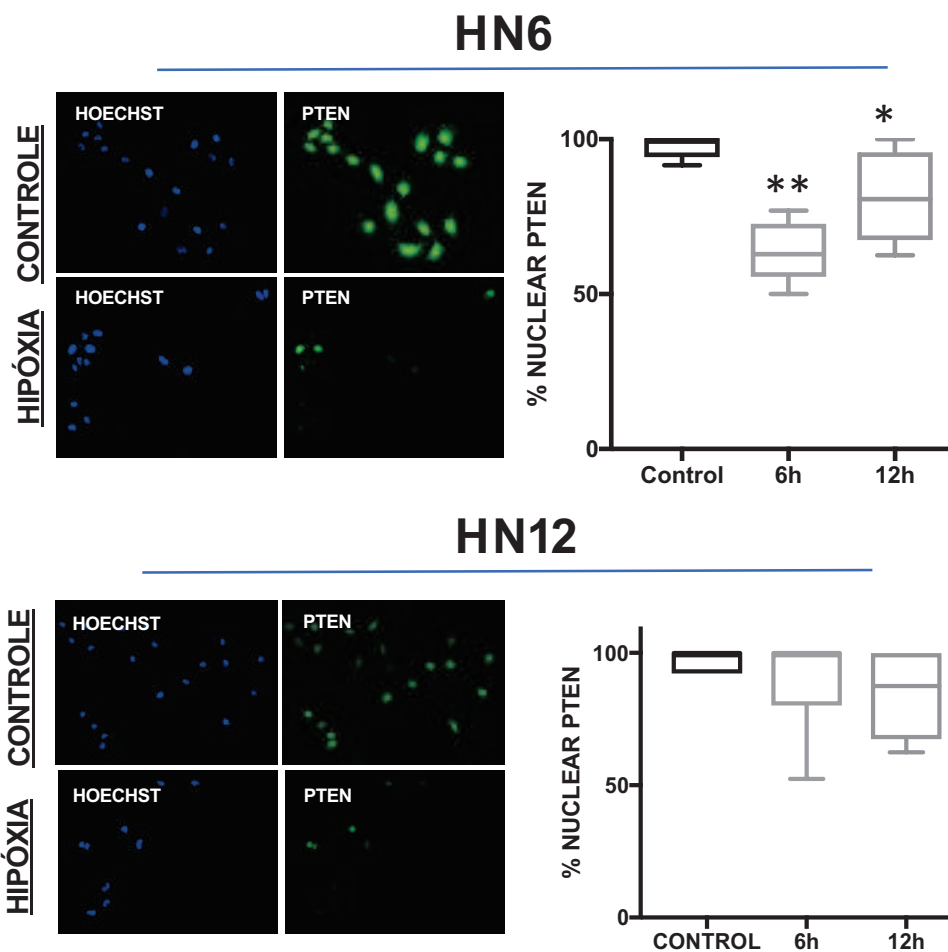


Figura 4A: Expressão de PTEN nuclear (*Cell Signaling*) em HN6, HN12. Nota-se a supressão do PTEN após 12 horas sob hipóxia (aumento 20X).

HN6

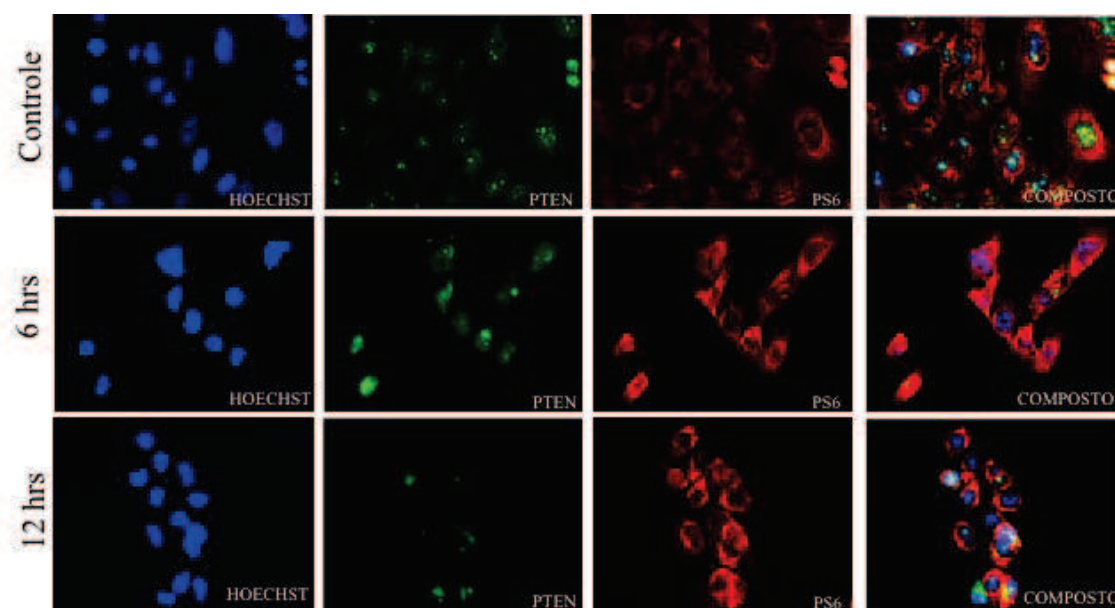


Figura 4B: Relação PTEN/pS6 em HN6. Imunofluorescência realizada em células de HN6. Nota-se o desaparecimento do PTEN nuclear, ao passo que pS6 apresenta-se notadamente mais forte sob condições de hipóxia (aumento 20X).

HN12

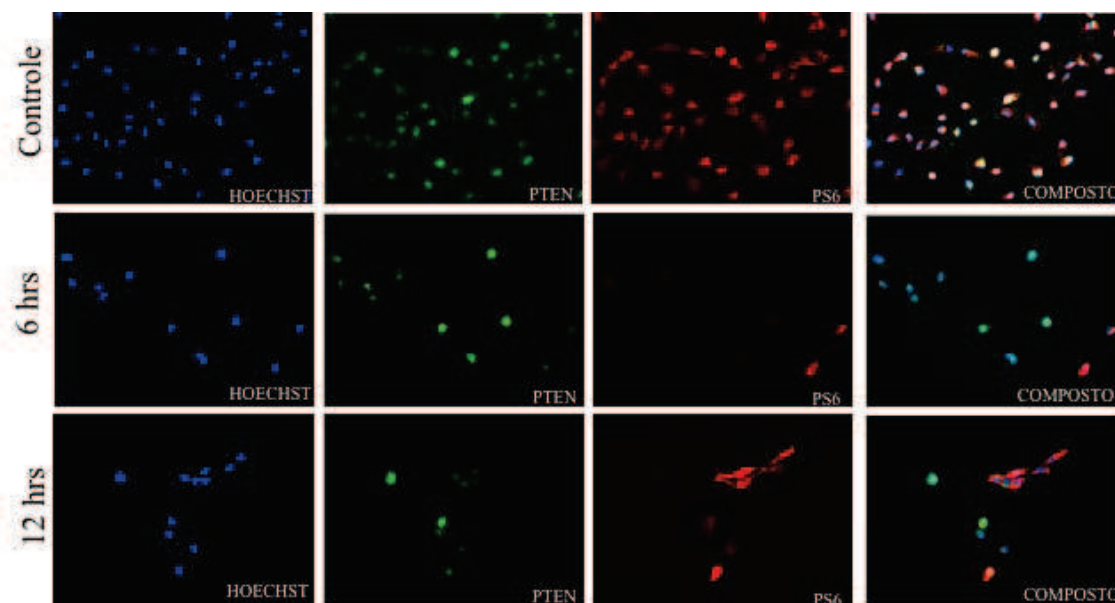


Figura 4C: Relação PTEN/pS6 em HN12. Imunofluorescência realizada em células de HN12. Nota-se o desaparecimento do PTEN nuclear, ao passo que pS6 apresenta-se visivelmente mais forte sob condições de hipóxia. (aumento 20x).

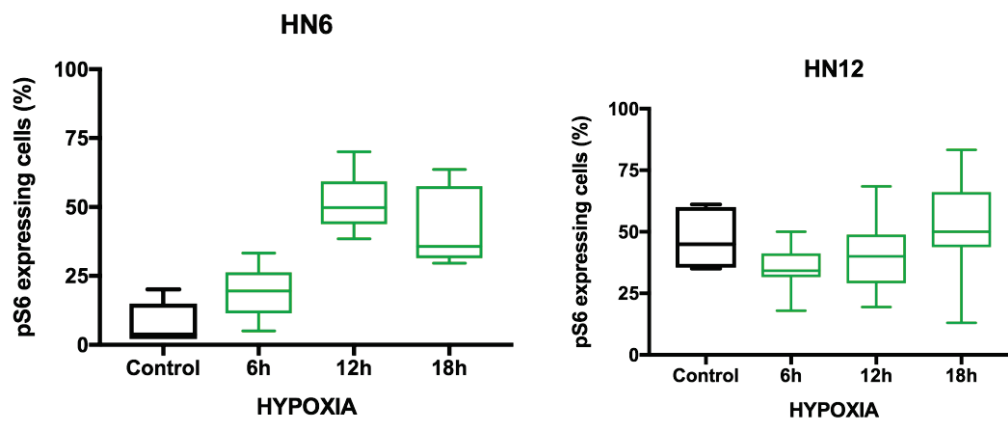


Figura 4D: Gráficos com a relação PTEN/pS6 em HN6 e HN12. Relação da expressão de PTEN e pS6 com hipóxia comparada ao grupo controle nas linhagens celulares HN6 e HN12.

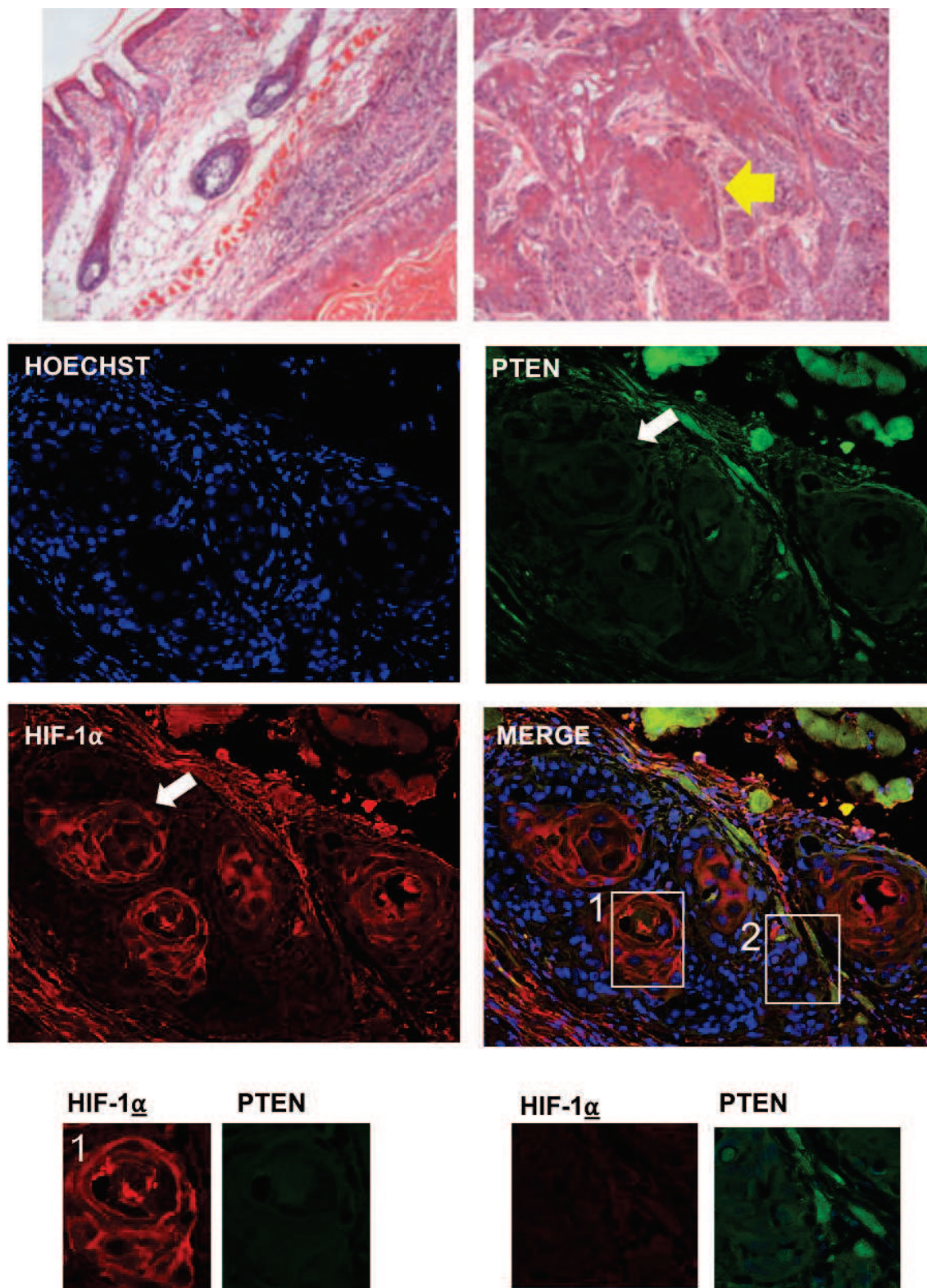


Figura 4E: H&E com pérola de queratina e expressão antagônica de HIF-1 α e PTEN. Ambos os cortes são de tecidos tumorais provenientes de camundongo xenoenxertado. A seta amarela indica a pérola de queratina. As setas brancas indicam uma região de hipóxia. A área 1 apresenta baixos níveis de PTEN. Enquanto na área 2 é possível observar o oposto, ou seja, altos níveis de PTEN (aumento 20x).

3.4. CÉLULAS DE CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO SOFREM EMT E AUMENTAM O COMPORTAMENTO INVASIVO EM CONDIÇÕES DE HIPÓXIA

Ao investigar as implicações da baixa concentração de O_2 no comportamento do CCP foi observado o acúmulo de Vimentina no estroma celular, comumente observado em células epiteliais que sofrem EMT (Fig. 5A e 5B, * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, ns $p < 0,05$). Em conjunto com a expressão de Vimentina, foi observado que células expostas a baixos níveis de O_2 apresentam o fenótipo invasivo quando comparadas ao controle. Ambas, HN6 e HN12 foram semeadas em câmaras de invasão Boyden com fibronectina e foram capazes de invadir a matrix em taxas mais altas comparadas às células em concentrações atmosféricas de O_2 (Fig. 5C, * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$).

HN6

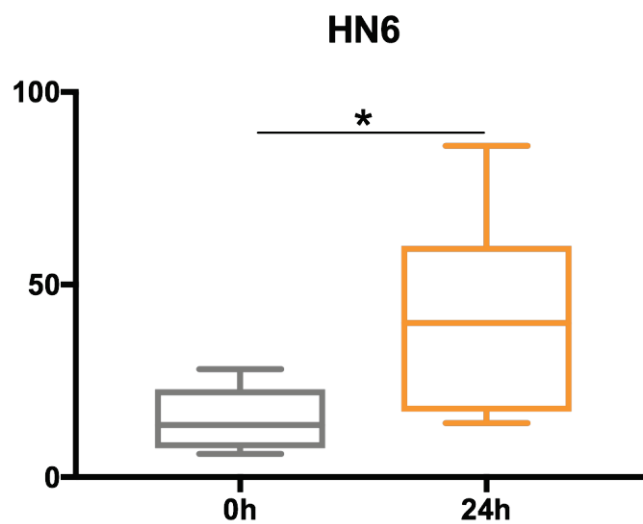
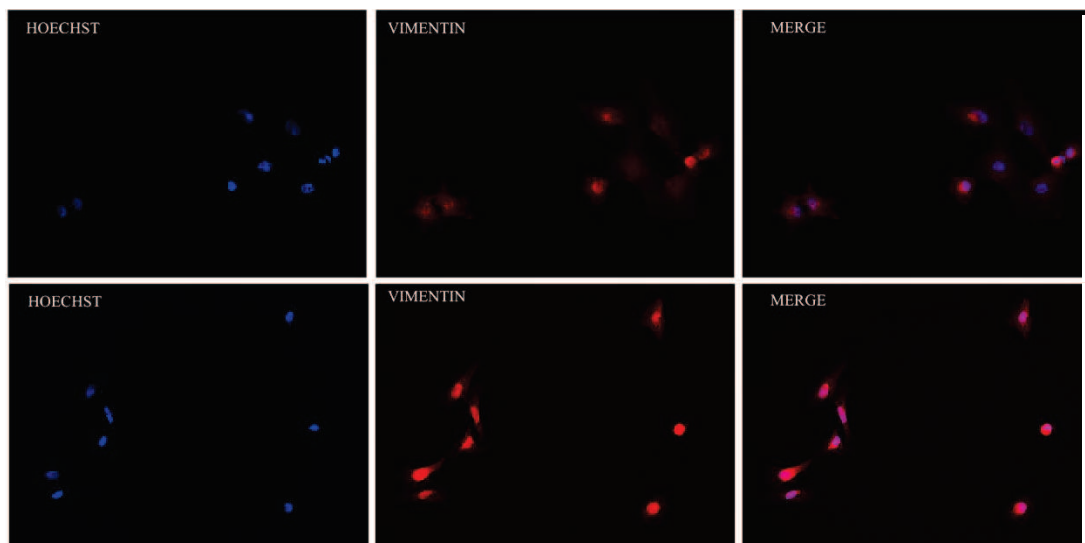


Figura 5A: Expressão de Vimentina em HN6. Após 12 horas em hipóxia a expressão de vimentina aumenta consideravelmente. Gráfico correspondente à quantificação da imunofluorescência (aumento 20x).

