

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA
ODONTOPEDIATRIA**

**Linha de Pesquisa
Diagnóstico de Afecções Buco-faciais**

TESE

Caracterização *in vitro* de células de cultura primária de tumores de glândula salivar: avaliação da auto-renovação e dos efeitos da IL-6 secretada por células endoteliais na fosforilação de STAT3, Akt e ERK.

LISIANE BERNARDI

Porto Alegre, 2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
NÍVEL DOUTORADO – CLÍNICA ODONTOLÓGICA/ODONTOPEDIATRIA

Linha de Pesquisa
Diagnóstico de Afecções Buco-faciais

TESE

Caracterização *in vitro* de células de cultura primária de tumores de glândula salivar:
avaliação da auto-renovação e dos efeitos da IL-6 secretada por células endoteliais na
fosforilação de STAT3, Akt e ERK.

LISIANE BERNARDI

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Odontologia, Nível
Doutorado, Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, como pré-requisito final para a
obtenção do título de doutor em Clínica
Odontológica - Odontopediatria.

Orientação no país:
Dra. Anna Christina Medeiros Fossati

Orientação no exterior:
Dr. Jacques Eduardo Nör

Porto Alegre, 2013.

CIP - Catalogação na Publicação

Bernardi, Lisiane

Caracterização in vitro de células de cultura primária de tumores de glândula salivar: avaliação da auto-renovação e dos efeitos da IL-6 secretada por células endoteliais na fosforilação de STAT3, Akt e ERK. / Lisiane Bernardi. -- 2013.

66 f.

Orientadora: Anna Christina Medeiros Fossati.

Coorientador: Jacques Eduardo Nôr.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Carcinoma Adenoide Cístico. 2. Adenocarcinoma. 3. Glândula Salivar. 4. Interleucina 6. 5. STAT3, Akt, ERK. I. Fossati, Anna Christina Medeiros, orient. II. Nôr, Jacques Eduardo, coorient. III. Título.

Dedicatória

Ao **meu noivo**, Leonardo, por me acompanhar, fielmente, nessa longa maratona

“*mestrado/doutorado*” durante seis anos...

À **minha família**, mais uma vez, nada seria possível sem a presença e
participação de vocês!

Agradecimentos Especiais

À minha orientadora **Dra. Anna Christina Medeiros Fossati**, agradeço por 12 anos de uma história juntas, desde o primeiro encontro de iniciação científica em 2001. Mais que minha orientadora, és uma grande amiga com quem divido minha vida e de quem ganho conselhos valiosos!!! Obrigada por todo o estímulo e por sempre acreditar que eu posso fazer, ainda que eu duvide...

Ao professor **Dr. Fernando Borba de Araujo**, agradeço pela oportunidade de aprendizado docente durante meu período de professora substituta na Clínica Infantil – FO-UFRGS e pela confiança e grande incentivo, para que eu fizesse o doutorado sanduíche na Universidade de Michigan. És parte essencial de toda a minha formação!!! Muito obrigada!

Ao meu orientador professor **Dr. Jacques Eduardo Nör**, agradeço pela oportunidade conferida a mim e aos demais estudantes de participar de um programa no exterior, abrindo seu laboratório e disponibilizando o seu tempo na condução e orientação dessas pesquisas. Este ano de convívio, certamente foi engrandecedor. Muito obrigada pelos ensinamentos científicos e pessoais a cada reunião! Agradeço também a sua família... O Natal de 2011 sempre estará em minha lembrança! Obrigada!

Agradecimentos

À **Universidade Federal do Rio Grande do Sul** pela excelência científica no ensino.

À **CAPES** pela bolsa de estudos durante o período do curso de Doutorado no país.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFRGS**, pela abrangência educacional, incentivando a formação de convênios e, sendo assim, possibilitando a minha experiência do doutorado sanduíche na Universidade de Michigan, EUA.

À **Universidade de Michigan**, em especial à Unidade de Odontologia, no nome do diretor **Peter Polverini**, pelo aceite de minha ida à Ann Arbor, assim como pela oportunidade e honra de ser integrante dos alunos recebedores da bolsa de estudos **Larry and Daniels Fellowship in Cancer Biology**.

Aos **colegas de pós-graduação**, em especial aos amigos da **Odontopediatria** e da **Patologia**.

Aos técnicos e professores do **quinto andar** sempre presentes com auxílio e sorrisos!

Aos professores da **Clínica Infantil**, pelo exemplo de profissionais.

À **Julcelaine**, agradeço pela amizade constante. Mesmo que à distância, sei que torcemos muito uma pela outra!

Aos professores da banca **Dra. Fernanda Visioli, Dr. Luciano Casagrande, Dra. Mabel Cordeiro e Dr. Marcelo Lamers**, pela disponibilidade em avaliar esse trabalho.

Ao **Laboratório de Angiogênese**, no nome do professor Jacques Eduardo Nör e aos **amigos da Universidade de Michigan, Sudha, Zhang, Kristy, Suny, April e Danielle**.

A todos os **amigos brasileiros** que conheci nesse período no exterior... em especial às novas amigas, **Cíntia Machado e Fernanda Nedel** e à minha metade, **Carolina Nör**... *“de duas se faz uma”*... Com cada um partilhei e, sobretudo, colhi... Obrigada por terem dividido suas vidas comigo!

E aos demais que participaram e contribuíram com este trabalho, obrigada!!!

Sumário

Resumo	2
Abstract	3
1. Antecedentes e Justificativas	4
Tumores de Glândula Salivar	4
<i>Carcinomas Mucoepidermóides</i>	5
<i>Carcinoma Adenoide Cístico (CAC)</i>	5
<i>Adenocarcinomas não especificados de outra forma (AdNOS)</i>	6
Câncer e Paciente Infantil e Adolescente	6
Microambiente Tumoral	7
<i>Vias de sinalização e Tumor</i>	9
<i>IL-6 e STAT3</i>	11
<i>Citocinas secretadas pelas células endoteliais no ambiente tumoral</i>	12
2. Objetivos	14
3. Manuscrito	15
4. Considerações Finais	43
5. Perspectivas	48
Referências Bibliográficas	49
Anexo 1	55
Anexo 2	56
Anexo 3	57
Apêndice 1	58
Apêndice 2	59
Apêndice 3	60

Resumo

O câncer é um problema de saúde pública mundial, apresentando acréscimo na sua incidência a cada ano. O seu processo de evolução ainda não foi completamente desvendado, dificultando a elaboração de terapias adequadas. Na busca por um melhor prognóstico, pesquisas recentes têm discutido o papel das citocinas inflamatórias, do nicho perivascular e das células-tronco nos mecanismos de desenvolvimento e manutenção dos tumores malignos. Os tumores de glândula salivar representam uma pequena porcentagem das patologias malignas da região de cabeça e pescoço, podendo ocorrer em adultos e em crianças. O diagnóstico dificilmente é precoce e a taxa de sobrevida é extremamente baixa comparada aos demais tumores da região. Assim, este estudo teve como objetivo estudar as células provenientes dos tumores de glândula salivar do tipo adenoide cístico (CAC) e adenocarcinoma NOS (AdNOS) quanto ao seu perfil imunofenotípico, quanto à existência ou não de células-tronco tumorais nessa população, bem como investigar possíveis modificações na ativação de STAT3, Akt e ERK (moléculas envolvidas em vias de sinalização de manutenção do tumor), quando em contato com fatores secretados por células endoteliais. Foram coletados 5 CACs e 4 AdNOS, no Hospital da Universidade de Michigan (Ann Arbor, MI, EUA), durante 2010 e 2012. As células foram isoladas e caracterizadas em citometria de fluxo em P0 e P7, demonstrando um perfil de células CD44⁺ALDH⁺Lin⁻ variando de 0,33 a 3,19% e 0,36 a 2,00%, respectivamente, entre 5 linhagens avaliadas. Na avaliação por *western blotting*, a e-caderina, o *Snail* e a actina de músculo liso foram ausentes em todos os tipos tumorais, enquanto que a citoqueratina 20 (Ck20) foi presente apenas nos AdNOS. Comparando os tumores com suas metástases, a presença de Ck20, p63 e β -catenina foi semelhante, enquanto que citoqueratina 7, a vimentina e o Bmi-1 foram maiores nas metástases. Tanto os AdNOS quanto CACs apresentaram receptores para IL-6, IL-8 e EGF. Foi observado que mediadores solúveis liberados pelas células endoteliais foram capazes de fosforilar STAT3, Akt e ERK em todas as células salivares estudadas, no entanto, a proteína recombinante humana IL-6, isoladamente, não foi capaz de ativar Akt. Orosferas foram geradas em todos os tipos tumorais, demonstrando o potencial de auto-renovação celular. Um maior número de esferas foi observado nas células metastáticas em relação às primárias. Células CD44⁺ALDH⁺, comparadas com CD44⁻ALDH⁻, geraram mais esferas, quando plaqueadas em alta densidade (5.000 células). No entanto, o inverso foi encontrado, quando uma única célula foi utilizada para o ensaio ($p > 0,05$). Devido à dificuldade de obtenção e manipulação de células de tumores de glândula salivar, ainda há muito que se investigar mecanisticamente. Considerando a fosforilação de STAT3 na presença de IL-6, semelhante ao verificado em outros tumores, o uso de anticorpos contra IL-6, talvez sejam uma opção no futuro.

Palavras-chave: carcinoma adenoide cístico; adenocarcinoma; IL-6; STAT3; célula endotelial; esferas

Abstract

Cancer is a public health problem worldwide, with an increase in incidence every year. The process of its evolution is still not completely understood, hindering the development of appropriate therapies. In the search for a better prognosis, recent reports have discussed the role of inflammatory cytokines, perivascular niche and stem cells in the mechanisms of development and maintenance of malignant tumors. The salivary gland tumors represent a small percentage of malignancies of the head and neck and can occur in both adults and children. Early diagnosis is difficult and the survival rate is extremely low compared to other tumors in the same region. Thus, this study aimed to study cells from the adenoid cystic carcinoma (ACC) and adenocarcinoma NOS (AdNOS) tumors of salivary gland regarding its immunophenotypic profile and the existence or absence of tumor stem cells in this population, as well as investigate possible changes in the activation of STAT3, Akt and ERK (molecules involved in signaling pathways of tumor maintenance), when exposed to factors secreted by endothelial cells. ACCs (n=5) and AdNOS (n=4) were collected at the Hospital of the University of Michigan (Ann Arbor, MI, USA), during 2010 to 2012. Cells were isolated and characterized by flow cytometry at P0 and P7, showing a profile of ALDH⁺CD44⁺Lin⁻ ranging from 0.33% to 3.19% and 0.36% and 2.00%, respectively, between 5 cell lines evaluated. In the protein profile, e-cadherin, Snail and SMA were absent in all tumor types. Ck20 was present only in AdNOS. Comparing primary tumors and their metastases, the presence of Ck20, and p63 β -catenin was similar, while Ck7, vimentin and Bmi-1 were higher in metastases. Both AdNOS as ACCs had receptors for IL-6, IL-8 and EGF. It was observed that soluble mediators released by endothelial cells were able to activate STAT3, Akt and ERK phosphorylation in all cells studied. However, recombinant human IL-6 alone was not able to activate Akt. Orospheres were generated in all tumor types, indicating the potential for cellular self-renewal. Highest number of spheres was observed in metastatic cells compared to primary. ALDH⁺CD44⁺ cells compared to ALDH⁻CD44⁻ generated more spheres when plated in high density (5,000 cells), however, the opposite was found when one single cell seed was evaluated ($p > 0.05$). There is doubt if these cell markers would be consider for a stem cell model in salivary tumors. Due to the difficulty of obtaining and manipulating salivary gland tumor cells, there is still much to investigate mechanistically. As the phosphorylation of STAT3, in the presence of IL-6, was similar to that observed in other tumors, the use of antibodies against IL-6, may be an option in the future.

Keywords: Salivary Gland Tumor; Adenoid cystic carcinoma; Adenocarcinoma; Endothelial cell; STAT3; IL-6; Spheres

1. Antecedentes e Justificativas

Tumores de Glândula Salivar

O Instituto Nacional do Câncer estimou, para o Brasil, em 2012, um risco de 10 novos casos de câncer de cavidade oral a cada 100 mil homens e 4 a cada 100 mil mulheres (INCA, 2012). Mais de 90% dos tumores orais são carcinomas espinocelulares (WARNAKULASURIYA, 2009).

Cânceres de glândulas salivares constituem um grupo de neoplasmas raros da cabeça e pescoço, representando 5% dos tumores malignos dessa região. Devido à sua raridade e diversidade, existem limitações na obtenção de dados que possam facilitar o seu diagnóstico precoce, assim como na definição de uma adequada terapia (LAURIE; LICITRA, 2006).

A Organização Mundial da Saúde classifica esses tumores epiteliais malignos em 24 diferentes subtipos histológicos, podendo ter origem em glândulas maiores (parótida, submandibular e sublingual) ou em menores (mucosa oral, palato, úvula, assoalho da boca, língua, entre outras) (EVESON *et al.*, 2005; LAURIE; LICITRA, 2006).

O diagnóstico dificilmente é precoce, visto que os tumores são assintomáticos, não ulcerados e de crescimento lento (BRADLEY *et al.*, 2007). O tratamento é cirúrgico, a quimioterapia não é indicada na maioria dos casos e a radioterapia é limitada, especialmente em pacientes infantis. Do sucesso do tratamento cirúrgico é que dependerá a taxa de reincidências do tumor (LAURIE; LICITRA, 2006; BRADLEY *et al.*, 2007; ELLIES; LASKAWI, 2010).

Dentre os subtipos, os mais prevalentes na população são os mucoepidermóides, seguidos dos adenóides císticos e adenocarcinomas não especificados de outra forma (MILANO *et al.*, 2007).

Carcinomas Mucoepidermoides

Os carcinomas mucoepidermoides compreendem uma variedade de diferentes tipos histológicos, classificados em relação a variação proporcional dos tipos celulares encontrados, podendo ser de células mucosas, de células pequenas indiferenciadas, células claras, células epidermoides entre outras (BYRD *et al.*, 2013; AZEVEDO *et al.*, 2008) (anexo 1).

Carcinoma Adenoide Cístico (CAC)

O carcinoma adenoide cístico (CAC) foi, primeiramente, descrito em 1859. São tumores mistos, incluindo células epiteliais e mioepiteliais (HUNT, 2011). Hoje, é classificado histopatologicamente em 3 diferentes padrões: tumores tubulares, cribiformes ou sólidos (MOSKALUK, 2013) (anexo 2). Dentre esses, os que apresentam o pior prognóstico são os de tumores sólidos.

Revisando a literatura, Husain e colaboradores (2013), relataram que o carcinoma adenoide cístico tem sido considerado incurável, devido a sua tendência de recorrer e gerar metástases, espalhando-se pela submucosa e invadindo a inervação (HUSAIN *et al.*, 2013). Terapias convencionais e outras experimentais, incluindo drogas contra EGFR e c-kit não têm mostrado resultados positivos (LAURIE *et al.*, 2011). Os CACs em sítios primários permanecem definindo uma taxa de sobrevida de 10 anos ao paciente que quando associada a metástases, cai para 3 anos.

Fusões no gene MYB-NFIB são bem características, no entanto, sem relevância para tratamentos até o presente momento. Investigações recentes, encontraram em média 22 diferentes mutações somáticas em cada amostra dos 60 casos de CACs avaliados (HO *et al.*, 2013).

Adenocarcinomas não especificados de outra forma (AdNOS)

A grande diversidade de tumores envolvendo componentes de diferenciação ductais existentes na atual classificação da Organização Mundial da Saúde (EVESON, *et al.*, 2005), nem sempre é suficiente para identificar todos esses tipos tumorais. Assim, tumores que possuem um componente ductal, mas que falham em se relacionar com os esquemas classificatórios, são definidos como adenocarcinomas não especificados de outra forma (anexo 3). Os dados acerca desse tipo de tumor são limitados e o que se percebe é que da categorização da sua diferenciação é que vai depender o grau de sua malignidade (NEVILLE, 2004; EVESON *et al.*, 2005).

