

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de
hotspots mutacionais

Ana Rita Serralha de Vargas

Orientadora: Professora Doutora Ana Ramos ^{1,2}

1 – Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL)

2 – Centro de Investigação em Saúde e Tecnologia (H&TRC)

Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais

Lisboa, 2023

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

Ana Rita Serralha de Vargas

Orientadora: Professora Doutora Ana Ramos ^{1,2}

1 – Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL)

2 – Centro de Investigação em Saúde e Tecnologia (H&TRC)

Júri

Presidente: Professora Doutora Edna Ribeiro (ESTeSL)

Arguente: Doutora Vânia Gonçalves (INS – Ricardo Jorge)

Trabalho elaborado no âmbito do projeto IPL/2021/GATumor_ESTeSL.

Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais

(esta versão incluiu as críticas e sugestões feitas pelo júri)

Lisboa, 2023

Agradecimentos

Aos meus pais, Carla e Luís, que nunca deixaram de acreditar em mim.

Ao meu irmão, André, pelo muito que representa para mim.

Ao meu namorado, Rafael, por toda a motivação que me deu.

À Rita, por toda a ajuda prestada durante estes duros dois anos.

A toda a restante família, amigos e colegas, que direta ou indiretamente fizeram parte deste percurso.

À professora doutora Ana Ramos, pela orientação.

Muito obrigada!

Resumo

Introdução: O *mechanistic target of rapamycin* (mTOR) é uma proteína quinase serina/treonina que regula as células em todos os processos catabólicos e anabólicos como o crescimento, a proliferação, a motilidade e a sobrevivência celular, a síntese de proteínas, a autofagia e a transcrição. O estudo da via de sinalização mTOR, que se encontra alterada em mais de 70% dos cancros humanos, é importante para entender o desenvolvimento de um tumor maligno.

Objetivos: Sistematizar as mutações encontradas no gene mTOR em cancro e determinar se existem *hotspots* mutacionais que possam influenciar a eficácia de inibidores da proteína.

Metodologia: Foram seguidas as normas PRISMA 2020. Foi consultada a base de dados *PubMed*, onde se obteve um total de 2207 artigos. Foram aplicados critérios de inclusão e exclusão, restando os 33 artigos relevantes para o tema.

Resultados/Discussão: A grande maioria dos estudos utiliza amostras de tecido fixado em formol e embebido em parafina para a pesquisa de mutações, utilizando o NGS como tecnologia de pesquisa. Foram encontradas 161 mutações, a grande maioria *missense* com potencial patogénico e com domínios mais mutados o FAT e quinase. São encontradas mutações no gene mTOR em vários tipos de cancro, muitas em cancros renais.

Considerações finais: As posições 1450 do domínio FAT; 2215, 2419 e 2427 do domínio quinase; e 2500 da proteína mTOR são *hotspots* mutacionais do gene mTOR e podem influenciar a eficácia de inibidores desta proteína.

Palavras-chave: “mTOR”, “mutação de genes”, “cancro humano”

Abstract

Introduction: The mechanistic target of rapamycin (mTOR) is a serine/threonine protein kinase that regulates cells in all catabolic and anabolic processes such as growth, proliferation, cell motility and survival, protein synthesis, autophagy and transcription. The study of the mTOR signaling pathway, which is altered in more than 70% of human cancers, is important to understand the development of a malignant tumor.

Objectives: Systematize the mutations found in the mTOR gene in cancer and determine if they are mutational hotspots that could influence the effectiveness of protein inhibitors.

Methodology: The PRISMA 2020 standard was followed. The PubMed database was consulted, where a total of 2207 articles were obtained. Inclusion and exclusion criteria were applied, 33 articles are relevant to the theme.

Results/Discussion: The majority use formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples for mutation screening, using NGS as the screening technology. 161 mutations were found, the vast majority missense with pathogenic potential and with more mutated domains FAT and kinase. Mutations in the mTOR gene are found in several types of cancer, many in kidney cancers.

Final considerations: Positions 1450 of the FAT domain; 2215, 2419 and 2427 of the kinase domain and 2500 of the mTOR protein are mutational hotspots of the mTOR gene and may influence the effectiveness of inhibitors of this protein.

Keywords: “mTOR”, “gene mutations”, “human cancer”

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

Índice

Índice de Tabelas.....	IX
Índice de Figuras.....	XI
Lista de Abreviaturas.....	XIII
1. Introdução.....	1
2. Enquadramento Teórico.....	3
2.1 Gene mTOR (mTORC1 e mTORC2).....	3
2.1.1 Domínios mTOR.....	4
2.1.2 Tipos de mutação.....	5
2.1.3 Inibidores mTOR.....	6
2.2 Via de sinalização mTOR.....	7
2.2.1 Sinalização a montante de mTOR.....	8
2.2.2 Sinalização a jusante de mTOR.....	9
2.3 mTOR e o cancro.....	10
3. Metodologia.....	13
4. Resultados.....	17
4.1 Características dos artigos.....	35
5. Discussão.....	41
6. Considerações finais.....	43
7. Referências Bibliográficas.....	45
8. Anexos.....	51
8.1 Anexo 1.....	51
8.2 Anexo 2.....	55

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

Índice de Tabelas

Tabela 3. 1 - Critérios de inclusão e de exclusão	13
Tabela 4. 1 – Resumo dos estudos incluídos com evidências sobre as mutações do gene mTOR em cancro e os seus hotspots mutacionais (n=33), 2010-presente	17
Tabela 8. 1 – PRISMA 2020 Checklist.....	51

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

Índice de Figuras

Figura 2. 1 – A proteína mTOR existe em dois complexos, mTORC1 e mTORC2	4
Figura 2. 2 - Domínios da proteína mTOR: HEAT, FAT, FRB, KD e FATC	5
Figura 2. 3 - Correspondência dos exões com os domínios mTOR.....	5
Figura 2. 4 - Rapamicina: um inibidor mTOR	6
Figura 2. 5 Esquema geral da via de sinalização mTOR	8
Figura 3. 1 - Processo de pesquisa bibliográfico de acordo com as diretrizes PRISMA 2020.....	15
Figura 4. 1 – Tipo de cancro	35
Figura 4. 2 – Tipo de amostra analisada	36
Figura 4. 3 – Tecnologias de sequenciação utilizadas	36
Figura 4. 4 – Mutações encontradas	37
Figura 4. 5 – Tipo de mutações encontradas	38
Figura 4. 6 – Domínios mutados	38
Figura 8. 1 – PRISMA 2020 Flow diagram	55

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

Lista de Abreviaturas

AKT – *protein kinase B*

ATC – *anaplastic thyroid cancer*

ATP – *adenosine triphosphate*

CCLT – *clear cell lung tumor*

ccRCC – *Clear Cell Renal Cell Carcinoma*

chRCC – *chromophobe renal cell carcinoma*

DNA – *deoxyribonucleic acid*

eIF4E – *eukaryotic translation initiation 4E*

ERK – *extracellular signal-regulated kinase*

EVT – *eosinophilic vacuolated tumor*

GIST – *gastrointestinal stromal tumor*

HGCA – *High-grade colorectal adenoma*

KD – *kinase*

LCNEC – *large cell neuroendocrine carcinoma*

LOT – *Low-grade oncocytic tumor*

MAPK – *mitogen-activated protein kinase*

mTOR – *mechanistic target of rapamycin*

mTORC1/2 – *mechanistic target of rapamycin complex 1/2*

mRNA – *messenger RNA*

NGS – *Next-Generation Sequencing*

NSCLC – *non-small cell lung cancer*

PDAC – *pancreatic ductal adenocarcinoma*

PDK1 – *pyruvate dehydrogenase kinase 1*

PI3K – *phosphoinositide 3-kinase*

PRAS40 – *proline-rich AKT substrate 40kDa*

PRISMA – *preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses*

PTEN – *phosphatase and tensin homolog*

TOS – *TOR signaling*

TSC – *tuberous sclerosis complex*

UDH – *usual ductal hyperplasia*

uRCC – *unclassified Renal Cell Carcinoma*

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

1. Introdução

A presente revisão sistemática foi realizada no âmbito da unidade curricular Projeto/Tese/Estágio do 2º ano do Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais ministrado pela Escola Superior de Tecnologias da Saúde de Lisboa (ESTeSL) do Instituto Politécnico de Lisboa e tem como tema “Revisão Sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais”.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, cancro é o termo genérico para um grande grupo de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo. Uma característica que define as neoplasias é a rápida criação de células anormais que crescem além dos seus limites e que podem invadir partes adjacentes do corpo e espalhem-se para outros órgãos – metástases. O cancro é uma das principais causas de morte em todo o mundo, com quase 10 milhões de mortes em 2020. Os mais comuns, em 2020, foram o cancro da mama (2,26 milhões de casos), pulmão (2,21 milhões de casos), colorretal (1,93 milhão de casos), próstata (1,41 milhão de casos), pele, que não melanoma (1,20 milhão de casos) e estômago (1,09 milhão de casos). No entanto, as causas mais comuns de morte por cancro foram do pulmão (1,80 milhão de mortes), colorretal (916 000 mortes), fígado (830 000 mortes), estômago (769 000 mortes) e mama (685 000 mortes). As causas do surgimento de cancro resultam da interação entre os fatores genéticos dos indivíduos e três categorias de agentes externos (agentes carcinogénicos físicos, como a radiação ultravioleta e ionizante; agentes carcinogénicos químicos, como o amianto, componentes do tabaco, álcool, aflatoxina – um contaminante alimentar e arsénio – um contaminante da água potável; e agentes carcinogénicos biológicos, como infeções por certos vírus, bactérias ou parasitas). O risco de cancro pode ser reduzido ao não fumar, evitar ou reduzir o consumo de álcool, manter uma dieta saudável, fazer exercício físico regularmente, entre outros. O diagnóstico precoce é importante, pois a mortalidade por cancro é reduzida quando os casos são detetados e tratados precocemente (Organization, 2023).

O estudo da via de sinalização do *mechanistic target of rapamycin* (mTOR), que se encontra alterada em mais de 70% dos cancros humanos, é importante para entender o desenvolvimento de um tumor maligno. Como têm sido encontradas diversas mutações no gene mTOR sem que, contudo, sejam definidas posições proteicas comumente mutadas, o objetivo desta revisão sistemática é sistematizar essas mesmas

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

mutações e determinar se existem *hotspots* mutacionais que possam influenciar a eficácia de inibidores da proteína, uma vez que não existe nenhum estudo anterior que contenha todas as mutações do gene mTOR encontradas até ao presente.

Esta dissertação está dividida em seis capítulos, começando pela introdução ao tema, onde se encontra a pertinência do estudo e o seu objetivo, seguido do enquadramento teórico no segundo capítulo. O terceiro capítulo, denominado “Metodologia”, apresenta o método utilizado, a estratégia de pesquisa e os critérios de inclusão e exclusão dos artigos. No quarto e quinto capítulos são apresentados os resultados, que serão discutidos posteriormente. Por fim, no sexto capítulo é apresentada uma reflexão final referente aos resultados obtidos.

2. Enquadramento Teórico

2.1 Gene mTOR (mTORC1 e mTORC2)

Em 1972, durante uma expedição à Ilha de Páscoa (também conhecida como Rapa Nui), com o objetivo de identificar produtos naturais de plantas e solo com potencial terapêutico, Shegal *et al.*, identificaram, numa amostra de solo, um componente de uma bactéria (*Streptomyces hygroscopicus*) com propriedades antifúngicas, imunossupressoras e anti-tumorais, que mais tarde se veio a chamar de rapamicina (Martel *et al.*, 1976). Várias análises a este componente revelaram que atua, em parte, devido à formação de um complexo com peptidil-prolil-isomerase FKBP12 para inibir as vias de sinalização necessárias ao crescimento celular e proliferação. Apesar das ideias estabelecidas até à data, o mecanismo de ação completo da rapamicina permaneceu ilusório até 1994, quando estudos bioquímicos identificaram o *mechanistic* (antigamente conhecido como “*mammalian*”) *target of rapamycin* (mTOR) como o alvo direto do complexo rapamicina-FKB12 em mamíferos (Chung *et al.*, 1992).

O mTOR é uma proteína quinase serina/treonina que regula as células em todos os processos catabólicos e anabólicos dependentes de nutrientes como o crescimento, a proliferação, a motilidade e a sobrevivência celular, a síntese de proteínas, a autofagia e a transcrição.