HN12

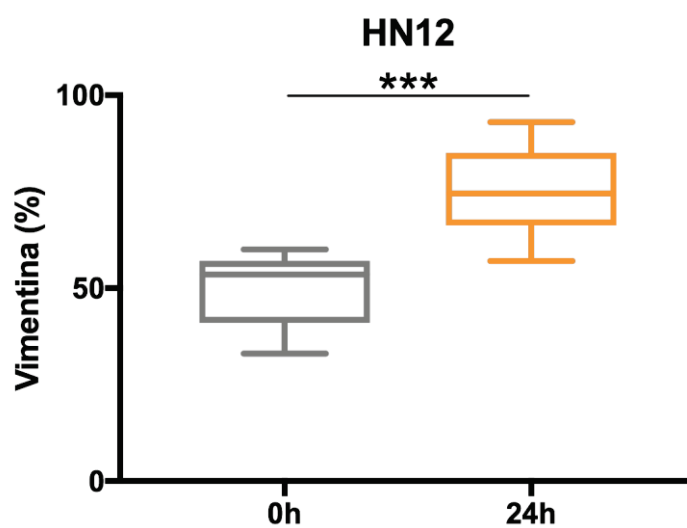
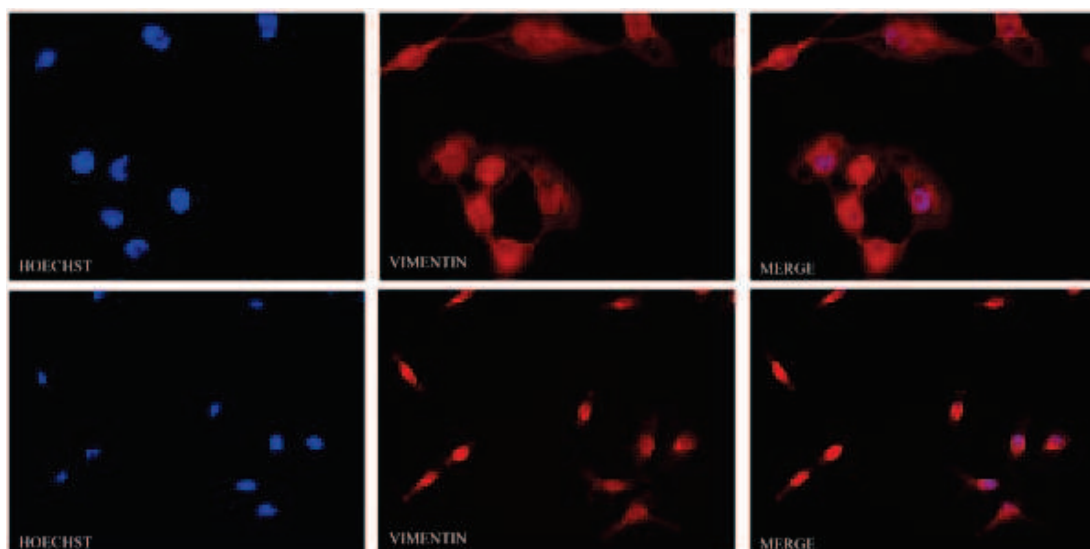


Figura 5B: Expressão de Vimentina em HN12. Para a linhagem HN12 a expressão de Vimentina manteve-se em média constante. Ela já apresentava altas taxas de expressão no grupo controle. Contudo, ao levar em consideração a morfologia celular bem como a concentração de Vimentina na célula percebemos a diferença entre o grupo tratado e a célula em hipóxia (aumento 20x).

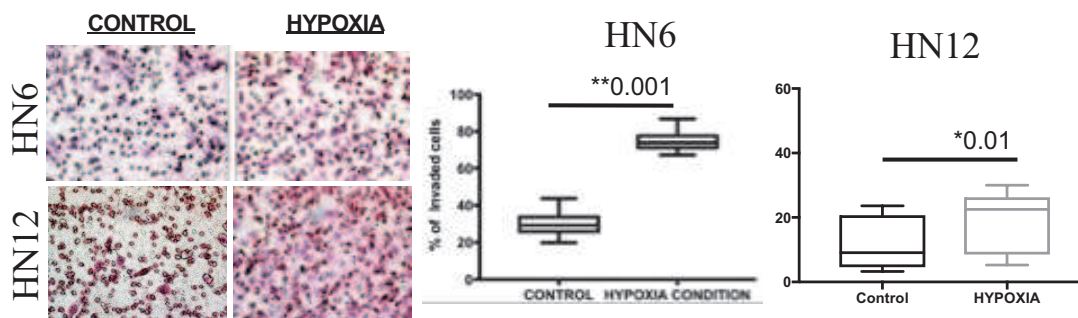


Figura 5C: Ensaio de invasão para HN6 e HN12. Relação do grau de invasão de células em condições normais de O_2 e sob hipóxia. Os gráficos com os resultados da HN6 e HN12, respectivamente.

3.5. INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DO POTENCIAL DO PTEN RECAPITULA O FENÓTIPO EMT AO LONGO DO AUMENTO DA EXPRESSÃO DOS GENES VIMENTINA E SNAIL

Na sequência dos achados, ativação de EMT e desequilíbrio de expressão de PTEN em hipóxia, investigamos se o PTEN poderia influenciar na aquisição do fenótipo EMT. Utilizando o composto químico bpV(pic) (um seletivo inibidor de PTEN a níveis nanomolares) (Fig. 6A) Este estudo encontrou que células CCP sofrem similar aquisição do fenótipo fusiforme que foi observado em condições de hipóxia (Fig. 6B). Assim a transição epitelial-mesenquimal foi observada após 30 horas da administração de bpV(pic), com pico do fenótipo depois de 48 horas (Fig. 6C). Ambas as linhagens celulares, HN6 e HN12, sofreram EMT sob a administração de bpV(pic) (Fig. 6B e 6C). Seguindo com o fenótipo celular, observamos por imunofluorescência que bpV(pic) foi capaz de induzir o acúmulo de Vimentina (Fig. 6D), e a expressão de genes associados incluindo VIM (Vimentina) fold change de 2.17x para HN6 e 3.38x para HN12 e SNAI1 (Snail) fold change de 1.67x para HN6 e 3.38 para HN12 , todos estes identificados por Q-PCR (Apêndices 2,3,4 e 5).

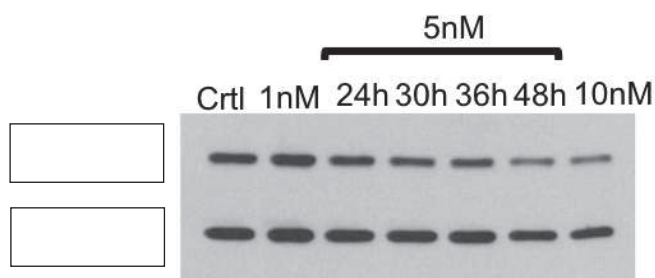


Figura 6A: Inibição farmacológica de PTEN em HN6. Western Blotting representando a diminuição da expressão proteica de PTEN (primeira linha) e GAPDH (segunda linha) em diferentes tempos de exposição ao BPVpic (inibidor farmacológico do PTEN) na mesma concentração para linhagem celular HN6.

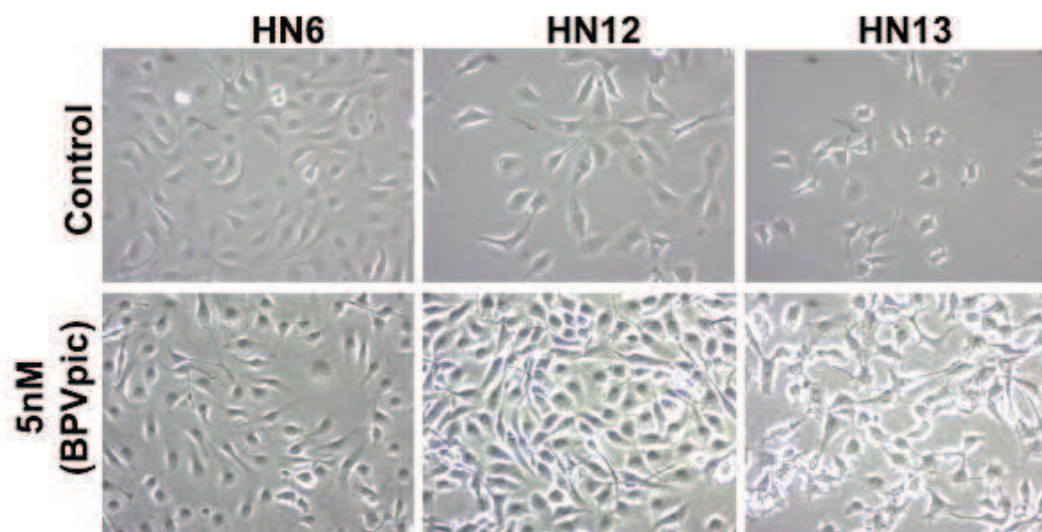


Figura 6B: Exposição ao bpV(pic). Morfologia celular observada nas diferentes linhagens de CCP (HN6, HN12 e HN13). Nota-se que mesmo as linhagens menos fusiformes como HN13 adquirem fenótipo EMT após exposição farmacológica ao inibidor de PTEN por 24 horas (aumento de 40X).

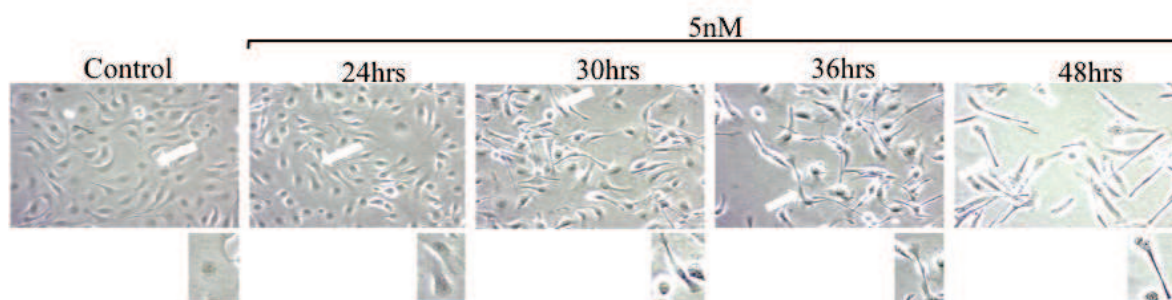


Figura 6C: Fenótipo fusiforme após diminuição dos níveis de PTEN. Foto tirada no aumento de 40x na qual é possível observar a mudança de fenótipo para o formato fusiforme na linhagem celular HN6.

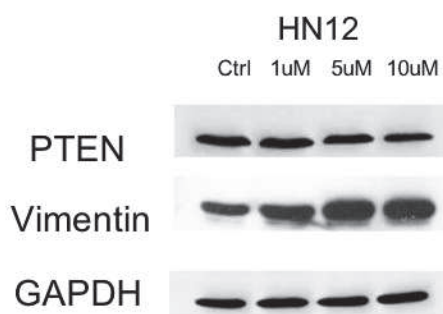


Figura 6D: Expressão de Vimentina após inibição de PTEN. Western Blotting representando a diminuição na expressão proteica de PTEN em concordância com as maiores concentrações da droga e o concomitante aumento de Vimentina.

3.6. EXPRESSÃO DE HIF-1 α ESTA DIRETAMENTE ASSOCIADA COM O DESEQUILÍBRIO DA EXPRESSÃO DE PTEN

Depois de confirmada a habilidade de bpV(pic) de induzir EMT, investigamos os efeitos do inibidor da proteína fosfatase de tirosina sobre os níveis de HIF-1 α . Dessa forma, foi visto que diminuição da expressão de PTEN leva ao aumento dos níveis de HIF-1 α (Fig. 7A). A perda de funcionalidade de PTEN foi realizado por meio shRNA nas células HN13 (Fig. 7B).

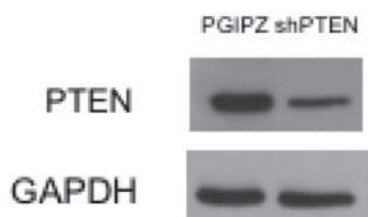


Figura 7A: Expressão de PTEN em shPTEN e pGIPZ. Western Blotting demonstrando a menor expressão de PTEN na linhagem celular shPTEN HN13.

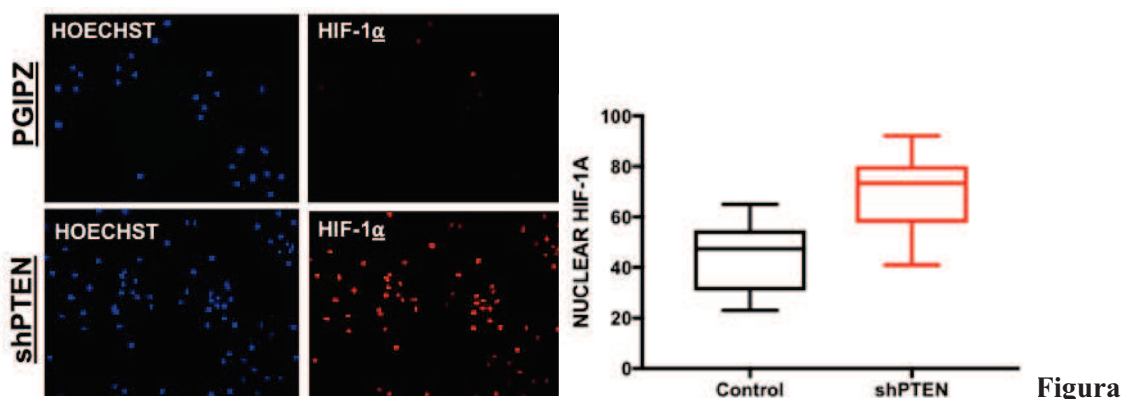


Figura 7B: Expressão de HIF-1 α em shPTEN HN13. Expressão de HIF-1 α é aumentada em shPTEN HN13 comparada ao pGIPZ. Indicando que HIF-1 α está *downstream* na via mTOR/AKT (aumento x20).

3.7. HIPÓXIA INDUZ ACÚMULO DE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS *IN VITRO* E *IN VIVO*

A presença de CTT mostrou conferir resistência fenotípica em diversos tumores sólidos. Similar, compostos antiangiogênicos usados contra tumores sólidos, especialmente em câncer de mama, mostraram induzir o acúmulo de células-tronco tumorais (20). No presente estudo, averiguamos se o cultivo de células de CCP em condições de hipóxia interfere na população de CTT. Por meio da análise de citometria

de fluxo identificamos a atividade enzimática de aldeídos desidrogenases. Ambas as linhagens apresentaram um significativo acúmulo de CTT (Fig. 8A, $*p<0,05$). Utilizando um modelo animal xenográfico para CCP (Fig. 8B), observamos que áreas de hipóxia dentro da massa tumoral são caracterizadas pelo acúmulo de células ALDH1A1 positivas. Tais achados sugerem que as CTT, não apenas dentro de regiões de hipóxia do tumor, mas também em modelo xenográfico expressaram HIF-1 α (Fig. 8C).

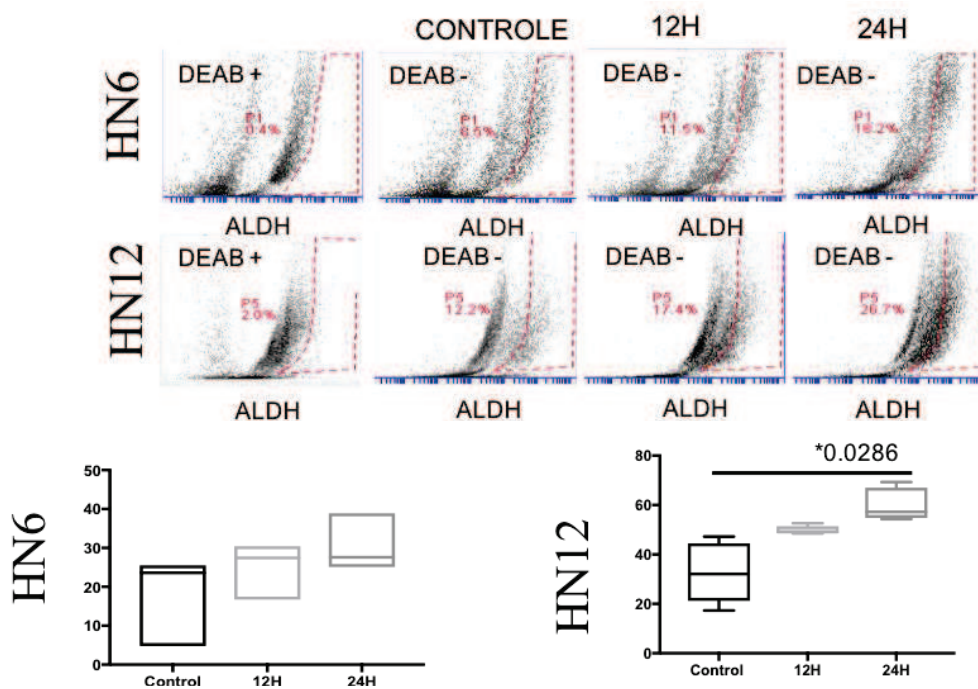


Figura 8A: Acúmulo de CTT em hipóxia. Células das linhagens HN6 e HN12 mantidas sob hipóxia comparadas com o controle.