Câncer e Paciente Infantil e Adolescente

Diferentes tipos de tumores são diagnosticados durante a infância e a adolescência. Nestes grupos, a maior incidência encontra-se entre as patologias malignas hematológicas, seguidas pelos tumores cerebrais (LINET *et al.*, 1999). Os tumores de cabeça e pescoço representam 10% dos casos e, entre esses, encontram-se os de glândulas salivares (ELLIES; LASKAWI, 2010).

Em geral, a incidência de tumores de glândulas salivares concentra-se em homens e mulheres acima de 45 anos de idade (EVESON *et al.*, 2005). No entanto, cerca de 5%-10% dos tumores de glândula salivar ocorrem em crianças e adolescentes (BRADLEY *et al.*, 2007; KUPFERMAN *et al.*, 2010). Entre esses pacientes, ocorrem, principalmente, na segunda década de vida e, embora sejam neoplasias raras, em geral, são quase sempre malignas (ELLIES; LASKAWI, 2010).

É difícil comparar, mas ao revisar dados, da Cruz Perez e colaboradores relataram que em adultos, 15-25% dos tumores são malignos, enquanto em jovens,

esses valores aumentam para 50-60% (DA CRUZ PEREZ *et al.*, 2004). Em revisão, Bradley e grupo relataram que em pacientes jovens, entre os tumores epiteliais malignos, os mais frequentes são os mucoepidermóides, tumores de células acinares, carcinoma adenóides císticos e adenocarcinomas não específicos (BRADLEY *et al.*, 2007).

O diagnóstico de uma “massa” na região de cabeça e pescoço de um paciente infanto-juvenil inclui lesões congênitas, inflamatórias e neoplásicas (DICKSON; DAVIDOFF, 2006). Em relação às neoplasias malignas, os sinais clínicos são similares aos encontrados em pacientes adultos, sendo que o tempo para a procura por atendimento ocorre em média de 1 a 2 anos após o surgimento de um aumento de volume perceptível ou quando sintomas de obstrução glandular são identificados (BRADLEY *et al.*, 2007). Os profissionais da saúde deveriam suspeitar de uma possível malignidade ao identificar aumento de volume nas regiões glandulares, sem a presença de sinais inflamatórios (BRADLEY *et al.*, 2007).

Microambiente Tumoral

O princípio da existência do câncer compreende seis capacidades biológicas adquiridas durante as várias etapas do desenvolvimento tumoral: manutenção de sinalização proliferativa, “fuga” dos genes supressores, resistência à morte celular, imortalidade replicativa, indução de angiogênese e ativação de invasão e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Devido a essa habilidade de sobrevivência, os tumores vêm sendo vistos não apenas como uma “massa” de células proliferativas cancerígenas. Atualmente, essas ilhotas celulares são consideradas tecidos complexos, compostos de diversos e distintos tipos celulares que, ao interagirem, participam do crescimento e manutenção tumoral (RITCHIE; NÖR, 2012; HANAHAN; WEINBERG, 2011). Além dessas células em simbiose, os tumores contêm um repertório de células recrutadas, aparentemente normais, que contribuem para a constituição do chamado microambiente do tumor (RITCHIE; NÖR, 2012).

Um ponto importante relacionado às investigações contemporâneas das células malignas, estaria na percepção que a gênese do tumor possa envolver não apenas um modelo clonogênico, já que hierarquias celulares vêm sendo identificadas histológica e fenotipicamente (LOCKE *et al.*, 2005). Esse modelo hierárquico define-se pela existência de uma célula-tronco tumoral, que estaria sendo um dos elementos responsáveis pela geração e manutenção do tumor (SHACKLETON *et al.*, 2009; KRISHNAMURTHY; NÖR, 2012).

Recentemente, foi demonstrado que tumores de cabeça e pescoço contêm a citada população. Nesse caso, as células-tronco tumorais foram isoladas em função do seu perfil imunofenotípico, de forma que, as células apresentaram-se CD44+/ALDH+/Lin- (KRISHNAMURTHY *et al.*, 2010). Essa população teve a habilidade de se auto-renovar, gerar tumores semelhantes aos originais e fazer isso serialmente em modelo animal, características essenciais para determiná-las como células-tronco tumorais (PARK *et al.*, 2009).

Em relação aos tumores de glândula salivar, a regência de um modelo de células-tronco tumorais ainda foi pouco explorada. Marcadores como ALDH, CD44 e CD133 vêm sendo investigados em carcinomas adenoides císticos (SUN *et al.*, 2010; ZHOU *et al.*, 2013; FUGITA *et al.*, 2012). Acredita-se que os tumores de glândula salivar tenham origem a partir de células progenitoras residentes ou nos ductos glandulares principais, sendo puramente epiteliais, ou nos ductos terminais, contendo um componente celular mioepitelial adicional (ADELSTEIN *et al.*, 2012).

Em geral, incluindo diferentes tipos e origens de câncer, ainda não se sabe muito a respeito das células-tronco tumorais. Imagina-se que o modelo funcional assemelhe-se aos observados para as células-tronco “fisiológicas”. Ou seja, que essas células estariam a maior parte do tempo quiescentes, coordenando a dinâmica do tumor, restritas aos seus nichos (REYA *et al.*, 2001). Nesse local, no nicho, por meio de interações com o estroma tumoral, receberiam nutrição, proteção e as informações necessárias para gerarem células-filhas que então, iriam dar o crescimento aos tumores (MORRISON; SPRADLING, 2008).

Krishnamurthy e colegas (2010) observaram que, em biópsias de tumores humanos, 80% das células expressando ALDH, definidas em suas amostras como células-tronco de tumores de cabeça e pescoço, localizaram-se próximas aos vasos sanguíneos, sugerindo a existência de um nicho perivascular para essas células. Recentemente, outros pesquisadores, usando um modelo organotípico murino, mostraram que células humanas de tumor de mama disseminaram-se no curto tempo de 9 semanas pelos pulmões, medula óssea e cérebro e que, nestes sítios, permaneceram dormentes, ou seja, quiescentes, residindo na microvasculatura (GHAJAR *et al.*, 2013).

Três décadas antes, Folkman já havia descrito que a presença de vasos sanguíneos no ambiente tumoral seria imprescindível para a continuidade do tumor, visto que teve, em seus estudos, crescimento tumoral dependente da angiogênese, ou seja, da formação de novos vasos a partir das células endoteliais pré-existentes (BUTLER *et al.*, 2010). Desde então, vários estudos têm demonstrado que as células tumorais secretam fatores angiogênicos para manter a sua própria rede vascular e, ao que parece, a própria microvasculatura do tumor pode estar relacionada à manutenção das suas células iniciadoras (GHAJAR *et al.*, 2013).

Vias de sinalização e Tumor

Fatores liberados pelas células tumorais podem influenciar 3 três moléculas chaves para a manutenção do tumor: Akt, ERK e STAT3. Em ordem, essas moléculas seriam essenciais para a agressividade, proliferação e progressão do tumor.

A família de Akt consiste de três membros (Akt1, Akt2 e Akt3). A via de sinalização mediada pela interação PI3K/Akt vem sendo um alvo na busca de drogas para o tratamento do câncer. O oncogene PIK3CA é um dos genes que mais apresenta formas mutadas nos cânceres humanos e, nestas condições, ativa constitutivamente a via de sinalização PI3K/Akt (SAMUELS *et al.*, 2004). Em carcinomas adenoides císticos, 45% dos tumores de pior prognóstico, do tipo sólido, avaliados (3/8),

apresentaram mutações em PI3K, que levaram a uma superexpressão de p-AKT (HO *et al.*, 2013).

A MAPK/ERK define uma via de sinalização celular que regula funções de sobrevivência celular, participando na proliferação, divisão, migração, apoptose e transformação celular (O'NEILL; KOLCH, 2004). Altos níveis de ERK têm sido relacionados a piores prognósticos em tumores de mama, enquanto a sua regulação tem modulado a agressividade de carcinoma espinocelular oral (JUDD *et al.*, 2012; BARTHOLOMEUSZ *et al.*, 2012).

Existem sete proteínas STAT em mamíferos (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B e STAT6), as quais respondem a estímulos e induzem transcrição de genes que atuam em desfechos fisiológicos e patológicos (REICH; LIU, 2006). Revisando o envolvimento de STATs nos processos inflamatórios e imunes num contexto tumoral, Yu e colaboradores (2009) relataram que evidências sugerem que STAT3 seletivamente induz e mantém o microambiente inflamatório pró-carcinogênico, estando presente no início da transformação maligna e durante a progressão do tumor.

A ativação de STAT3 consequente da presença de citocinas inflamatórias no microambiente foi necessária para que células epiteliais do estômago e esôfago que expressavam SOX2 (um regulador de auto-renovação, encontrado em células-tronco embrionárias e indiferenciadas) transformassem-se e coordenassem, assim, a tumorigênese no local. Portanto, é possível que altos níveis de p-STAT3 estejam associados com um pior prognóstico em carcinomas espinocelulares humanos de esôfago (LIU *et al.*, 2013).

Quando o silenciamento de STAT3 foi induzido por Chen e colegas (2013), verificou-se, por meio de *western blotting*, diminuição de VEGF e de MMP9, indicando que STAT3 pode estar envolvida na modulação da angiogênese e da invasão tumoral. Rac1 e MgcRacGAP modulam a fosforilação de STAT3 e seu transporte ao núcleo e essa associação é aumentada na presença de IL-6 (TONOZUKA *et al.*, 2004).

IL-6 e STAT3

IL-6 é uma citocina multifuncional que foi originalmente caracterizada como envolvida na regulação das respostas imune e inflamatória (YU *et al.*, 2009). A IL-6 é uma ativadora potente da via de sinalização Jak/STAT3 e, sua elevada expressão, tem sido detectada em diversos tumores de origem epitelial (LIU *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2013a). A IL-6, nos tecidos, também pode atuar na fosforilação de ERK/MAPK e Akt (CULIG, 2013). O uso de terapias utilizando medicamentos que atuem restringindo a ação de IL-6 pode ser uma possibilidade futura no tratamento do câncer (COWARD *et al.*, 2011).

O silenciamento de IL-6, em células de tumores de bexiga (HT137 e HT1197), diminuiu a proliferação celular e o volume do tumor gerado, em camundongos, a partir de tais células. Os tumores atingiram, em média, um volume 4 vezes menor, no mesmo período de 24 dias, quando comparados aos controles (CHEN *et al.*, 2013). O mesmo grupo de pesquisa encontrou resultados semelhantes quanto ao volume do tumor em células de tumores de esôfago (CE81T) silenciadas para IL-6 (CHEN *et al.* 2013a).

Além do envolvimento no desenvolvimento inicial e manutenção dos tumores, a IL-6 parece estar envolvida nos processos de invasão. Nesse sentido, avaliando esferas geradas a partir de células SOX2⁺ de carcinomas espinocelulares de estômago e esôfago, Liu e colaboradores (2013) demonstraram que, as células da periferia das estruturas geradas, quando cultivadas com 10ng/mL de IL-6, tornaram-se irregulares e protusivas e diminuíram sua expressão de e-caderina.

Apesar de ser classificada como uma citocina inflamatória, a IL-6 ela é secretada por células não inflamatórias, como, por exemplo, por células tumorais e endoteliais (NEIVA *et al.*, 2009).

Citocinas secretadas pelas células endoteliais no ambiente tumoral

Considerando amplamente a unidade tumoral, os estudos acerca da tumorigênese, além de perseguirem uma melhor compreensão sobre a funcionalidade e origem das células malignas, têm buscado contemplar os elementos presentes no estroma do tumor, bem como dos mecanismos envolvidos na interação deste com tais células (UNGEFROREN *et al.*, 2011; NEIVA *et al.*, 2009).

Já na última década, vem se estudando a relação entre células tumorais e células endoteliais em tumores cerebrais e de cabeça e pescoço (CALABRESE *et al.*, 2007; NEIVA *et al.*, 2009; KRISHNAMURTHY, 2011). Neiva e colegas (2009) demonstraram que, em linhagens celulares de tumores de cabeça e pescoço, a via de comunicação não seria unidirecional, ou seja, o controle das informações que estariam contribuindo para a progressão tumoral não viria apenas das células tumorais, mas sim, de uma comunicação recíproca dessas células com as células endoteliais. Nesse sentido, foi identificado que as células endoteliais não estariam funcionalmente limitadas à formação de vasos, visto que ao secretarem IL-6, IL-8 e EGF ativaram, nas células tumorais, a fosforilação de STAT3, Akt e ERK, respectivamente.

Em seqüência a esses dados, em recente estudo, Krishnamurthy (2011) demonstrou que situação semelhante ocorria, quando as células-tronco tumorais de câncer de cabeça e pescoço (CD44+/ALDH+/Lin-) eram expostas aos fatores secretados pelas células endoteliais. Ou seja, foi verificada a ativação de STAT3 nessas células, resposta que foi percebida menos intensa nas células negativas para os mesmos marcadores (CD44-/ALDH-/Lin-). A mesma tese, relata que foi verificado que a citocina secretada pelas células endoteliais que estaria atuante nessa ativação seria a IL-6. Em experimentos para avaliar a auto-renovação das células-tronco tumorais, constataram que o contato com meio de cultura proveniente das células endoteliais e, conseqüentemente a IL-6 liberada por essas células, aumentou a geração de esferas.

Recentemente, Ghajar e grupo de pesquisa (2013), demonstraram que o endotélio microvascular induziu a quiescência sustentada de células malignas em modelos de cultura de tumores de mama. Assim, acreditam que as células endoteliais e

os fatores depositados em volta e na sua membrana basal possam ser os principais componentes envolvidos no nicho das células tumorais dormentes.

O amplo espectro de heterogeneidade fenotípica, biológica e clínica que os tumores de glândula salivar exibem, tem representado um desafio na investigação dessa patologia e na busca por métodos terapêuticos eficientes (HO *et al.*, 2013). Identificar componentes envolvidos na dinâmica do desenvolvimento desses tumores é imprescindível para um melhor prognóstico. Assim, os objetivos dessa tese concentram-se em avaliar a importância do diálogo entre as células endoteliais e as tumorais na ativação das vias de STAT3, Akt e ERK e realizar investigações iniciais de se um modelo de células-tronco é aplicável a esses tumores.

2. Objetivos

Objetivo Geral

Caracterizar as células de tumores de glândula salivar, quando em contato com fatores secretados pelas células endoteliais e, quanto à presença/ausência de células-tronco, *in vitro*.

Objetivos Específicos

Para atingir esses objetivos, foram realizados:

- O Isolamento e o cultivo das células tumorais, provenientes de tumores de glândula salivar do subtipo adenoide cístico e adenocarcinoma NOS.
- A caracterização dessas células quanto à (1) presença/ausência de células CD44 e ALDH positivas; (2) presença/ausência de proteínas epiteliais, mioepiteliais e mesenquimais e; (3) potencial de auto-renovação.
- A avaliação do efeito dos fatores secretados pelas células endoteliais na ativação de STAT3, Akt e ERK nas células dos tumores de glândula salivar avaliados.
- A avaliação do efeito da citocina IL-6 recombinante humana na ativação de STAT3, Akt e ERK nas células dos tumores de glândula salivar avaliados.
- A avaliação do efeito do bloqueio da citocina IL-6 recombinante humana, nos fatores secretados pelas células endoteliais, na ativação de STAT3, Akt e ERK nas células dos tumores de glândula salivar avaliados.
- A avaliação *in vitro* da capacidade das células CD44⁺ALDH⁺ e CD44⁻ALDH⁻ de sofrerem auto-renovação.