O peso molecular do mTOR é de 289kDa e este existe em dois complexos multiproteicos, mTORC1 e mTORC2. O mTORC1 é um complexo proteico heterotrimérico, constituído por cinco subunidades, além do mTOR, RAPTOR, mLST8, PRAS40 e DEPTOR. Este complexo é sensível à rapamicina e a sua função está relacionada com a síntese de proteínas. O RAPTOR é necessário para a localização subcelular correta do mTOR e facilita o recrutamento de substrato para o mTOR, ligando-se a TOS no substrato mTORC1. mLST8 foi proposto para associar ao domínio catalítico do complexo e estabilizar o laço quinase, não sendo essencial para a sinalização mTORC1. As suas subunidades restantes, PRAS40 e DEPTOR, foram caracterizadas como reguladores negativos. Dessa forma, quando a atividade do mTORC1 é reduzida, as duas subunidades são recrutadas para o complexo e promovem a inibição do mTORC1 (Seeboeck *et al.*, 2019). O mTORC2 é constituído pelas proteínas mTOR, DEPTOR, RICTOR, mLST8 e mSIN1, PROTOR, envolvidas na regulação das funções do citoesqueleto, estimulam fibras de actina, paxilina, RhoA, RAC1 e proteína quinase C (PKC α). Este complexo não é sensível à rapamicina, a não

ser com tratamentos prolongados (Jiang & Liu, 2008). A figura 2.1 diz respeito aos dois complexos onde o mTOR existe, mTORC1 e mTORC2.

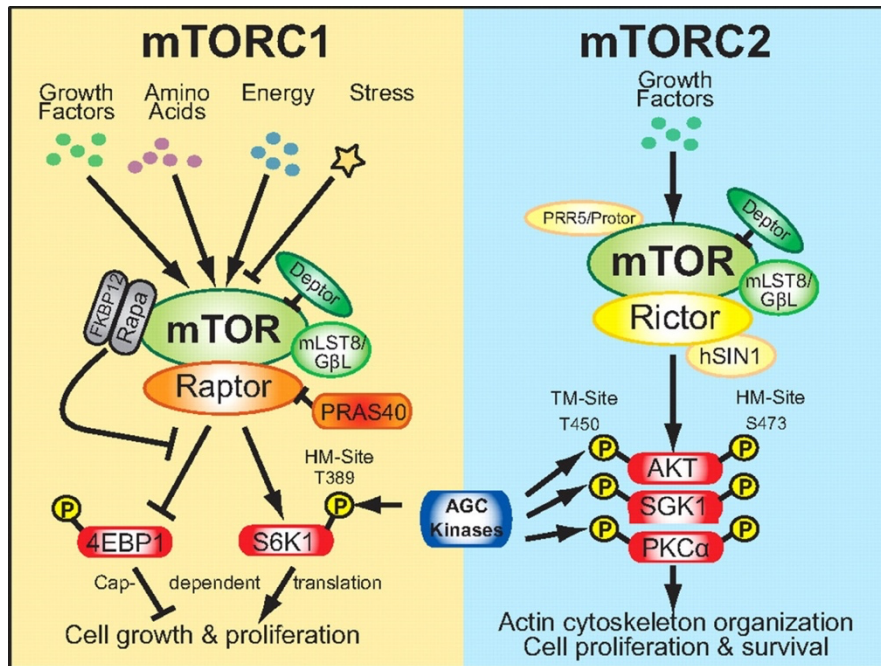


Figura 2. 1 – A proteína mTOR existe em dois complexos, mTORC1 e mTORC2

Fonte: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925820548515>

2.1.1 Domínios mTOR

O mTOR contém 2549 aminoácidos e compreende diferentes domínios estruturais ao nível da proteína, que o distingue de outras proteínas quinases. Do N-terminal ao C-terminal, possui repetições do domínio HEAT com aproximadamente 40 aminoácidos cada, o domínio FAT (FRAP-ATM-TRAP), que consiste em quatro hélices α , o domínio de ligação FKBP12-rapamicina (FRB), o domínio quinase (KD), onde o ATP e os substratos a serem fosforilados se ligam e o domínio FATC (FAT-C-terminal) (Uniprot, 2023). Na figura 2.2 é possível observar a proteína mTOR, assim como o aminoácido onde começa e acaba cada domínio. Na figura 2.3 está representado o gene mTOR e os exões onde começam e acabam cada domínio.

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

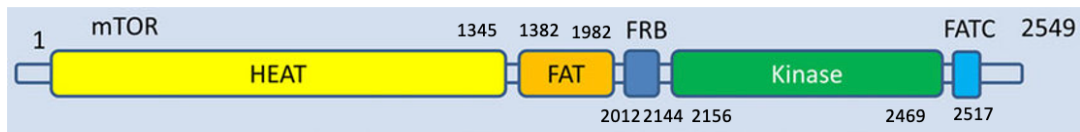


Figura 2. 2 - Domínios da proteína mTOR: HEAT, FAT, FRB, KD e FATC

Adaptado: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/cmb.2015.0103>



Figura 2. 3 - Correspondência dos exões com os domínios mTOR

Adaptado: <https://thenounproject.com/browse/icons/term/gene/>

2.1.2 Tipos de mutação

Uma mutação é qualquer alteração estável na cadeia de DNA que pode passar à descendência. Existem vários tipos de mutações, entre os quais:

1. Mutações *sinónimas*: onde ocorre uma mudança de uma das bases do DNA, que muda o tripleto de nucleótidos da sequência, mas acaba por codificar o mesmo aminoácido. Isto porque uma das características do código genético é ser “redundante”;
2. Mutações *missense*: onde ocorre uma mudança de uma das bases do DNA, que muda o tripleto de nucleótidos da sequência, passando a codificar um aminoácido diferente do que seria esperado;
3. Mutações *nonsense*: onde ocorre uma mudança de uma das bases do DNA, que muda o tripleto de nucleótidos da sequência, passando a codificar um codão de terminação. Ou seja, a proteína é cortada prematuramente;
4. Mutações *frameshift*: onde ocorre uma alteração na grelha de leitura, por inserção, duplicação ou deleção de bases do DNA (Oiseth *et al*, 2022).

2.1.3 Inibidores mTOR

Os inibidores de mTOR mais conhecidos são a rapamicina e os seus análogos, também chamados de rapalogs, que demonstraram algum efeito na terapia anti-tumoral.

A rapamicina (representada na figura 2.4) é uma lactona macrocíclica, produzida pela bactéria *Streptomyces hygroscopicus* e foi o primeiro inibidor de mTOR a ser descoberto (Eng *et al.*, 1984). Esta entra nas células e liga-se ao recetor FKBP12, formando, assim, um complexo inibidor. Esse complexo inibidor liga-se à região C-terminal de proteínas denominadas TOR FRB, onde exerce um efeito citotóxico, inibindo as funções de sinalização TOR para alvos a jusante (Oshiro, 2004).

A rapamicina apresenta como grandes desvantagens a sua fraca solubilidade em água e a sua baixa estabilidade físico-química. Foi para ultrapassar essas limitações que foram desenvolvidos os seus análogos, com propriedades farmacocinéticas melhoradas, como o temsirolímus, que atua inibindo a fosforilação do mTOR ao nível de S6K1 e 4E-BP1, e o deforolímus, que diminui a fosforilação também de 4E-BP1. Contudo, o sucesso clínico dos análogos da rapamicina tem sido limitado a alguns cancros raros e as taxas de resposta em grandes tumores têm sido modestas, uma vez que é cada vez mais reconhecido que este mecanismo é insuficiente na obtenção de um efeito anticancerígeno forte quando utilizados sozinhos (Zhou *et al.*, 2010). Apesar da constante procura, ainda não foi desenvolvida uma molécula enzimaticamente estável que consiga a inibição total da via mTOR.

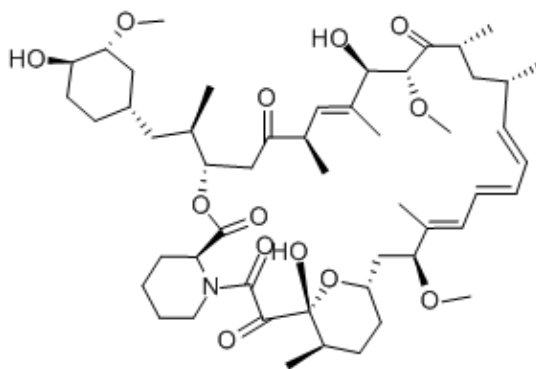


Figura 2. 4 - Rapamicina: um inibidor mTOR

Fonte: <https://www.chemwhat.pt/rapamicina-cas-53123-88-9/>

Atualmente, estão a ser desenvolvidas outras classes de inibidores de mTOR como os inibidores competitivos ATP, que se encontram em fase de ensaios clínicos. O

desenvolvimento de novos fármacos capazes de inibir mTOR por processos diferentes da rapamicina apresenta uma abordagem mais eficaz e consegue contornar problemas relacionados com a utilização de análogos que só inibem o complexo mTORC1. Entre eles, pode-se destacar moléculas como a PP242 e PP30, que inibem tanto p70S6K1 como 4E-BP1 (Schenone *et al.*, 2011). Outras moléculas em fase de estudo são os chamados inibidores seletivos, que também inibem ambos os complexos mTOR. Elas são o INK128 e o AZD8055, ambos em fase I de ensaios clínicos e com grandes resultados em leucemias (pela indução da apoptose) e carcinomas hepatocelulares em estado avançado, respetivamente (García-Echeverría, 2010).

2.2 Via de sinalização mTOR

A via de sinalização PI3K/AKT/mTOR tem sido considerada uma via fundamental nos processos que envolvem a proliferação, migração, invasão, crescimento, diferenciação, sobrevivência e metabolismo celular, sendo que a desregulação do gene que codifica o mTOR implica graves consequências para a mesma (Corradetti & Guan, 2006). A figura 2.5 representa um esquema abrangente da via de sinalização PI3K/AKT/mTOR.

no cancro da próstata, colorretal, mama, tireoide, rim, linfomas, melanomas e glioblastomas.

A PI3K e a PTEN são proteínas implicadas na perda de sensibilidade à insulina de tumores malignos. Mutações no gene que codifica a PTEN são verificadas em algumas doenças benignas congénitas, bem como em vários tumores, enfatizando o papel da PTEN e consequentemente do PI3K na carcinogénese (Cortot *et al*, 2006).

A proteína AKT é uma quinase serina/treonina que desempenha funções em vários processos celulares como metabolismo da glicose, apoptose, proliferação, transcrição e migração celular. Existem três tipos (AKT 1, 2, 3), cada um codificado por um gene diferente e a sua expressão varia, sendo a AKT2 a mais abundante nos tecidos sensíveis à insulina. Anomalias ao nível da AKT (amplificação) estão envolvidas no cancro da próstata, ovários e mama. Também aparece frequentemente ativada em tumores do pâncreas, representando um indicador biológico da agressividade tumoral. A AKT é o principal elo de ligação entre o PI3K e o complexo TSC, sendo que a inibição de AKT pode ser suficiente para o bloqueio da ativação de mTORC1, sendo a AKT a molécula-chave para a ativação deste complexo (Cortot *et al*, 2006).

A via Ras/Raf/MEK/ERK é ativada por muitos fatores de crescimento e citocinas que são importantes para a proliferação celular e apoptose. Esta via tem como alvo o complexo TSC2, uma vez que o Ras ativado induz a fosforilação da TSC2. A Ras ativa a Raf, depois de estimulada por fatores de crescimento, hormonas ou citocinas (Roux *et al*, 2004). A Raf fosforila a MEK, que ativa a ERK e esta fosforila substratos essenciais para a regulação da expressão, metabolismo e rearranjos do citoesqueleto (Jiang & Liu, 2008).

2.2.2 Sinalização a jusante de mTOR

Como dito anteriormente, a via mTOR desempenha um papel crucial na síntese de proteínas e sobrevivência celular. O mTORC1 regula o crescimento celular, no entanto, este é realizado por intermédio de reguladores de tradução como o 4EBP1 e o p70S6K1.

O 4EBP1 atua como repressor da tradução por ligação e inativação de eIF4E. O mTOR fosforila diretamente e inibe a atividade de 4EBP1, podendo também, indiretamente, inibir a fosfatase da proteína, que por sua vez, desfosforila 4EBP1 durante as etapas do ciclo celular G1 para S (Sonenberg & Gingras, 1998).

