

# NOVO INIBIDOR DE MTOR DE ALTA ESPECIFICIDADE EM CANCRO GÁSTRICO

Miguel Pereira<sup>1</sup>, Priscila Mendes<sup>1</sup>, João Palma<sup>2</sup>, Miguel Brito<sup>1</sup>, Edna Ribeiro<sup>1</sup>, Renata Cervantes<sup>1</sup>, Ana Marques-Ramos<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>H&TRC-Health & Technology Research Center, ESTeSL- Escola Superior de Tecnologia da Saúde, Instituto Politécnico de Lisboa. <sup>2</sup>Hospital de Vila Franca de Xira, EPE. \*ana.ramos@estesl.ipl.pt

## OBJECTIVO

Desenvolver um composto que iniba especifica e totalmente o mTOR e avaliar o seu efeito terapêutico num modelo animal de tumor gastrointestinal.

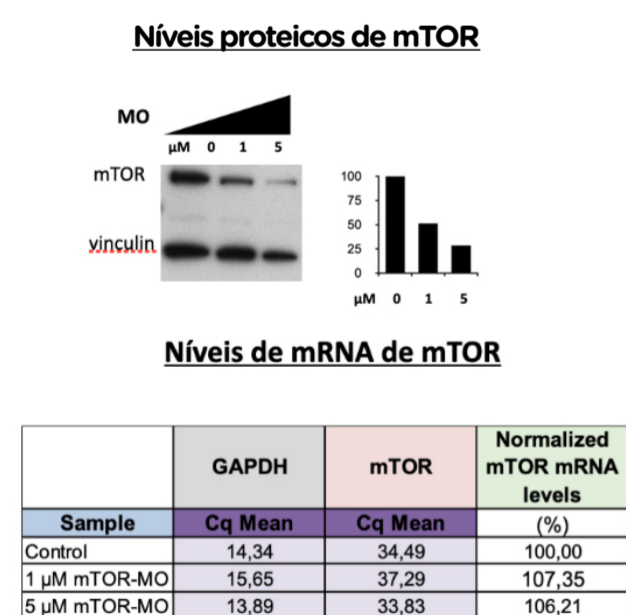
## INTRODUÇÃO

O *mechanistic target of rapamycin* (mTOR) é uma quinase que regula o crescimento, proliferação e sobrevivência celulares<sup>1</sup>. A desregulação da via de mTOR está presente em diversas patologias, sendo a sua hiperativação observada em mais de 70% de cancros humanos, incluindo cancro gástrico (CG)<sup>1</sup>. Apesar de existirem atualmente diversos inibidores de mTOR (mTORi), a sua utilização clínica ainda é limitada<sup>2</sup> devido à elevada toxicidade associada à inibição inespecífica de outras proteínas e à inibição parcial da via<sup>3-5</sup>. Assim, é crucial desenvolver uma nova classe de mTORi que iniba específica e totalmente a via do mTOR. As opções terapêuticas atuais em CG são invasivas e agressivas<sup>6</sup> e sabendo que neste tipo tumoral há hiperativação da via e sobreexpressão da proteína mTOR<sup>1</sup>, uma potencial forma de restringir a progressão CG é através da utilização de um mTORi.