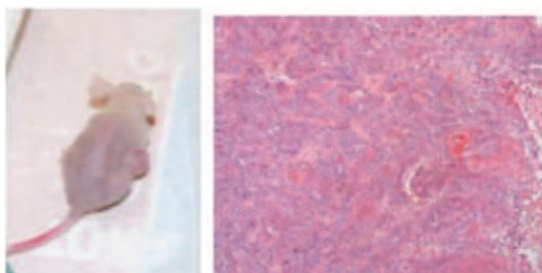


Figura 8B: Animais xenoenxertados. Animais nudes foram xenoenxertados com a linhagem celular HN12.

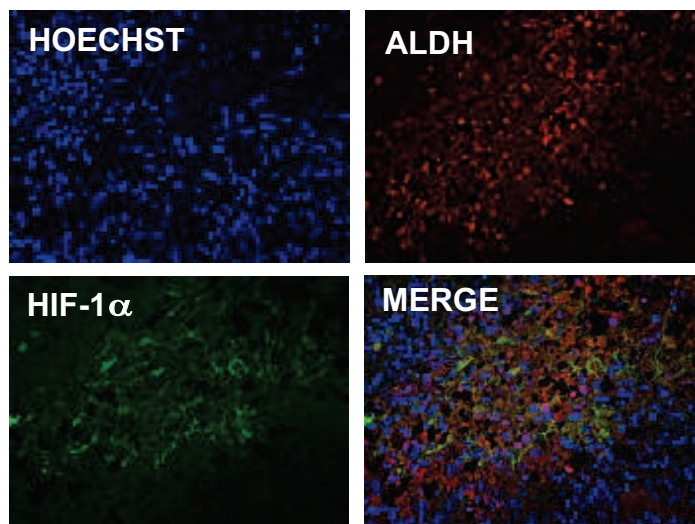


Figura 8C: Expressão de ALDH1A1 em áreas de hipóxia. Expressão co-localizada de HIF-1 α e ALDH1A1 em tecidos tumorais provenientes de camundongos xenoinxertados (aumento 20x).

3.8. DESEQUILÍBRIO DE PTEN RESULTA NO ACÚMULO DE CTT

Com a finalidade de identificar se o acúmulo de CTT foi em resposta à hipóxia está diretamente associado com baixa expressão de PTEN, tratamos as linhagens de CTT com bpV(pic) e investigamos a atividade enzimática da ALDH1A1 por citometria de fluxo. Encontramos que a administração de bpV(pic) resultou no acúmulo de CTT CD44⁺ e ALDH1A1^{Bright} (Fig. 9, * p<0,05, **p<0,005). Ainda, com a inibição farmacológica de PTEN foi observado o aumento de expressão do gene NANOG para HN6 (Apêndice 1).

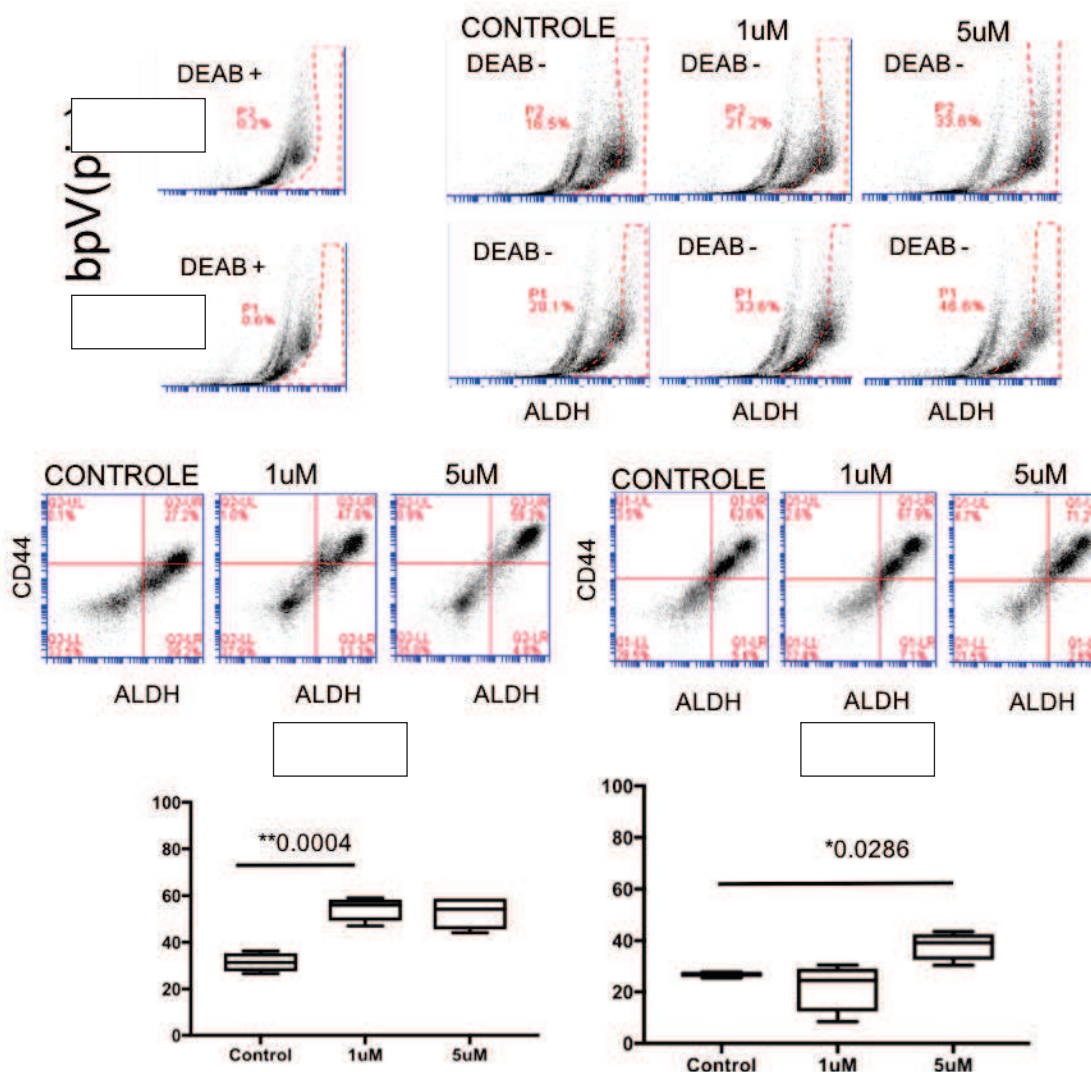


Figura 9: Aumento de CTT após inibição de PTEN. Células das linhagens HN6 e HN12 tratadas com inibidor de PTEN por 24hrs comparadas ao controle.

3.9. CICLO CELULAR

O ensaio de ciclo celular com iodeto de propídio foi realizado comparando o controle com a condição de hipóxia. Foi possível notar que as células entraram em parada do ciclo celular. Para a linhagem HN6 (Figura 10A) achamos o ns $p>0,05$, mesmo não sendo estatisticamente significativo é possível notar pelo gráfico a tendência das células para G0 e G1, enquanto que, para linhagem HN12 (Figura 10B) foi encontrado o $*p<0,05$, estatisticamente significativo.

HN6

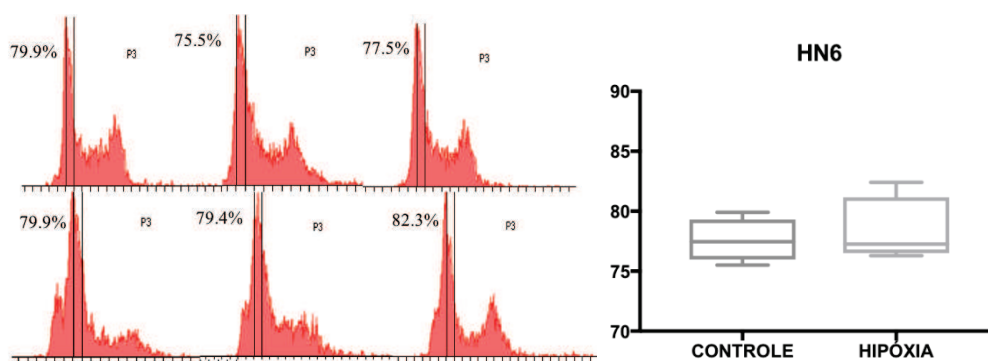


Figura 10A: Análise de ciclo celular em hipóxia para HN6. Para a linhagem HN6 não foi encontrada significância estática para parada do ciclo celular (ns $p > 0.05$). Embora, pela visualização do gráfico, nota-se claramente a maior porcentagem de células nas fases de G0 e G1.

HN12

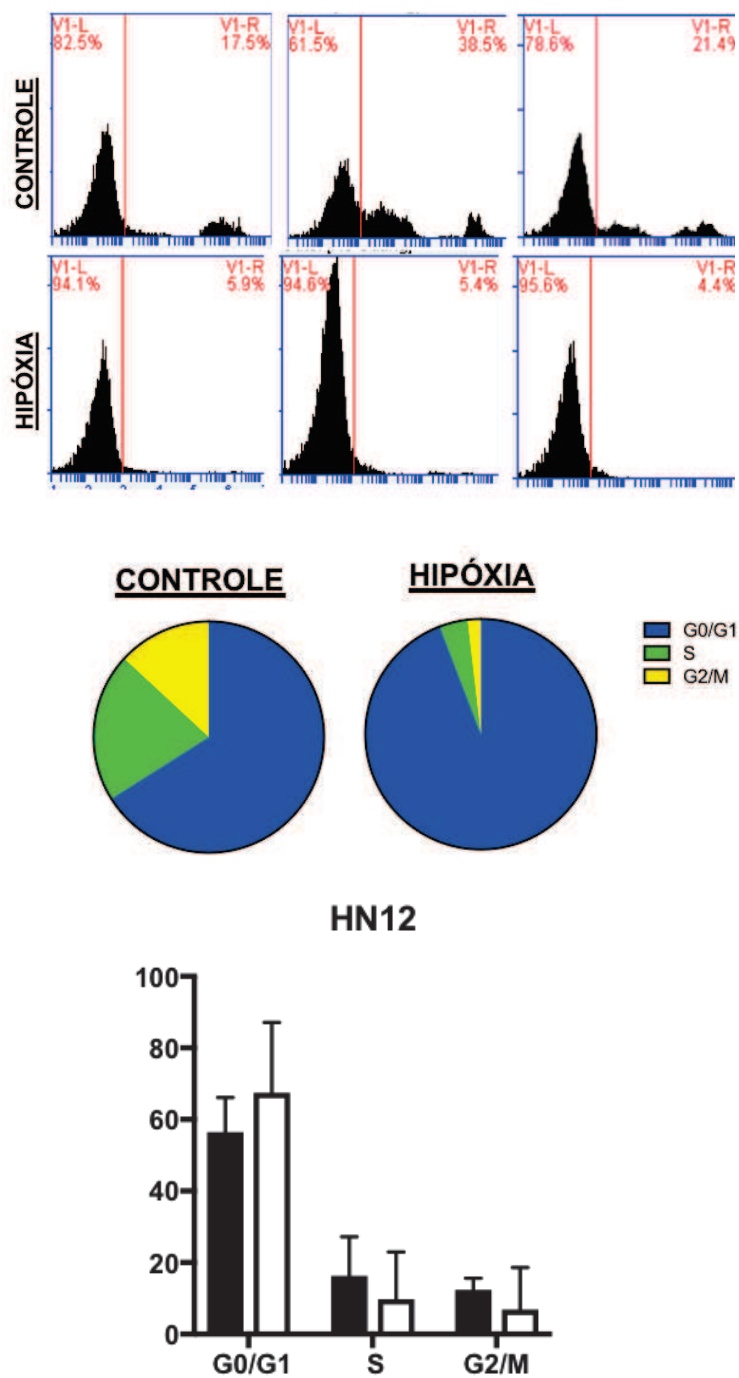


Figura 10B: Análise de ciclo celular em hipóxia para HN12. Para linhagem HN12 foi encontrada significância estatística $*p < 0,05$. O gráfico em pizza apresenta a porcentagem de células por fase do ciclo celular e nitidamente é possível notar o aumento de células em G0 e G1 após hipóxia.

4. DISCUSSÃO

O tratamento antiangiogênico, apesar de ser bastante promissor, vem sendo amplamente discutido em relação ao aumento de metástases e a presença de recidivas após seu uso (18, 20). Desta forma, o presente trabalho buscou mimitizar, *in vitro*, as consequências deste tipo de tratamento.

Sendo assim, consideramos a hipóxia a principal consequência imediata decorrente dos inibidores de angiogenese, investigou-se um modo eficaz de estudar tal fenômeno em linhagens tumorais de CCP. A literatura traz alguns métodos alternativos de indução *in vitro* à hipóxia, mas ainda insipientes e com resultados superficiais (32), outros métodos tradicionalmente usados carregam problemas relacionados à manutenção da concentração de O₂, ou fazem apenas uma indução química, o que não representa verdadeiramente a condição de hipóxia (32).

Devido à dificuldade de se criar condições de hipóxia com as metodologias existentes, constatou-se a necessidade de elaborar um método mais rentável e eficiente. Assim, a câmara de hipóxia desenvolvida para este projeto e descrita acima oferece a vantagem de gerar hipóxia em cultura celular de modo eficiente e barato comparado aos métodos tradicionais.

Do ponto de vista do microambiente tumoral, a redução da oxigenação das células tumorais, devido à redução da vascularização, gera nichos de hipóxia. A hipóxia impacta diretamente o microambiente tumoral de diferentes maneiras, incluindo mudança no pH do tecido, resultando na menor eficácia da droga. Soma-se a isso, o fato de que condições de hipóxia são atualmente apontadas como um microambiente tumoral capaz de contribuir para o fenótipo de CTT, além de auxiliarem na heterogeneidade tumoral. Esse é o caso do câncer de mama que responde a terapia anti-angiogênica pela estimulação da população de CTT (22). De modo geral, áreas de hipóxia são as principais consequências, como já relatado em outros trabalhos, para o aumento de CTT (33).

As CTT recentemente ganharam a atenção da comunidade científica devido às claras evidências do seu envolvimento com o comportamento agressivo do tumor, resistência à quimioterapia e acentuada habilidade para se adaptar a mudanças no microambiente tumoral. Devido ao fato de muitas das propriedades reportadas sobre as CTT parecerem contraditórias e frequentemente não conciliarem entre os tumores sólidos, a chave para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o

tratamento do câncer é um melhor entendimento do circuito molecular que regula o comportamento desse tipo celular.

A presença de hipóxia também está associada com a indução do fenótipo EMT em tumores sólidos incluindo carcinoma hepatocelular (48), câncer colorretal(49), hepatoblastoma, carcinoma pancreático, mama e colon (50, 51).

O presente estudo demonstra que os mecanismos moleculares da hipóxia e EMT estão envolvidos na disfunção de PTEN. A inibição farmacológica de PTEN leva diretamente a aquisição do fenótipo EMT em células-tronco tumorais em conjunto com o aumento da regulação de genes associados ao fenótipo EMT como *Vimentina* e *Snail*. A observação entre a modulação negativa do PTEN induzido pela hipóxia e a ativação de EMT foi feita em câncer de pulmão por Kohnoh *et al*, 2016 (29).

Nossos achados sugerem fortemente que o supressor tumoral PTEN atua como o regulador das CTT bem como previne o fenótipo EMT em câncer de cabeça e pescoço.

Demonstramos que os níveis proteicos de PTEN também são controlados pela hipóxia. Então, condições de hipóxia levam a menor expressão proteica de PTEN e a interferência farmacológica do PTEN (por meio de inibidores de tirosina fosfatase), concomitante a inibição dos níveis proteicos de PTEN, levam ao aumento de HIF-1 α . Portanto, nossos resultados sugerem que previas observações na via mTOR como ativador de HIF-1 α deve ser, no mínimo, parcialmente regulado pela disfunção do PTEN.

Complementar ao observado em câncer de mama, mostramos que os nichos de hipóxia nos camundongos xenoenxertados apresentam co-localização de células-tronco tumorais (ALDH1A1) e HIF-1 α . E o mais surpreendente, os ensaios de co-localização sugerem que as células ALDH1A1⁺ estão se desenvolvendo dentro dos nichos de hipóxia.