O eIF4E é um fator de iniciação, que é ativado por vários estímulos mutagénicos. A fosforilação do 4EBP1 faz com que haja libertação de eIF4E, que juntamente com outros

fatores de iniciação, vão permitir que haja a identificação do codão de iniciação AUG, permitindo o início da tradução. O eIF4E aumenta a proliferação, sobrevivência celular e angiogénese. Este processo sofre regulação através da proteína RAPTOR, pois quando esta está presente no complexo mTOR, este fosforila o 4EBP1 e o p70S6K1 (Ciuffreda *et al.*, 2010).

O p70S6K1 é uma quinase serina/treonina importante a jusante do mTOR, podendo também ser ativada por PDK1 e MAPK. O mTOR fosforila o p70S6K1, conduzindo à recolha de subunidades 40S dos ribossomas, aumentando, conseqüentemente, a tradução de mRNAs. A amplificação da região do DNA que codifica o p70S6K1 e a sua sobreexpressão são encontradas em algumas linhas celulares do cancro da mama (Jiang & Liu, 2008).

2.3 mTOR e o cancro

A via de sinalização mTOR é frequentemente ativada em cancros humanos, sendo que estudos demonstram que mutações ao nível desta via provocam perturbações no crescimento celular e no metabolismo que contribuem significativamente para o desenvolvimento de tumores (Yecies & Manning, 2011).

Existem vários artigos que relacionam a via mTOR e o cancro, dando uma visão geral dos níveis proteicos dos vários genes pertencentes à via em várias neoplasias distintas:

1. PTEN reduzida ou inativada em gliomas, melanomas, cancro da próstata e da mama (Schenone *et al.*, 2011);
2. TSC e quinase de ligação GTP K-Ras mutadas no cancro da bexiga (Jiang & Liu, 2008);
3. Várias proteínas da via mTOR com atividade de tirosina quinase sobreexpressas em tumores gastrointestinais, do fígado, do pâncreas e do pulmão e desreguladas em carcinomas de células renais (Schenone *et al.*, 2011).

A ativação exagerada da sinalização mTOR contribui significativamente para o início e desenvolvimento de tumores, sabendo-se que a atividade mTOR é desregulada em muitos tipos de cancro, incluindo carcinomas da mama, próstata, pulmão, melanoma, bexiga, cérebro e renal. As razões para a ativação são várias, entre as mais comuns estão mutações no gene PTEN (supressor de tumor) e o aumento da atividade PI3K e AKT. Além disso, a sobreexpressão a jusante de mTOR, também leva a um mau

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

prognóstico do cancro. Demonstrou-se que o aumento da atividade do mTOR impulsiona a progressão do ciclo celular e aumenta a proliferação celular, principalmente devido ao seu efeito na síntese de proteínas. Além disso, o mTOR ativo suporta o crescimento do tumor e inibe a autofagia. Este, fornece oxigénio e nutrientes às células do carcinoma, aumentando a tradução e a angiogénese.

O objetivo desta revisão sistemática é sistematizar as mutações encontradas no gene mTOR em cancro e determinar se existem *hotspots* mutacionais que possam influenciar a eficácia de inibidores da proteína.

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

3. Metodologia

Foi realizada uma revisão sistemática da literatura do tipo qualitativo, seguindo as normas *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA). As diretrizes PRISMA 2020 consistem numa *checklist* com 27 itens (Anexo 1) e um fluxograma constituído por quatro fases, denominadas identificação, seleção, elegibilidade e inclusão (Anexo 2), que têm o objetivo de reunir e sintetizar resultados de vários estudos.

Fase de identificação

Nesta primeira fase, foi consultada a base de dados *PubMed*. A estratégia de pesquisa foi definida por meio do operador booleano “AND”, com a seguinte chave de pesquisa: (*mTOR*) AND (*gene mutation*) AND (*human cancer*). A pesquisa obteve um total de 2207 artigos identificados. Nesta fase, foram também excluídos os artigos duplicados (5), ficando um total de 2202 artigos.

Fase de seleção

Na segunda fase, realizada de 11 de novembro de 2022 a 06 de fevereiro de 2023, com o objetivo de limitar os resultados, foram aplicados critérios de inclusão e de exclusão, descritos na Tabela 3.1:

Tabela 3. 1 - Critérios de inclusão e de exclusão

	Critérios de inclusão	Critérios de exclusão
Ano de publicação	A partir de 2010, inclusive	Antes de 2010
Idioma	Inglês	Outros
Humanos/animais	Humanos	Animais
Genes	mTOR	Outros

Fonte: autor

Através da leitura dos resumos (*abstract*), no fim desta fase, foram excluídos 2091 artigos, por serem revisões sistemáticas ou artigos publicados antes de 2010, em idiomas que não inglês, em animais e sobre outros genes da via que não mTOR, ficando assim 112 que seguiam para a fase de elegibilidade.

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

Fase de elegibilidade

Nesta fase, realizada de 07 de fevereiro a 10 de junho de 2023, os 112 artigos que satisfaziam os critérios de inclusão foram analisados de forma integral. Foram excluídos 78 artigos, 71 porque não continham, pelo menos, uma mutação do gene mTOR e 7 por não ter sido encontrado o artigo completo.

Fase de inclusão

Foram incluídos 33 artigos relevantes para o tema desta revisão sistemática. Todo o processo de pesquisa bibliográfica encontra-se representado na Figura 3.1:

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

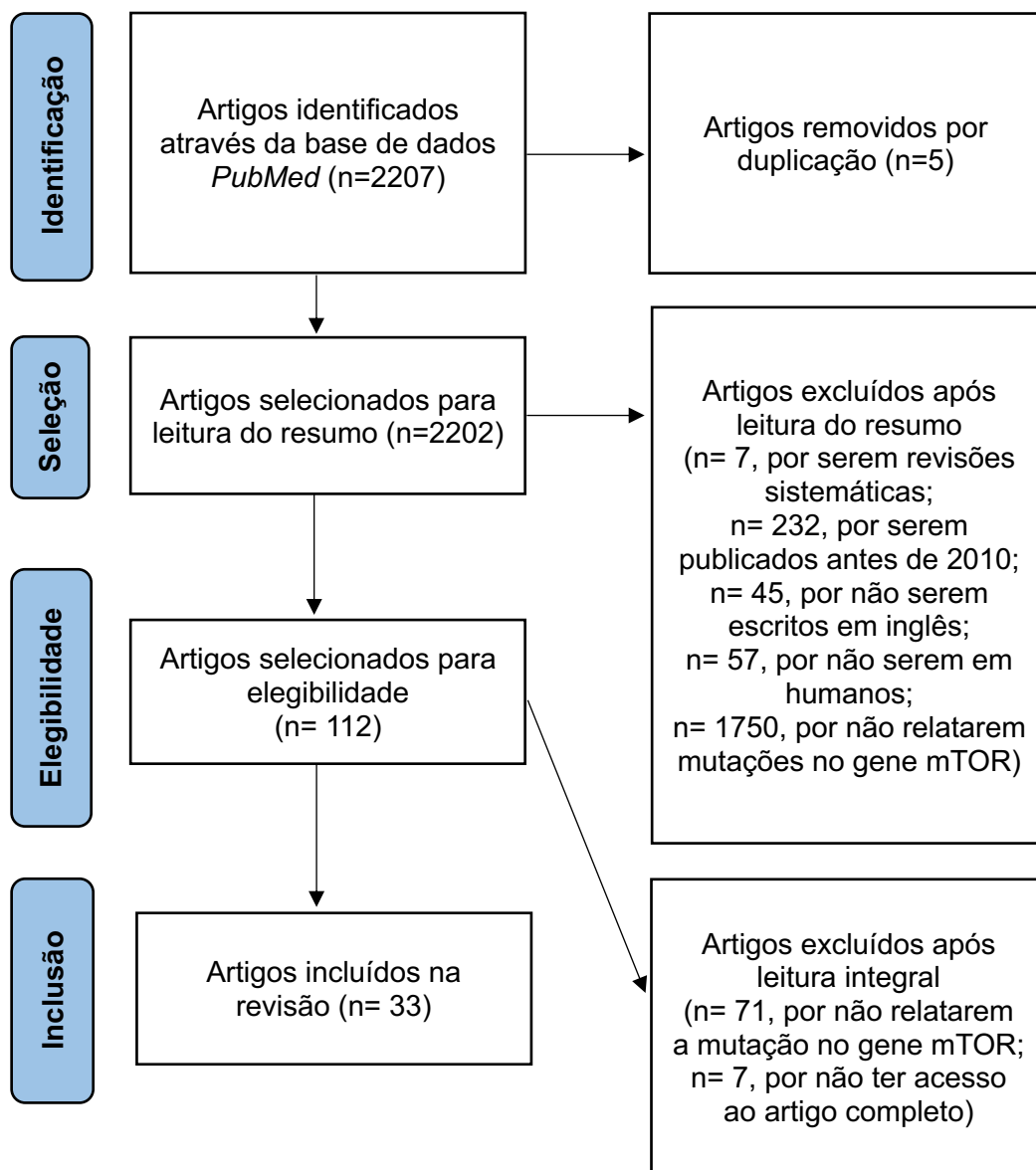


Figura 3. 1 - Processo de pesquisa bibliográfico de acordo com as diretrizes PRISMA 2020

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

4. Resultados

Na tabela abaixo são apresentados os artigos seleccionados, considerando para cada um, o autor e ano, a amostra (n), o tipo de cancro, a amostra analisada, a tecnologia utilizada para a pesquisa das mutações, as mutações encontradas, o domínio da proteína mutado, o tipo de mutação e o seu significado biológico.

Tabela 4. 1 – Resumo dos estudos incluídos com evidências sobre as mutações do gene mTOR em cancro e os seus hotspots mutacionais (n=33), 2010-presente

Autor (ano)	Amostra (n)	Tipo de cancro	Amostra analisada	Tecnologia utilizada para a pesquisa de mutações	Mutação	Domínio da proteína	Tipo de mutação	Significado biológico da mutação
Bellmunt, J., et al. (2018)	2/19	Carcinoma urotelial metastático	Amostras de tecido de bexiga	NGS (DNA exónico de 400 genes)	1. NM_004958.3:c.6040G>A (NP_004949.1:p.Glu2014Lys) e NM_004958.3:c.7255G>A (NP_004949.1:p.Glu2419Lys) 2. NM_004958.3:c.3654+3G>A	FRB quinase HEAT 29	<i>Missense</i> <i>Missense</i> <i>Splicing</i>	Mutações p.Glu2014Lys e p.Glu2419Lys são mutações ativadoras e foram observadas no paciente com resposta total à terapia combinada everolímus e pazopanib. Mutação c.3654+3G>A observada em paciente com resposta parcial à terapia
Brugarolas, J. (2014)	5/100	Carcinoma de células renais do	-	-	NM_004958.3:c.4379T>C (NP_004949.1:p.Leu1460Pro)	FAT	<i>Missense</i>	Essas mutações aumentam a atividade do mTORC1, não

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

		tipo de células claras (ccRCC)			NM_004958.3:c.6644C>A (NP_004949.1:p.Ser2215Tyr) NM_004958.3:c.7514G>C (NP_004949.1:p.Arg2505Pro)	quinase N.A.	<i>Missense</i> <i>Missense</i>	parecendo aumentar do mTORC2. Nas mutações p.Leu1460Pro e p.Ser2215Tyr, a sensibilidade ao serolímus foi preservada
Chen, Y-B., et al. (2016)	5/62	Carcinoma de células renais com histologia não classificada (uRCC)	Amostras de tecido congelado e amostras de tecido fixado em formol e embebido em parafina	NGS (DNA exónico de 230 oncogenes, genes supressores de tumor e vias consideradas acionáveis)	NM_004958.3:c.5917A>T (NP_004949.1:p.Ile1973Phe) NM_004958.3:c.7280T>G (NP_004949.1:p.Leu2427Arg) (3x) NM_004958.3:c.7423G>A (NP_004949.1:p.Val2475Met)	FAT quinase N.A.	<i>Missense</i> <i>Missense</i> <i>Missense</i>	Foram gerados mutantes mTOR p.Leu2427Arg e p.Val2475Met, que sugeriram que as mutações p.Ile1973Phe e p.Leu2427Arg provavelmente são patogénicas, enquanto que a mutação p.Val2475Met pode ser uma mutação <i>passenger</i>
Coleman, N., et al. (2021)	1	Adenocarcinoma endometrial metastático IB grau II (pulmonar)	Amostras de tecido fixado em formol e embebido em parafina	NGS (DNA exónico de 143 genes)	NM_004958.3:c.4376C>A (NP_004949.1:p.Ala1459Asp)	FAT	<i>Missense</i>	A mutação mTOR ativadora surgiu como um mecanismo de resistência adquirido à inibição AKT (ARQ751) e resposta subsequente à inibição dos complexos mTORC1 e mTORC2
Cui, M., et al. (2019)	1/19	Carcinoma da paratireoide recorrente (10) ou metastático (6 pulmão,	Amostras de tecido de 10 µm fixado em formol e embebido em parafina	NGS (DNA exónico de 560 genes)	NM_004958.3:c.1832_1881del (NP_004949.1:p.Leu611Profs*18) NM_004958.3:c.4850dupA (NP_004949.1:p.Ile1618Aspfs*31)	HEAT 15 FAT	<i>Frameshift</i> <i>Frameshift</i>	A mutação p.Leu611Profs*18 teve uma mudança na grelha de leitura, onde o Leu611 foi o primeiro aminoácido a ser alterado para Pro. O novo codão stop é na