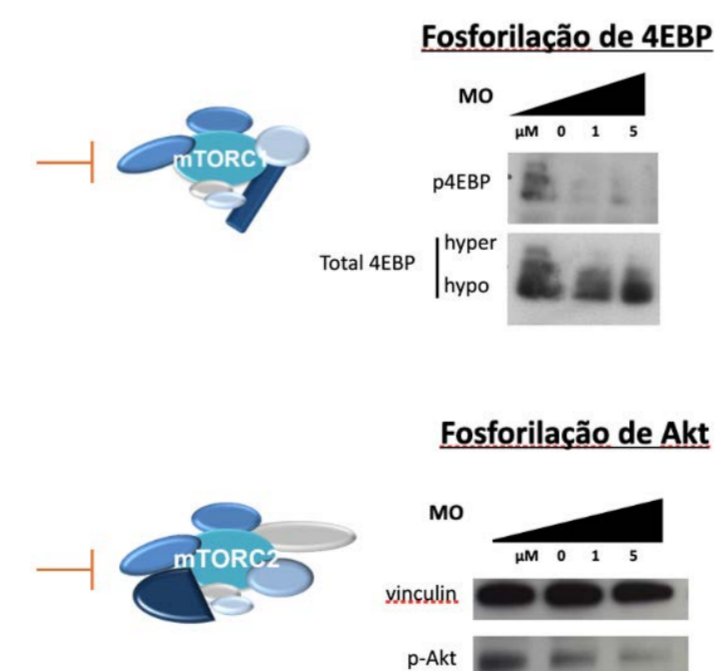
## MATERIAL E MÉTODOS

A molécula escolhida para inibir o mTOR foi um morfolino (mTOR-MO), um oligonucleótido antisense com elevada especificidade, estabilidade e ausência de toxicidade<sup>7</sup>. O mTOR-MO foi testado em gp202, uma linha celular de CG8, a 1 e 5 µM mTOR-MO durante 48h, seguindo-se a análise, por western blot, dos níveis proteicos de mTOR, 4EBP e Akt (substratos de mTOR), dos níveis de mRNA de mTOR por real-time PCR, da proliferação celular recorrendo ao teste de exclusão Azul de Tripano e da indução da morte celular, através do Apoptosis/ Necrosis Detection Kit (Abcam®). Para avaliar o potencial terapêutico de mTOR-MO em ratinhos foi induzido CG em murganhos Balb/c nude através da administração subcutânea de células gp202 (1,2x10<sup>6</sup>), quando os tumores atingiram 200 m<sup>3</sup> iniciou-se a administração intraperitoneal de mTOR-MO (15 mg/kg), 2x/semana durante 3 semanas. Os tumores resultantes foram avaliados histologicamente por 3 patologistas.

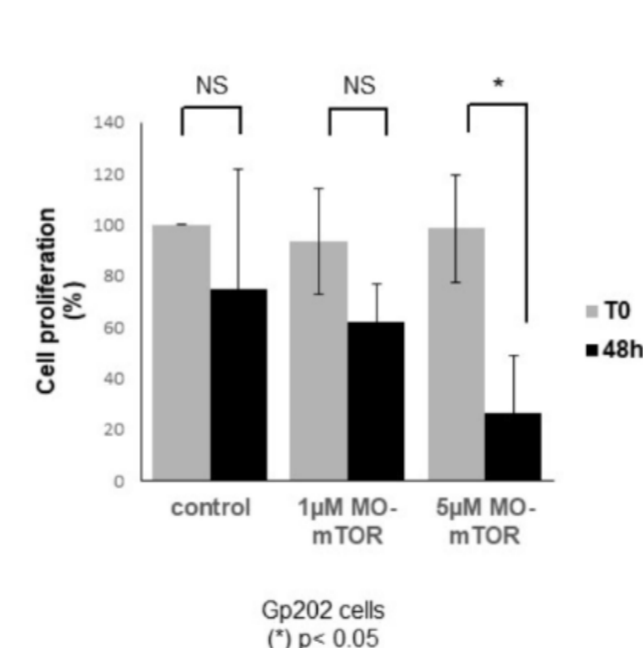
### mTOR-MO diminui os níveis proteicos de mTOR



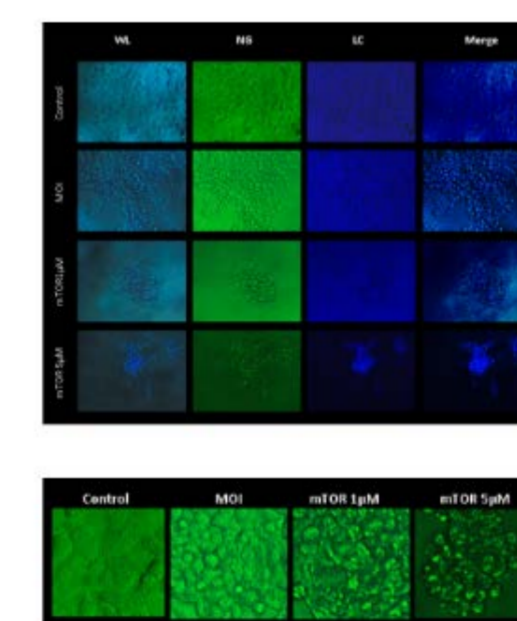
### mTOR-MO inibe a via de sinalização de mTOR