3. Manuscrito

Manuscrito a ser submetido para a revista *Journal of Dental Research*

Fator de Impacto em 2013: 3.826

In vitro characterization of primary cell cultures from salivary gland tumors: analysis of self-renew and effect of IL-6 secreted by endothelial cells in the phosphorylation of STAT3, Akt and ERK.

Lisiane Bernardi^{1,2}, Kristy Warner², Carolina Nör², Anna Christina Medeiros Fossati³, Jacques Eduardo Nör^{2,4,5}

¹ Department of Pediatric Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul School of Dentistry, Brazil;

² Department of Restorative Sciences, University of Michigan School of Dentistry;

³ Department of Morphological Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul Institute of Basic Science, Brazil;

⁴ Department of Biomedical Engineering, University of Michigan College of Engineering;

⁵ Department of Otolaryngology, University of Michigan School of Medicine.

Abstract: 247 words

Manuscript: 3,157 words

Figures: 4 figures

Supplementary Figures: 3 figures

References: 24 references

Keywords: Salivary Gland Tumor; Adenoid cystic carcinoma; Adenocarcinoma; Endothelial cell; STAT3; IL-6; Tumor initiating cells

Running title: Secreted factors from endothelial cells on salivary gland tumors

Corresponding author:

Jacques E. Nör DDS, PhD
University of Michigan School of Dentistry
1011 N. University Rm. 2309
Ann Arbor, MI, 48109-1078
United States
Telephone: (734) 936-9300
E-mail: jenor@umich.edu

Abstract

Salivary malignant tumors have in general 5 year of survivor and an evident propensity for late recurrences. Due to its rarity and diversity, there are limitations in obtaining data which would facilitate early diagnosis. Here, adenoid cystic carcinoma (ACC) and adenocarcinoma NOS (AdNOS) cells were isolated and characterized by flow cytometry at P0 and P7, showing a profile of ALDH⁺CD44⁺Lin⁻ ranging from 0.33% to 3.19% and 0.36% and 2.00%, respectively, in the cell lines evaluated. In the protein profile, comparing primary tumors and their metastases, the presence of Ck20, and p63 β -catenin was similar, while Ck7, vimentin and Bmi-1 were higher in metastases. Both AdNOS as ACCs had receptors for IL-6, IL-8 and EGF. It was observed that soluble mediators released by endothelial cells were capable of phosphorylating STAT3, Akt and ERK in all cells studied. However, rhIL-6 alone was not able to activate Akt. Orospheres were generated from unsorted cells from all tumor types, indicating the self-renewal potential. Highest number of spheres was observed in metastatic tumor cells compared to primary tumor. ALDH⁺CD44⁺ cells generated more spheres compared to ALDH⁻CD44⁻ when 5,000 sorted cells were cultivated in 6-well ultralow attachment plates. The opposite was found when one single cell was cultivated in 96-well ultralow attachment ($p > 0.05$). There is still much to investigate mechanistically, but as the phosphorylation of STAT3, in the presence of IL-6, was similar to that observed in other tumors, the use of antibodies against IL-6, may be an option in the future.

Keywords: Salivary Gland Tumor; Adenoid cystic carcinoma; Adenocarcinoma; Endothelial cell; STAT3; IL-6; Spheres

Introdução

Tumores malignos de glândula salivar são neoplasmas raros, representando menos do que 5% de todos os casos de câncer de cabeça e pescoço. Entre os seus 24 subtipos, os mais prevalentes na população são os mucoepidermóides, seguidos pelos carcinomas adenoide císticos e adenocarcinomas (Eveson *et al.*, 2005; Milano *et al.*, 2007).

O diagnóstico precoce é difícil, visto que os tumores são assintomáticos, não ulcerados e de crescimento lento (Bradley *et al.*, 2007). O sucesso da remoção cirúrgica é importante para evitar a taxa de recorrências (Bradley *et al.*, 2007; Ellies & Laskawi, 2010).

Devido a sua raridade e diversidade, existem limitações na obtenção de dados, que facilitariam o diagnóstico precoce, assim como a definição de terapias adequadas (Laurie & Licitra, 2006). Além disso, as linhagens celulares existentes para estudos *in vitro* são limitadas e mais, revelou-se que aquelas originadas a partir de carcinomas adenoide císticos, apresentam contaminação cruzada com células humanas de outros tumores e, inclusive, de outras espécies (Zhao *et al.*, 2011; Phuchareon *et al.*, 2009; AATC, 2010). Nesse sentido, existe a necessidade de usar culturas de células primárias, isoladas diretamente dos tumores, para pesquisas.

Estudos atuais sobre tumorigênese, além de buscarem melhor compreender a funcionalidade das células malignas, têm investigado os elementos presentes no

estroma do tumor e seus mecanismos de interação com tais células (Neiva *et al.* 2009; Ungefroren *et al.*, 2011). Assim, um importante ponto relacionado à pesquisa contemporânea estaria na percepção que a origem do tumor envolveria não somente um modelo clonogênico, já que hierarquias celulares têm sido identificadas histologicamente e fenotipicamente (Locke *et al.*, 2005). Esse modelo hierárquico é definido pela existência da célula-tronco tumoral, a qual seria um responsável pela geração e manutenção do tumor (Shackleton *et al.*, 2009; Krishnamurthy & Nör, 2012).

Recentemente, foi demonstrado que tumores de cabeça e pescoço contêm a citada população. Nesse caso, as células-tronco tumorais foram isoladas de acordo com o seu perfil imunofenotípico, sendo células CD44⁺ALDH⁺Lin⁻ (Krishnamurthy *et al.*, 2010). Essa população mostrou a habilidade de auto-renovação, de gerar tumores similares aos do sítio de sua origem *in vivo* e de fazer isso serialmente em um modelo animal, características essas, fundamentais para determinar uma população celular como tronco (Park *et al.*, 2009). Krishnamurthy e colegas (2010) apresentaram que essa população localizava-se próxima aos vasos sanguíneos.

Em 1971, Folkman relatou que a presença de vasos sanguíneos no ambiente tumoral seria necessária para o crescimento continuado do tumor, já que tal processo mostrou ser dependente de angiogênese. Com isso, foi proposto que fatores secretados pelas células tumorais poderiam estar contribuindo para a formação de novos vasos. Na última década, tem sido evidenciada a relação entre as células tumorais malignas e fatores secretados a partir das células endoteliais em tumores de cérebro e de cabeça e pescoço (Calabrese *et al.*, 2007; Neiva *et al.*, 2009;

Krishnamurthy *et al.*, 2010). Nesse sentido, foi demonstrado que a rota de comunicação não seria unidirecional e que o controle da informação que contribui para a progressão estaria também sendo gerada pelas células endoteliais da microvasculatura (Neiva *et al.*, 2009). Neiva e grupo encontraram que a função das células endoteliais no tumor, não estaria restrita à formação de vasos, já que essas células, além de VEGF, também secretam IL-6, EGF e IL-8, que são moléculas importantes na ativação de STAT3, Akt e ERK. Essas moléculas seriam essenciais para a progressão, proliferação e agressividade dos tumores. Mais, as células endoteliais e os fatores depositados dentro e, em torno de sua membrana basal, podem também estar envolvidos em manter dormentes células tumorais em seus nichos metastáticos (Ghajar *et al.*, 2013).

Considerando que o tempo de sobrevida de um paciente diagnosticado com um tumor de glândula salivar, em geral, é de 5 anos e a evidente propensão a recorrências tardias, é importante tentar aprofundar os conhecimentos a cerca do mecanismos relacionados com o crescimento e manutenção desse tipo de tumor. Dessa forma, após isolar as células do tecido tumoral, nós caracterizamos o imunoperfil, avaliamos a capacidade de auto-renovação *in vitro* e verificamos a existência de uma relação entre fatores secretados pelas células endoteliais na fosforilação de STAT3, Akt e ERK nas células tumorais de adenocarcinomas e carcinomas adenoide císticos.

Metodologia

Isolamento Celular e Cultivo

Foram coletadas amostras de tecido a partir de 5 carcinomas adenoide císticos (CACs) e 4 adenocarcinomas não especificados de outra forma (AdNOS) de glândula salivar de pacientes adultos no Hospital da Universidade de Michigan (Ann Arbor, MI, EUA) entre 2010 e 2012. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de Michigan (09858) e todos os pacientes assinaram um consentimento informado, aprovando a remoção e doação das amostras tumorais. O isolamento celular foi feito conforme descrito por Krishnamurthy e colegas (2010). Brevemente, as espécimes de tumor foram coletadas em DMEM *high glucose*, 10% de soro fetal bovino (SFB) (#10438-026) (Invitrogen, Grand Island, NY), e 100 U/mL AAA (Sigma, St. Louis, MO) a 4°C. Foi realizada digestão mecânica e enzimática com colagenase e hialuronidase (Stem Cell Technologies; Vancouver, BC, Canada) por 1h. As células foram filtradas com um filtro de *nylon* de 40-mm (BD Falcon; Franklin Lakes, NJ). SFB foi adicionado para parar a reação enzimática. As células tumorais foram cultivadas em DMEM *high glucose* suplementado com 10% de SBF, 5% AAA, 1ug/ml de insulina de pâncreas bovina, 0.4ug/ml de hidrocortisona and 2ug/ml EGF (Sigma-Aldrich).

Células endoteliais humanas isoladas a partir da microvasculatura (HDMECs; Cambrex, Walkersville, MD) foram cultivadas em um meio específico para o seu crescimento (EGM2-MV; Lonza, Walkersville, MD). Meio condicionado concentrado (MCC) das HDMECs foi obtido a partir da coleta do meio livre de suplementos e soro

(EBM; Lonza, Walkersville, MD) em que foram cultivadas HDMECs por 24 horas. O meio condicionado das células endoteliais (CM-HDMEC) foi obtido utilizando o MCC diluído em DMEM na proporção de 1:5. Todos os experimentos foram realizados com células entre a sétima e nona passagens.

Western Blot

Os primeiros experimentos de *western blot* foram realizados para caracterizar o perfil das células tumorais isoladas. Todas as amostras de células dos tumores foram semeadas em placas de 60mm (3×10^5 células) e cultivadas por 24h. Os anticorpos primários utilizados foram os seguintes: (1) camundongo anti-humano: e-caderina, vimentina, n-caderina, *snail*, actina de músculo liso (SMA), β -catenina, β -actina, (Cell Signaling Technology) e citoqueratina 7 (Abcam, Cambridge, MA); (2) coelho anti-humano: citoqueratina 20, p63 and Bmi-1 (Cell Signaling), CXCR1 e CXCR2 (receptores de IL-8) (Abcam, Cambridge, MA), receptor de IL-6, EGFR (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) e gp130 (Biosource, Camarillo, CA). A análise das proteínas foi feita por *western blot*, para avaliar a fosforilação STAT3, Akt, ERK das células tumorais após a exposição a diferentes tratamentos. Para isso, as células dos tumores salivares foram semeadas em placas de 60 mm (3×10^5), cultivadas com meio livre de soro e outros fatores durante 24h e após esse período, foram expostas a diferentes tratamentos durante 15, 30, 60 e 120 minutos: (a) DMEM + 20 ng/ml Rh-IL-6 (R&D Systems, Minneapolis, MN); (b) CM-HDMEC ou (c) CM-HDMEC contendo 1 μ g/ml anti-IL-6, anti-IL-8, anti-EGF, ou isotipo IgG para controle (R&D Systems, Minneapolis, MN). Células

não expostas foram usadas para o controle. Anticorpos primários foram os seguintes: (1) camundongo anti-humano: phospho-STAT3, ERK1/2 (Cell Signaling Technology) e GAPDH (Chemicon, Millipore, Billerica, MA); e (2) coelho anti-humano: STAT3, phospho-Akt, Akt phospho-ERK1/2, (Cell Signaling Technology).

A proteína foi coletada e 20ug foram utilizadas para os *western blots*. Proteínas imunorreativas foram visualizadas com substrato quimioluminescente (SuperSignal West Pico; Thermo Scientific, Rockford, IL). Triplicata e 3 experimentos independentes foram realizados para cada amostra, para verificar a reprodutibilidade dos dados.

Seleção Celular por Citometria de Fluxo (FACS)

Células obtidas dos tumores e das culturas primárias em cultivo foram ressuspensas em tampão fosfato (10^6 células/mL). O *kit* Aldefluor foi usado para identificar células com alta atividade de ALDH (ALDH^{high}), seguindo as instruções de incubação do fabricante (Stem Cell Technologies). Depois da incubação, as células foram expostas ao anticorpo para CD44 conjugado com APC (camundongo anti-humano CD44; clone G44-26BD; BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ).

Geração de Orosferas

Os experimentos e análise foram realizados conforme descrito por Krishnamurthy & Nör (2013). Rapidamente, células selecionadas por FACS foram cultivadas em placas de 6 poços (5×10^3 células/poço) ou em placas de 96 poços (1 célula/poço) de baixa aderência (Corning, New York, NY). As células foram cultivadas em DMEM *low-glucose*,

10% de SFB e 100 U/mL de penicilina/estreptomicina a 37°C e 5% CO₂ por 10 ou 15 dias. Meio de cultura era adicionado a cada 3 dias. Orosferas foram definidas como colônias de células não aderentes com no mínimo 25 células. Os experimentos foram feitos em triplicata para cada condição.

Análise Estatística

Teste t de *student* ou *one-way* ANOVA, seguidos por análise *post hoc* foram realizados usando o *software SigmaStat 2.0* (SPSS, Chicago, IL). Diferença estatística foi determinada quando $p \leq 0,001$.

Resultados

Foi possível isolar e manter a cultura primária de células dos tumores recebidos. Inicialmente, as células isoladas foram caracterizadas por *western blot* e citometria de fluxo. Posteriormente, a habilidade de auto-renovação foi avaliada e na sequência, o efeito dos fatores secretados pelas células endoteliais na fosforilação de STAT3, Akt, e ERK. A descrição da origem dos tumores de acordo com o gênero e idade do paciente, o tipo de tumor, a região de origem e a incidência primária/metástase estão descritos na tabela suplementar 1.

Caracterização das células dos CACs e Adenocarcinomas

A figura 1A demonstra o perfil epitelial, mioepitelial, mesenquimal e de sobrevivência das células do tumor. As proteínas e-caderina, o *snail* e o SMA foram ausentes em todos os tumores. A citoqueratina 20 (Ck20) foi mais evidente nas células

dos adenocarcinomas. O restante das proteínas esteve presente, independente da origem do tumor. Comparando os tumores primários com suas metástases, foi observado um perfil semelhante em relação a todas as proteínas avaliadas. Nesse sentido, a presença de Ck20, p63 e β -catenina foram similares. A expressão de n-caderina e Bmi-1 foram maiores nas metástases em relação ao tumor primário, enquanto os níveis de citoqueratina 7 e vimentina foram menores. Células dos CACs e dos adenocarcinomas apresentaram receptores para IL-6, IL-8 e EGF (figura 1B). A morfologia celular foi variável entre as linhagens celulares, apresentando formatos poligonais, fusiformes e estrelados (figura 1C). Controle positivo para os marcadores epiteliais podem ser verificados na figura suplementar 1 (figura S1).

Os marcadores CD44 e ALDH foram analisados em todas as células isoladas antes da primeira passagem (P0) (Figure1 D) e ao longo das passagens, exemplificado pela passagem 7 (P7) (Figure1 E).