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

		1 fígado, 1 linfonodo e 1 tecido subcutâneo)						posição 18. A mutação p.Ile1618Aspfs*31 teve uma mudança na grelha de leitura, onde o Ile1618 foi o primeiro aminoácido a ser alterado para Asp. O novo codão stop é na posição 31 – provavelmente serão patogénicas
Every, M. J., et al. (2018)	1	Carcinoma urotelial de baixo grau da bexiga e um tumor simultâneo do trato urinário superior de alto grau com metástase pulmonar	Amostras de tecido fixado em formol e embebido em parafina (dos dois tumores e da metástase)	Sequenciamento do exoma	Metástase pulmonar: NM_004958.3:c.4448G>T (NP_004949.1:p.Cys1483Phe)	FAT	<i>Missense</i>	A mutação mTOR ativadora é importante para a metástase pulmonar. O inibidor de mTOR everolimus inibiu a sinalização mTOR a jusante e induziu a citotoxicidade nas células tumorais metastáticas
Farçaş, M., et al. (2022)	8/19	Tumor vacuolado eosinofílico (EVT)	-	NGS (DNA exónico de 592 genes)	NM_004958.3:c.7280T>G (NP_004949.1:p.Leu2427Arg) (2x) NM_004958.3:c.7257_7259delinsTGT (NP_004949.1:p.Glu2419_Ala2420delinsAspVal)	quinase quinase	<i>Missense</i> <i>Frameshift</i>	As mutações mTOR relatadas serão provavelmente patogénicas

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

					<p>NM_004958.3:c.7280T>A (NP_004949.1:p.Leu2427Gln) (2x)</p> <p>NM_004958.3:c.5930C>A (NP_004949.1:p.Thr1977Lys)</p> <p>NM_004958.3:c.7280T>C (NP_004949.1:p.Leu2427Pro)</p> <p>NM_004958.3:c.4343_4363del (NP_004949.1:p.Thr1448_Glu 1455delinsLys)</p>	<p>quinase</p> <p>FAT</p> <p>quinase</p> <p>FAT</p>	<p><i>Missense</i></p> <p><i>Missense</i></p> <p><i>Missense</i></p> <p><i>Frameshift</i></p>	
Gao, X., et al. (2018)	2/14	Carcinoma de células renais metastático	Amostras de tecido fixado em formol e embebido em parafina	NGS (DNA exónico de 300 genes e 113 intrões de 35 genes)	<p>NM_004958.3:c.7257A>C</p> <p>NM_004958.3:c.7257A>T (NP_004949.1:p.Glu2419Asp)</p> <p>NM_004958.3:c.6644C>A (NP_004949.1:p.Ser2215Tyr)</p>	<p>quinase</p> <p>quinase</p>	<p><i>Missense</i></p> <p><i>Missense</i></p>	O único paciente que teve uma resposta parcial ao everolimus abrigou uma mutação mTOR p.Glu2419Asp na amostra metastática pré-tratamento
Hu, Y., et al. (2021)	4/41	Adenoma da paratireoide	Tecido embebido em solução RNAlater e sangue periférico	NGS (WES e RNA-seq)	<p>NM_004958.3:c.7257A>C</p> <p>NM_004958.3:c.7257A>T (NP_004949.1:p.Glu2419Asp)</p> <p>NM_004958.3:c.6644C>T (NP_004949.1:p.Ser2215Phe)</p> <p>NM_004958.3:c.4079T>C (NP_004949.1:p.Leu1360Ser)</p> <p>NM_004958.3:c.7501A>T (NP_004949.1:p.Ile2501Phe)</p>	<p>quinase</p> <p>quinase</p> <p>N.A.</p> <p>N.A.</p>	<p><i>Missense</i></p> <p><i>Missense</i></p> <p><i>Missense</i></p> <p><i>Missense</i></p>	O mTOR é um gene <i>driver</i> do adenoma da paratireoide

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

Ichimura, K., et al. (2016)	11/197	124	Tumor de células germinativas do sistema nervoso central (70 germinomas puros e 54 tumores de células germinativas não germinomatosas)	194 amostras de tecido congelado, 3 amostras de tecido fixado em formol e embebido em parafina e 68 amostras de sangue	Sequenciação de Sanger (WES)	NM_004958.3:c.3238C>T (NP_004949.1:p.Arg1080Cys)	HEAT 26	Missense	Todas as mutações mTOR foram encontradas nos tumores de células germinativas do SNC
		65	Tumor de células germinativas testiculares (39 seminomas e 26 GCTs não germinomatosos)			NM_004958.3:c.4358T>C (NP_004949.1:p.Leu1453Pro)	FAT	Missense	
						NM_004958.3:c.5912C>T (NP_004949.1:p.Ala1971Val)	FAT	Missense	
8	Tumor de células germinativas metastático para o sistema	NM_004958.3:c.5941A>G (NP_004949.1:p.Lys1981Glu)	FAT	Missense					
		NM_004958.3:c.6643T>C (NP_004949.1:p.Ser2215Pro)	quinase	Missense					
		NM_004958.3:c.6644C>T (NP_004949.1:p.Ser2215Phe)	quinase	Missense					
		NM_004958.3:c.5997T>A (NP_004949.1:p.Cys1999fs)	N.A.	Frameshift					
		NM_004958.3:c.6725A>G (NP_004949.1:p.His2242Arg)	quinase	Missense					
		NM_004958.3:c.6981G>T	quinase	Missense					
		NM_004958.3:c.6981G>A	quinase	Missense					
		NM_004958.3:c.6981G>C (NP_004949.1:p.Met2327Ile)	quinase	Missense					
		NM_004958.3:c.7000T>G (NP_004949.1:p.Leu2334Val)	quinase	Missense					
		NM_004958.3:c.7247C>A (NP_004949.1:p.Ala2416Asp)	quinase	Missense					

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

			nervoso central						
Jahn, S. W., et al. (2016)	1/16	9	Hiperplasia ductal usual (UDH) da mama não associada a quaisquer alterações neoplásicas atualmente reconhecidas (papiloma e cancro da mama invasivo)	Amostras de tecido fixado em formol e embebido em parafina	NGS (DNA exónico de 409 genes)	NM_004958.3:c.7216G>A (NP_004949.1:p.Val2406Met)	quinase	<i>Missense</i>	A mutação p.Val2406Met foi encontrada na UDH da mama dentro do papiloma intraductal e é considerada uma mutação <i>driver</i>
		7	Hiperplasia ductal usual (UDH) da mama dentro do papiloma intraductal						
Kapur, P., et al. (2022)	4/7		Tumor renal oncocítico de baixo grau (LOT)	Amostras de tecido de 3-5 µm fixado em formol e embebido	NGS para pesquisa e PCR e sequenciação de Sanger para	NM_004958.3:c.7280T>A (NP_004949.1:p.Leu2427Gln) NM_004958.3:c.6644C>A (NP_004949.1:p.Ser2215Tyr) NM_004958.3:c.7237_7238del insCT (NP_004949.1:p.Ser2413Leu)	quinase quinase quinase	<i>Missense</i> <i>Missense</i> <i>Missense</i>	As mutações mTOR relatadas serão provavelmente ativadoras

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

			em parafina	validação (WES)	NM_004958.3:c.4354_4365del (NP_004949.1:p.Lys1452_Glu1455del)	FAT	<i>Frameshift</i>		
Kong, Y., et al. (2016)	43/412	210	Melanoma acral	Amostras de tecido fixado em formol e embebido em parafina	Sequenciação de Sanger (DNA exónico de 58 genes)	NM_004958.3:c.3383C>T (NP_004949.1:p.Pro1128Leu) (2x)	HEAT 27	<i>Missense</i>	Mutações não sinónimas do mTOR em pacientes com melanoma é bastante frequente e o mTOR pode, portanto, ser um alvo de potencial para a terapia direcionada em pacientes asiáticos com melanoma
		105	Melanoma mucosal			NM_004958.3:c.3824T>C (NP_004949.1:p.Val1275Ala) (2x)	HEAT 31	<i>Missense</i>	
						NM_004958.3:c.3907T>C (NP_004949.1:p.Cys1303Arg) (2x)	HEAT 31	<i>Missense</i>	
30	Melanoma na pele com dano crónico induzido pelo sol	NM_004958.3:c.5506G>A (NP_004949.1:p.Ala1836Thr) (2x)	FAT	<i>Missense</i>					
		NM_004958.3:c.5741G>C (NP_004949.1:p.Gly1914Ala) (2x)	FAT	<i>Missense</i>					
					NM_004958.3:c.5499_5510del (NP_004949.1:p.Thr1834_Thr1837del) (2x)	FAT	<i>Frameshift</i>		
					NM_004958.3:c.5484_5496del (NP_004949.1:p.1830_1833delATTA) (2x)	FAT	<i>Frameshift</i>		

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

		58	Melanoma na pele sem dano crónico induzido pelo sol			NM_004958.3:c.514C>G (NP_004949.1:p.Leu172Val)	HEAT 5	<i>Missense</i>	
						NM_004958.3:c.643G>T (NP_004949.1:p.Ala215Ser)	HEAT 6	<i>Missense</i>	
						NM_004958.3:c.696G>T NM_004958.3:c.696G>C	HEAT 7	<i>Missense</i>	
						(NP_004949.1:p.Gln232His) NM_004958.3:c.931C>T	HEAT 9	<i>Missense</i>	
						(NP_004949.1:p.Arg311Cys) NM_004958.3:c.1115A>T	HEAT 11	<i>Missense</i>	
						(NP_004949.1:p.Gln372Leu) NM_004958.3:c.1437T>C	HEAT 17	Sinónima	
						(NP_004949.1:p.Asp479=) NM_004958.3:c.2147G>A	HEAT 24	<i>Missense</i>	
						(NP_004949.1:p.Gly716Asp) NM_004958.3:c.2997C>T	HEAT 27	Sinónima	
						(NP_004949.1:p.Asn999=) NM_004958.3:c.3366T>G	HEAT 27	<i>Missense</i>	
						NM_004958.3:c.3366T>A NM_004958.3:c.3364T>C	HEAT 27	<i>Missense</i>	
		9	Desconhecido			(NP_004949.1:p.Phe1122Leu) NM_004958.3:c.3401C>T	HEAT 27	<i>Missense</i>	
						(NP_004949.1:p.Ala1134Val) NM_004958.3:c.3415G>A	HEAT 28	<i>Missense</i>	
						(NP_004949.1:p.Val1139Met) NM_004958.3:c.3550C>G	HEAT 30	<i>Missense</i>	
						(NP_004949.1:p.Leu1184Val) NM_004958.3:c.3703C>T	HEAT 31	<i>Missense</i>	
						(NP_004949.1:p.Arg1235Trp) NM_004958.3:c.3913G>A	HEAT 28	<i>Missense</i>	
						(NP_004949.1:p.Ala1305Thr) NM_004958.3:c.3462G>C	HEAT 30	Sinónima	
						(NP_004949.1:p.Arg1154=)			