A observação sobre o aumento de CTT em câncer de mama após o uso de antiangiogênicos, relatada por Conley e colegas, explica o ganho de resistência após a terapia anti-angiogênica (22). A perda do PTEN em câncer de próstata e o desenvolvimento de um fenótipo EMT em conjunto com o aumento de CTT foi relatada por Mulholland *et al*, 2012 (30). A perda da expressão de PTEN em cânceres de cabeça e pescoço foi recentemente demonstrada por Matsumoto *et al* (Laboratório de Biologia

Epitelial) como sendo um mecanismo derivado do acúmulo de espécies reativas de oxigênio que oxidam o PTEN (26).

Considerando a sinalização celular, a ativação da via mTOR resulta no aumento de HIF-1 α como previamente relatado (37, 38). Níveis aumentados de HIF-1 α estão associados ao pior diagnóstico em câncer de colon (39), pâncreas (40), mama (41), neurofibrosarcoma (42), câncer de pulmão (43, 44), câncer de cabeça e pescoço (45, 46) entre outros.

Além disso, é importante ressaltar que as células tumorais são dotadas de heterogeneidade nos diferentes tipos de tumores e nos diferentes graus de estadiamento ou mesmo entre tumores primários e metastáticos do mesmo paciente (35, 36).

Entre diversas condições capazes de mudar o comportamento e o número de células tumorais, o acúmulo de mutações, a ativação de modificações epigenéticas, e mudanças no ambiente tumoral resultam na indução da seleção clonal e variações no comportamento tumoral.

Embora os altos níveis de mTOR sejam comumente observados no câncer de cabeça e pescoço e bem associado com a ativação de HIF-1 α , o *status* do supressor tumoral PTEN (regulador maior da via PI3K/mTOR) é fracamente explorado na biologia do câncer de cabeça e pescoço. O *PTEN* é encontrado mutado entre 9-23% de todos os cânceres de cabeça e pescoço, enquanto que a perda dos níveis de proteicos foi observada em mais de 31,2% de todos os casos (47). As discrepâncias entre os níveis de PTEN mutado e a perda da expressão proteica sugerem a presença mecanismos de regulação pós transcricionais. De fato, o laboratório de Biologia Epitelial da Universidade de Michigan, coordenado pelo Dr. Castilho, mostrou que o aumento de espécies reativas de oxigênio em câncer de cabeça e pescoço resulta na oxidação do PTEN e, conseqüentemente, na perda da função (26).

Lesões na córnea podem induzir a *downregulation* de PTEN, cuja consequência será a ativação significativa de AKT, já que outros experimentos mostraram que a migração celular era dependente da ativação de AKT. Então, a inibição de PTEN significa o aumento da migração e simultaneamente a inibição de AKT irá agir de modo antagônico, ou seja, diminuindo a migração celular (52).

Haja vista que o fármaco bpV(pic) seja aceito como um inibidor da atividade de PTEN, a sua especificidade, ainda que administrado em baixos níveis, pode modificar

funções desconhecidas que podem ou não contribuir para o estudo (53). Desse modo, o composto bpV poderia interferir com a proteína relata Src de maneira direta ou em razão da modulação de PTEN. A via PTEN/PI3K é ubiquitinada por todo o corpo, assim, interferindo na inibição de PTEN e, portanto, na sinalização de PI3K deve ter efeitos não intencionais em outros alvos (53). Para minimizar algumas preocupações, a terapia de curta duração com bpV permite um maior controle da relação dose e tempo de ação do composto do organismo por meio da interrupção do tratamento da droga (53).

Apesar de estes trabalhos corroborarem com nosso estudo, eles não estabelecem de forma clara a ação do tratamento antiangiogênico levando ao aumento de metástases e recidiva tumoral. Portanto, em vista do presente entendimento da relação entre a terapia anti-angiogênica e a aquisição de resistência tumoral, o presente trabalho traz resultados importantes.

Essas observações são preocupantes quando se trata de tratamento antiangiogênico benéfico em células cancerosas não tronco, mas falham em afetar as células-tronco tumorais. Estudos prévios do Laboratório de Biologia Epitelial, da Universidade de Michigan (USA), demonstraram que os níveis proteicos de VEGF são altos para HN6 (1021.5 pg/mL), HN12 (1062.5pg/mL) e HN13 (1145.7 pg/mL). Estes valores são a média da duplicada ajustados pela diluição (resultados não publicados). Este resultado torna coerente o uso dos antiangiogênicos para o câncer de cabeça e pescoço (Anexo 3).

Contudo, o tratamento antiangiogênico gera áreas de hipóxia dentro da massa tumoral, e o presente estudo apresenta fortes indícios do aumento da malignidade tumoral netas regiões por meio da supressão do PTEN e ativação da via mTOR/AKT (Apêndice 7). Portanto futuros trabalhos devem estudar a inibição da referida via em conjunto com o tratamento antiangiogênico, como por exemplo, a Rapamicina – uma droga amplamente conhecida por sua capacidade de inibir mTOR. Desse modo, os resultados sugerem que é preciso realizar terapia-alvo específica para CTT durante a terapia anti-angiogênica, para que esta não contribua com o aumento da malignidade.

5. CONCLUSÕES

Por meio de técnica inovadora, apresenta-se câmara de hipóxia capaz de mimetizar consequências do tratamento antiangiogênico em CCP em experimentos *in vitro*;

Observa-se mudanças morfológicas nas células cultivadas sob hipóxia, com formato fusiforme, típico de células com comportamento mais invasivo. A hipóxia é a causa da redução nos níveis de *PTEN* que desencadeia a ativação da via mTOR/AKT que leva ao fenótipo EMT, o mesmo é observado após o tratamento com bpV(pic).

A expressão gênica de *SNAIL* e *VIMENTINA* é super-expressa após a inibição de *PTEN*.

A situação de hipóxia e tratamento farmacológico produz o acúmulo de células-tronco tumorais, comprovada pela expressão elevada de ALDHA1 e CD44 bem como NANOG.

Assim, demonstra-se que a hipóxia desenvolve papel crucial para aumento da agressividade do tumor e que as drogas anti-angiogênicas devem considerar o potencial efeito na cascata metabólica após o silenciamento do *PTEN*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(2):69-90.
2. Gold KA, Lee HY, Kim ES. Targeted therapies in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer.* 2009;115(5):922-35.
3. Klein JD, Christopoulos A, Ahn SM, Gooding WE, Grandis JR, Kim S. Antitumor effect of vandetanib through EGFR inhibition in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2012;34(9):1269-76.
4. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971;285(21):1182-6.
5. Cao Y, Langer R. A review of Judah Folkman's remarkable achievements in biomedicine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(36):13203-5.
6. Li WW, Li VW, Hutnik M, Chiou AS. Tumor angiogenesis as a target for dietary cancer prevention. *J Oncol.* 2012;2012:879623.
7. Kerbel R, Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(10):727-39.
8. Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(4):273-86.
9. El-Kenawi AE, El-Remessy AB. Angiogenesis inhibitors in cancer therapy: mechanistic perspective on classification and treatment rationales. *Br J Pharmacol.* 2013;170(4):712-29.
10. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature.* 2005;438(7070):932-6.
11. Cohen MH, Gootenberg J, Keegan P, Pazdur R. FDA drug approval summary: bevacizumab plus FOLFOX4 as second-line treatment of colorectal cancer. *Oncologist.* 2007;12(3):356-61.
12. Yan X, Lin Y, Yang D, Shen Y, Yuan M, Zhang Z, et al. A novel anti-CD146 monoclonal antibody, AA98, inhibits angiogenesis and tumor growth. *Blood.* 2003;102(1):184-91.
13. Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2006;355(24):2542-50.
14. Yang JC, Haworth L, Sherry RM, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, et al. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med.* 2003;349(5):427-34.

15. Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts SR, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol.* 2007;25(12):1539-44.
16. Ebos JM. Prodding the Beast: Assessing the Impact of Treatment-Induced Metastasis. *Cancer Res.* 2015;75(17):3427-35.
17. Ebos JM, Lee CR, Cruz-Munoz W, Bjarnason GA, Christensen JG, Kerbel RS. Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell.* 2009;15(3):232-9.
18. Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(8):592-603.
19. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, et al. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res.* 2006;66(19):9339-44.
20. Conley SJ, Gheordunescu E, Kakarala P, Newman B, Korkaya H, Heath AN, et al. Antiangiogenic agents increase breast cancer stem cells via the generation of tumor hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(8):2784-9.
21. Liu H, Lv L, Yang K. Chemotherapy targeting cancer stem cells. *Am J Cancer Res.* 2015;5(3):880-93.
22. Kohnoh T, Hashimoto N, Ando A, Sakamoto K, Miyazaki S, Aoyama D, et al. Hypoxia-induced modulation of PTEN activity and EMT phenotypes in lung cancers. *Cancer Cell Int.* 2016;16:33.
23. Mulholland DJ, Kobayashi N, Ruscetti M, Zhi A, Tran LM, Huang J, et al. Pten loss and RAS/MAPK activation cooperate to promote EMT and metastasis initiated from prostate cancer stem/progenitor cells. *Cancer Res.* 2012;72(7):1878-89.
24. Zagni C, Almeida LO, Balan T, Martins MT, Rosselli-Murai LK, Papagerakis P, et al. PTEN Mediates Activation of Core Clock Protein BMAL1 and Accumulation of Epidermal Stem Cells. *Stem Cell Reports.* 2017;9(1):304-14.
25. Matsumoto CS, Almeida LO, Guimaraes DM, Martins MD, Papagerakis P, Papagerakis S, et al. PI3K-PTEN dysregulation leads to mTOR-driven upregulation of the core clock gene BMAL1 in normal and malignant epithelial cells. *Oncotarget.* 2016;7(27):42393-407.
26. Squarize CH, Castilho RM, Abrahao AC, Molinolo A, Lingen MW, Gutkind JS. PTEN deficiency contributes to the development and progression of head and neck cancer. *Neoplasia.* 2013;15(5):461-71.

27. Zhou J, Wulfkuhle J, Zhang H, Gu P, Yang Y, Deng J, et al. Activation of the PTEN/mTOR/STAT3 pathway in breast cancer stem-like cells is required for viability and maintenance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(41):16158-63.
28. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 1999;399(6733):271-5.
29. Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem*. 1997;272(36):22642-7.
30. McKeown SR. Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours-implications for treatment response. *Br J Radiol*. 2014;87(1035):20130676.
31. Wu D, Yotnda P. Induction and testing of hypoxia in cell culture. *J Vis Exp*. 2011(54).
32. Ito A, Aoyama T, Yoshizawa M, Nagai M, Tajino J, Yamaguchi S, et al. The effects of short-term hypoxia on human mesenchymal stem cell proliferation, viability and p16(INK4A) mRNA expression: Investigation using a simple hypoxic culture system with a deoxidizing agent. *J Stem Cells Regen Med*. 2015;11(1):25-31.
33. Carnero A, Leonart M. The hypoxic microenvironment: A determinant of cancer stem cell evolution. *Bioessays*. 2016;38 Suppl 1:S65-74.
34. Paez-Ribes M, Allen E, Hudock J, Takeda T, Okuyama H, Vinals F, et al. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell*. 2009;15(3):220-31.
35. Land SC, Tee AR. Hypoxia-inducible factor 1alpha is regulated by the mammalian target of rapamycin (mTOR) via an mTOR signaling motif. *J Biol Chem*. 2007;282(28):20534-43.
36. Hudson CC, Liu M, Chiang GG, Otterness DM, Loomis DC, Kaper F, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol Cell Biol*. 2002;22(20):7004-14.
37. Anderson K, Lutz C, van Delft FW, Bateman CM, Guo Y, Colman SM, et al. Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature*. 2011;469(7330):356-61.
38. Zhang Y, Young ED, Bill K, Belousov R, Peng T, Lazar AJ, et al. Heterogeneity and immunophenotypic plasticity of malignant cells in human liposarcomas. *Stem Cell Res*. 2013;11(2):772-81.

39. Beasley NJ, Leek R, Alam M, Turley H, Cox GJ, Gatter K, et al. Hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in head and neck cancer: relationship to tumor biology and treatment outcome in surgically resected patients. *Cancer Res.* 2002;62(9):2493-7.
40. Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol.* 2001;21(12):3995-4004.
41. Baba Y, Nosho K, Shima K, Irahara N, Chan AT, Meyerhardt JA, et al. HIF1A overexpression is associated with poor prognosis in a cohort of 731 colorectal cancers. *Am J Pathol.* 2010;176(5):2292-301.
42. Miyake K, Yoshizumi T, Imura S, Sugimoto K, Batmunkh E, Kanemura H, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha, histone deacetylase 1, and metastasis-associated protein 1 in pancreatic carcinoma: correlation with poor prognosis with possible regulation. *Pancreas.* 2008;36(3):e1-9.
43. Gruber G, Greiner RH, Hlushchuk R, Aebersold DM, Altermatt HJ, Berclaz G, et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha in high-risk breast cancer: an independent prognostic parameter? *Breast Cancer Res.* 2004;6(3):R191-8.
44. Fukushima S, Endo M, Matsumoto Y, Fukushi JI, Matsunobu T, Kawaguchi KI, et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha is a poor prognostic factor and potential therapeutic target in malignant peripheral nerve sheath tumor. *PLoS One.* 2017;12(5):e0178064.
45. Lin CS, Liu TC, Lee MT, Yang SF, Tsao TC. Independent Prognostic Value of Hypoxia-inducible Factor 1-alpha Expression in Small Cell Lung Cancer. *Int J Med Sci.* 2017;14(8):785-90.
46. Hung JJ, Yang MH, Hsu HS, Hsu WH, Liu JS, Wu KJ. Prognostic significance of hypoxia-inducible factor-1alpha, TWIST1 and Snail expression in resectable non-small cell lung cancer. *Thorax.* 2009;64(12):1082-9.
47. Aebersold DM, Burri P, Beer KT, Laissue J, Djonov V, Greiner RH, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha: a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. *Cancer Res.* 2001;61(7):2911-6.
48. Roh JL, Cho KJ, Kwon GY, Ryu CH, Chang HW, Choi SH, et al. The prognostic value of hypoxia markers in T2-staged oral tongue cancer. *Oral Oncol.* 2009;45(1):63-8.
49. Giudice FS, Squarize CH. The determinants of head and neck cancer: Unmasking the PI3K pathway mutations. *J Carcinog Mutagen.* 2013;Suppl 5.

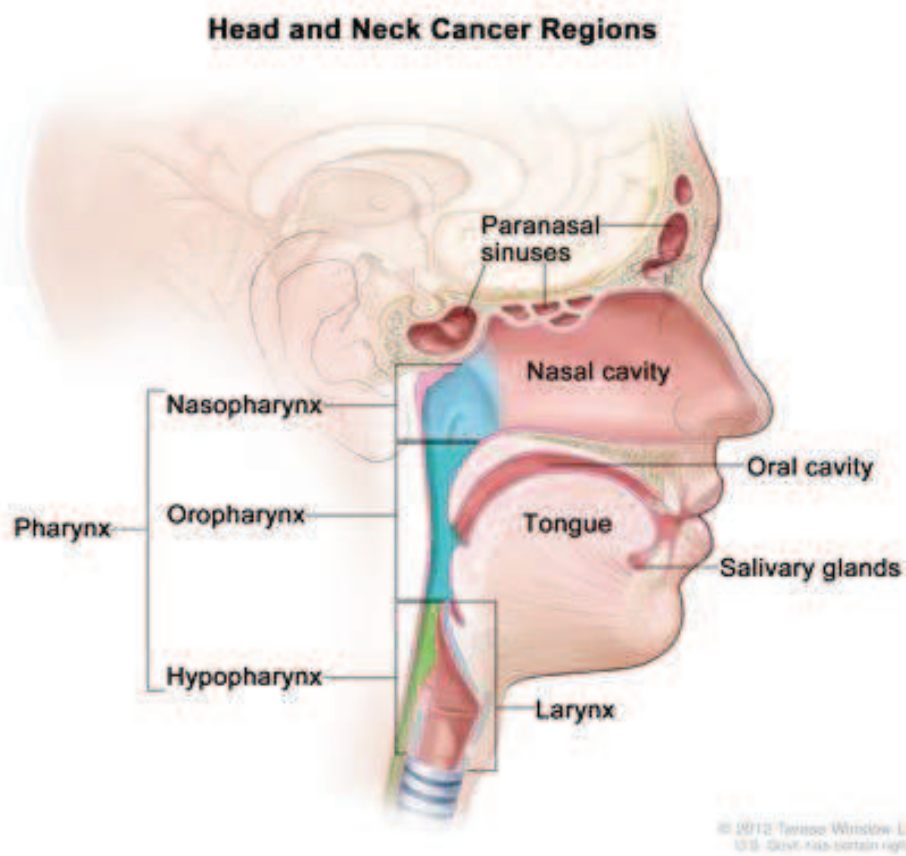
50. Zhang L, Huang G, Li X, Zhang Y, Jiang Y, Shen J, et al. Hypoxia induces epithelial-mesenchymal transition via activation of SNAIL1 by hypoxia-inducible factor -1alpha in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*. 2013;13:108.
51. Choi BJ, Park SA, Lee SY, Cha YN, Surh YJ. Hypoxia induces epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells through ubiquitin-specific protease 47-mediated stabilization of Snail: A potential role of Sox9. *Sci Rep*. 2017;7(1):15918.
52. Cannito S, Novo E, Compagnone A, Valfre di Bonzo L, Busletta C, Zamara E, et al. Redox mechanisms switch on hypoxia-dependent epithelial-mesenchymal transition in cancer cells. *Carcinogenesis*. 2008;29(12):2267-78.
53. Cannito S, Novo E, di Bonzo LV, Busletta C, Colombatto S, Parola M. Epithelial-mesenchymal transition: from molecular mechanisms, redox regulation to implications in human health and disease. *Antioxid Redox Signal*. 2010;12(12):1383-430.