IL-6 recombinante humana (Rh-IL-6) e fatores secretados pelas HDMEC induzem a fosforilação de STAT3, Akt e ERK nas amostras tumorais

As células provenientes dos CACs (HACC2A, HACC2B) e adenocarcinomas (UM-AD2, UM-AD3) foram expostas ao meio livre de soro com 20ng/mL de Rh-IL-6 ou com MCC e os níveis de fosforilação das moléculas investigadas foi analisado em diferentes tempos por 2h. Foi observado que STAT3 e ERK foram fosforilados nas células expostas à IL-6, quando comparando os níveis com o controle (células não tratadas), enquanto que isso não foi observado para Akt (Figura 2A-D). A fosforilação

de STAT3 e ERK também foi vista quando as células foram submetidas ao MCC. Entretanto, a fosforilação de Akt foi consistentemente evidente quando comparado ao meio não condicionado (Figura 2E-H). A resposta dos CACs e adenocarcinomas foi similar para ambos os tratamentos, mostrando um pico de fosforilação de STAT3 e ERK após 30 e 15 minutos, respectivamente. A mais proeminente expressão de p-Akt foi demonstrada após 15 ou 30 minutos de exposição ao meio condicionado das HDMEC, exclusivamente. Em todas as células avaliadas não foi verificada a presença constitutiva de p-STAT3 e p-Akt. Antes da exposição aos tratamentos, apenas uma discreta expressão para p-ERK pode ser observada.

Efeito da IL-6, IL-8 e EGF secretadas pelas células endoteliais na fosforilação de STAT3, Akt, e ERK nas células dos tumores CACs e adenocarcinomas

Após comparar os efeitos da Rh-IL-6 e do meio condicionado das células endoteliais, foi decidido avaliar a exposição das células ao meio condicionado das HDMECs na presença de anticorpos que neutralizassem IL-6, IL-8 e EGF. O bloqueio de IL-6 definitivamente inibiu a fosforilação de STAT3 em todas as células, mas não teve efeito nos níveis de fosforilação de Akt e ERK, comparando ao IgG (Figura 3A-D). O bloqueio de IL-8 não modificou os níveis de fosforilação das 3 moléculas avaliadas. Já, o bloqueio de EGF demonstrou uma leve redução na expressão de p-Akt e de p-STAT3 nas células UM-AD2 e um mais evidente decréscimo apenas nas células metastáticas (UM-HACC2B). Em relação aos níveis de fosforilação de STAT3 e ERK, os efeitos do bloqueio da ação de EGF foi variável entre as amostras. Como o resultado

mais consistente foi em relação ao bloqueio de IL-6/p-STAT3, um experimento de ELISA foi realizado para verificar a proporção de IL-6 liberada pelas células tumorais e endoteliais (CM-HDMEC). Foi verificada uma menor proporção de IL-6 liberada pelas células tumorais em relação às endoteliais (Figura 3E). A concentração de IL-6 foi menor nas amostras de células UM-HACC2A quando comparada com as células UM-HACC2B, células provenientes do mesmo paciente, sendo do sítio primário e da metástase, respectivamente. Controles positivos dos ensaios mecanísticos podem ser verificados na figura suplementar 2 (figura S2).

Ensaio de auto-renovação e geração de orosferas a partir das células totais e selecionadas CD44/ALDH (FACS)

Durante o período do experimento, foi possível observar orosferas em todos os tipos celulares avaliados (Figura 4A-C). Os adenocarcinomas tiveram um maior número de esferas quando comparados aos CACs, sendo que as células UM-AD2 apresentaram o maior número absoluto. Para os adenocarcinomas, o número de esferas aumentou durante os primeiros 10 dias, decrescendo após esse período. Nos CACs, a número de esferas foi crescente até o dia 7, mantendo-se até o final do ensaio. Quando as células não selecionadas foram avaliadas, a concentração de esferas foi maior nas células das metástases quando comparadas aos seus sítios primários (Figura 4E). Na avaliação das 5.000 células selecionadas, mais esferas foram observadas nas células CD44⁺ALDH⁺ em relação às células com imunoperfil negativo. Entretanto, nas células selecionadas, UM-HACC2A atingiu um maior número de estruturas em relação

à sua metástase (Figure 4F). Não houve diferenças significativas entre os grupos. Nos experimentos envolvendo a semeadura de uma única célula selecionada, os resultados foram opostos, apresentando mais esferas nas células CD44⁺ALDH⁻, porém, também sem diferença significativa (Figura 4G).

Discussão

Nos últimos 60 anos, contaminação de culturas celulares humanas e animais tem sido um problema para as pesquisas (ATCC, 2010). Em relação aos tumores de glândula salivar, foi demonstrado que linhagens celulares obtidas a partir de CACs apresentavam contaminação com outros tipos celulares (Phuchareon *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2011). Por esse motivo, para o desenvolvimento desse trabalho, foi necessário coletar tumores e isolar nossas próprias células. Além de utilizar as células primárias do tumor, outro aspecto importante, foi a possibilidade de trabalhar com uma população celular heterogênea. Como nós trabalhamos com culturas primárias, nós verificamos diferentes morfologias nas células ao longo das passagens, mesmo usando um meio de cultivo especial para favorecer o crescimento apenas de células epiteliais. Para tomar vantagem disso, nós escolhemos realizar os experimentos em passagens iniciais (P7), para, com isso, nos aproximarmos *in vitro* das condições celulares do tumor *in vivo*.

Assim como a morfologia distinta, notou-se que a expressão proteica tanto de marcadores epiteliais (Ck7, Ck20), mioepiteliais (p63) e mesenquimais (vimentina, n-

caderina) estiveram simultaneamente presentes nas células dos tumores examinados (Figura 1A).

Bmi-1 é necessário para a auto-renovação celular, uma característica importante das células-tronco (Park *et al.*, 2003). Em nosso estudo, a expressão de Bmi-1 teve os maiores níveis nas linhagens celulares que demonstravam altos níveis dos marcadores epiteliais e baixos níveis para os marcadores mesenquimais. Também foi observado que as células provenientes de metástases apresentaram menor expressão de proteínas epiteliais e maiores níveis de Bmi-1 do que seus respectivos sítios primários. A transformação maligna na maioria dos carcinomas é frequentemente acompanhada por um aumento da habilidade migratória e está associada com a perda da diferenciação epitelial e com o ganho de um fenótipo mesenquimal. Tal processo é conhecido como transição epitélio-mesênquima (Christiansen *et al.*, 2006). Em nosso laboratório, foi verificado por imunistoquímica, em biópsias de tumores de cabeça e pescoço, que as células positivas para CD44 e ALDH (células-tronco tumorais) expressavam positividade para e-caderina quando localizadas ao redor dos vasos sanguíneos, enquanto passavam a expressar n-caderina e vimentina quando presentes na luz dos mesmos vasos (dados não mostrados).

O número de células CD44⁺ALDH⁺ em nossas amostras foi identificado antes e durante o seu cultivo após o isolamento a partir dos tumores (P0 e P7) por citometria de fluxo, já que tais moléculas têm demonstrado ser bons marcadores para células-tronco de tumores de cabeça e pescoço, gostaríamos de avaliar a sua expressão nos tumores malignos de glândula salivar. Considerando todas as amostras avaliadas, o número de

células CD44⁺ALDH⁺Lin⁻ foi inferior a 3,2%, o que foi similar ao descrito previamente para carcinomas espinocelulares (Krishnamurthy *et al.*, 2010). Em tal estudo, Krishnamurthy e colegas demonstraram que as células endoteliais foram capazes de iniciar eventos de sinalização que aumentaram a sobrevivência e a auto-renovação da população CD44⁺ALDH⁺.

Especificamente, o papel da IL-6, IL-8 e EGF secretados pelas células endoteliais na ativação de vias de sinalização em células não selecionadas de linhagens de tumores de cabeça e pescoço já havia sido descrito anteriormente (Neiva *et al.*, 2009). No presente estudo, mesmo as células possuindo produção autócrina de IL-6, a ativação constitutiva de STAT3 não foi verificada. Entretanto, a IL-6 presente no meio condicionado das células endoteliais, definitivamente mostrou estar envolvida na fosforilação de STAT3 nos CACs e adenocarcinomas, como mostrado pelo uso do anticorpo anti-IL-6.

A presença de vasos sanguíneos no tumor é necessária para manter o crescimento tumoral, já que esse processo foi mostrado ser dependente de angiogênese (Folkman, 1971). Seguindo isso, maior número de vasos significa maior número de células endoteliais, que podem ser capazes de liberar IL-6 para o microambiente do tumor e ativar moléculas responsáveis pelo desenvolvimento e crescimento tumoral, incluindo STAT3, que tem sido envolvida na regulação do crescimento e auto-renovação de células-tronco de glioblastomas, por exemplo (Sherry *et al.*, 2009). Os níveis de concentração de IL-6 podem também estar envolvidos na resistência celular a drogas quimioterápicas. Aqui, nós encontramos maior presença de

IL-6 nas células provenientes de metástase de CACs, comparando ao seu sítio primário, o que pode estar relacionado, portanto, ao perfil invasivo do tumor.

Além da função de STAT3, a hiperativação da via PI3K-Akt é frequentemente selecionada durante a tumorigênese. As funções celulares normalmente reguladas por essa via estão vinculadas para promover a proliferação e a sobrevivência das células neoplásicas malignas (Luo *et al.*, 2003). Em contato com o meio condicionado das HDMEC, Akt foi evidentemente fosforilada, o que não ocorreu de mesma forma após à exposição somente à IL-6. Portanto, algum outro fator secretado pelas células endoteliais, além da IL-6, parece estar sendo de grande importância na ativação dessa via. Por essa razão, nós também realizamos o bloqueio de IL-8 do meio condicionado das HDMECs, no entanto, sem resultados efetivos na inibição da fosforilação de Akt.

Pensando acerca da auto-renovação e na possibilidade de identificar *in vitro* um modelo de células-tronco tumorais nos AdNOS e CACs de glândula salivar, nós avaliamos a habilidade das células selecionadas ou não para CD44 e ALDH em gerar esferas. Tanto as células selecionadas e não selecionadas foram capazes de formar esferas. Quando 5.000 células foram cultivadas nas placas de 6 poços, nós observamos um aumento no número de esferas na população de células CD44⁺ALDH⁺, comparando com as células CD44⁻ALDH⁻. Entretanto, nós não pudemos observar resultados semelhantes, quando uma única célula foi semeada em placas de 96 poços. Assim, para confirmar se CD44 e ALDH são marcadores de células-tronco nesses tumores, estudos *in vivo* precisam ser realizados.

Devido aos tumores malignos de glândulas salivares serem raros e à dificuldade de se obter linhagens celulares confiáveis, neste momento, a maioria das informações disponíveis na literatura é proveniente de análises imunohistoquímicas em tecido de biópsias dessas patologias. Iniciando estudos mecanísticos desses tumores, nós demonstramos que os fatores secretados pelas células endoteliais são importantes para fosforilar Akt, ERK e STAT3. E que, principalmente, a IL-6 secretada por tais células foi capaz de ativar STAT3 nas células tumorais. Com isso, no futuro, assim como têm acontecido em outros tipos tumorais, IL-6 e STAT3 podem ser possíveis alvos nas terapias dos tumores malignos de glândulas salivares.

Agradecimentos

Nós agradecemos aos pacientes que nos forneceram as amostras dos tumores, com as quais essas linhagens foram geradas. Suporte para esse trabalho foi fornecido pelo NIH/NIDCR (R01-DE21139 e R01-DE23220) e pelo *University of Michigan Head Neck SPORE* (P50-CA97248). Lisiane Bernardi recebeu a bolsa de estudos da Universidade de Michigan: *Larry and Daniels Fellowship in Cancer Biology* e CAPES-Brasil.

Conflito de Interesses

Os autores declaram não existirem conflitos de interesse.

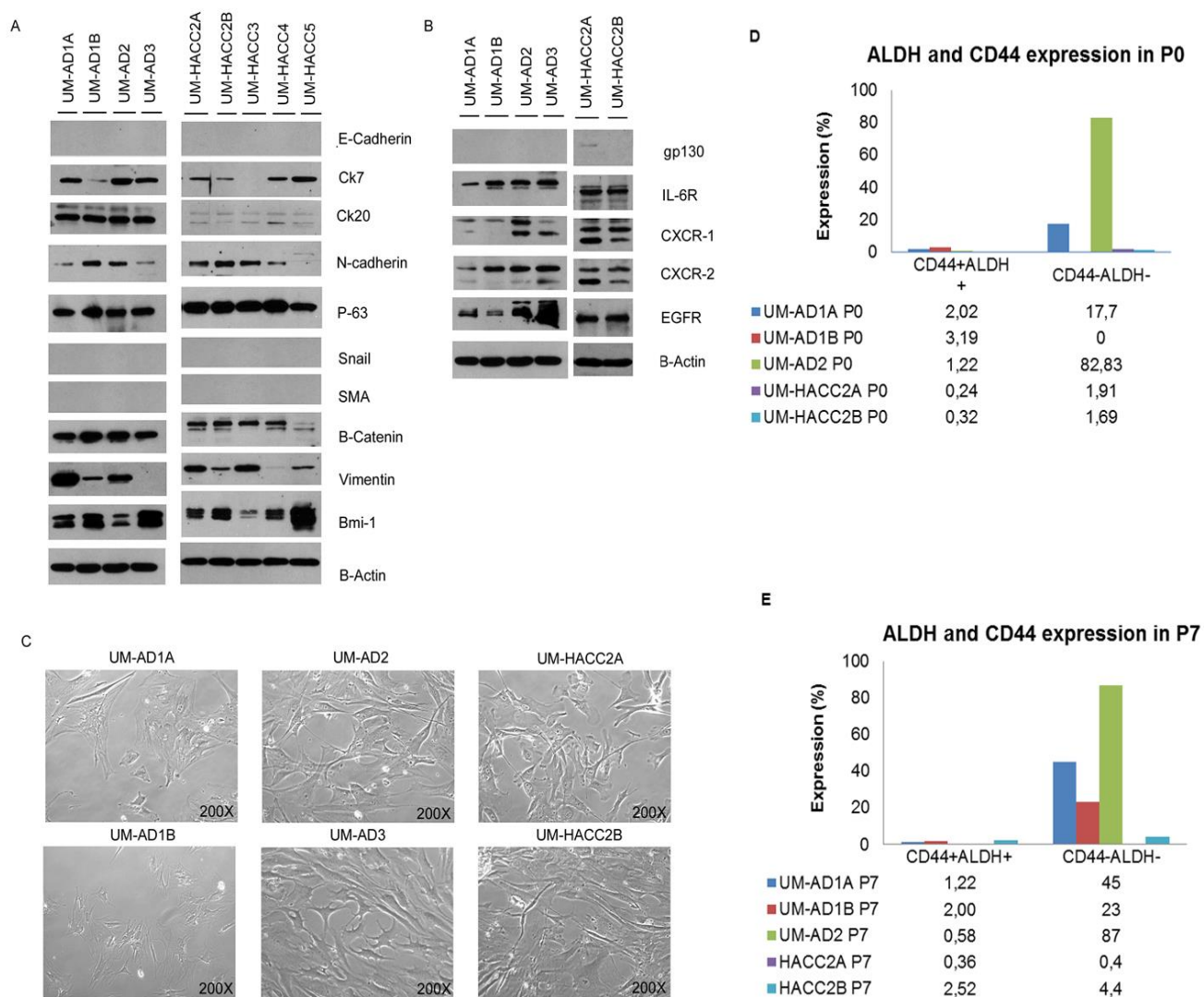


Figura 1 Caracterização das células dos tumores CACs e adenocarcinomas. (A) Perfil epitelial, mioepitelial, mesenquimal e de sobrevivência. (B) Expressão dos receptores de IL-6, IL-8 e EGF. (C) Fotomicrografia representativa das células isoladas na passagem 7. (D, E) Imunoperfil para a expressão de CD44 e ALDH.