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

					NM_004958.3:c.3752A>C (NP_004949.1:p.Glu1251Ala)	HEAT 30	<i>Missense</i>	
					NM_004958.3:c.3802G>A (NP_004949.1:p.Ala1268Thr)	HEAT 32	<i>Missense</i>	
					NM_004958.3:c.3986T>C (NP_004949.1:p.Leu1329Pro)	N.A.	<i>Missense</i>	
					NM_004958.3:c.4070T>C (NP_004949.1:p.Leu1357Pro)	FAT	<i>Missense</i>	
					NM_004958.3:c.4330G>A (NP_004949.1:p.Glu1444Lys)	FAT	<i>Missense</i>	
					NM_004958.3:c.4731G>A (NP_004949.1:p.Ala1577=)	FAT	Sinónima	
					NM_004958.3:c.4680C>T (NP_004949.1:p.Ala1560=)	FAT	Sinónima	
					NM_004958.3:c.4487A>T (NP_004949.1:p.Gln1496Leu)	FAT	<i>Missense</i>	
					NM_004958.3:c.5044T>C (NP_004949.1:p.Ser1682Pro)	FAT	<i>Missense</i>	
					NM_004958.3:c.5107A>G (NP_004949.1:p.Asn1703Asp)	FAT	<i>Missense</i>	
					NM_004958.3:c.5469C>T (NP_004949.1:p.Ala1823=)	FAT	Sinónima	
					NM_004958.3:c.5553C>T (NP_004949.1:p.Ser1851=)	FAT	Sinónima	
					NM_004958.3:c.5772G>T NM_004958.3:c.5772G>A NM_004958.3:c.5772G>C (NP_004949.1:p.Val1924=)	FAT	Sinónima	
					NM_004958.3:c.5745C>T (NP_004949.1:p.His1915=)	FAT	Sinónima	
					NM_004958.3:c.5432G>A (NP_004949.1:p.Arg1811His)	FAT	<i>Missense</i>	
					NM_004958.3:c.5217T>G			

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

					NM_004958.3:c.5217T>A (NP_004949.1:p.His1739Gln)	FAT	<i>Missense</i>	
					NM_004958.3:c.5106A>G (NP_004949.1:p.Lys1702=)	FAT	Sinónima	
					NM_004958.3:c.5794A>G (NP_004949.1:p.Ile1932Val)	FAT	<i>Missense</i>	
					NM_004958.3:c.5902C>T (NP_004949.1:p.His1968Tyr)	N.A.	<i>Missense</i>	
					NM_004958.3:c.6026C>T (NP_004949.1:p.Ala2009Val)	N.A.	<i>Missense</i>	
					NM_004958.3:c.5971G>C (NP_004949.1:p.Ala1991Pro)	N.A.	<i>Missense</i>	
					NM_004958.3:c.5972C>T (NP_004949.1:p.Ala1991Val)	N.A.	<i>Missense</i>	
					NM_004958.3:c.6047T>C (NP_004949.1:p.Leu2016Pro)	N.A.	<i>Missense</i>	
					NM_004958.3:c.6141G>T			
					NM_004958.3:c.6141G>A	N.A.	<i>Missense</i>	
					NM_004958.3:c.6141G>C (NP_004949.1:p.Met2047Ile)			
					NM_004958.3:c.6381C>G			
					NM_004958.3:c.6381C>A	N.A.	Sinónima	
					NM_004958.3:c.6381C>T (NP_004949.1:p.Ser2127=)			
					NM_004958.3:c.6386A>G (NP_004949.1:p.Lys2129Arg)	quinase	<i>Missense</i>	
					NM_004958.3:c.6637C>T (NP_004949.1:p.Pro2213Ser)	quinase	<i>Missense</i>	
					NM_004958.3:c.6565C>T (NP_004949.1:p.His2189Tyr)	quinase	<i>Missense</i>	
					NM_004958.3:c.6520C>T (NP_004949.1:p.Leu2174Phe)	quinase	<i>Missense</i>	
					NM_004958.3:c.6909G>T			

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

						NM_004958.3:c.6909G>A NM_004958.3:c.6909G>C NM_004958.3:c.6907C>T (NP_004949.1:p.Leu2303=) NM_004958.3:c.6953C>T (NP_004949.1:p.Thr2318Ile)	quinase quinase	Sinónima <i>Missense</i>	
Lasota, J., et al. (2019)	1/14	Tumor estromal gastrointestinal (GISTs)	Amostras de tecido de 5 µm fixado em formol e embebido em parafina	NGS para pesquisa e PCR + sequenciação de Sanger para confirmação	NM_004958.3:c.6625C>G (NP_004949.1:p.Leu2209Val)	quinase	<i>Missense</i>	A mutação p.Leu2209Val também já foi relatada num carcinoma urotelial e num carcinoma neuroendócrino de grandes células	
Lee, S. H., et al. (2017)	1/12	Adenoma colorretal de alto grau (HGCA)	Amostras de tecido congelado fixado em formol e embebido em parafina	PCR digital e sequenciação de Sanger (WES)	NM_004958.3:c.6644C>T (NP_004949.1:p.Ser2215Phe)	quinase	<i>Missense</i>	O mTOR é um gene <i>driver</i> do adenoma colorretal de alto grau	
Lim, S. M., et al. (2016)	3/39	13 Cancro gástrico 15 Carcinoma de células renais 2 Cancro da tiroide	Amostras de tecido fixado em formol e embebido em	NGS para pesquisa (DNA exónico de 409 genes) e sequenciação de Sanger	Cancro gástrico – NM_004958.3:c.4261A>G (NP_004949.1:p.Asn1421Asp) Angiossarcoma – NM_004958.3:c.5312A>G (NP_004949.1:p.Lys1771Arg)	FAT FAT	<i>Missense</i> <i>Missense</i>	A prevalência dos genes mutados recorrentemente e a sua correlação com o benefício clínico sugerem fortemente que	

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

		2	Cancro da cabeça e pescoço	parafina e sangue	para confirmação	Carcinoma de células renais – NM_004958.3:c.5917A>T (NP_004949.1:p.Ile1973Phe)	FAT	<i>Missense</i>	conferem sensibilidade ao everolimus
		7	Sarcoma						
Lupini, L., et al. (2019)	3/8		Adenocarcinoma endometrial	Amostras de tecido de 20 µm fixado em formol e embebido em parafina	NGS (DNA exónico de 50 genes)	NM_004958.3:c.7550A>G (NP_004949.1:p.Asp2517Gly) NM_004958.3:3328T>C (NP_004949.1:p.Tyr1110His) NM_004958.3:4376C>A (NP_004949.1:p.Ala1459Asp)	FATC HEAT 27 FAT	<i>Missense</i> <i>Missense</i> <i>Missense</i>	As três mutações mTOR relatadas foram encontradas no tecido já com doença maligna. Não foram relatadas mutações mTOR em tecidos coletados meses ou anos antes do aparecimento do tumor
Mohanty, S. K., et al. (2022)	1/18		Tumor renal oncocítico de baixo grau (LOT)	Amostras de tecido fixado em formol e embebido em parafina	NGS (DNA exónico de 324 genes)	NM_004958.3:7281G>A (NP_004949.1:p.Leu2427Arg)	quinase	<i>Missense</i>	A mutação p.Leu2427Arg é patogénica
Morini, A., et al. (2022)	7/10		Tumor renal oncocítico de baixo grau (LOT)	Amostras de tecido fixado em formol e embebido em parafina	NGS para pesquisa (DNA exónico de 26 genes) e sequenciação de Sanger para confirmação	NM_004958.3:c.6644C>T (NP_004949.1:p.Ser2215Phe) NM_004958.3:c.7499T>A (NP_004949.1:p.Ile2500Asn) NM_004958.3:c.6644C>A (NP_004949.1:p.Ser2215Tyr) NM_004958.3:c.4348T>G (NP_004949.1:p.Tyr1450Asp) NM_004958.3:c.320_323delinsATTT	quinase N.A. quinase FAT HEAT 3	<i>Missense</i> <i>Missense</i> <i>Missense</i> <i>Missense</i> <i>Frameshift</i>	As mutações p.Tyr1450Asp, p.Ser2215Phe, p.Ser2215Tyr, p.Leu2427Gln, p.Ile2500Phe, p.Ile2500Asn são patogénicas ativadoras

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

						(NP_004949.1:p.Phe107_Ala108delinsTyrPhe) NM_004958.3:c.7280T>G (NP_004949.1:p.Leu2427Gln) NM_004958.3:c.7498A>T (NP_004949.1:p.Ile2500Phe)	quinase N.A.	<i>Missense</i> <i>Missense</i>	
Murugan, A. K., et al. (2015)	116	63	Neoplasias da tiroide que incluem 10 bóciós multinodulares benignos	Amostras de tecido fixado em formol e embebido em parafina	Sequenciação de 19 exões	NM_004958.3:c.663C>G (NP_004949.1:p.Thr221=) NM_004958.3:c.5333C>T (NP_004949.1:p.Ser1851=)	HEAT FAT	Sinónima Sinónima	Nestas mutações, o codão foi trocado, no entanto o aminoácido produzido é o mesmo
		41	Cancro da tiroide papilífero						
		7	Variante foliculares						
		1	Variante de células altas						
		1	Cancro de células hurthle						
		1	Variante de células colunares						
		2	Cancro da tiroide mal diferenciado						
Murugan, A. K., et al. (2019)	2/58	20	Cancro da tiroide anaplásico (ATC)	Linhas celulares e	Sequenciação de 30 exões	Linha celular ATC C643 – NM_004958.3:c.1256A>G (NP_004949.1:p.His419Arg)	HEAT 10	<i>Missense</i>	As mutações mTOR podem resultar na alteração conformacional da proteína, com

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

		12	Linhas celulares de cancro da tiroide (incluindo 8 linhas celulares ATC)	amostras de tecido		Melanoma – NM_004958.3:c.7076G>A (NP_004949.1:p.Gly2359Glu)	quinase	<i>Missense</i>	consequências funcionais significativas para a atividade quinase e interação das proteínas a montante e a jusante da via de sinalização mTOR (confirmado pelas mutações introduzidas). A análise funcional das duas novas mutações mostrou que ambas eram de ganho de função
		23	Melanomas		Mutações mTOR ativadas introduzidas: NM_004958.3:c.6817C>T (NP_004949.1:p.Pro2273Ser)	quinase	<i>Missense</i>		
		3	Linhas celulares de melanoma		NM_004958.3:c.6862G>A (NP_004949.1:p.Glu2288Lys)	quinase	<i>Missense</i>		
Rodríguez-Moreno, J. F., et al. (2017)		1	Carcinoma de células renais de células claras metastático (ccRCC)	Tecido e sangue	Sequenciação de Sanger (WES)	NM_004958.3:c.5920T>C (NP_004949.1:p.Tyr1974His)	FAT	<i>Missense</i>	A mutação p.Tyr1974His foi adquirida no início do desenvolvimento do tumor como responsável pela sensibilidade ao temsirolimus. É uma mutação ativadora do complexo mTORC1
Robbins, C. M., et al. (2011)		1/6	Tumores da próstata metastáticos sistémicos	Amostras de tecido da próstata metastáticas congeladas e tecido normal de vários locais	NGS (3508 exões de 577 genes)	NM_004958.3:c.6809G>T (NP_004949.1:p.Arg2270Leu)	quinase	<i>Missense</i>	A mutação p.Arg2270Leu é provavelmente patogénica

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

			anatômicos					
Roldan-Romero, J. M., et al. (2020)	8/87 (3 com metástase)	Carcinoma de células renais cromóforo (chRCC)	78 mostras de tecido fixado em formol e embebido em parafina e 17 tecidos congelados	NGS (DNA exónico de 42 genes + 250 nucleótidos a montante do local do início da tradução)	NM_004958.3:c.6644C>T (NP_004949.1:p.Ser2215Phe) NM_004949.3:c.7498A>T (NP_004949.1:p.Ile2500Phe) NM_004958.3:c.7501A>T (NP_004949.1:p.Ile2501Phe) NM_004958.3:c.6016G>T (NP_004949.1:p.Val2006Phe) NM_004958.3:c.7280T>G (NP_004949.1:p.Leu2427Arg) (x3) NM_004958.3:c.4837G>C (NP_004949.1:p.Glu1613Gln)	quinase N.A. N.A. N.A. quinase FAT	Missense Missense Missense Missense Missense Missense	As mutações p.Ser2215Phe, p.Ile2500Phe, p.Ile2501Phe e p.Val2006Phe foram descritas como ativadoras. A maioria das mutações mTOR eram variantes patogénicas, sendo as restantes com significado desconhecido
Shah, R. B., et al. (2020)	6/14	Carcinoma de células renais com estroma (angio) leiomiomatoso	Amostras de tecido fixado em formol e embebido em parafina	NGS (DNA exónico de 170 genes)	NM_004958.3:c.6644C>A (NP_004949.1:p.Ser2215Tyr) NM_004958.3:c.7280T>A (NP_004949.1:p.Leu2427Gln) NM_004958.3:c.7498A>T (NP_004949.1:p.Ile2500Phe) NM_004958.3:c.4348T>G (NP_004949.1:p.Tyr1450Asp) NM_004958.3:c.1145A>G (NP_004949.1:p.Asn382Ser)	quinase quinase N.A. FAT HEAT 9	Missense Missense Missense Missense Missense	Mutações mTOR são frequentes nos RCC/LMS, o que sugere fortemente que essas mutações são patogénicas
Shanmugam, V., et al. (2019)	2/28	Sarcoma histiocítico	-	NGS (DNA exónico e intrónico de 447 genes)	NM_004958.3:c.6644C>A (NP_004949.1:p.Ser2215Tyr)	quinase	Missense	A mutação mTOR p.Ser2215Tyr é patogénica