7. ANEXOS

ANEXO 1: Anatomia da região da cabeça e pescoço

NIH -NATIONAL CANCER INSTITUTE

<https://www.cancer.gov/types/head-and-neck/head-neck-fact-sheet>



ANEXO 2. Artigo científico “Hypoxia-induced accumulation of cancer stem cells and activation of EMT is mediated by deregulated PTEN” a ser submetido à revista Cancer letter (fator de impacto: 6.3)

Hypoxia-induced accumulation of cancer stem cells and activation of EMT is mediated by deregulated PTEN

Carlos H. V. Nascimento-Filho^{1,2}; Liana P. Webber^{1,3}; Gabriell B. Borgato⁴; Eny M. Goloni-Bertollo²; Cristiane H. Squarize^{1,5} and Rogerio M. Castilho^{1,5}

¹ Laboratory of Epithelial Biology, Department of Periodontics and Oral Medicine, University of Michigan, School of Dentistry, Ann Arbor, Michigan, USA.

² Department of Molecular Biology, Faculty of Medicine of São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

³ Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

⁴ Department of Oral Biology, School of Dentistry, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, São Paulo, Brazil.

⁵ University of Michigan Comprehensive Cancer Center, Ann Arbor, Michigan, USA.

*Corresponding author:

Rogerio M. Castilho

Laboratory of Epithelial Biology

Department of Periodontics and Oral Medicine

University of Michigan

1011 N University Ave, Room 3210

Ann Arbor, MI

48109-1078

Phone: (734) 615-3406

e-mail: rcastilh@umich.edu

Keywords: anti-angiogenic treatment, hypoxia, PTEN loss, epithelial-mesenchymal transition, cancer stem cell

Abstract

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is the six most common malignancies worldwide. Antiangiogenic drugs are a conventional treatment, although it has been shown to stimulate hypoxic areas inside the tumor, and hypoxia has been associated with metastasis as well as accumulation of cancer stem cell (CSC) in breast cancer. To study the effects of hypoxia on HNSCC behavior and accumulation of cancer stem cell. Culture of HN6 tumor cells under hypoxic conditions was carried out for 6hrs, 12hrs, and 24hrs under an O₂ concentration of 1%. The content of cancer stem cell was determined using Aldefluor assay according to the manufacturer's (STEMCELL Technologies) to detect ALDH1A1^{bright} cells in combination with APC mouse anti-human CD44. Tumor invasion under hypoxic conditions was carried out using Millicell Cell Culture Inserts (Millipore, Billerica, MA, USA). Control tumor cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS and 1% antibiotics at normoxia levels (~21% of O₂), while hypoxia group was maintained at 1% of O₂. We used a PTEN inhibitor (BPV) concentrations of 1nM, 5nM, and 10nM. PTEN expression is downregulated under hypoxic conditions. Hypoxia-induced PTEN downregulation triggered an epithelial-mesenchyme transition phenotype (EMT) and accumulation of CSC. Plus, we showed antagonistic expression of PTEN and HIF-1 α when targeted disruption of PTEN (shPTEN HN13 cell line) strongly suggesting that loss of PTEN activates the PI3K/mTOR pathway in association with HIF-1 α upregulated. Validation of our results in xenograft animal models showed colocalization of ALDH1A1 cells and hypoxic areas along with the loss of nuclear localization of PTEN. Thus, we show that hypoxia-driven downregulation of PTEN plays a crucial role in tumor aggressiveness and that the potential use of CSC-targeted therapies should be considered during the administration of anti-angiogenic drugs to minimize tumor resistance.

Introduction

Head and neck cancer is one of the 10 most common cancers in the US (Jemal et al., 2011). In recent years there were significant advances in the understanding of the genetic landscape of HNSCC and the molecular signaling network commonly found disrupted in HPV and non-HPV oral and pharynx cancers. Yet, the 5-years relative survival rate of patients afflicted with this disease have marginally improved in the last decades (2007 to 2013, source: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/oralcav.html>).

Much of the complexity in managing oral and pharynx cancer relies on the heterogeneity of cancer cells, the high number of mutation found in non-HPV HNSCC, and in the presence of a recently described population of tumor cells presenting self-renew ability and capable of dividing into many cell types thereby constituting the tumor mass. The heterogenic nature of HNSCC is reflected in the low success rates of monotherapies when compared with the administration of multi-drug regimens. Anti-angiogenic agents like sunitinib and bevacizumab are currently in use for several solid tumors, however, the long-term benefits are restricted to a moderate increase in progression-free survival while little benefit is observed regarding the overall survival (18). From a cancer behavior perspective, administration of anti-angiogenic drugs has shown to increase metastasis and tumor relapse upon a short period of treatment (17, 34). Not only anti-angiogenic drugs increase the chance for metastasis but can also modify the tumor microenvironment by creating hypoxic niches within the tumor mass. Indeed, the development of hypoxic niches in breast cancer treated with anti-angiogenic molecules results in the accumulation of CSCs (20). Along HIF-1 α association with the accumulation of CSCs, emerging data linked the constitutive activation of the mTOR signaling pathway with high levels of HIF-1 α (35, 36). Because we have shown that PTEN can directly regulate the population of epithelial stem cells (24), and PTEN can control the PI3K/mTOR pathway (25-27), we hypothesize that hypoxic conditions could lead to a transient downregulation of PTEN levels in cancer tissues. Furthermore, deregulated PTEN levels would result in mTOR-driven accumulation of HIF-1 α and accumulation of cancer stem cells as we have previously observed in normal epithelial tissues (24).

Here we demonstrate that hypoxic conditions lead to a fast downregulation of PTEN levels in HNSCC along with the activation of an EMT-like phenotype and enhanced invasive properties. We also found that hypoxic niches of xenografts lack PTEN levels while containing ALDH1A1 1A1 1A1 1A1 positive cancer stem cells. Pharmacological inhibition of PTEN

recapitulate the effects of hypoxia and result in the accumulation of HIF-1 alpha and CSCs, along with the acquisition of an EMT phenotype.

Materials and Methods

Cell lines

Squamous cell carcinoma cell HN6, HN12, and HN13 were maintained in a 5% CO₂ humidified incubator at 37°C and cultured in DMEM – High glucose (Hyclone Laboratories Inc), supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (Thermo Scientific), 1% antibiotic (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Xenografts

The *in vivo* study was performed according to the University of Michigan Committee on Use and Care of Animals (UCUCA) approved protocol and in compliance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Scid mice (The Jackson Laboratory) were housed in 12-hrs light/dark cycles, and they received standard rodent chow and water ad libitum in compliance with AAALAC guidelines.

Invasion assay

Invasion assay: cells were seeded in 24-well plates over a thin homogeneous layer of fibronectin (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) in Millicell Cell Culture Inserts (Millipore, Billerica, MA, USA). Tumor cells from the control group were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS and 1% antibiotics, and the hypoxia group at around 1% O₂. Invasive cells in the lower chamber were stained with hematoxylin and eosin (H&E).

Immunofluorescence

Cells were blocked in 0.5% (v/v) Triton X-100 in PBS and 3% (w/v) bovine serum albumin (BSA) and then incubated with anti-PTEN (Cell Signaling Technology). Cells were then washed three times, incubated with Alexa 488-conjugated secondary antibody and stained

with Hoechst 33342 for visualization of DNA content. Images were taken using a QImaging ExiAqua monochrome digital camera attached to a Nikon Eclipse 80i Microscope (Nikon Melville, NY, USA) and visualized with QCapturePro software.

Flow cytometry

HNSCC cancer stem cells were identified by aldehyde dehydrogenase (ALDH1A1 1A1 1A1) activity and CD44 (BD Biosciences, Mountain View, CA, USA) expression using flow cytometry. The Aldefluor kit (StemCell Technologies, Durham, NC, USA) was used according to the manufacturer's instructions to identify cells with high ALDH1A1 enzymatic activity. Cells under hypoxic conditions or receiving BPV(pic) were suspended with activated Aldefluor substrate (BODIPY amino acetate) or negative control (dimethylamino benzaldehyde, a specific ALDH1A1 inhibitor) for 45 minutes at 37°C. Then, cells were washed and suspended with CD44 – APC conjugated and incubated for 25 min in shaking rotor at 4°C. All samples were analyzed using a flow cytometer Accuri C6 (BD Biosciences, USA) equipped with two excitation lasers: a blue solid state (488 nm) and a diode red (640 nm) providing up to 6 simultaneous detection parameters, including 4 fluorescent colors plus FSC and SSC.

Cell Cycle

Cell cycle distribution was accessed by propidium iodide staining. After exposed to hypoxic conditions cells were harvested and fixed with 70% ethanol on ice for 2 hours. The cell pellet was resuspended in 0.5mL PBS containing 0.25% Triton X-100 for permeabilization and incubated for 15 minutes on ice. Cells were then incubated with PBS containing propidium iodide (Sigma-Aldrich; 20 μ g/mL) and RNase solution (Sigma-Aldrich; 10 μ g/mL) for 30 min at room temperature. The relative number of cells in different phases of the cell cycle was accessed by flow cytometry, and the percentages of cells in G1, S, and G2 were calculated.

Western Blot

Tumor cells were lysed with cell lysis buffer containing protease inhibitors and briefly sonicated. Total protein was run in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to an Immobilon membrane (Millipore, Billerica, MA, USA). Membranes were blocked in 5% nonfat dry milk containing 0.1 M Tris (pH 7.5), 0.9% NaCl

and 0.05% Tween-20 for 1 hour at room temperature. Membranes were incubated with PTEN (Cell Signaling Technology, Danvers, MA), Vimentin (AB-2 Thermo Fisher), primary antibodies at 4°C overnight (Supplementary Table S1). Membranes were then incubated with appropriate secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, Sta. Cruz, CA, USA). The signal was developed using the ECL SuperSignal West Pico Substrate (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). GAPDH served as a loading control (Calbiochem, Gibbstown, NJ, USA).

Reverse transcriptase PCR (RT-PCR)

HNSCC cells were seeded as described above, followed by exposure to normoxia or 1% O₂ for 48 h, when total RNA was isolated with an RNeasy mini kit (QIAGEN). cDNA was synthesized with Oligo dT primer and the ImProm-II Reverse Transcription System (Promega). cDNA fragments were amplified with the following primer pairs: Sequência (5' → 3') GAPDH Forward ACCCACTCCTCCACCTTTGAC Reverse CCACCACCCTGTTGCTGTAG, SNAI1 Forward GCGTGTGCTCGGACCTTCT Reverse ATCCTGAGCAGCCGGACTCT, VIMENTINA Forward GACGCCATCAACACCGAGTT Reverse CTTTGTCGTTGGTTAGCTGGT, NANOG Forward CCCAGCCTTTACTCTTCCTA Reverse CCAGGTTGAATTGTTCCAGGTC. PCRs were performed with a GeneAmp PCR system 9700 (PE Applied Biosystems) for 30 cycles (with the exception of *β-actin* [25 cycles]) at 95°C for 40 s, annealing at 56°C for 40 s and extension at 72°C for 1 min with a final extension of 7 min at 72°C. Products were analyzed on a 1.5% agarose gel.

Statistical analysis

All statistical analysis was performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Statistical tests used were a one-way analysis of variance (ANOVA) and Student's *t*-test. Asterisks denote statistical significance (**p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.001; and NS *p*>0.05).

Results

Hypoxia induces in vitro and in vivo downregulation of the tumor suppressor gene PTEN in HNSCC.

Solid tumors including head and neck squamous cell carcinomas are characterized by its fast-growing and local invasion properties. During rapid cell division and enhanced tumor mass, solid tumors often undergo hypoxia. The effects of hypoxia on solid tumors are of interest to cancer biologists as recent findings suggest increased aggressive behavior and the development of a resistant phenotype to chemo and radiotherapies. Here we decided to explore the role of hypoxia over HNSCC biology and its potential interaction with PTEN, a tumor suppressor gene known to negatively control the PI3K signaling pathway commonly seen overexpressed in solid tumors.

Using two HNSCC cell lines (HN6 and HN12), we decided to explore the expression levels of PTEN upon exposure of tumor cells to hypoxic conditions. We found that PTEN at the protein level is found downregulated upon hypoxia (2% of O₂ concentration) (Fig. 1A and B, * p<0.05, **p<0.005). Most interesting we observed that HNSCC cells under hypoxic conditions change the phenotype from an epithelioid shape to a spindle shape with elongated extensions resembling the activation of the epithelial-mesenchyme transition (Fig. 1C). Furthermore, we decided to explore if hypoxic conditions would impact the activation status of the PI3K/mTOR signaling pathways as common event observed during downregulation of PTEN. Using the phosphorylated S6 protein (pS6) as a readout of the mTOR pathway we observed that hypoxia induces the accumulation of pS6 in cancer cells (Fig. 1D and E, ns p>0.05, * p<0.05, **p<0.005, ***p<0.001).

Areas containing keratin pearls or extensive necrosis are often seen in solid tumor biopsies. These areas are associated with reduced levels of oxygen that can lead to the activation of differentiation programs and ultimately cellular death. Here we sought to explore in vivo the correlation between the presence of hypoxic areas and the expression status of the tumor suppressor PTEN. Using xenografts (n=5) of HNSCC, we were able to recapitulate the fast tumor growth rate observed in HNSCC, that result in the formation of keratin pearls and areas of necrosis (Fig. 2A). Using immunofluorescence technique, we found that tumors areas surrounding the keratin pearls do express high levels of HIF-1alpha. Interesting, positive cells for HIF-1alpha are negative for PTEN expression, whereas we could observe PTEN positive cells in areas negative for HIF-1alpha (Fig. 2B and C, red_HIF-1alpha, green_PTEN).

HNSCC undergo EMT and increased invasive behavior under hypoxic conditions

We further decide to explore the potential implications of hypoxic conditions on the behavior of HNSCC. HNSCC cultured at 1% of O₂ demonstrates accumulation of vimentin, a stromal cellular marker commonly observed in epithelial cells undergoing EMT (Fig. 3A and B, * p<0.05, **p<0.005). Along with vimentin expression, we observed that cells exposed to low levels of O₂ presented an enhanced invasive phenotype when compared to controls. Both, HN6 and HN12 seeded onto Boyden invasion chambers coated with fibronectin were capable of invading matrix at higher rates compared to sham-treated cells (Fig. 3C, * p<0.05, **p<0.005).

Pharmacological inhibition of PTEN recapitulates EMT phenotype along with the overexpression of Vimentin, and Snail genes.

Following our findings on the activation of EMT and downregulation of PTEN upon hypoxia, we decided to explore if PTEN could influence the acquisition of the EMT phenotype. Using the chemical compound BPV(pic) (a selective inhibitor of PTEN at low nanomolar levels) (Fig. 4A), we found that HNSCC cells undergo similar acquisition of fusiform phenotype that observed with hypoxia figure 1C. Indeed, the epithelia mesenchyme transition could be observed after 30 hours of BPV(pic) administration with a peak on the phenotype observed after 48 hours (Fig. 4B). Both HN6 and HN12 undergo EMT phenotype upon administration of BPV(pic) (Fig. 4C). Along with the cellular phenotype, we observed that BPV(pic) was able to induce protein accumulation of vimentin (Fig. 4D), and the expression of the EMT-associated genes including VIM (vimentin), TWIST1 and SNAI1 (Snail) identified by Q-PCR (Fig. 4E).

Expression of HIF-1alpha is directly associated with downregulation of PTEN.

To confirm our findings, we performed a shRNA targeting PTEN in HN13 cells (Fig. 4G), and we found that genetic downregulation of PTEN leads to overexpression of HIF-1alpha levels (Fig. 4H, **p<0.005).

Hypoxia induces the accumulation of cancer stem cells *in vitro* and *in vivo*.

The presence of cancer stem cells has been shown to confer a resistant phenotype to several solid tumors. Similar, antiangiogenic agents used in solid tumors, especially in breast cancer, have shown to induce the accumulation of cancer stem cells (20). Here we decided to explore if HNSCC growing under hypoxic conditions would interfere with the population of cancer stem cells. Using flow cytometry to identify the enzymatic activity of Aldehyde dehydrogenases we found that both cell lines present a significant accumulation of cancer stem cells (Fig. 5A and 5B, * $p < 0.05$). Using our xenograft model for HNSCC, we also observed that hypoxic areas within the tumor mass were characterized by the accumulation of ALDH1A1 positive cells. Interestingly, we found that many cells expressing ALDH1A1 staining also expressed HIF-1A suggesting that cancer stem cells are not just found within the hypoxic areas, but also expressed HIF-1A (Fig. 5D).