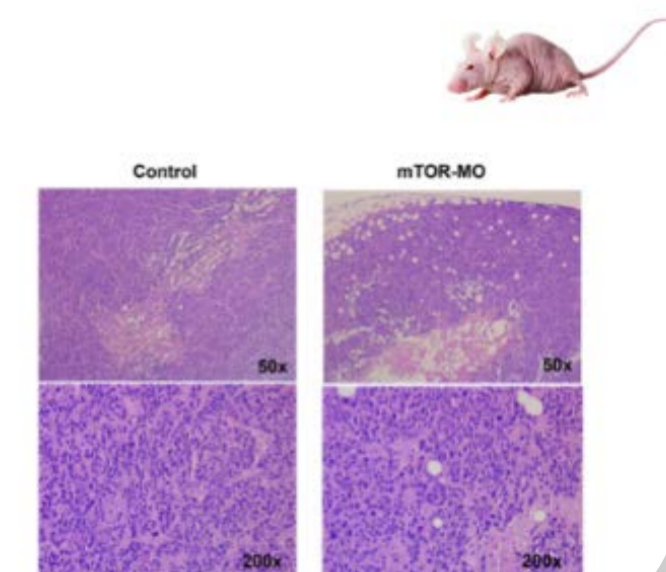
### mTOR-MO reduz a proliferação de células de cancro gástrico



### mTOR-MO induz picnose e cariorrexe



### mTOR-MO reduz a quantidade de células tumorais e aumenta a morte celular in vivo



## CONCLUSÃO

mTOR-MO é eficaz a inibir a via de sinalização de mTOR, o que se traduz numa redução expressiva da proliferação de células de CG, possivelmente pela indução da morte celular, eventos que são espelhados igualmente in vivo. Dada a sua elevada eficácia e especificidade de atuação, o mTOR-MO possui um robusto potencial terapêutico para CG.

- Marques-Ramos, A. & Cervantes, R. Expression of mTOR in normal and pathological conditions. *Mol. Cancer* 22, 112 (2023).
- Yu, K. & Toral-Barza, L. Biochemical and Pharmacological Inhibition of mTOR by Rapamycin and an ATP-Competitive mTOR Inhibitor. in *mTOR* (ed. Weichhart, T.) vol. 821 15-28 (Humana Press, Totowa, NJ, 2012).
- O'Reilly, K. E. et al. mTOR Inhibition Induces Upstream Receptor Tyrosine Kinase Signaling and Activates Akt. *Cancer Res.* 66, 1500-1508 (2006).
- Kim, L. C., Cook, R. S. & Chen, J. mTORC1 and mTORC2 in cancer and the tumor microenvironment. *Oncogene* 36, 2191-2201 (2017).
- Janku, F., Yap, T. A. & Meric-Bernstam, F. Targeting the PI3K pathway in cancer: are we making headway? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 15, 273-291 (2018).
- Pratas, A. et al. Effects of apigenin on gastric cancer cells. *Biomed. Pharmacother.* 172, 116251 (2024).
- Albertini, R. J., Judice, S. A., Recio, L. & Walker, V. E. Hprt mutant frequency and p53 gene status in mice chronically exposed by inhalation to benzene. *Chem. Biol. Interact.* 184, 77-85 (2010).
- Gärtner, F., David, L., Seruca, R., Machado, J. C. & Sobrinho-Simões, M. Establishment and characterization of two cell lines derived from human diffuse gastric carcinomas xenografted in nude mice. *Virchows Arch.* 428, (1996).

Evaluator	#1	#2	#3	mean
Sample	MO-mTOR			
Tumoral viable cells	50%	20%	60%	60%
Mitotic index	33 figures per 10 HPF	14 figures per 10 HPF	29 figures per 10 HPF	25 figures per 10 HPF
Necrosis	40%	20%	30%	30%
Fibrosis	Not documented	Not documented	Not documented	Not documented
Inflammation	Not documented	Not documented	Not documented	Not documented

Evaluator	#1	#2	#3	mean
Sample	Control MO			
Tumoral viable cells	90%	95%	95%	93%
Mitotic index	20 figures per 10 HPF	5 figures per 10 HPF	27 figures per 10 HPF	17 figures per 10 HPF
Necrosis	10%	5%	10%	8%
Fibrosis	Not documented	Not documented	Not documented	Not documented
Inflammation	Not documented	Not documented	Not documented	Not documented