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

Shi, Y., et al. (2018)	1	Cancro da mama avançado	Biópsia líquida (ctDNA)	NGS	NM_004958.3:c.4624G>T (NP_004949.1:p.Asp1542Tyr)	FAT	<i>Missense</i>	O sequenciamento subsequente mostrou que a mutação mTOR desapareceu, o que revela o efeito curativo após administração do inibidor de mTOR everolimus
Shull, A. Y., et al. (2012)	68	Melanoma metastático	Linhas celulares tumorais de melanoma	Sequenciação de Sanger (DNA exónico de 31 genes)	NM_004958.3:c.7327C>T (NP_004949.1:p.Arg2443*) NM_004958.3:c.1654C>T (NP_004949.1:p.Leu552Phe)	quinase HEAT 13	<i>Nonsense</i> <i>Missense</i>	As mutações mTOR estão envolvidas na progressão do melanoma metastático
Sivapalan, L., et al. (2022)	3 com doença ressecável + 4 com doença não ressecável	Adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC)	Tecido e sangue periférico	Sequenciação completa do exoma do gDNA tumoral e do ctDNA plasmático	NM_004958.3:c.4991G>A (NP_004949.1:p.Gly1664Asp) NM_004958.3:c.2063C>T (NP_004949.1:p.Ala688Val)	FAT HEAT 17	<i>Missense</i> <i>Missense</i>	O mTOR é um gene <i>driver</i> do adenocarcinoma ductal pancreático
Tjota, M., et al. (2020)	2/18	Neoplasias renais eosinofílicas	Amostras de tecido fixado em formol e embebido em parafina	NGS (DNA exónico de 1213 genes)	NM_004958.3:c.7280T>A (NP_004949.1:p.Leu2427Gln) NM_004958.3:c.5930C>G (NP_004949.1:p.Thr1977Arg)	quinase FAT	<i>Missense</i> <i>Missense</i>	A mutação mTOR p.Thr1977Arg demonstrou ativar a sinalização mTORC1 in vitro. A mutação mTOR p.Leu2427Gln é crítica na manutenção da integridade estrutural do domínio de adesão do mTOR

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

<p>Wu, S., et al. (2021)</p>	<p>2/4</p>	<p>Tumor de células claras do pulmão (CCLT)</p>	<p>Tecido</p>	<p>NGS (DNA exónico de 416 genes)</p>	<p>1. NM_004958.3:c.439A>G (NP_004949.1:p.Lys1466Glu) e NP_004949.1:p.Tyr1450_Trp1456del</p> <p>2. NP_004949.1:p.Phe2421fs e NM_004958.3:c.7255G>T (NP_004949.1:p.Glu2419fs)</p>	<p>FAT</p> <p>FAT</p> <p>quinase</p> <p>quinase</p>	<p><i>Missense</i></p> <p><i>Frameshift</i></p> <p><i>Frameshift</i></p> <p><i>Frameshift</i></p>	<p>Várias observações sugeriram que o mTOR pode contribuir para o desenvolvimento e progressão do tumor</p>
<p>Yamaguchi, H., et al. (2015)</p>	<p>1</p>	<p>Carcinoma neuroendócrino de grandes células (LCNEC)</p>	<p>Tecido e sangue periférico</p>	<p>NGS para pesquisa e sequenciação de Sanger para confirmação</p>	<p>NM_004958.3:c.6625C>G (NP_004949.1:p.Leu2209Val)</p>	<p>quinase</p>	<p><i>Missense</i></p>	<p>O mTOR pode ser considerado um oncogene de “boa-fé”</p>
<p>Zhang, H., et al. (2022)</p>	<p>21</p>	<p>Cancro do pulmão de células não pequenas (NSCLC)</p>	<p>Tecido e sangue periférico</p>	<p>NGS (DNA exónico de 1000 genes)</p>	<p>Antes do tratamento: NM_004958.3:c.5253C>G NM_004958.3:c.5253C>A NM_004958.3:c.5251T>C (NP_004949.1:p.Phe1751Leu) (2x) NM_004958.3:c.5687G>A (NP_004949.1:p.Arg1896Gln) NM_004958.3:c.941C>T (NP_004949.1:p.Thr314Ile)</p> <p>Depois do tratamento com osimertinib: NM_004958.3:c.4350T>G NM_004958.3:c.4350T>A</p>	<p>FAT</p> <p>FAT</p> <p>HEAT 8</p> <p>FAT</p>	<p><i>Missense</i></p> <p><i>Missense</i></p> <p><i>Missense</i></p> <p><i>Missense</i></p>	<p>O mTOR foi significativamente relacionado ao prognóstico</p>

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

					(NP_004949.1:p.Tyr1450Ter) NM_004958.3:c.910A>C NM_004958.3:c.910A>T (NP_004949.1:p.Met304Leu)	HEAT 7	<i>Missense</i>	
--	--	--	--	--	---	--------	-----------------	--

Legenda: N.A. – Não Aplicável

4.1 Características dos artigos

Os resultados permitiram perceber que mutações no gene mTOR são encontradas em vários tipos de cancro, como no carcinoma urotelial metastático, adenocarcinoma endometrial metastático, melanomas, tumores estromais gastrointestinais, cancro da tiroide e paratiroide, tumores da próstata, cancro da mama, adenocarcinoma ductal pancreático, cancro de células claras e cancro de células não pequenas do pulmão, mas com especial atenção a cancros renais (n=11), mais especificamente, carcinoma de células renais do tipo de células claras, carcinoma de células renais com histologia não classificada, carcinoma de células renais metastático, tumor renais oncocítico de baixo grau, carcinoma de células renais cromóforo, carcinoma de células renais com estroma (angio)leiomiomatoso e neoplasias renais eosinofílicas, como é possível verificar na figura 4.1.

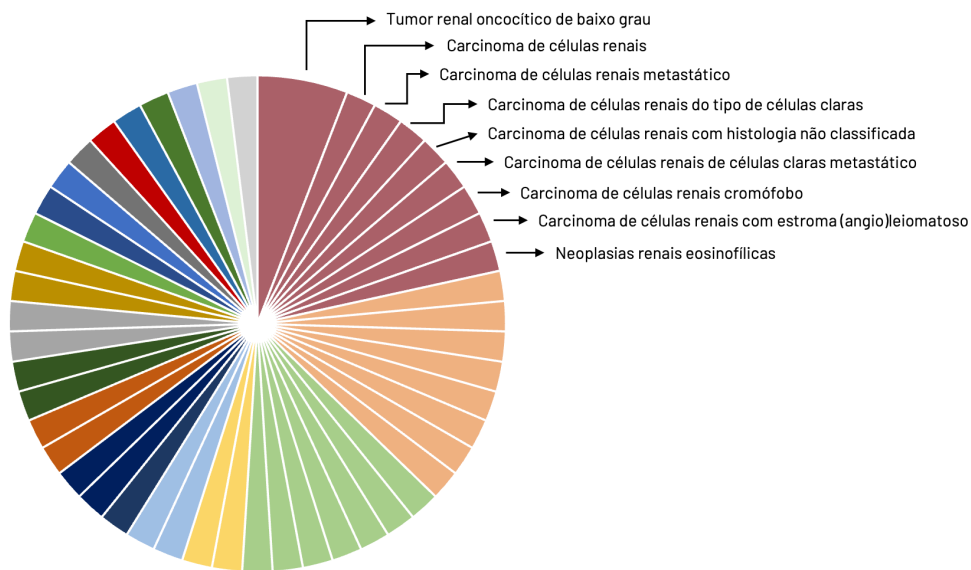


Figura 4. 1 – Tipo de cancro

Fonte: autor

Quanto ao tipo de amostra analisada, a grande maioria utiliza amostras de tecido fixado em formol e embebido em parafina com o NGS utilizado como tecnologia de sequenciação (figuras 4.2 e 4.3).

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

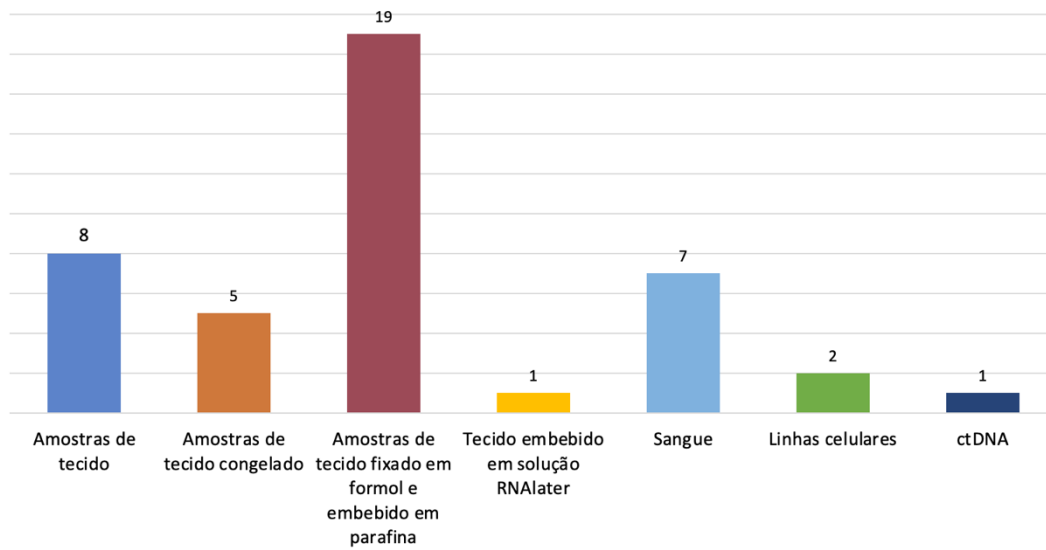


Figura 4. 2 – Tipo de amostra analisada

Fonte: autor

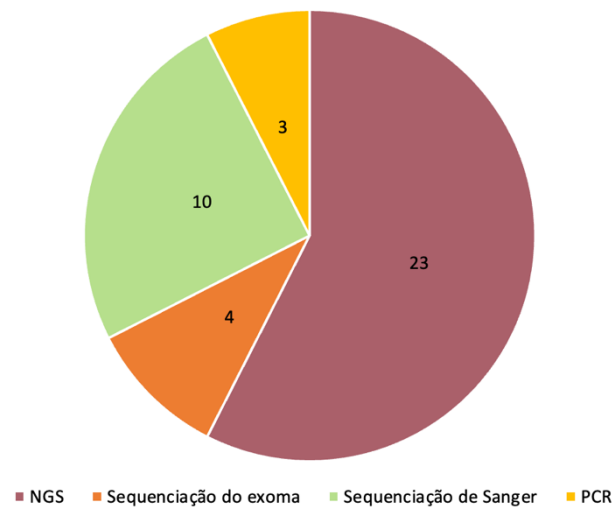


Figura 4. 3 – Tecnologias de sequenciação utilizadas

Fonte: autor

Ao longo dos 33 artigos foram encontradas 161 mutações no gene mTOR (figura 4.4), das quais p.Leu2427Arg apareceu com uma frequência de 9/161 (5,6%), p.Ser2215Tyr com uma frequência de 6/161 (3,7%), p.Leu2427Gln e p.Ser2215Phe com

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de hotspots mutacionais

uma frequência de 5/161 (3,1%) e p.Ile2500Phe com uma frequência de 3/161 (1,9%). Além dessas, também apareceu uma mutação p.Leu2427Pro e p.Ser2215Pro (0,6%). Também foram encontradas mutações em duas posições bastante mutadas, p.Tyr1450Ter (0,6%), p.Tyr1450_Trp1456del (0,6%), p.Tyr1450Asp (1,2%), p.Glu2419_Ala2420delinsAspVal (0,6%), p.Glu2419Asp (1,2%), p.Glu2419fs (0,6%) e p.Glu2419Lys (0,6%).