Downregulation of PTEN results in the accumulation of cancer stem cells in HNSCC.

In order to identify if the accumulation of cancer stem cells driven by hypoxia is directly associated with the downregulation of PTEN, we treated HNSCC cell lines with BPV(pic) and explored the enzymatic activity of ALDH1A1 by flow cytometry. We found that administration of BPV(pic) resulted in the accumulation of CD44⁺ and ALDH1A1 cancer stem cells (Fig. 6A and 6B, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$).

Discussion

Cancer stem cells have recently gained significant attention from the research community due to emerging evidence on CSC involvement in aggressive tumor behavior, resistance to chemotherapy and enhanced ability to adapt to changes on the tumor microenvironment. Because many of the reported properties of CSCs may appear contradictory and often difficult to conciliate among different solid tumors, better understand on the molecular circuitry that rules CSCs behavior is key to the development of new therapeutic strategies to manage cancer. It is important, however, to recognize that CSCs are endowed with significant heterogeneity among tumors of different grades or between a primary and a metastatic tumor from the same patient (37, 38). Among several conditions capable of changing the behavior and number of CSC, the accumulation of new mutations, the activation of epigenetic modifications, and changes on the tumor environmental result in forced clonal selection and variations on cancer

behavior. From an environmental standpoint, reduced oxygenation of tumor cells due to reduced vascularization result in the development of hypoxic niches. Hypoxia impacts the tumor microenvironment in different ways including by changing the tissue pH resulting in poor drug performance. Also, hypoxic conditions have recently been pointed as microenvironmental cues capable of contributing to the CSC phenotype and heterogeneity. This is the case of breast cancer that responds to antiangiogenic therapy by stimulation the population of CSCs (20). Complementary to breast cancer, we show that hypoxic niches on HNSCC xenografts present co-localization of CSCs (ALDH1A1+ cells) and HIF-1alpha. Most surprisingly, the co-localization assays suggest that ALDH1A1+ cells are thriving within the hypoxic niches. These observations are particularly worrisome to anti-angiogenesis therapies that may be beneficial in targeting cancer cells but may fail in affecting CSCs. Furthermore, our results suggest that targeting CSCs may be beneficial during antiangiogenic therapies.

From a signaling standpoint, activation of the mTOR pathway results in the accumulation of HIF-1alpha as previously reported (39, 40). Increased levels of HIF-1 alpha has been associated with poor prognosis of colon cancer (41), pancreas (42), breast (43), peripheral nerve sheath tumors (44), lung cancer (45, 46), and HNSCC (47, 48) among others. Although high levels of mTOR are commonly reported in HNSCC and well associated to the activation of HIF-1alpha, the status of the tumor suppressor gene PTEN (master regulator of the PI3K/mTOR pathway) is far less explored in HNSCC biology. PTEN is found mutated in between 9-23% of all HNSCC while the loss of protein levels is observed in over 31.2% of the cases (reviewed in (49)). The discrepancy between the levels of PTEN mutation and loss of protein expression suggests the presence of post-translation regulation mechanisms. Indeed, we have shown that accumulation of reactive oxygen species in HNSCC results in PTEN oxidation and consequent loss of function (25). Here we found that protein levels of PTEN are also controlled by hypoxia. Hypoxic conditions drive down the protein expression of PTEN, and pharmacological interference of PTEN (tyrosine phosphatase inhibitors) along gene silencing strategies result in the accumulation of HIF-1 alpha. Therefore, we show here that compromised PTEN function result in the activation of the mTOR pathway and further accumulation of HIF-1alpha. Our data, therefore, suggest that previous observation on the role of mTOR as a HIF-1 alpha activator may be, at least, partially mediated by PTEN dysfunction.

Along with the accumulation of CSCs, the presence of hypoxia is also associated with the induction of EMT-like phenotype in solid tumors including hepatocellular carcinomas (50), colorectal cancer (51), hepatoblastoma, pancreatic carcinoma, breast and colon carcinomas (52), (reviewed in (53)). Here we demonstrate that the molecular mechanism of hypoxia and EMT

involves the dysfunction of PTEN. Pharmacological inhibition of PTEN directly leads to the acquisition of an EMT-like phenotype of HNSCC cells along with the upregulation of EMT-associated genes like Snail. Overall our findings suggest that the tumor suppressor PTEN acts as a guardian of CSCs and prevents the EMT-like phenotype of HNSCC.

References

1. Bergers, G., and Hanahan, D. (2008) Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* 8, 592-603
2. Ebos, J. M., Lee, C. R., Cruz-Munoz, W., Bjarnason, G. A., Christensen, J. G., and Kerbel, R. S. (2009) Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 15, 232-239
3. Paez-Ribes, M., Allen, E., Hudock, J., Takeda, T., Okuyama, H., Vinals, F., Inoue, M., Bergers, G., Hanahan, D., and Casanovas, O. (2009) Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell* 15, 220-231
4. Conley, S. J., Gheordunescu, E., Kakarala, P., Newman, B., Korkaya, H., Heath, A. N., Clouthier, S. G., and Wicha, M. S. (2012) Antiangiogenic agents increase breast cancer stem cells via the generation of tumor hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 2784-2789
5. Land, S. C., and Tee, A. R. (2007) Hypoxia-inducible factor 1alpha is regulated by the mammalian target of rapamycin (mTOR) via an mTOR signaling motif. *J Biol Chem* 282, 20534-20543
6. Hudson, C. C., Liu, M., Chiang, G. G., Otterness, D. M., Loomis, D. C., Kaper, F., Giaccia, A. J., and Abraham, R. T. (2002) Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol Cell Biol* 22, 7004-7014
7. Zagni, C., Almeida, L. O., Balan, T., Martins, M. T., Rosselli-Murai, L. K., Papagerakis, P., Castilho, R. M., and Squarize, C. H. (2017) PTEN Mediates Activation of Core Clock Protein BMAL1 and Accumulation of Epidermal Stem Cells. *Stem Cell Reports* 9, 304-314
8. Matsumoto, C. S., Almeida, L. O., Guimaraes, D. M., Martins, M. D., Papagerakis, P., Papagerakis, S., Leopoldino, A. M., Castilho, R. M., and Squarize, C. H. (2016) PI3K-PTEN dysregulation leads to mTOR-driven upregulation of the core clock gene BMAL1 in normal and malignant epithelial cells. *Oncotarget* 7, 42393-42407

9. Squarize, C. H., Castilho, R. M., Abrahao, A. C., Molinolo, A., Lingen, M. W., and Gutkind, J. S. (2013) PTEN deficiency contributes to the development and progression of head and neck cancer. *Neoplasia* 15, 461-471
10. Zhou, J., Wulfschlegel, J., Zhang, H., Gu, P., Yang, Y., Deng, J., Margolick, J. B., Liotta, L. A., Petricoin, E., 3rd, and Zhang, Y. (2007) Activation of the PTEN/mTOR/STAT3 pathway in breast cancer stem-like cells is required for viability and maintenance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 16158-16163
11. Anderson, K., Lutz, C., van Delft, F. W., Bateman, C. M., Guo, Y., Colman, S. M., Kempinski, H., Moorman, A. V., Tittley, I., Swansbury, J., Kearney, L., Enver, T., and Greaves, M. (2011) Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature* 469, 356-361
12. Zhang, Y., Young, E. D., Bill, K., Belousov, R., Peng, T., Lazar, A. J., Pollock, R. E., Simmons, P. J., Lev, D., and Kolonin, M. G. (2013) Heterogeneity and immunophenotypic plasticity of malignant cells in human liposarcomas. *Stem Cell Res* 11, 772-781
13. Beasley, N. J., Leek, R., Alam, M., Turley, H., Cox, G. J., Gatter, K., Millard, P., Fuggle, S., and Harris, A. L. (2002) Hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in head and neck cancer: relationship to tumor biology and treatment outcome in surgically resected patients. *Cancer Res* 62, 2493-2497
14. Laughner, E., Taghavi, P., Chiles, K., Mahon, P. C., and Semenza, G. L. (2001) HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol* 21, 3995-4004
15. Baba, Y., Nosho, K., Shima, K., Irahara, N., Chan, A. T., Meyerhardt, J. A., Chung, D. C., Giovannucci, E. L., Fuchs, C. S., and Ogino, S. (2010) HIF1A overexpression is associated with poor prognosis in a cohort of 731 colorectal cancers. *Am J Pathol* 176, 2292-2301
16. Miyake, K., Yoshizumi, T., Imura, S., Sugimoto, K., Batmunkh, E., Kanemura, H., Morine, Y., and Shimada, M. (2008) Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha, histone deacetylase 1, and metastasis-associated protein 1 in pancreatic carcinoma: correlation with poor prognosis with possible regulation. *Pancreas* 36, e1-9

17. Gruber, G., Greiner, R. H., Hlushchuk, R., Aebersold, D. M., Altermatt, H. J., Berclaz, G., and Djonov, V. (2004) Hypoxia-inducible factor 1 alpha in high-risk breast cancer: an independent prognostic parameter? *Breast Cancer Res* 6, R191-198
18. Fukushima, S., Endo, M., Matsumoto, Y., Fukushi, J. I., Matsunobu, T., Kawaguchi, K. I., Setsu, N., K. I. I., Yokoyama, N., Nakagawa, M., Yahiro, K., Oda, Y., Iwamoto, Y., and Nakashima, Y. (2017) Hypoxia-inducible factor 1 alpha is a poor prognostic factor and potential therapeutic target in malignant peripheral nerve sheath tumor. *PLoS One* 12, e0178064
19. Lin, C. S., Liu, T. C., Lee, M. T., Yang, S. F., and Tsao, T. C. (2017) Independent Prognostic Value of Hypoxia-inducible Factor 1-alpha Expression in Small Cell Lung Cancer. *Int J Med Sci* 14, 785-790
20. Hung, J. J., Yang, M. H., Hsu, H. S., Hsu, W. H., Liu, J. S., and Wu, K. J. (2009) Prognostic significance of hypoxia-inducible factor-1alpha, TWIST1 and Snail expression in resectable non-small cell lung cancer. *Thorax* 64, 1082-1089
21. Aebersold, D. M., Burri, P., Beer, K. T., Laissue, J., Djonov, V., Greiner, R. H., and Semenza, G. L. (2001) Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha: a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. *Cancer Res* 61, 2911-2916
22. Roh, J. L., Cho, K. J., Kwon, G. Y., Ryu, C. H., Chang, H. W., Choi, S. H., Nam, S. Y., and Kim, S. Y. (2009) The prognostic value of hypoxia markers in T2-staged oral tongue cancer. *Oral Oncol* 45, 63-68
23. Giudice, F. S., and Squarize, C. H. (2013) The determinants of head and neck cancer: Unmasking the PI3K pathway mutations. *J Carcinog Mutagen Suppl* 5
24. Zhang, L., Huang, G., Li, X., Zhang, Y., Jiang, Y., Shen, J., Liu, J., Wang, Q., Zhu, J., Feng, X., Dong, J., and Qian, C. (2013) Hypoxia induces epithelial-mesenchymal transition via activation of SNAIL by hypoxia-inducible factor -1alpha in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 13, 108
25. Choi, B. J., Park, S. A., Lee, S. Y., Cha, Y. N., and Surh, Y. J. (2017) Hypoxia induces epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells through ubiquitin-specific protease 47-mediated stabilization of Snail: A potential role of Sox9. *Sci Rep* 7, 15918

26. Cannito, S., Novo, E., Compagnone, A., Valfre di Bonzo, L., Busletta, C., Zamara, E., Paternostro, C., Povero, D., Bandino, A., Bozzo, F., Cravanzola, C., Bravoco, V., Colombatto, S., and Parola, M. (2008) Redox mechanisms switch on hypoxia-dependent epithelial-mesenchymal transition in cancer cells. *Carcinogenesis* 29, 2267-2278
27. Cannito, S., Novo, E., di Bonzo, L. V., Busletta, C., Colombatto, S., and Parola, M. (2010) Epithelial-mesenchymal transition: from molecular mechanisms, redox regulation to implications in human health and disease. *Antioxid Redox Signal* 12, 1383-1430

Figure 1

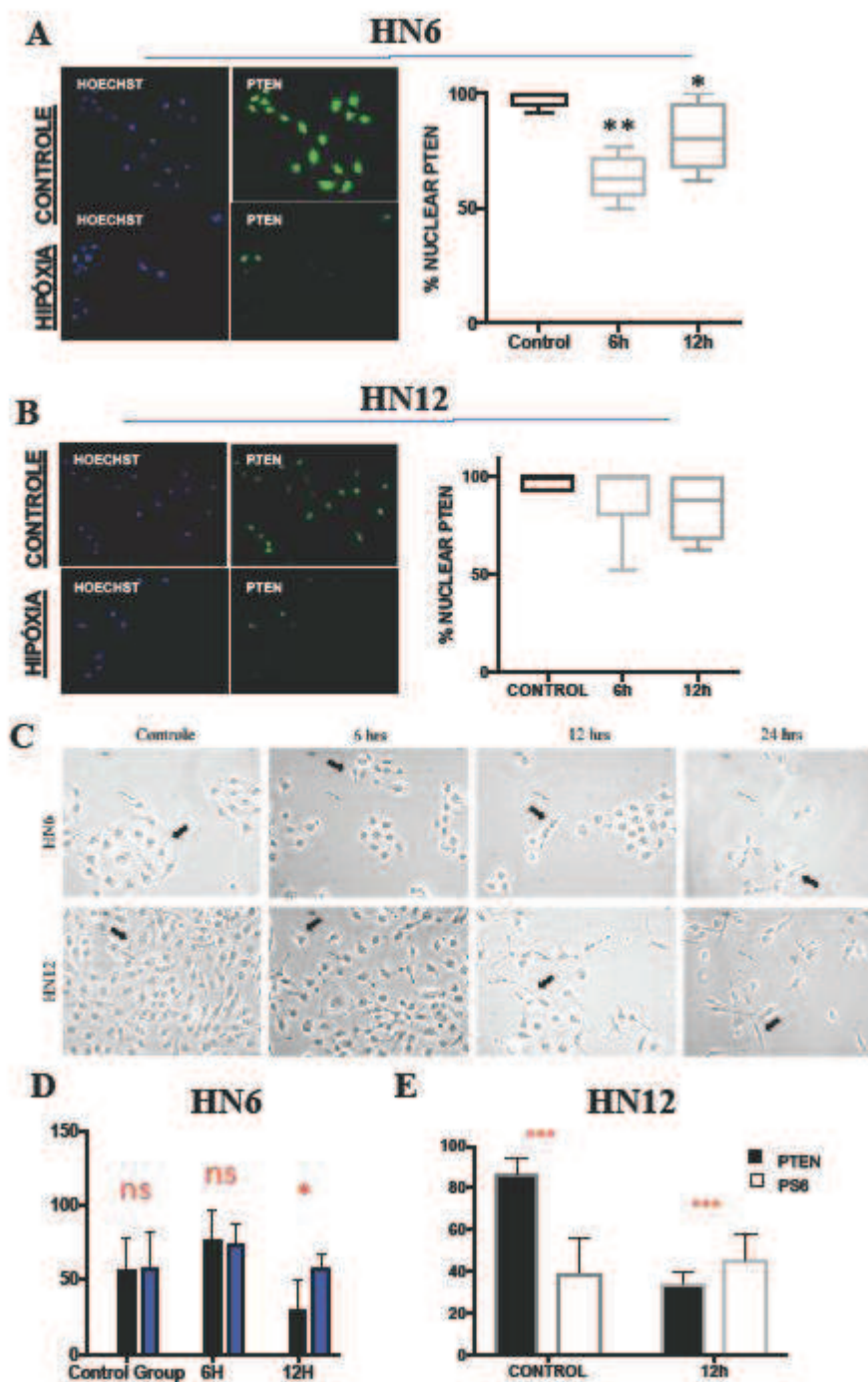


Figure 1: Hypoxia induces downregulation of PTEN. **A and B.** Immunofluorescence staining depict downregulation of PTEN protein levels upon exposure to hypoxic conditions. **C.** Phase contrast image demonstrating change on the cellular phenotype of HN6 and HN12 upon exposure to hypoxia. **D.** Hypoxia induces the accumulation of pS6 protein within the first 12 hrs of exposure.