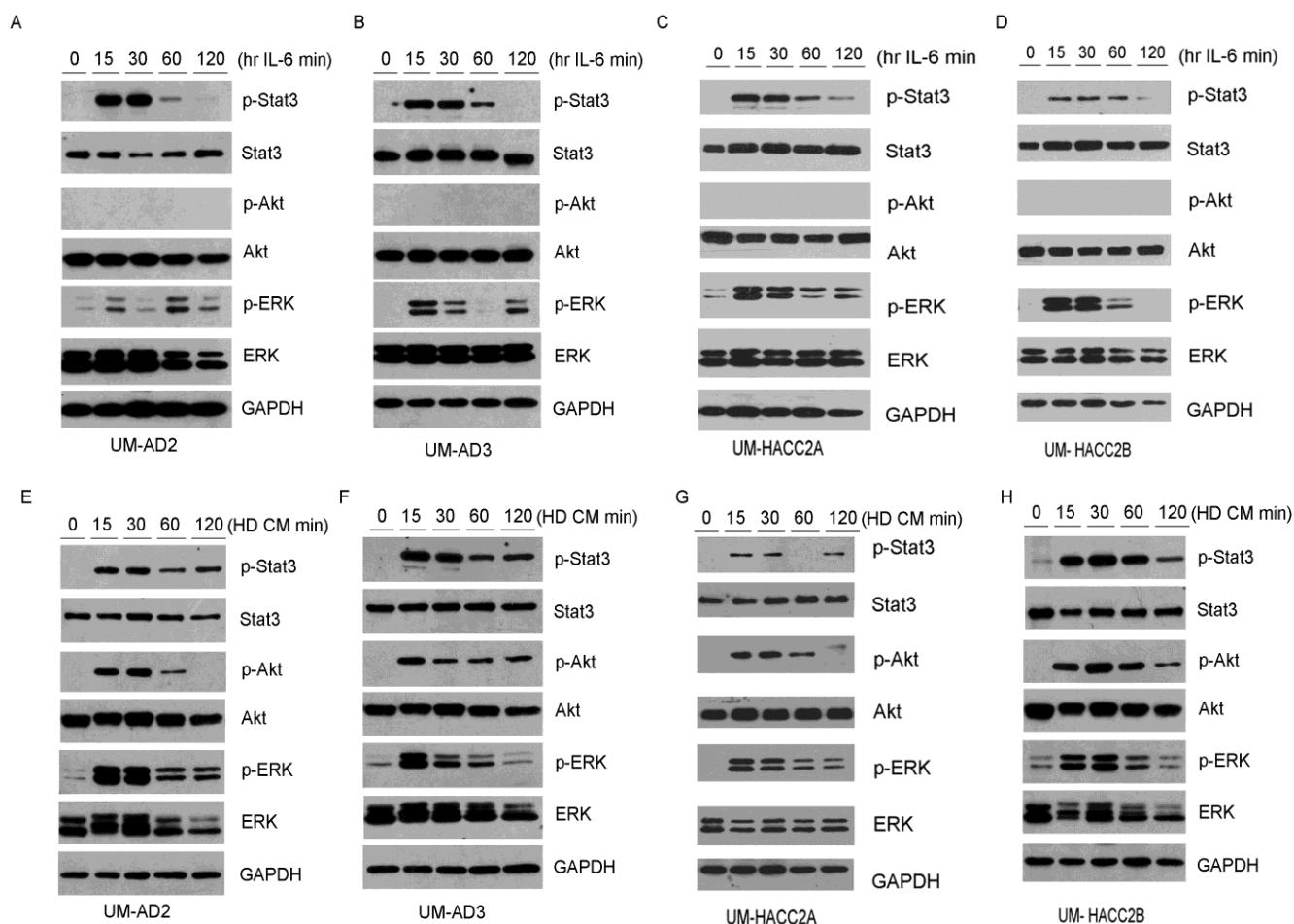


Figura 2 Sinalização de STAT3, Akt e ERK nas células dos tumores de glândula salivar CACs (UM-HACC2A, UM-HACC2B) e adenocarcinomas (UM-AD2, UM-AD3). Células depois de mantidas por 24h em meio livre de suplementos/SFB foram expostas à 20ng/mL de Rh-IL-6 (A-D) e MC-HDMEC (E-G) em diferentes tempos. Células não tratadas estão representadas no tempo zero.

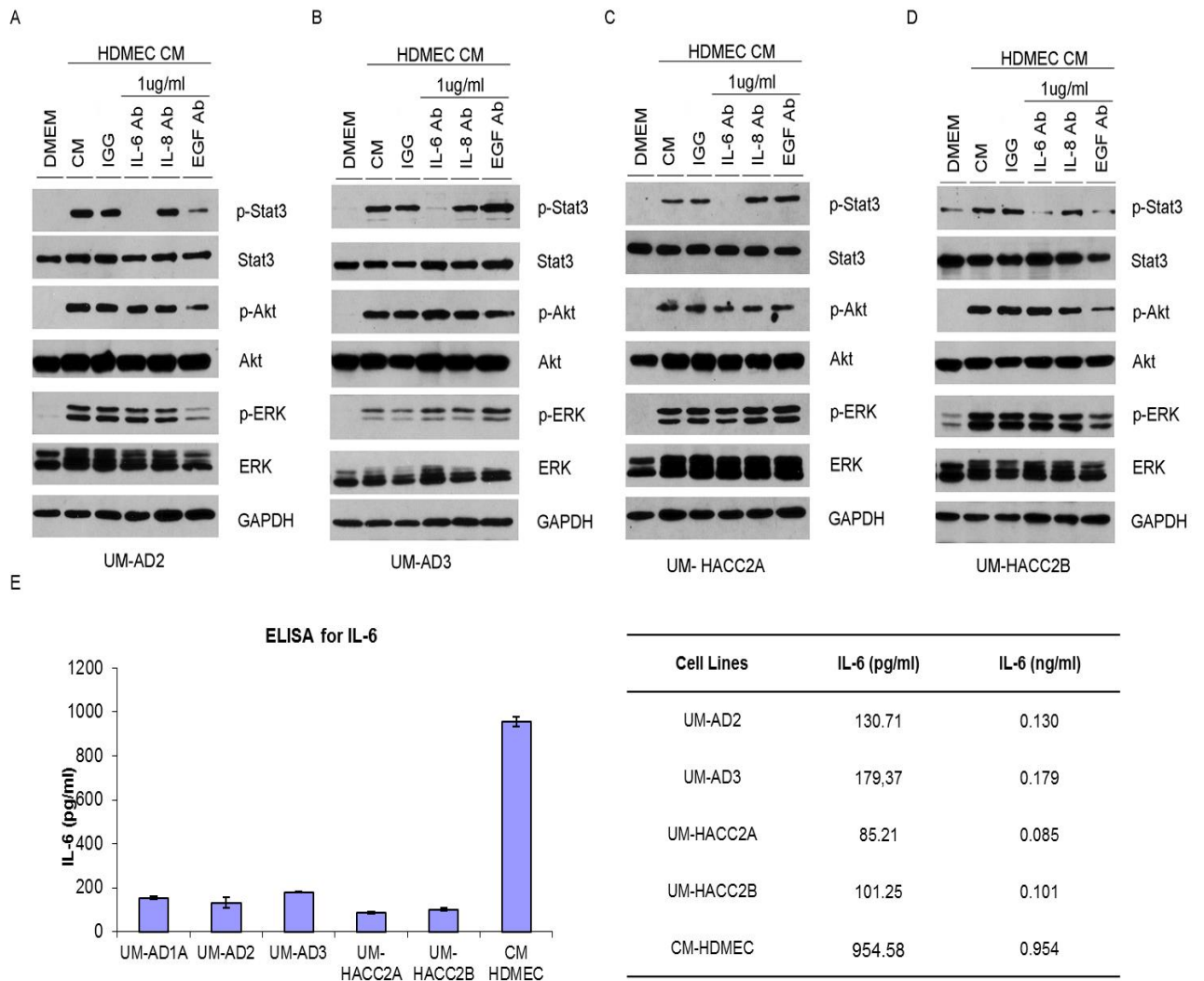


Figura 3 Efeito da IL-6, IL-8 e EGF secretados pelas células endoteliais na fosforilação de STAT3, Akt e ERK nas células dos tumores de glândula salivar CACs (UM-HACC2A, UM-HACC2B) e adenocarcinomas (UM-AD2, UM-AD3). (A-D) Células depois de mantidas por 24h em meio livre de suplementos/SFB foram expostas a DMEM, CM-HDMEC e CM-HDMEC contendo 1 μ g/ml de anticorpos neutralizantes anti-IL-6, anti-EGF e anti-IL-8; ou 1 μ g/ml de anti-IgG por 30 minutos. (E) ELISA demonstra níveis de IL-6 secretados por células UM-HACC2A, UM-HACC2B, UM-AD1A, UM-AD2, UM-AD3 e HDMEC.

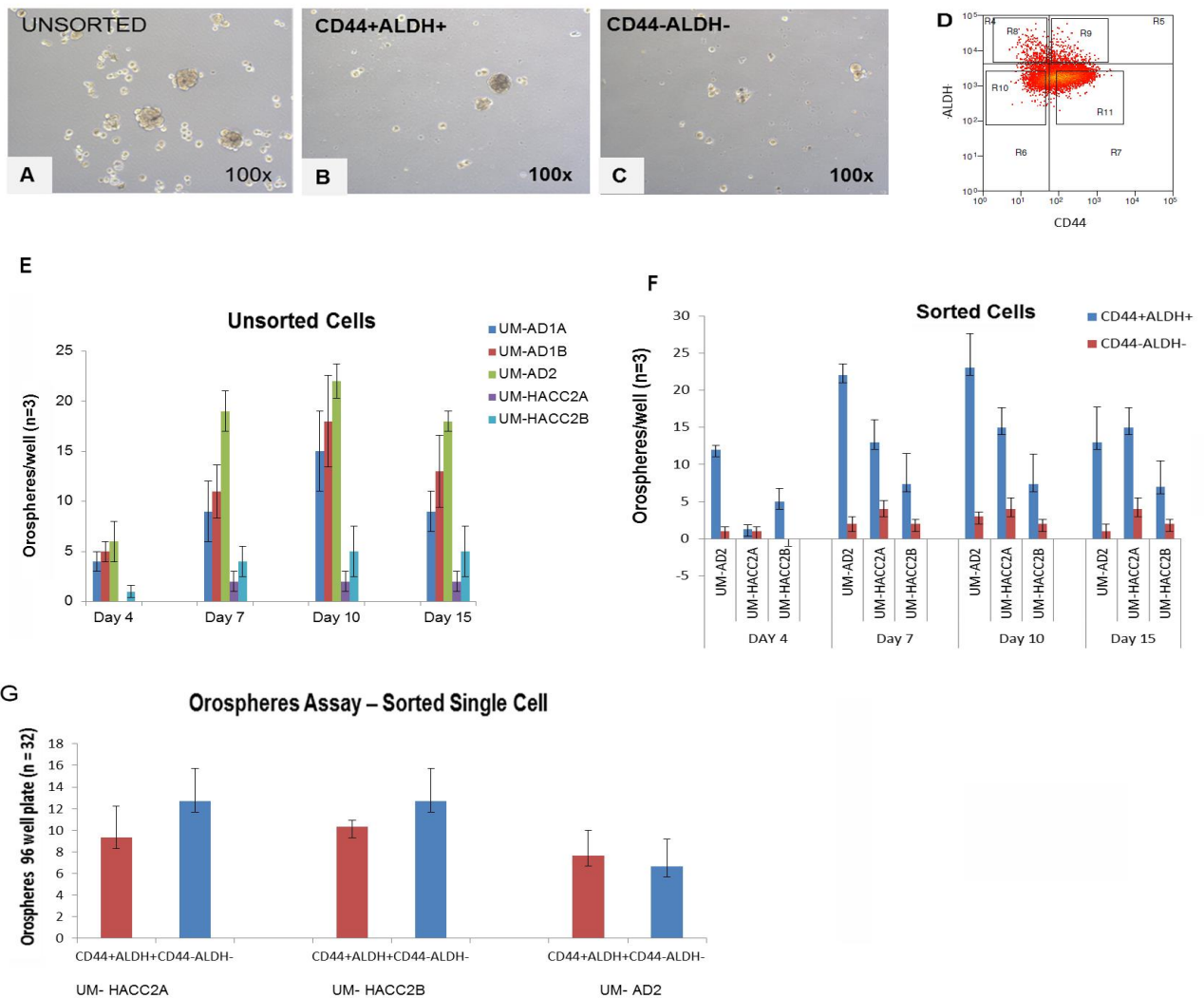


Figura 4 Ensaio de auto-renovação e geração de esferas (A-C) Fotomicrografias representativas de ensaio com 5.000 células UM-AD2 crescendo em placa de baixa aderência de 6 poços durante 15 dias. (D) Representação do selecionamento das células CD44 e ALDH (E-F) Gráficos demonstram o número de esferas geradas durante 15 dias após o plaqueamento em placa de baixa aderência de 5.000 células UM-AD1A*, UM-AD1B, UM-AD2, HACC2A e HACC2B selecionadas ou não por citometria de fluxo (G) Uma única célula CD44⁺ALDH⁺ ou CD44⁻ALDH⁻ de UM-AD2, HACC2A e HACC2B foi capaz de gerar esferas (32 poços avaliados em triplicata). *Células UM-AD1A selecionadas por citometria não foram avaliadas.

Material Suplementar

Tabela S1 Perfil dos tumores CACs e Adenocarcinomas de acordo com o gênero e idade do paciente, o tipo de tumor, a região de origem, o TNM e a incidência primária/metástase.

Tabela 1. Tumores de Glândula Salivar coletados no Hospital da Universidade de Michigan (Ann Arbor, MI, EUA), durante o período de outubro de 2010 e junho de 2012.

Pacientes	Células	Sexo	Idade	Classificação	Região	Incidência
Paciente 1	UM-AD1A	M	-	AdNOS	Glândula submandibular	Primário
	UM-AD1B			AdNOS	Linfonodo	Metástase
Paciente 2	UM-AD2	M	62	AdNOS	Glândula Parótida	Primário
Paciente 3	UM-AD3	M	54	AdNOS	Glândula Parótida	Primário
Paciente 4	UM-HACC2A	F	53	CAC	Glândula salivar menor	Primário
	UM-HACC2B			CAC	Linfonodo	Metástase
Paciente 5	UM-HACC3	M	50	CAC	Glândula parótida	Primário
Paciente 6	UM-HACC4	F	76	CAC	Glândula parótida	Primário
Paciente 7	UM-HACC5	-	-	CAC	-	Primário

AdNOS - Adenocarcinomas não especificados de outra forma

CAC - carcinoma adenoide cístico

Material Suplementar

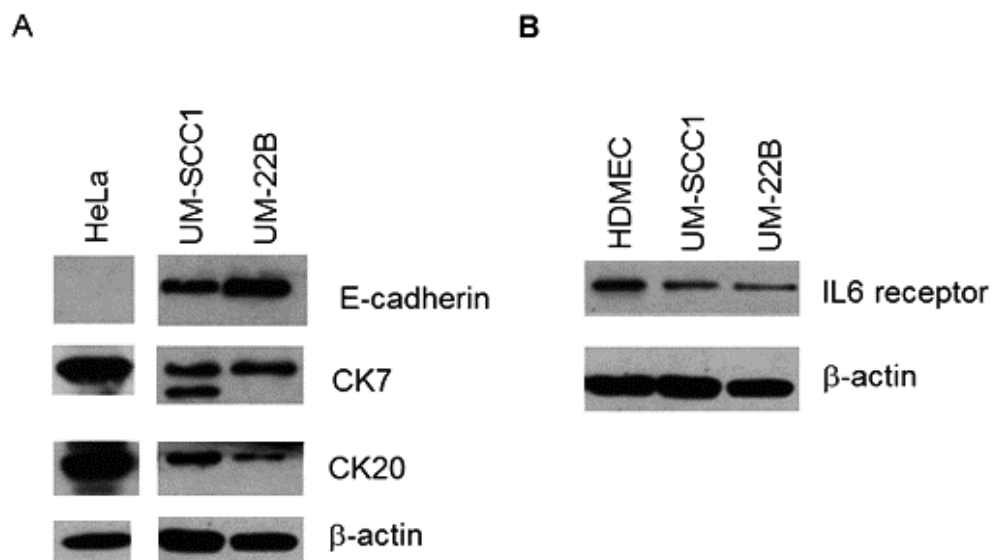


Figura S1 (A-B) Expressão de marcadores epiteliais e de receptor de IL-6 em diferentes células: células tumorais (HeLa, UM-SSC1, UM-22B) e célula endotelial da microvasculatura humana (HDMEC).