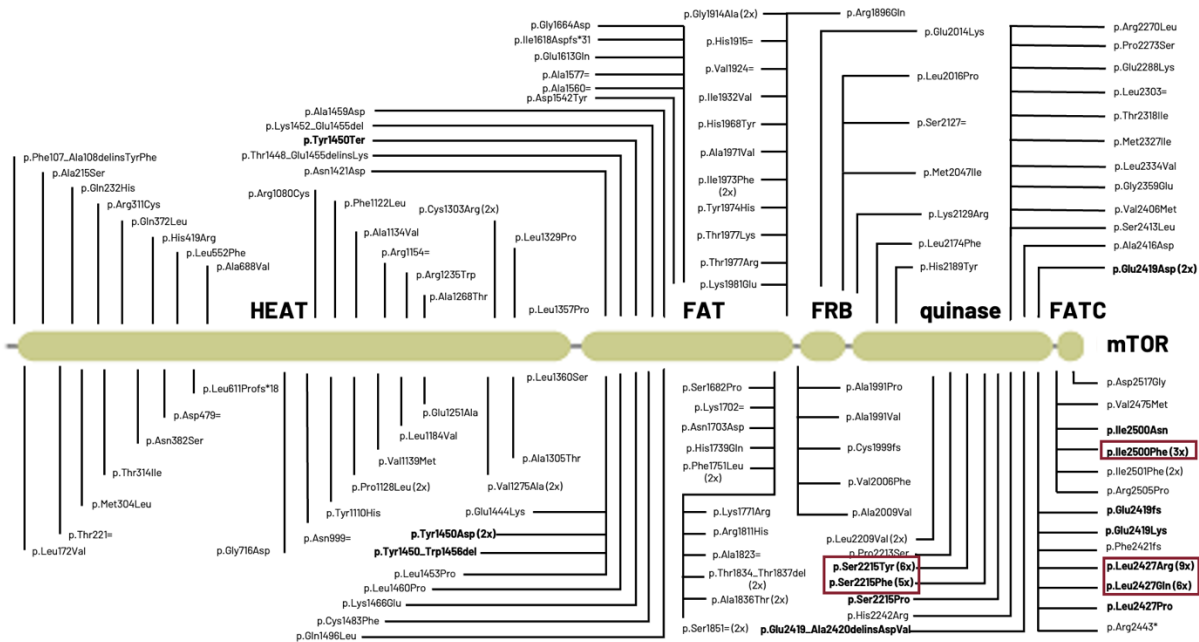


Figura 4. 4 – Mutações encontradas

Fonte: autor

A grande maioria das mutações encontradas no gene mTOR são *missense*, com a codificação um aminoácido diferente do que seria esperado, 134/161 (83,3%). No entanto, também existem mutações *frameshift* com uma frequência de 11/161 (6,8%), mutações sinónimas com uma frequência de 14/161 (8,7%), e uma mutação *nonsense* e uma de *splicing*, com uma frequência de 2/161 (1,2%), como é possível observar na figura 4.5.

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

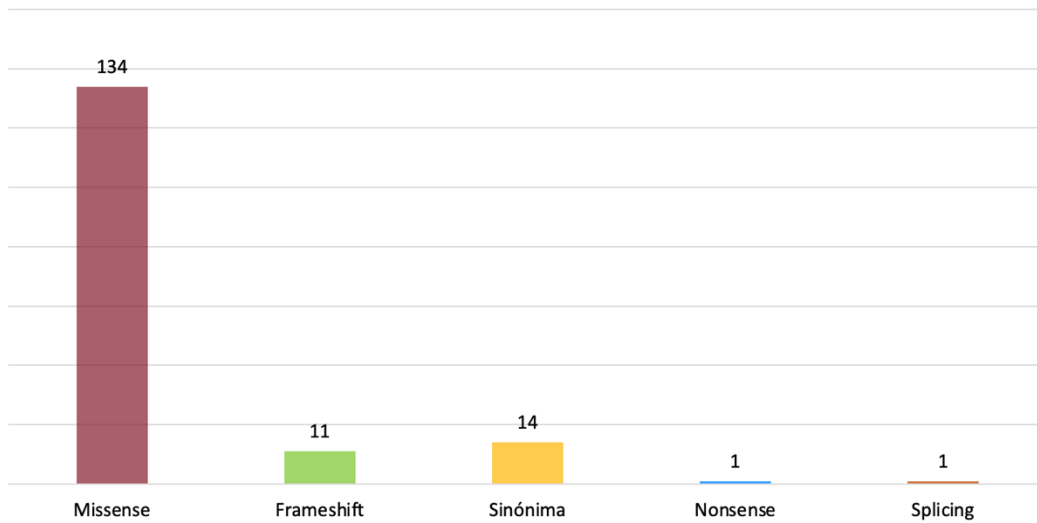


Figura 4. 5 – Tipo de mutações encontradas

Fonte: autor

Quanto aos domínios da proteína em que ocorrem mais frequentemente mutações, é possível destacar os domínios FAT e quinase. Das 161 mutações encontradas, 52 (32,3%) localizam-se no domínio FAT (1382-1982), 53 (32,9%) no domínio quinase (2156-2469), 35 (21,7%) no domínio HEAT (16-1345), uma (0,6%) no domínio FRB (2012-2144) e uma (0,6%) no domínio FATC (2517-2549). 19 mutações (N.A.) não têm um domínio associado (11,9%), figura 4.6.

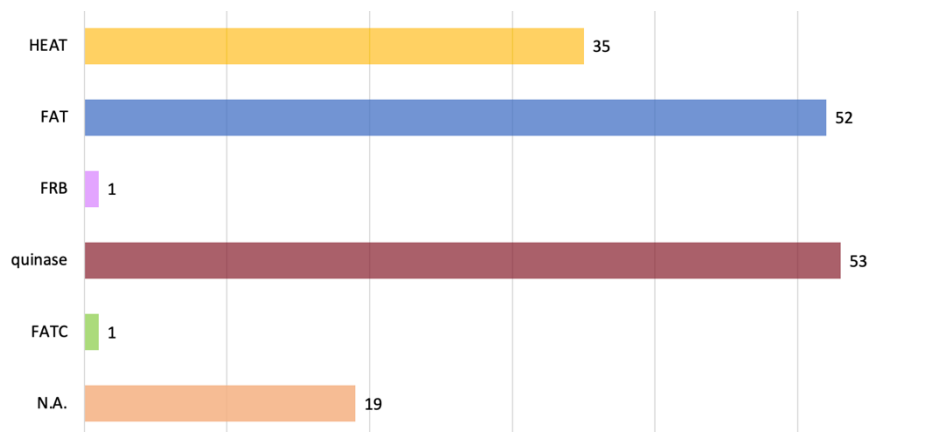


Figura 4. 6 – Domínios mutados

Fonte: autor

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

Ao longo dos 33 artigos foram relatadas diversas mutações ativadoras, ou seja, mutações que irão desencadear o desenvolvimento do tumor e que são frequentemente utilizadas como alvo para o desenvolvimento de novos medicamentos, como os inibidores da atividade da proteína mTOR. Entre elas, p.Glu2014Lys e p.Glu2419Lys ativadoras no carcinoma urotelial metastático, p.Ala1459Asp ativadora no adenocarcinoma endometrial metastático que surgiu como um mecanismo de resistência adquirido à inibição AKT, p.Cys1483Phe ativadora importante nas metástases pulmonares, p.Leu2427Gln, p.Ser2215Tyr, p.Ser2413Leu, p.Tyr1450Asp, p.Ser2215Phe, p.Ile2500Phe e p.Ile2500Asn ativadoras do tumor renal oncocítico de baixo grau, p.Tyr1974His ativadora do complexo mTORC1 no carcinoma de células renais de células claras metastático e p.Ser2215Phe, p.Ile2500Phe, p.Ile2501Phe e p.Val2006Phe ativadoras no carcinoma de células renais cromóforo. Também foram relatadas várias mutações patogénicas, como p.Ile1973Phe, p.Leu2427Arg, p.Leu611Phe*18, p.Ile1618Asp*31, p.Glu2419_Ala2420delinsAspVal, p.Tyr1450Asp, p.Ser2215Phe, p.Ser2215Tyr, p.Leu2427Gln, p.Ile2500Phe, p.Ile2500Asn e p.Arg2270Leu.

Quanto ao efeito da administração de inibidores mTOR, um paciente com mutação mTOR p.Glu2419Asp na amostra pré-tratamento teve uma resposta parcial ao everolimus e as mutações p.Asn1421Asp, p.Lys1771Arg e p.Ile1973Phe também são sensíveis ao everolimus. Uma mutação p.Tyr1974His foi adquirida no início do desenvolvimento de um carcinoma de células renais de células claras metastático como responsável pela sensibilidade ao temsirolimus. A mutação p.Asp1542Tyr é completamente sensível ao everolimus, uma vez que desapareceu após a administração do inibidor num cancro da mama avançado.

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

5. Discussão

O presente trabalho consistiu numa revisão sistemática da literatura que teve como objetivo a sistematização das mutações encontradas no gene mTOR até ao presente, assim como a determinação de *hotspots* mutacionais que possam influenciar a eficácia de inibidores da proteína.

Dos 2207 artigos identificados na base de dados PubMed, através da chave de pesquisa (*mTOR*) AND (*gene mutation*) AND (*human cancer*), apenas 33 artigos corresponderam aos critérios de inclusão, nomeadamente serem publicados a partir do ano de 2010, inclusive, escritos em inglês e em humanos. Assim, o intervalo de anos dos artigos selecionados é entre 2010-2022.

Os resultados permitiram perceber que mutações no gene mTOR são encontradas em vários tipos de cancro, mas com especial atenção a cancros renais (n=11). Esta informação veio a confirmar o porquê de inibidores mTOR terem sido utilizados pela primeira vez e continuarem a ser utilizados em cancros renais.

Quanto ao tipo de amostra analisada, a grande maioria utilizou amostras de tecido fixado em formol e embebido em parafina, uma vez que a primeira análise é o processamento histológico e posteriormente utiliza-se o material para testes complementares. A fixação interrompe o processo de autólise pelo qual qualquer tecido passa ao ser retirado do organismo. O processo de fixação faz com que a autólise não ocorra e seja possível analisar-se os tecidos com o seu aspeto original. Além disso, a fixação também estabiliza estruturas bioquímicas intra e extracelulares, permite a penetração de outros reagentes necessários para o processamento histológico (como a coloração) e impede que o tecido seja colonizado por microrganismos. A parafina é utilizada na fase da impregnação/inclusão, que faz com que a peça de tecido adquira rigidez suficiente para que seja possível a realização de cortes finos (Nunes & Cinsa, 2016).

No que diz respeito à tecnologia utilizada para a pesquisa de mutações, a grande maioria dos artigos utilizou o *Next-Generation Sequencing* (NGS), caracterizado como uma sequenciação de DNA e RNA automatizada de alto rendimento, pois esta tecnologia permite sequenciar o DNA de forma muito mais rápida e barata em comparação com tecnologias utilizadas antigamente. No entanto, a sequenciação de Sanger continua a ser utilizada, mas numa perspetiva de apenas confirmar os resultados obtidos pelo NGS, uma vez que se torna num método caro e ineficiente para larga escala.

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

O tipo de mutação apresentada tem elevada importância, uma vez que, a depender do tipo de mutação e do local em que ela ocorre, a variante terá maior potencial em alterar a função da proteína e portanto, ser patogénica. Mutações que ocorrem em regiões do DNA que não são fundamentais para a estrutura e função da proteína, como os intrões, bem como aquelas que, mesmo que ocorram em regiões essenciais, mas que não comprometam a estrutura e função da proteína sintetizada, como as sinónimas, terão baixo potencial patogénico. Neste caso, como as mutações *missense* estão em maior frequência, é possível afirmar que estas têm grande probabilidade de serem patogénicas.