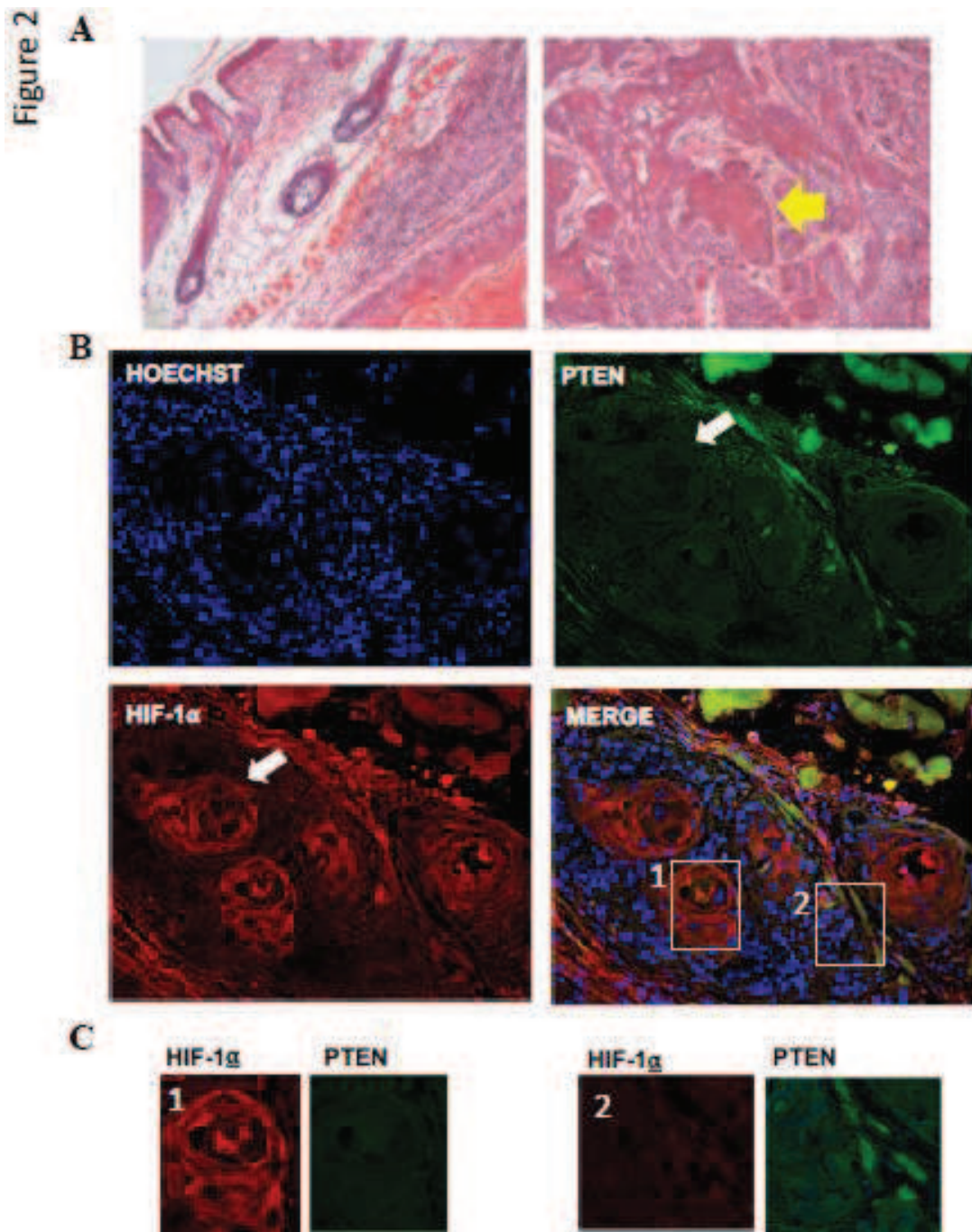


Figure 2. HNSCC Xenograft. **A.** H&E staining of HNSCC xenografts depict tumors cells under the skin of nude mice (left image) presenting a solid growth and the presence of keratin (right figure_arrow). **B and C.** Immunofluorescence staining for PTEN (green) and HIF-1 α (red) demonstrate the presence of hypoxic areas (HIF-1 α positive areas) and loss of nuclear expression of PTEN. Note that there is no colocalization between HIF-1 α and PTEN on xenograft samples.

Figure 3

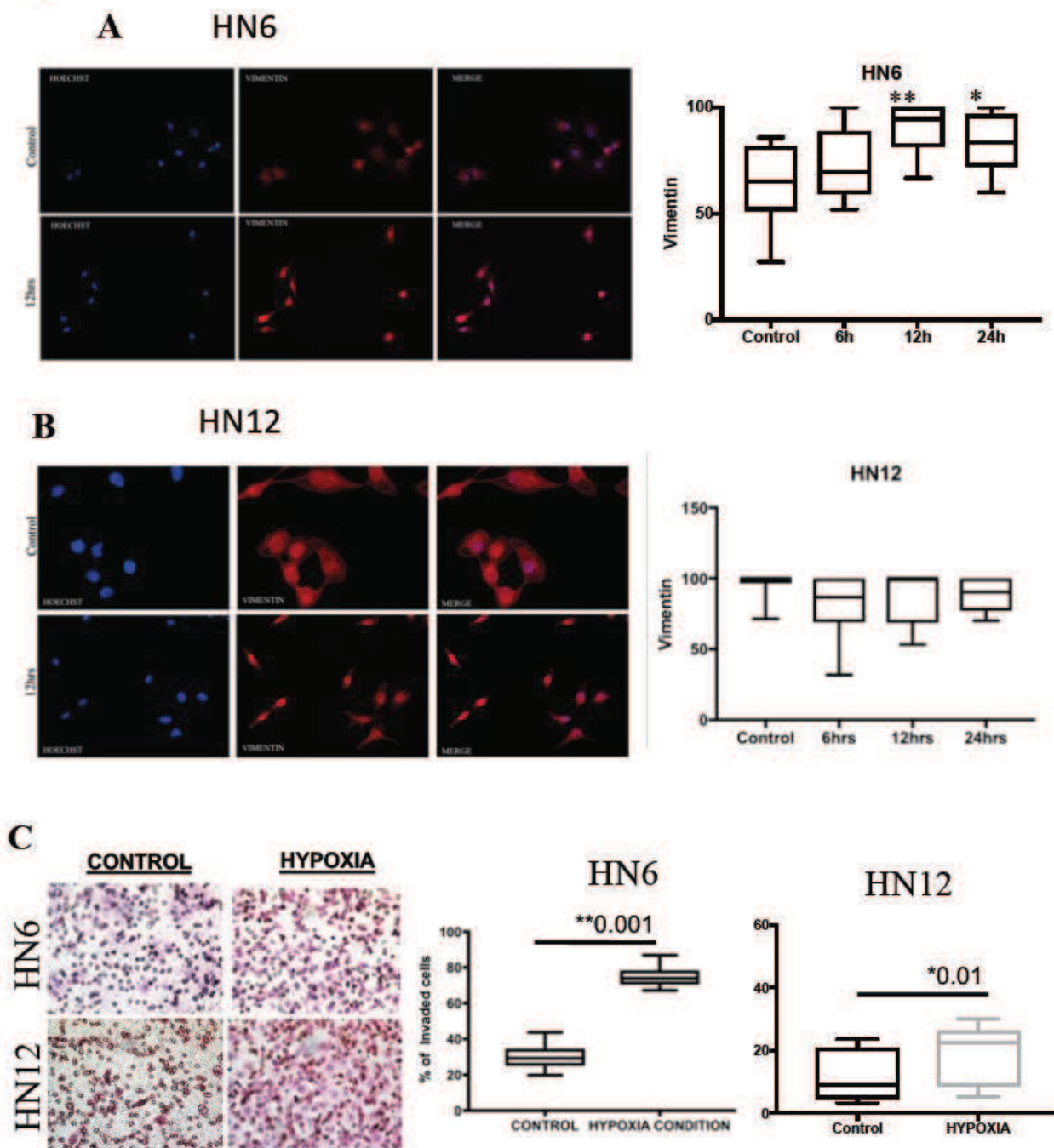


Figure 3. Hypoxia induces EMT phenotype. **A and B.** Immunofluorescence of HN6 and HN12 cells show accumulation of the stromal marker vimentin in tumor cells upon hypoxia. **C.** Invasion assay demonstrate that HNSCC cells present enhanced tumor invasion upon exposure to hypoxic conditions.

Figure 4

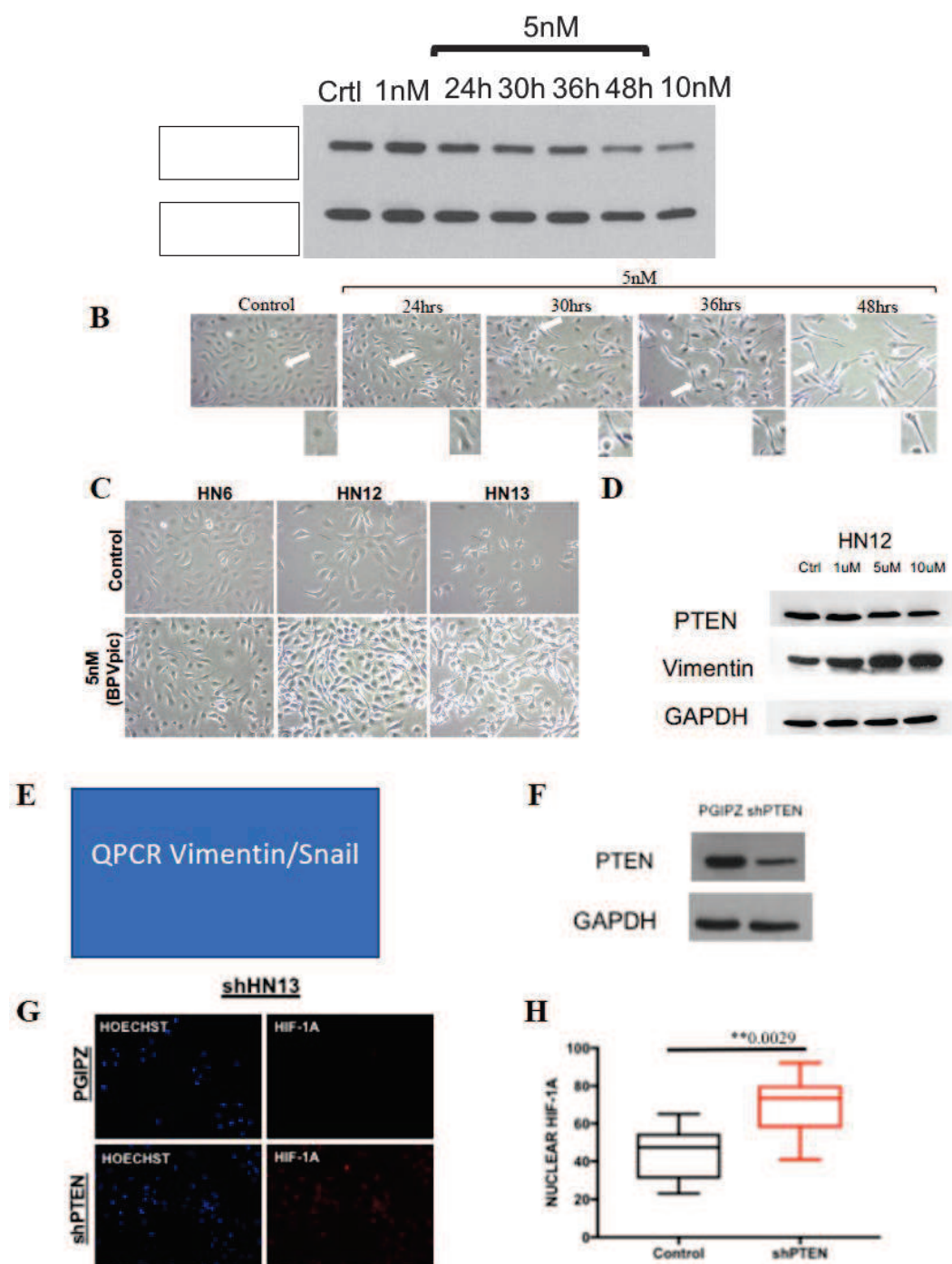


Figure 4. Pharmacological inhibition of PTEN induces EMT phenotype. **A.** Time course of HNSCC cell treated with the PTEN inhibitor bpV(pic) demonstrate strong inhibition of PTEN starting in 24 hrs up to 48 hrs. GAPDH was used as loading controls. **B.** Time course morphological changes of HNSCC cancer cells upon administration of bpV(pic). Note that in 30 hrs is noticeable the spindle shape morphology of HNSCC. **C.** HNSCC cells HN6 and HN12, and HN13 demonstrate changes in morphology upon administration of bpV(pic). **D.** bpV(pic) induces a concentration dependent accumulation of vimentin in HN12 cell. **E.** Real time PCR

demonstrate accumulation of the EMT markers Snail and Vimentin upon administration of bpV(pic). **F.** shRNA for PTEN. **G and H.** HNSCC cell with shRNA for PTEN demonstrate accumulation of HIF-1 α compared with control (PGIPZ).

Figure 5

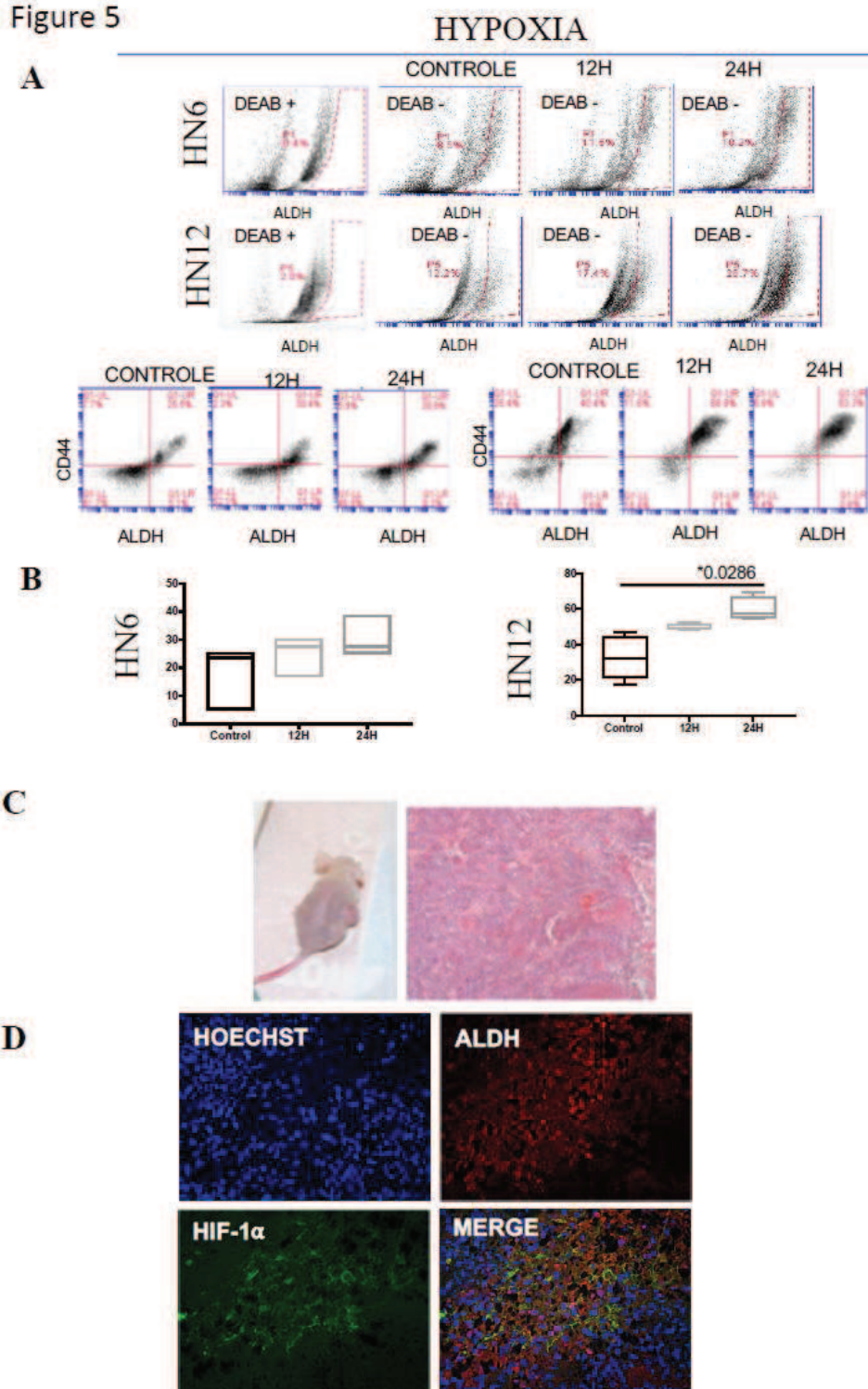


Figure 5. Hypoxia induces accumulation of CSCs. **A and B.** HNSCC cultured under hypoxic conditions result in the accumulation of ALDH1A1 cells (upper panel). Double staining of HNSCC cells for the CSC markers ALDH1A1 and CD44 demonstrate a time-dependent accumulation of CSCs. **C.** Xenograft mice with tumor growth on the right flank, and H&E staining of tumors (right). **D.** Immunofluorescence staining of tumor cells for ALDH1A1 (red) and HIF-1 α (green) demonstrate the colocalization of CSCs and hypoxic areas.