Material Suplementar

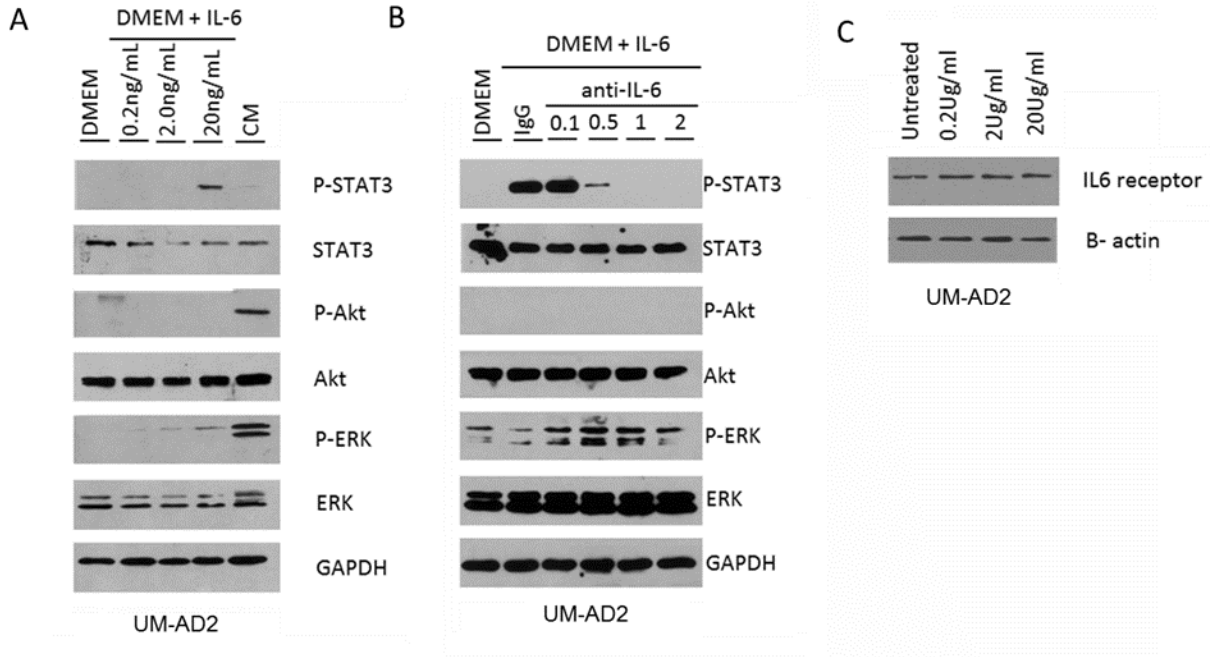


Figura S2 Efeito na fosforilação de STAT3, Akt e ERK nas células dos tumores UM-AD2. As células foram mantidas por 24h em meio livre se suplementos/SFB foram expostas a 0.2 ng/mL, 2ng/mL ou 20ng/mL de Rh-IL-6 e MC-HDMEC (A) ou expostas a DMEM, contendo 0.1 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml e 2 µg/ml de anticorpos neutralizantes anti-IL-6 e 1 µg/ml de anti-IgG por 30 minutos (B). Em C, verificação da presença de receptor de IL-6 em resposta à exposição à 0.2 ng/mL, 2ng/mL ou 20ng/mL de Rh-IL-6.

Referências

1. AATC - American Type Culture Collection Standards Development Organization Workgroup ASN-0002 (2010). Cell line misidentification: the beginning of the end. *Nat Rev Cancer* 10(6):441-8.
2. Bradley P, McClelland L, Mehta D (2007). Paediatric salivary and epithelial neoplasms. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 69(3):137-45.
3. Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C, Hamner B *et al.* (2007). A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell* 11(1):69-82.
4. Christiansen J, Rajasekaran AK (2006). Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res* 66(17):8319–26.
5. Ellies M, Laskawi R (2010). Diseases of the salivary glands in infants and adolescents. *Head Face Med* 15:1-7.
6. Eveson JW, Auclair P, Gnepp DR, El-Naggar AK (2005). Tumours of the salivary gland. In: World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours IARC Pres. pp.209-281.
7. Folkman J (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285(21):1182-6.
8. Ghajar CM, Peinado H, Mori H, Matei IR, Evason KJ, Brazier H *et al.* (2013). The perivascular niche regulates breast tumour dormancy. *Nat Cell Biol* [Epub ahead of print]
9. Krishnamurthy S, Dong Z, Vodopyanov D, Imai A, Helman JI, Prince ME *et al.* (2010) Endothelial cell-initiated signaling promotes the survival and self-renewal of cancer stem cells. *Cancer Res* 70(23):9969-78.
10. Krishnamurthy S, Nör JE (2012) Head and neck cancer stem cells. *J Dent Res* 91(4):334-40.
11. Krishnamurthy S, Nör JE (2013). Orosphere assay: A method for propagation of head and neck cancer stem cells. *Head Neck* 35(7):1015-21.

12. Laurie SA, Licitra L (2006). Systemic therapy in the palliative management of advanced salivary gland cancers. *J Clin Oncol* 10(17):2673-8.
13. Locke M, Heywood M, Fawell S, Mackenzie IC (2005). Retention of intrinsic stem cell hierarchies in carcinoma-derived cell lines. *Cancer Res* 65(19):8944-50.
14. Luo J, Manning BD, Cantley LC (2003). Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell* 4(4):257-62.
15. Milano A, Longo F, Basile M, Iaffaioli RV, Caponigro F (2007). Recent advances in the treatment of salivary gland cancers: emphasis on molecular targeted therapy. *Oral Oncol* 43(8):729-34.
16. Morrison SJ, Spradling AC (2008). Stem Cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* 132(4):598-611.
17. Neiva KG, Zhang Z, Miyazawa M, Warner KA, Karl E, Nör JE (2009). Cross talk initiated by endothelial cells enhances migration and inhibits anoikis of squamous cell carcinoma cells through STAT3/Akt/ERK signaling. *Neoplasia* 11(6):583-93.
18. Park CY, Tseng D, Weissman IL (2009). Cancer stem cell directed therapies: recent data from the laboratory and clinic. *Mol Ther* 17(2):219-30.
19. Park IK, Qian D, Kiel M, Becker MW, Pihalja M, Weissman IL *et al.* (2003). Bmi1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* 423:302–305.
20. Phuchareon J, Ohta Y, Woo JM, Eisele DW, Tetsu O (2009). Genetic profiling reveals cross-contamination and misidentification of 6 adenoid cystic carcinoma cell lines: ACC2, ACC3, ACCM, ACCNS, ACCS and CAC2. *PLoS One* 4(6):e6040.
21. Shackleton M, Quintana E, Fearon ER, Morrison SJ (2009). Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell* 138(5):822-9.
22. Sherry MM, Reeves A, Wu JK, Cochran BH (2009). STAT3 is required for proliferation and maintenance of multipotency in glioblastoma stem cells. *Stem Cells* 27(10):2383-92

23. Ungefroren H, Sebens S, Seidl D, Lehnert H, Hass R (2011). Interaction of tumor cells with the microenvironment. *Cell Commun Signal* 9:18.
24. Zhao M, Sano D, Pickering CR, Jasser SA, Henderson YC, Clayman GL *et al.* (2011). Assembly and initial characterization of a panel of 85 genomically validated cell lines from diverse head and neck tumor sites. *Clin Cancer Res* 17(23):7248-64.

4. Considerações Finais

Estima-se que, em 2013, o Brasil apresente 257.870 novos casos de câncer para o sexo masculino e 260.640 para o sexo feminino. Para a grande maioria dos tumores, não existe um tratamento que represente 100% de sucesso e, portanto, até o momento, as políticas de saúde da Organização Mundial de Saúde reforçam a prevenção, a detecção, o diagnóstico e tratamento precoces, como pontos-chaves no combate à doença.

Os tumores de glândula salivar dificilmente são detectados precocemente, pois, em geral, têm um crescimento lento e indolor, sendo que são identificados quando metástases já são encontradas. Além disso, possuem 24 diferentes subtipos, todos raros, quando comparados a outros tumores de cabeça e pescoço, o que traz dificuldade na obtenção de dados epidemiológicos e clínicos que ajudem na compreensão de sua evolução e no estabelecimento de melhores métodos terapêuticos (LAURIE; LICITRA, 2006).

Outro desafio, referente a esses tumores é a obtenção de material biológico para investigações laboratoriais. Especificamente, em relação ao carcinoma adenoide cístico, a literatura tem apresentado relatos que deflagram que as linhagens celulares utilizadas em estudos, atualmente, apresentam-se contaminadas com células tumorais provenientes de outros tumores humanos ou mesmo de outras espécies animais (ZHAO *et al.*, 2011; PHUCHAREON *et al.*, 2009).

Na busca por linhagens celulares, células provenientes de CACs foram isoladas e modificadas geneticamente para serem imortalizadas, o que poderia afastar mais ainda o fenótipo dessas células com as correspondentes *in vivo* (QUEIMADO *et al.*, 1999). Assim, em nosso estudo, foi necessário partir do isolamento das células do tecido, tanto nos CACs, quanto nos adenocarcinomas. As células, depois de isoladas,

foram cultivadas em meio de cultura específico para favorecer o crescimento de células epiteliais e, mesmo assim, uma população heterogênea foi percebida ao longo das passagens. A decisão por realizar os experimentos com células cultivadas até a passagem de número sete, foi decorrente da dificuldade de cultivo dessas células ao longo dos repiques, aliado ao interesse em manter a citada heterogeneidade celular.

A morfologia celular foi variável entre os tumores e ao longo das passagens. No início, as culturas formavam tapetes e apresentavam colônias de células aderidas entre si, lembrando uma cultura de células epiteliais tumorais. No perfil proteico, o conjunto de células apresentou tanto elementos estruturais epiteliais, como as citoqueratinas 7 e 20, como a molécula de adesão n-caderina, característica de células mesenquimais ou de células tumorais em transição epitélio-mesênquima. Ainda em relação à avaliação do perfil imunofenotípico, grupos controles, constituídos de tecidos normais de biopsia de glândula salivar, de tecido conjuntivo e de tecido epitelial, por exemplo, seriam interessantes, para comparar as informações aqui encontradas.

Um aspecto interessante, foi a possibilidade de comparar células provenientes do sítio primário de desenvolvimento tumoral com as metástases geradas nos linfonodos. A quantidade de IL-6 secretada pelas células tumorais da metástase UM-HACC2B foi maior em relação às células do sítio primário UM-HACC2A, assim como o potencial de gerar esferas, a partir de toda a população do tumor, ou seja, não selecionada por citometria. Em relação às células CD44⁺ALDH⁺, considerado um perfil encontrado nas células-tronco de carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço, este foi semelhante entre esses grupos.

Procurando investigar se os CACs e os AdNOS aqui avaliados seriam regidos por um modelo de organização hierárquico, experimentos *in vitro* e *in vivo* foram realizados. Para o estudo *in vitro*, foi utilizado o modelo de geração de esferas. Foi encontrado que, quando o experimento era realizado com um número de 5.000 células, plaqueadas em placas de baixa aderência de 6 poços, as células CD44⁺ALDH⁺,

previamente selecionadas, geraram um maior número de esferas em relação CD44⁻ALDH⁻. No entanto, o contrário foi observado quando o experimento partia do plaqueamento em placa de baixa aderência de 96 poços de apenas uma única célula. Para ambos os resultados, não foram encontradas diferenças estatísticas significantes. Os modelos experimentais são diferentes e isso, talvez, possa explicar os resultados contraditórios. Sendo que as culturas avaliadas continham uma população heterogênea morfológicamente, apesar da seleção imunofenotípica, no experimento de uma única célula, nem sempre era possível visualizar a presença de tal célula no dia inicial do plaqueamento.

Experimentos *in vivo*, que não estão descritos no artigo da presente tese, foram realizados durante o estágio no exterior, na tentativa de geração de tumores a partir das células isoladas das amostras de adenocarcinomas de glândula salivar humanos (UM-AD1A, UM-AD1B e UM-AD2). Nesses ensaios, foi realizada a implantação de células selecionadas (CD44⁺ALDH⁺Lin⁻ ou CD44⁻ALDH⁻Lin⁻), após o isolamento dos tumores primários, em camundongos imunocomprometidos (SCID). Os animais foram mantidos por cerca de um ano e não desenvolveram tumores com a metodologia utilizada em nosso laboratório (Apêndice 1-3) (KRISHNAMURTHY *et al.*, 2010; NÖR *et al.*, 2001).

Não existem modelos animais definidos para a geração de tumores a partir de células primárias de CACs e adenocarcinomas, descritos na literatura. Moskaluk e grupo, em 2011, conseguiram desenvolver um modelo de xenotransplante, o qual consiste na implantação de uma porção do tecido removido da biópsia e, mesmo com essa técnica, obtiveram alguns casos de insucesso (MOSKALUK *et al.*, 2011). Nós acreditamos que vários aspectos possam ter influenciado na não geração dos tumores em nossa pesquisa como, por exemplo: (a) mesmo enriquecendo a população tumoral com os marcadores determinados, o desenvolvimento dos tumores pode ser lento, seguindo o padrão do seu desenvolvimento em humanos; (b) a metodologia utilizada talvez não seja a mais adequada e a aplicação de um modelo organotípico possa vir a ter êxito com a mesma população; (c) é possível, que esses marcadores não sejam

específicos para as células-tronco de tumores de glândula salivar estudados, considerando que estes sigam o modelo hierárquico de desenvolvimento e evolução, ou ainda (d) a técnica para a geração de tumores *in vivo*, utilizando as células isoladas diretamente do tumor e selecionadas por citometria, em nossa pesquisa, seguiu a metodologia já aplicada em nosso laboratório (KRISHNAMURTHY *et al.*, 2010). Com isso, ao mesmo tempo em que as células foram selecionadas quanto à expressão de CD44 e ALDH, foram descartadas as células que apresentassem expressão dos marcadores CD2, CD3, CD10, CD16, CD18, a fim de eliminar as células da linhagem hematopoética. No entanto, um aspecto a ser considerado é que além de ter sido identificado em granulócitos, o CD10 é também referido como um marcador de células-tronco epiteliais mamárias (BACHELARD-CASCALES *et al.*, 2010). Considerando que este tipo celular é encontrado em glândulas salivares, é possível que células importantes para a geração do tumor tenham sido ignoradas.

Devido a todas essas dificuldades acima relatadas, até então, a grande maioria das pesquisas de tumores salivares tem utilizado o material de biópsia desses tumores para a realização de técnicas imunoistoquímicas e técnicas que permitam a avaliação de mutações genéticas. É possível que a dificuldade existente para a obtenção de cultura dessas células, explique o motivo da carência de estudos mecanísticos na literatura.

É por meio de estudos mecanísticos que, ao longo dos últimos anos, as pesquisas têm sido capazes de relacionar a atividade desregulada de vias de sinalização com a carcinogênese. Essas vias de sinalização nas células tumorais podem sofrer influência de outras células, além das tumorais, existentes no microambiente do tumor. Nesse sentido, aqui, nós observamos que mediadores solúveis liberados pelas células endoteliais foram capazes de fosforilar STAT3, Akt e ERK em todas as células salivares e que, especificamente IL-6 é que foi, notavelmente, capaz de ativar STAT3.

A importância das células endoteliais tem sido discutida em diferentes aspectos. Sabe-se que crescimento tumoral é dependente da angiogênese, que essas células podem secretar, além de IL-6, outras citocinas capazes de ativar moléculas envolvidas com a transformação tumoral celular e ainda, que componentes da microvasculatura podem estar influenciando na quiescência das células tumorais nos sítios de metástase (GAJHAR *et al.*, 2013; BUTLER *et al.*, 2010; NEIVA *et al.*, 2009).