Figure 6

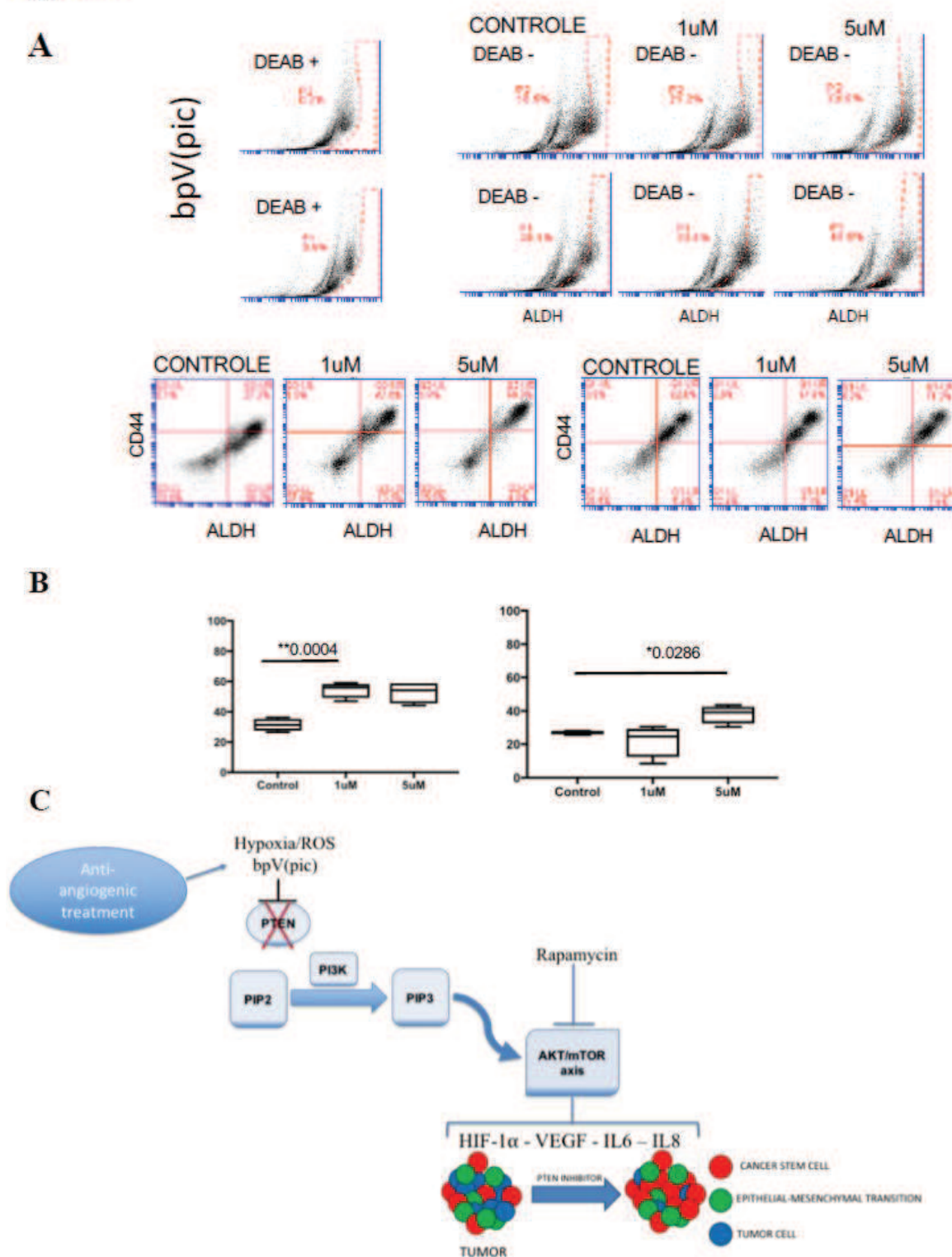
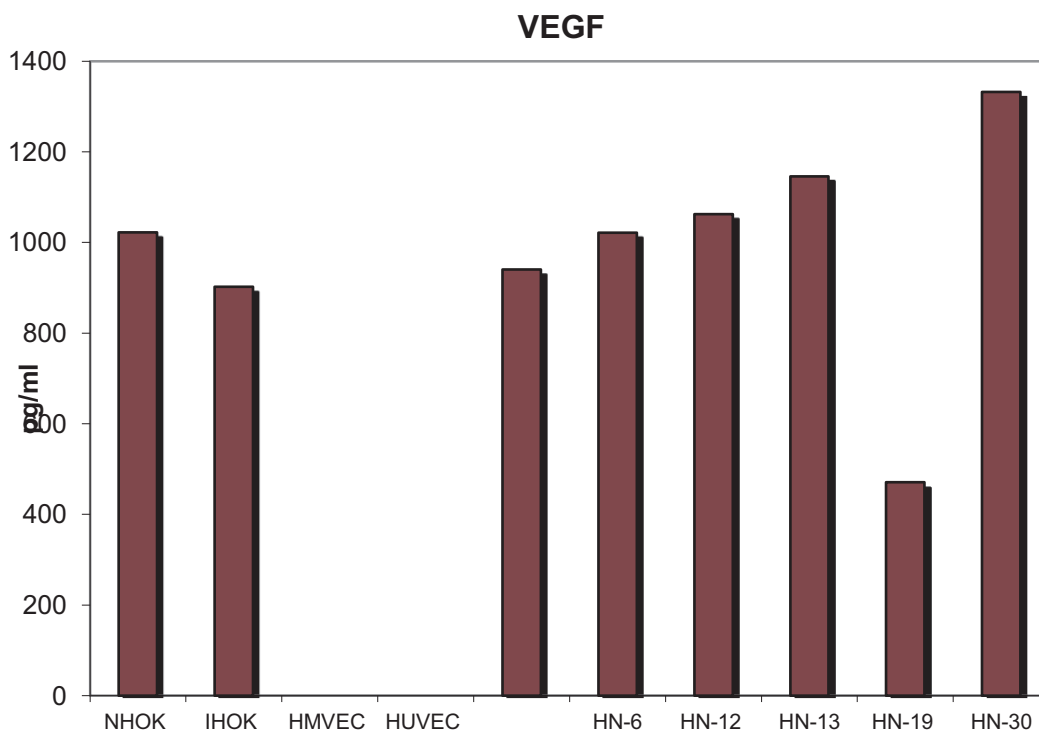


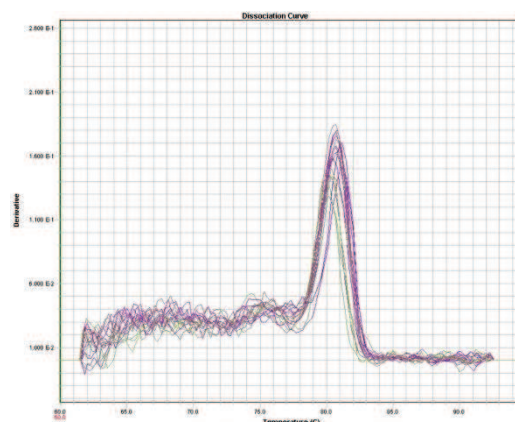
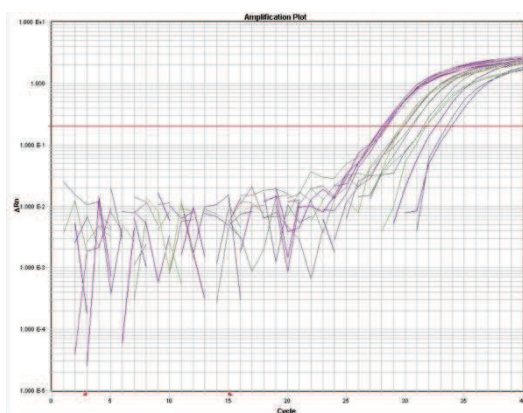
Figure 6. Flow cytometry of HNSCC tumor cells receiving bpV(pic). **A and B.** Administration of bpV(pic) result in the accumulation of CD44 positive and ALDH1A1 cells. **C.** Schematic representation demonstrate the downregulation of PTEN leads to the activation of the AKT/mTOR signaling pathway and the accumulation of CSCs.

ANEXO 3: Secretoma de VEGF em diferentes linhagens celulares.

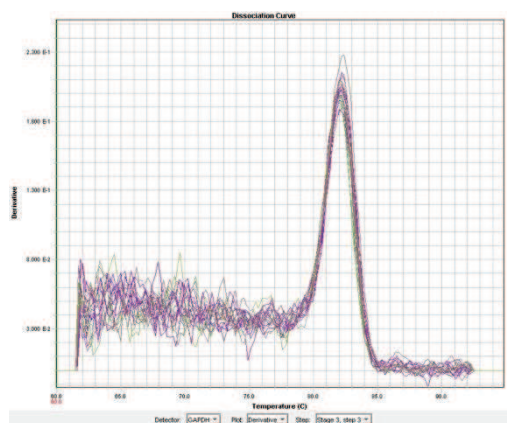
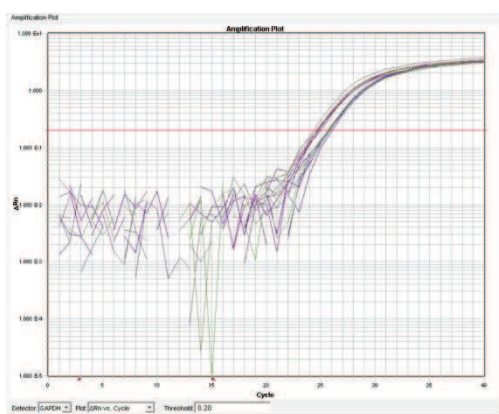
Gráfico gentilmente cedido pelo Dr. Rogério Castilho (Universidade de Michigan, EUA).



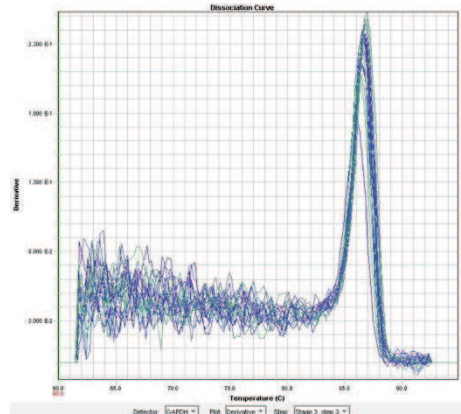
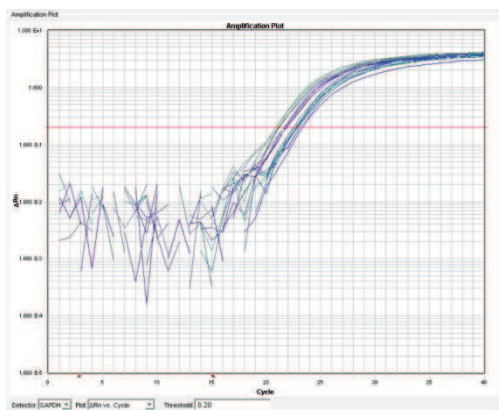
8. APÊNDICES



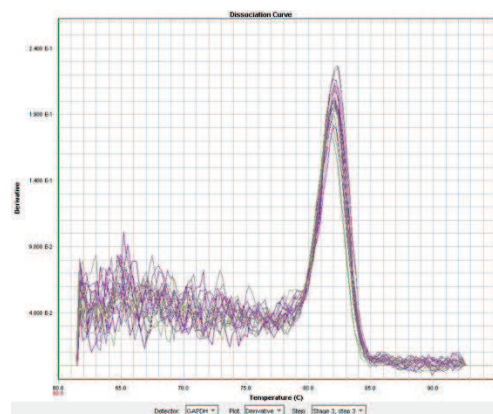
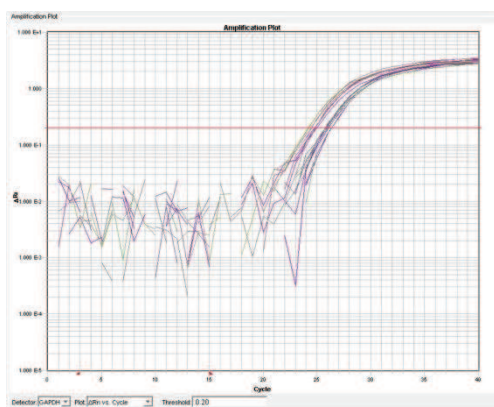
Apêndice 1: Expressão gênica de NANOG em HN6. O primeiro gráfico representa a amplificação e o segundo o de dissociação.



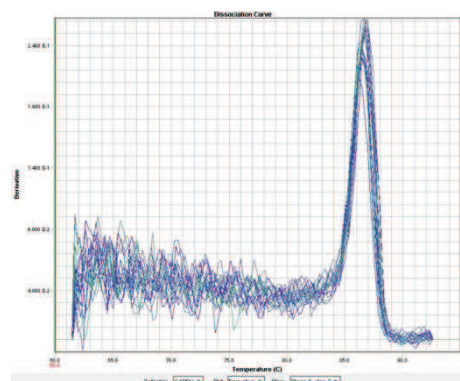
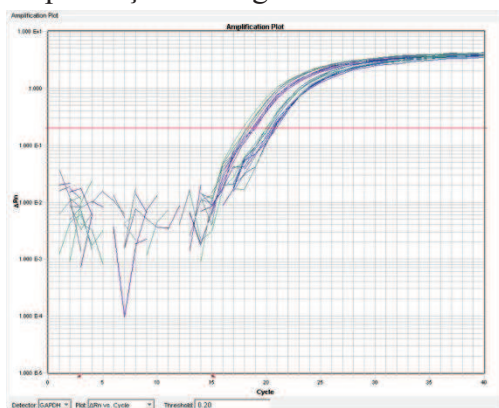
Apêndice 2: Expressão gênica de SNAIL em HN6. O primeiro gráfico representa a amplificação e o segundo o de dissociação.



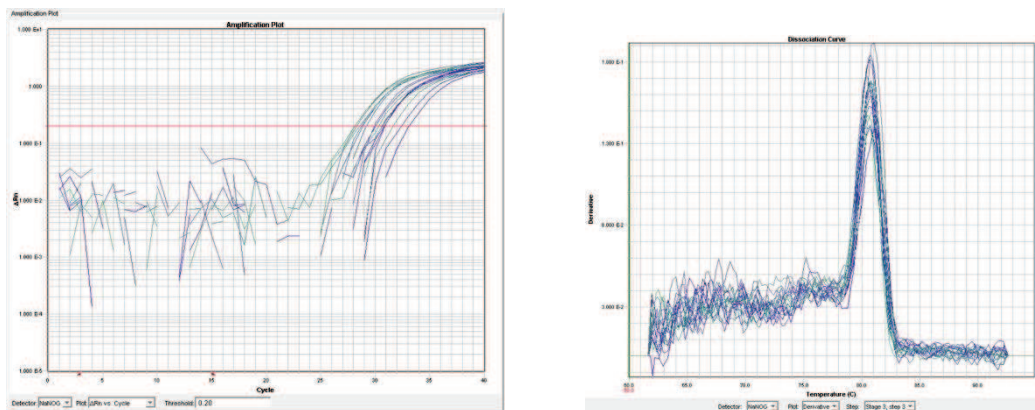
Apêndice 3: Expressão gênica de *VIMENTINA* em HN6. O primeiro gráfico representa a amplificação e o segundo o de dissociação.



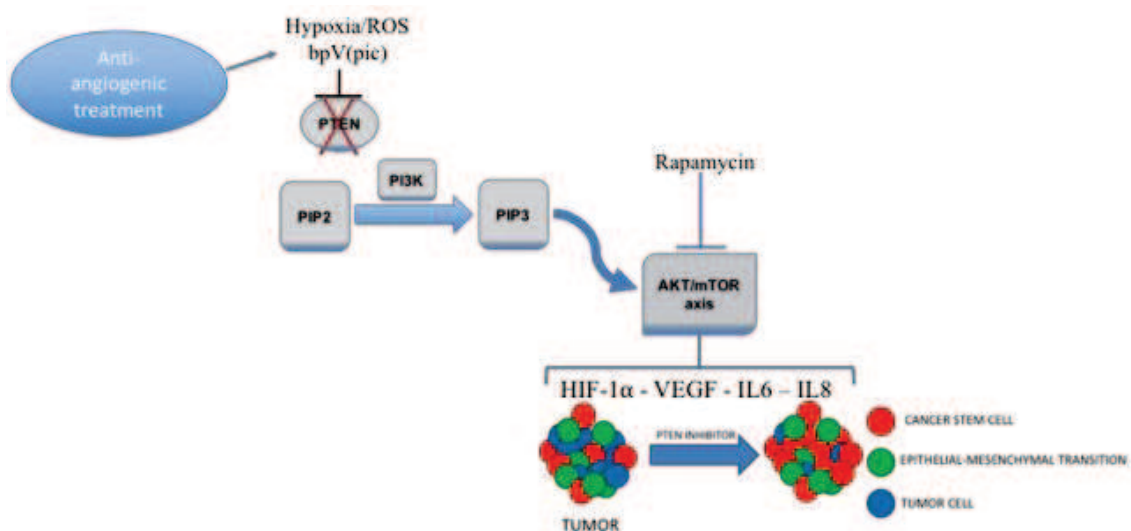
Apêndice 4: Expressão gênica de *SNAIL* em HN12. O primeiro gráfico representa a amplificação e o segundo o de dissociação.



Apêndice 5: Expressão gênica de *VIMENTINA* em HN12. O primeiro gráfico representa a amplificação e o segundo o de dissociação.



Apêndice 6: Expressão gênica de *NANOG* em HN12. O primeiro gráfico representa a amplificação e o segundo o de dissociação.



Apêndice 7: Fluxograma apresentando a relação entre o tratamento antiangiogênico e o aumento da agressividade pelo aumento da heterogeneidade celular.