Considerando que STAT3 foi ativado na presença de IL-6, semelhante ao que se verifica para outros tumores, terapias usando anticorpos contra IL-6, talvez sejam uma opção no futuro, em se tratando de carcinomas adenoides císticos e adenocarcinomas NOS. Ainda, em relação a terapias contra os tumores, parece que a investigação do nicho tumoral, especificamente nos aspectos relacionados à comunicação da microvasculatura do tumor com as células tumorais, pode vir a ser um alvo promissor.

5. Perspectivas

- Verificar a influência da exposição das células tumorais a Rh-IL-6 na expressão de e-caderina, n-caderina, β -catenina, vimentina e Bmi-1.
- Verificar a influência da exposição das células tumorais aos fatores solúveis provenientes das células endoteliais na expressão de e-caderina, n-caderina, β -catenina, vimentina e Bmi-1.
- Confrontar os dados obtidos até o momento e completar a avaliação acima sugerida, utilizando células endoteliais modificadas, a fim de diminuir a sua expressão de IL-6.
- Avaliar um modelo de geração de tumor organotípico *in vivo*, para estudar parâmetros referentes ao desenvolvimento de neoplasia malignas de glândula salivar, considerando, em especial foco, as células-tronco tumorais.
- Realização de ensaios funcionais de sobrevivência e migração em situações em que as células tumorais estiverem ou não expostas aos fatores solúveis provenientes das células endoteliais.

Referências Bibliográficas

1. ADELSTEIN, D. J. *et al.* Biology and management of salivary gland cancers. **Semin Radiat Oncol**, Philadelphia, v.22, n. 3, p. 245-53, Jul. 2012.
2. AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION STANDARDS DEVELOPMENT ORGANIZATION WORKGROUP ASN-0002. Cell line misidentification: the beginning of the end. **Nat Rev Cancer**, London, v.10, n.6, p. 441-8, Jun. 2010.
3. ANTON, K.; GLOD, J. Targeting the tumor stroma in cancer therapy. **Curr Pharm Biotechnol**, Hilversum, v.10, n.2, p.185-91, Fev. 2009.
4. AZEVEDO, R.S. *et al.* Comparative Cytokeratin Expression in the Different Cell Types of Salivary Gland Mucoepidermoid Carcinoma. **Head Neck Pathol**, Secaucus, v. 2, n. 4, p. 257–264, Dez. 2008.
5. BACHELARD-CASCALES, E. *et al.* The CD10 enzyme is a key player to identify and regulate human mammary stem cells. **Stem Cells**, Basel, v. 28, n. 6, p.1081-8, Jun. 2010.
6. BARTHOLOMEUSZ, C. *et a.* High ERK protein expression levels correlate with shorter survival in triple-negative breast cancer patients. **Oncologist**, Dayton, v. 17, n. 6, p. 766-74, Maio. 2012.
7. BRADLEY, P.; MCCLELLAND, L.; MEHTA, D. Paediatric salivary and epithelial neoplasms. **ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec**, Basel, v. 69, n. 3, p.137-45, Jan. 2007.
8. BUTLER, J.M.; KOBAYASHI, H.; RAFII, S. Instructive role of the vascular niche in promoting tumour growth and tissue repair by angiocrine factors. **Nat Rev Cancer**, London, v. 10, n. 2, p. 138-46, Fev. 2010.
9. BYRD, S.A. *et al.* Predictors of Recurrence and Survival for Head and Neck Mucoepidermoid Carcinoma. **Otolaryngol Head Neck Surg**, London, Maio. 2013. Disponível em <doi: 10.1177/0194599813489659>
10. CALABRESE, C. *et al.* A perivascular niche for brain tumor stem cells. **Cancer Cell**, Cambridge, v. 11, n. 1, p. 69-82, Jan. 2007.
11. CHEN, M.F. *et al.* IL-6 expression regulates tumorigenicity and correlates with prognosis in bladder cancer. **PLoS One**, San Francisco, v.8, n. 4, Apr. 2013.

12. CHEN, M.F. *et al.* IL-6 expression predicts treatment response and outcome in squamous cell carcinoma of the esophagus. **Mol Cancer**, London, 12:26, Abr. 2013
13. CHRISTIANSEN, J.J.; RAJASEKARAN, A.K. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. **Cancer Res**, Chicago, v.66, n.17, p. 8319–26, Set. 2006
14. COWARD, J. *et al.* Interleukin-6 as a therapeutic target in human ovarian cancer. **Clin Cancer Res**, Denville, v. 17, n. 18, p. 6083-96, Set. 2011.
15. CULIG, Z. Interleukin-6 as a therapy target in oral squamous carcinoma. *Expert Opin Ther Targets*, London, v. 17, n. 1, p. 53-9. Jan. 2013.
16. DA CRUZ PEREZ, D.E. *et al.* Salivary gland tumors in children and adolescents: a clinicopathologic and immunohistochemical study of fifty-three cases. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**, Amsterdam, v. 68, n. 7, p. 895-902, Jul. 2004.
17. DICKSON, P.V.; DAVIDOFF, A.M. Malignant neoplasms of the head and neck. **Semin Pediatr Surg**, Philadelphia, v.15, n. 2, p.92-8, Maio. 2006.
18. ELLIES, M.; LASKAWI, R. Diseases of the salivary glands in infants and adolescents. **Head Face Med**, London, n. 15, p.1-7, Fev. 2010.
19. EVESON, J.W. *et al.* Tumours of the salivary gland. **World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours**. Lyo, IARC Press, 2005. 430p. 209-281p.
20. FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **N Engl J Med**, Boston, v. 285, n. 21, p.1182-6, Nov. 1971.
21. FUJITA, S.; IKEDA, T. Cancer stem-like cells in adenoid cystic carcinoma of salivary glands: relationship with morphogenesis of histological variants. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v.41, n.3, p. 207-213, Mar. 2012.
22. GHAJAR, C.M. *et al.* The perivascular niche regulates breast tumour dormancy. **Nat Cell Biol**, New York, v. 15, n. 7, p. 807-17, Jul. 2013.
23. HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, Cambridge, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar. 2011.

- 24.HO, A.S. *et al.* The mutational landscape of adenoid cystic carcinoma. **Nat Genet**, New York, 2013. Disponível em: <doi: 10.1038/ng.2643>
- 25.HUNT, J.L. An update on molecular diagnostics of squamous and salivary gland tumors of the head and neck. **Arch Pathol Lab Med**, Chicago, v.135, n.5, p.602-609, Maio. 2011.
- 26.HUSAIN, Q. *et al.* Sinonasal adenoid cystic carcinoma: systematic review of survival and treatment strategies. **Otolaryngol Head Neck Surg**, Rochester, v. 148, n. 1, p. 29-39, Jan. 2013.
- 27.JEMAL A. *et al.* Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin**, Hoboken, v. 61, n.2, p. 69-90, Mar-Abr. 2011.
- 28.JUDD, N.P. *et al.* ERK1/2 regulation of CD44 modulates oral cancer aggressiveness. **Cancer Res**, v. 72, n. 1, p. 365-74, Jan. 2012.
- 29.KRISHNAMURTHY, S.; NÖR, J.E. Orosphere assay: A method for propagation of head and neck cancer stem cells. **Head Neck**, New York, v. 35, n. 7, p. 1015-21, Jul. 2013.
- 30.KRISHNAMURTHY, S.; NÖR, J.E. Head and neck cancer stem cells. **J Dent Res**, Chicago, v. 91, n. 4 p. 334-40, Abr. 2012.
- 31.KRISHNAMURTHY, S. **Endothelial Cell – Stem Cell Crosstalk in Head and Neck Cancer**. 2011. 309f. Oral Health Ph.D. Dissertation, School of Dentistry, University of Michigan, MI, EUA, 2011.
- 32.KRISHNAMURTHY, S. *et al.* Endothelial cell-initiated signaling promotes the survival and self-renewal of cancer stem cells. **Cancer Res**, Chicago v.70, n. 23, p. 9969-78, Dez. 2010.
- 33.KUPFERMAN, M.E. *et al.* Outcomes of pediatric patients with malignancies of the major salivary glands. **Ann Surg Oncol**, New York, v. 17, n. 12, p. 3301-7, Dez. 2010.
- 34.LAURIE, S.A. *et al.* Systemic therapy in the management of metastatic or locally recurrent adenoid cystic carcinoma of the salivary glands: a systematic review. **Lancet Oncol**, London, v. 12, n. 8, p. 815-24, Ago. 2011.

35. LAURIE, S.A.; LICITRA, L. Systemic therapy in the palliative management of advanced salivary gland cancers. **J Clin Oncol**, Alexandria, v. 24, n. 17, p. 2673-8, Jun. 2006.
36. LINET, M.S. *et al.* Cancer surveillance series: recent trends in childhood cancer incidence and mortality in the United States. **J Natl Cancer Inst**, Bethesda, v. 91, n. 12, p. 1051-8, Jun. 1999
37. LIU, K. *et al.* Sox2 cooperates with inflammation-mediated Stat3 activation in the malignant transformation of foregut basal progenitor cells. **Cell Stem Cell**, Cambridge, v. 12, n. 3, p. 304-15, Mar. 2013.
38. LOCKE, M. *et al.* Retention of intrinsic stem cell hierarchies in carcinoma-derived cell lines. **Cancer Res**, Chicago, v. 65, n. 19, p. 8944-50, Jan. 2005.
39. LUO, J. *et al.* Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. **Cancer Cell**, Cambridge, v. 4, n. 4, p. 257-62, Out. 2003.
40. MILANO A. *et al.* Recent advances in the treatment of salivary gland cancers: emphasis on molecular targeted therapy. **Oral Oncol**, Amsterdam, v. 43, n. 8, p. 729-34, Set. 2007.
41. MORRISON, S. J.; SPRADLING, A. C. Stem Cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. **Cell**, Cambridge, v. 132, n. 4, p. 598-611, Fev. 2008.
42. MOSKALUK, C.A. *et al.* Development and characterization of xenograft model systems for adenoid cystic carcinoma. **Lab Invest**, Baltimore, v.91, n.10, p. 1480-90, Out. 2011.
43. MOSKALUK, C.A. Adenoid cystic carcinoma: clinical and molecular features. **Head Neck Pathol**, Secaucus, v. 7, n. 1, p. 17-22, Mar. 2013.
44. NEIVA, K.G. *et al.* Crosstalk initiated by endothelial cells enhances migration and inhibits anoikis of squamous cell carcinoma cells through STAT3/Akt/ERK signaling. **Neoplasia**, New York, v. 11, n. 6, p.583-93, Jun. 2009.
45. NEVILLE, B. W. *et al.* **Patologia Oral e Maxilofacial**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 798p.

46. NÖR, J.E. *et al.* Engineering and characterization of functional human microvessels in immunodeficient mice. **Lab Invest**, Baltimore, n. 81, p. 453–63, 2001.
47. O'NEILL E, KOLCH W. Conferring specificity on the ubiquitous Raf/MEK signalling pathway. *Br J Cancer*, London, v. 90, n. 2, p. 283-8, Jan. 2004.
48. PARK, I. K. *et al.* Bmi1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. **Nature**, London, v. 423, n. 6937, p. 302-5, Maio. 2003.
49. PARK, C.Y.; TSENG, D.; WEISSMAN, I.L. Cancer stem cell directed therapies: recent data from the laboratory and clinic. **Mol Ther**, San Diego, v. 17, n. 2, p. 219-30, Fev. 2009.
50. PHUCHAREON, J. *et al.* Genetic profiling reveals cross-contamination and misidentification of 6 adenoid cystic carcinoma cell lines: ACC2, ACC3, ACCM, ACCNS, ACCS and CAC2. **PLoS One**, San Francisco, v. 4, n. 6, p. e6040, Jun. 2009.
51. QUEIMADO, L. *et al.* In Vitro Transformation of Cell Lines from Human Salivary Gland Tumors. *Int J Cancer*, New York, v. 81, n. 5, p.793-798, Maio. 1999.
52. REICH, N.C.; LIU, L. Tracking STAT nuclear traffic. **Nat Rev Immunol**, London, v. 6, n. 8, p. 602-12, Ago. 2006.
53. REYA, T. *et al.* Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, London, v.414, n.6859, p.105-111, Nov. 2001.
54. RITCHIE, K.E.; NÖR, J.E. Perivascular stem cell niche in head and neck cancer. *Cancer Lett*, Amsterdam, v. 338, n. 1, p.41-6, Set. 2013.
55. SAMUELS, Y. *et al.* High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. **Science**, New York, v. 304, n. 5670, p. 554, Abr. 2004.
56. SHACKLETON, M. *et al.* Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. **Cell**, Cambridge, v. 138, n. 5, p. 822-9, Set. 2009.

57. SHERRY, M.M. *et al.* STAT3 is required for proliferation and maintenance of multipotency in glioblastoma stem cells. **Stem Cells**, Basel, v. 27, n. 10, p. 2383-92, Out. 2009.
58. SUN, S.; WANG, Z. ALDH high adenoid cystic carcinoma cells display cancer stem cell properties and are responsible for mediating metastasis. *Biochem Biophys Res Commun*, New York, v. 396, n. 4, p. 843-348, Jun. 2010.
59. TONOZUKA, Y. *et al.* A GTPase-activating protein binds STAT3 and is required for IL-6-induced STAT3 activation and for differentiation of a leukemic cell line. *Blood*, New York, v. 104, n. 12, p. 3550-7, Dez. 2004.
60. TU, S. *et al.* Overexpression of interleukin-1beta induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice. **Cancer Cell**, Cambridge, v. 14, n. 5, p. 408-19, Nov. 2008.
61. UNGEFROREN, H. *et al.* Interaction of tumor cells with the microenvironment. **Cell Commun Signal**, London, n. 13, p. 9:18, Set. 2011.
62. WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncology**, Oxford, v. 45, n. 4-5, p. 309–316, Abr. 2009.
63. YU H, PARDOLL D, JOVE R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. **Nat Rev Cancer**, London, v. 9, n. 11, p. 798-809, Nov. 2009.
64. ZHAO, M. *et al.* Assembly and initial characterization of a panel of 85 genomically validated cell lines from diverse head and neck tumor sites. **Clin Cancer Res**, Denville, v. 17, n. 23, p. 7248-64, Dez. 2011.
65. ZHOU, J.H. *et al.* ALDH1 immunohistochemical expression and its significance in salivary adenoid cystic carcinoma. *Head Neck*, New York, v. 35, n. 4, p. 575-578, Maio. 2013.

Anexo 1

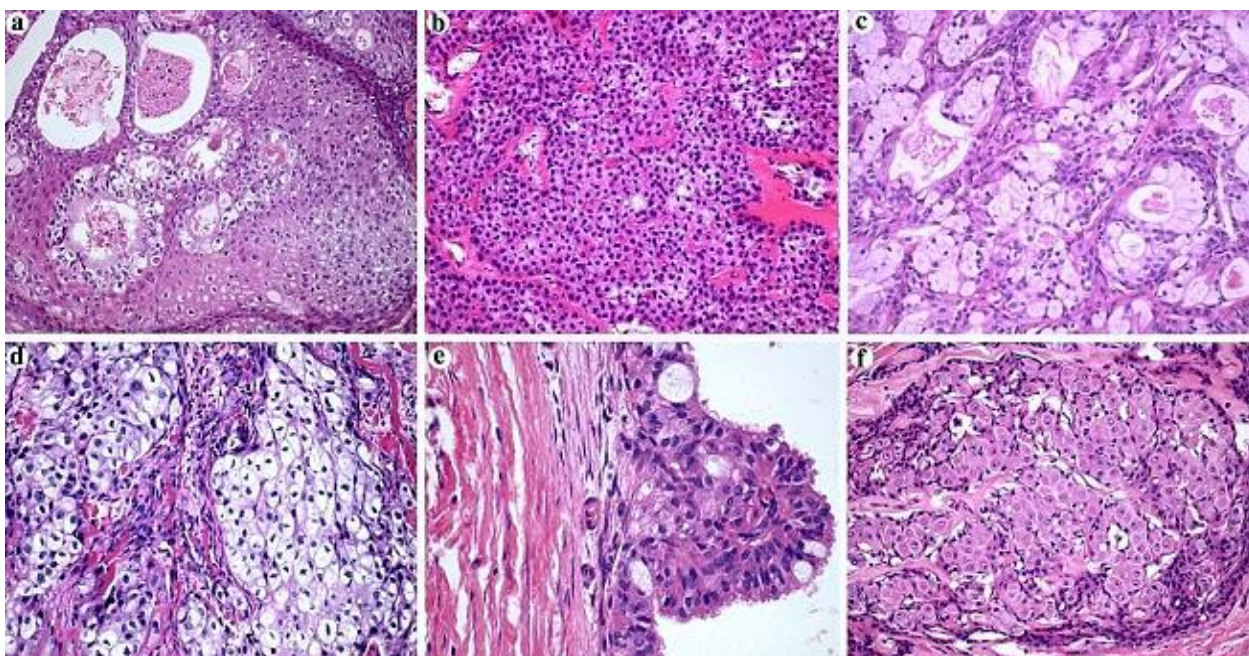


Figura 1 Tipos celulares encontrados em carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares. (Hematoxilina e Eosina, magnificação original 200x) (a) Células escamosas; (b) células intermediárias; (c) células mucosas; (d) células claras; (e) células colunares (Hematoxilina e Eosina, magnificação original 400x); (f) células oncócicas

Fonte: AZEVEDO, R.S et al. *Comparative Cytokeratin Expression in the Different Cell Types of Salivary Gland Mucoepidermoid Carcinoma.* **Head Neck Pathol, Secaucus**, v. 2, n. 4, p. 257–264, Dec. 2008.

Anexo 2

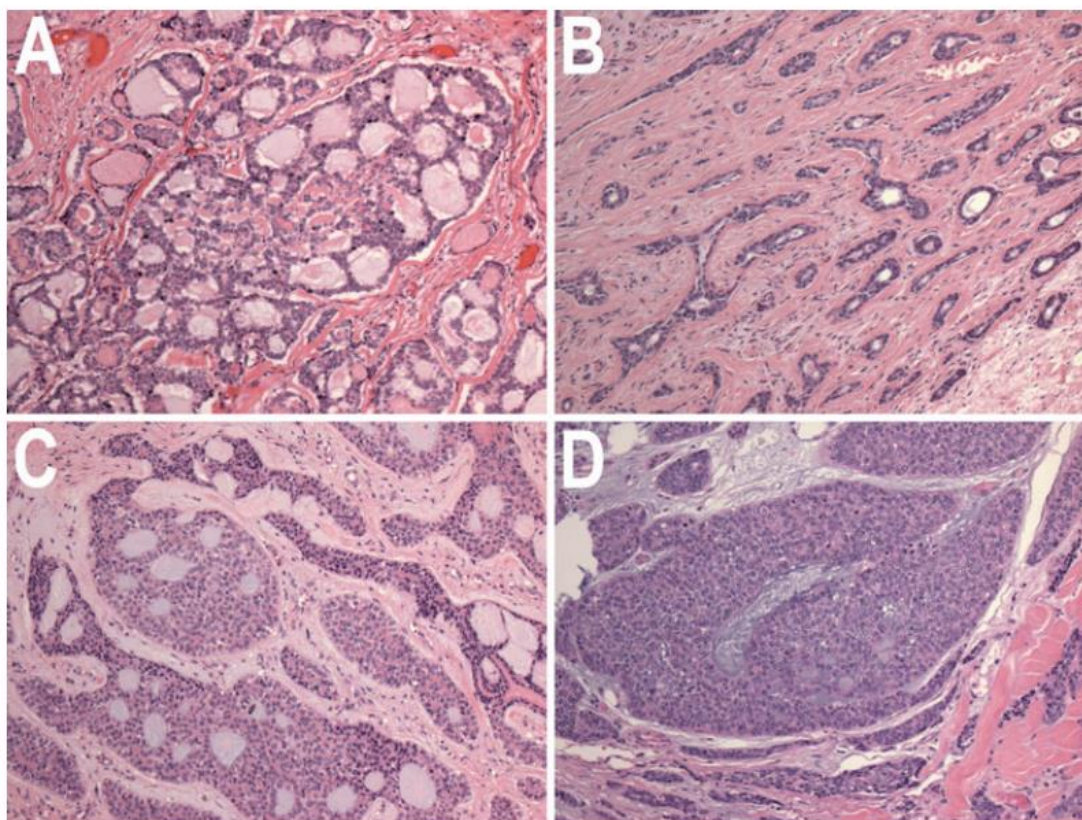


Figura 1 Tipos e graus histológicos de CAC. **a.** Padrão Cribriforme, sem crescimento de componente sólido (Grau 1). **b.** Padrão Tubular, sem componente sólido (Grau 1). **c.** Padrão de crescimento cribriforme, com áreas de crescimento sólido compreendendo menos do que 30% do tumor (Grau 2). **d.** Predomínio de padrão de crescimento sólido (Grau 3). Todas as figuras em coloração de Hematoxilina e Eosina, magnificação original de 40x.

Fonte: MOSKALUK, C.A. *Adenoid cystic carcinoma: clinical and molecular features.* *Head Neck Pathol, Secaucus*, v. 7, n. 1, p. 17-22, Mar. 2013.

Anexo 3

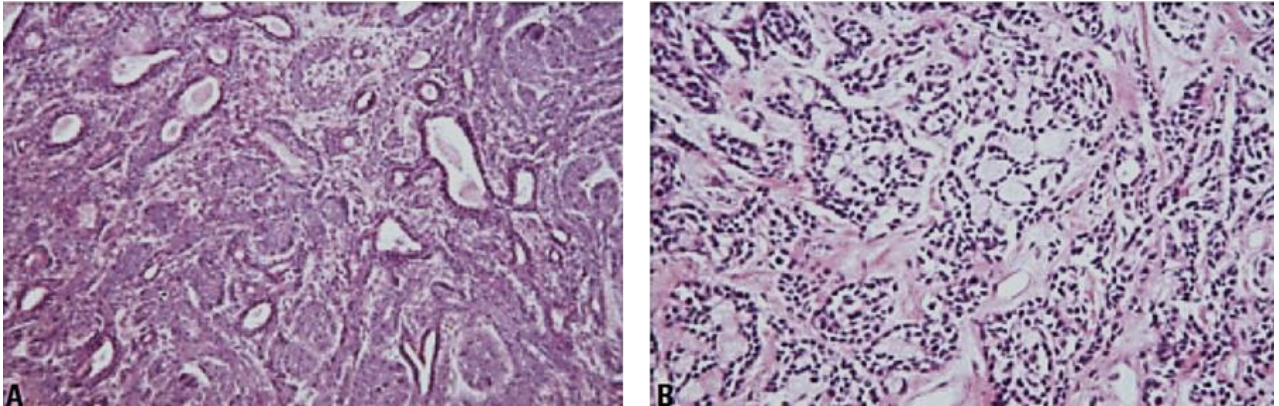


Fig. 5.27 Adenocarcinomas não especificados de outra forma. **A** variabilidade celular e de arquitetura. Diferenciação ductal proeminente é presente, nas proximidades das ilhas tumorais. **B** estruturas tubulares focais com núcleos hialina, lembrando um carcinoma adenoide cístico.

Fonte: EVESON, J.W.; AUCLAIR, P.; GNEPP, D. R.; EL-NAGGAR, A. K. *Tumours of the salivary gland. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours.* Lyo, IARC Press, 2005. 430p. 209-281p.

Apêndice 1

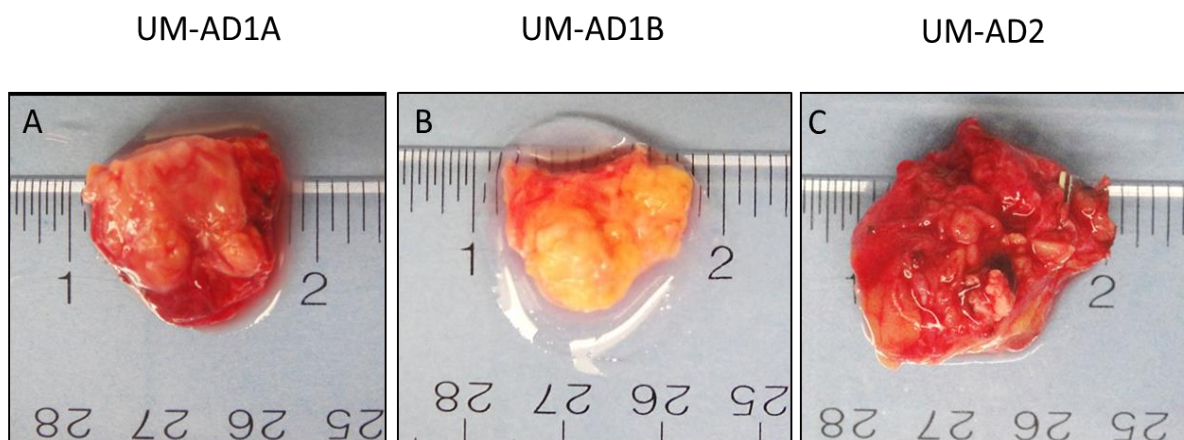


Tabela – Expressão de CD44 e ALDH por citometria de fluxo

	UM-AD1A	UM-AD1B	UM-AD2
CD44+ALDH+	63.700 (2.02%)	17.000 (3.19%)	18.000 (1.22%)
CD44-ALDH-	520.000 (17.7%)	0 (0%)	752.540 (82.83%)

Figura Apêndice1 Imagens A-C representam a amostra de tecido total coletada e utilizada para o isolamento das células UM-AD1A, UMAD1B e UM-AD2. Na tabela, estão descritos os valores absolutos, resultantes da seleção celular por citometria de fluxo, considerando a marcação duplo positiva ou negativa para CD44 e ALDH.

Apêndice 2

Tabela - Análise *in vivo*. Os dados mostram a distribuição das células selecionadas a partir de UM-AD1A, UM-AD1B e UM-AD2, cultivadas nos *scaffolds* e implantadas nos camundongos.

Amostra	Scaffolds (n)	Número de Células/Scaffold	
		CD44+ALDH+	CD44-ALDH-
UM-AD1A	20	<ul style="list-style-type: none">▪ 10.000 (4)▪ 1.000 (4)▪ 100 (4)▪ 10 (4)▪ 0 (4) *	▪ 10.000 (4) *
UM-AD1B	16	<ul style="list-style-type: none">▪ 3.000 (4)▪ 1.000 (4)▪ 100 (4)▪ 10 (4)▪ 10.000 (4) *	10.000 (4) *
UM-AD2	20	▪ 1.000 (10)	▪ 1.000 (10)

* Mesmo grupo foi estabelecido como controle negativo para essas amostras

Figura Apêndice2 Tabela demonstra a distribuição das células nos implantes. Foram implantados 1 ou 2 *scaffolds*/animal, sendo que cada animal foi destinado exclusivamente para o grupo duplo positivo (CD44⁺ALDH⁺) ou para o grupo duplo negativo (CD44⁻ALDH⁻). Para as células UM-AD1A e UM-AD1B foi realizada uma diluição seriada, com o número de células/*scaffold* variando em cada animal. As células UM-AD2 foram implantadas em mesmo número para todos os animais.

Apêndice 3

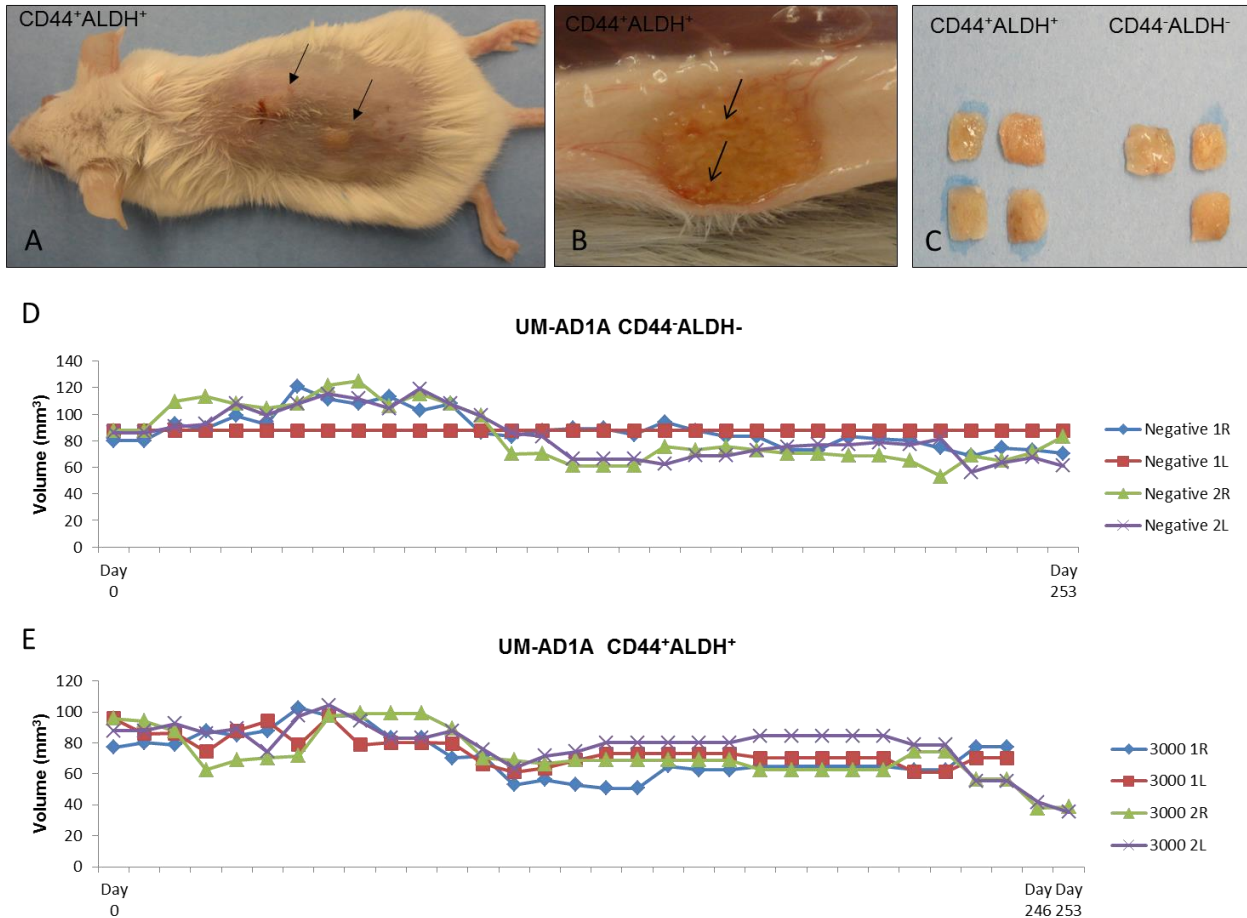


Figura Apêndice3 Experimento *in vivo*. (A) Imagem representa um animal do grupo CD44⁺ALDH⁺Lin⁻ (UM-AD1A) após 253 dias de manutenção do implante. Setas indicando o local dos implantes (B-C) demonstram os implantes durante e após a sua remoção. Em B, é possível identificar que o tecido associado aos implantes apresentava-se vascularizado (setas). (D-E) gráficos representativos de UM-AD1A demonstram a mensuração do volume dos *scaffolds* durante o período de 253 dias. As medidas foram realizadas a cada 7 dias e em nenhum dos animais, durante o experimento, foi percebido crescimento tumoral.