Ao longo dos 33 artigos foram encontradas 161 mutações no gene mTOR, p.Leu2427Arg, p.Ser2215Tyr, p.Leu2427Gln, p.Ser2215Phe, p.Ile2500Phe com maior frequência. Estas mutações podem ser consideradas mutações *driver* uma vez que induzem a doença e estão descritas como mutações ativadoras na maior parte dos artigos analisados. Também foram encontradas mutações em duas posições bastante mutadas, p.Tyr1450Ter, p.Tyr1450_Trp1456del, p.Tyr1450Asp, p.Glu2419_Ala2420delinsAspVal, p.Glu2419Asp, p.Glu2419fs e p.Glu2419Lys.

6. Considerações finais

Em suma, dos 2207 artigos identificados na base de dados PubMed, apenas 33 corresponderam aos critérios de inclusão.

Os resultados permitiram perceber que mutações no gene mTOR são encontradas em vários tipos de cancro, sendo que 33% dos artigos com mutações mTOR dizem respeito a cancros renais.

Quanto ao tipo de amostra analisada, a grande maioria utiliza amostras de tecido fixado em formol e embebido em parafina para a pesquisa de mutações, com o NGS como tecnologia de pesquisa.

Nos 33 artigos foram encontradas 161 mutações no gene mTOR, a grande maioria são *missense* com potencial patogénico e com domínios mais mutados o FAT e quinase.

As mutações mais frequentes foram p.Leu2427Arg, p.Ser2215Tyr, p.Leu2427Gln, p.Ser2215Phe, p.Ile2500Phe. Sendo que também existem mais duas posições bastante mutadas, 1450 e 2419. Estas mutações podem ser consideradas mutações *driver* uma vez que induzem a doença.

É, portanto, possível afirmar que os aminoácidos tirosina (Tyr) na posição 1450, serina (Ser) na posição 2215, glutamato (Glu) na posição 2419, leucina (Leu) na posição 2427 e isoleucina (Ile) na posição 2500 da proteína mTOR são *hotspots* mutacionais do gene mTOR e podem influenciar a eficácia de inibidores desta proteína.

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

7. Referências Bibliográficas

Bellmunt, J., *et al.* (2018). Everolimus and pazopanib (E/P) benefit genomically selected patients with metastatic urothelial carcinoma. *British Journal of Cancer*. 119 (6): 707-712, doi: 10.1038/s41416-018-0261-0;

Brugarolas, J. (2014). Molecular genetics of clear-cell renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. 32 (18): 1968-1976, doi: 10.1200/JCO.2012.45.2003;

Chen, Y-B., *et al.* (2016). Molecular analysis of aggressive renal cell carcinoma with unclassified histology reveals distinct subsets. *Nature Communications*. 7, doi: 10.1038/ncomms13131;

Chung, J., *et al.* (1992). Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activations of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases. *Cell*. 69 (7): 1227-1236, doi: 10.1016/0092-8674(92)90643-q;

Ciuffreda, L., *et al.* (2010). The mTOR pathway: a new target in cancer therapy. *Current Cancer Drug Targets*. 10 (5): 484-495, doi: 10.2174/156900910791517172;

Coleman, N., *et al.* (2021). Emergence of mTOR mutation as an acquired resistance mechanism to AKT inhibition, and subsequent response to mTORC1/2 inhibition. *NPJ Precision Oncology*. 5 (1): 99, doi: 10.1038/s41698-021-00240-w;

Corradetti, M. N. & Guan, K-L. (2006). Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR? *Oncogene*. 25: 6347-6360, doi: 10.1038/sj.onc.1209885;

Cui, M., *et al.* (2019). Preliminary exploration of potential molecular therapeutic targets in recurrent and metastatic parathyroid carcinomas. *International Journal of Cancer*. 144 (3): 525-532, doi: 10.1002/ijc.31948;

Eng, C. P., *et al.* (1984). Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors. *The journal of antibiotics*. 37 (10):1231-1237, doi: 10.7164/antibiotics.37.1231;

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

Every, M. J., *et al.* (2018). Genomic case report of a low grade bladder tumor metastasis to lung. *BMC Urology*. 18 (1): 74, doi: 10.1186/s12894-018-0386-8;

Farçaç, M., *et al.* (2022). Eosinophilic vacuolated tumor (EVT) of kidney demonstrates sporadic TSC/MTOR mutations: next-generation sequencing multi-institutional study of 19 cases. *Modern Pathology*. 35 (3): 344-351, doi: 10.1038/s41379-021-00923-6;

Gao, X., *et al.* (2018). Comprehensive Genomic Profiling of Metastatic Tumors in a Phase 2 Biomarker Study of Everolimus in Advanced Renal Cell Carcinoma. *Clinical Genitourinary Cancer*. 16 (5): 341-348, doi: 10.1016/j.clgc.2018.04.001;

García-Echeverría, C., *et al.* (2010). Allosteric and ATP-competitive kinase inhibitors of mTOR for cancer treatment. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters*. 20 (15): 4308-5312, doi: 10.1016/j.bmcl.2010.05.099;

Hu, Y., *et al.* (2021). Integrated Whole-Exome and Transcriptome Sequencing of Sporadic Parathyroid Adenoma. *Frontiers in Endocrinology*. 12, doi: 10.3389/fendo.2021.631680;

Ichimura, K., *et al.* (2016). Recurrent neomorphic mutations of MTOR in central nervous system and testicular germ cell tumors may be targeted for therapy. *Acta Neuropathologica*. 131 (6): 889:901, doi: 10.1007/s00401-016-1557-x;

Jahn, S. W., *et al.* (2016). Mutation Profiling of Usual Ductal Hyperplasia of the Breast Reveals Activating Mutations Predominantly at Different Levels of the PI3K/AKT/mTOR Pathway. *The American Journal of Pathology*. 186 (1): 15-23, doi: 10.1016/j.ajpath.2015.09.004;

Jiang, B-H. & Liu, L-Z. (2008). Role of mTOR in anticancer drug resistance: perspectives for improved drug treatment. *Drug Resistance Updates*. 11 (3): 63-76, doi: 10.1016/j.drug.2008.03.001;

Kapur, P., *et al.* (2022). Germline and sporadic mTOR pathway mutations in low-grade oncocytic tumor of the kidney. *Modern pathology*. 35 (3): 333-343, doi: 10.1038/s41379-021-00896-6;

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

Kong, Y., *et al.* (2016). Analysis of mTOR Gene Aberrations in Melanoma Patients and Evaluation of Their Sensitivity to PI3K-AKT-mTOR Pathway Inhibitors. *Clinical Cancer Research*. 22 (4): 1018-27, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1110;

Korets, S. B., *et al.* (2011). Targeting the mTOR/4E-BP pathway in endometrial cancer. *Clinical Cancer Research*. 17 (24): 7518-7528, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1664;

Lasota, J., *et al.* (2019). New Mechanisms of mTOR Pathway Activation in KIT-mutant Malignant GISTs. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 27 (1): 54-58, doi: 10.1097/PAI.0000000000000541;

Lee, S. H., *et al.* (2017). Whole-exome sequencing identified mutational profiles of high-grade colon adenomas. *Oncotarget*. 8 (4): 6579-6588, doi: 10.18632/oncotarget.14172;

Lim, S. M., *et al.* (2016). Next-generation sequencing reveals somatic mutations that confer exceptional response to everolimus. *Oncotarget*. 7 (9): 10547-56, doi: 10.18632/oncotarget.7234;

Lupini, L., *et al.* (2019). Molecular biomarkers predicting early development of endometrial carcinoma: A pilot study. *European Journal of Cancer Care*. 28 (6), doi: 10.1111/ecc.13137;

Martel, R. R., *et al.* (1976). Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 55 (1): 48-51, doi: 10.1139/y77-007;

Mohanty, S. K., *et al.* (2022). Oncocytic renal neoplasms with diffuse keratin 7 immunohistochemistry harbor frequent alterations in the mammalian target of rapamycin pathway. *Modern Pathology*. 35 (3): 361-375, doi: 10.1038/s41379-021-00969-6;

Morini, A., *et al.* (2022). Low-grade oncocytic renal tumor (LOT): mutations in mTOR pathways genes and low expression of FOXI1. *Modern pathology*. 35 (3): 352-360, doi: 10.1038/s41379-021-00906-7;

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

Murugan, A. K., *et al.* (2015). Absence of somatic mutations of the mTOR gene in differentiated thyroid cancer. *Meta Gene*. 6: 69-71, doi: 10.1016/j.mgene.2015.08.005;

Murugan, A. K., *et al.* (2019). Identification and Characterization of Two Novel Oncogenic mTOR Mutations. *Oncogene*. 38 (26): 5211-5226, doi: 10.1038/s41388-019-0787-5;

Mutalyzer 3 (2023). <https://mutalyzer.nl> (consultado a 06/05/2023);

Nunes, C. & Cinsa, L. (2016). Princípios do processamento histológico de rotina. *Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais*. 8: 31-40;

Oiseth, S., *et al.* (2022). Tipos de Mutações. <https://www.lecturio.com/pt/concepts/tipos-de-mutacoes/> (consultado a 13/07/2023);

Organization, W. H. (2023). Cancer. <https://www.who.int> (consultado a 23/03/2023);

Oshiro, N., *et al.* (2004). Dissociation of raptor from mTOR is a mechanism of rapamycin-induced inhibition of mTOR function. *Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms*. 9 (4): 359-366, doi: 10.1111/j.1356-9597.2004.00727.x.;

Page, M. J., *et al.* (2021). The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BJM*. 372 (71), doi: 10.1136/bmj.n71. <http://www.prisma-statement.org/> (consultado a 26/04/2023);

Rodríguez-Moreno, J. F., *et al.* (2017). Exceptional Response to Temsirolimus in a metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma With an Early Novel MTOR-Activating Mutation. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 15 (11): 1310-1315, doi: 10.6004/jnccn.2017.7018;

Robbins, C. M., *et al.* (2011). Copy number and targeted mutational analysis reveals novel somatic events in metastatic prostate tumors. *Genome Research*. 21 (1): 47-55, doi: 10.1101/gr.107961.110;

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

Roldan-Romero, J. M., *et al.* (2020). Molecular characterization of chromophobe renal cell carcinoma reveals mTOR pathway alterations in patients with poor outcome. *Modern pathology*. 33 (12): 2580-2590, doi: 10.1038/s41379-020-0607-z;

Roux, P., *et al.* (2004). Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal kinase. *PNAS*. 101 (37): 13489-13494, doi: 10.1073/pnas.0405659101;

Schenone, S., *et al.* (2011). ATP-competitive inhibitors of mTOR: an update. *Current Medicinal Chemistry*. 18 (20): 2995-3014, doi: 10.2174/092986711796391651;

Seeboeck, R., *et al.* (2019). Current Coverage of the mTOR Pathway by Next-Generation Sequencing Oncology Panels. *International Journal of Molecular Sciences*. 20 (3): 690, doi: 10.3390/ijms20030690;

Shah, R. B., *et al.* (2020). "Renal Cell Carcinoma With Leiomyomatous Stroma" Harbor Somatic Mutations of TSC1, TSC2, MTOR, and/or ELOC (TCEB1): Clinicopathologic and Molecular Characterization of 18 Sporadic Tumors Supports a Distinct Entity. *Multicenter Study*. 44 (5): 571-581, doi: 10.1097/PAS.0000000000001422;

Shanmugam, V., *et al.* (2019). Identification of diverse activating mutations of the RAS-MAPK pathway in histiocytic sarcoma. *Modern pathology*. 32 (6): 830-843, doi: 10.1038/s41379-018-0200-x;

Shi, Y., *et al.* (2018). Benefit of everolimus as a monotherapy for a refractory breast cancer patient bearing multiple genetic mutations in the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Cancer Biology & Medicine*. 15 (3): 314-321, doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2017.0188;

Shull, A. Y., *et al.* (2012). Novel somatic mutations to PI3K pathway genes in metastatic melanoma. *PLoS One*. 7 (8), doi: 10.1371/journal.pone.0043369;

Sivapalan, L., *et al.* (2022). Longitudinal profiling of circulating tumour DNA for tracking tumour dynamics in pancreatic cancer. *BMC Cancer*. 22 (1): 369, doi: 10.1186/s12885-022-09387-6;

Revisão sistemática das mutações no gene mTOR em cancro e determinação de *hotspots* mutacionais

Sonenberg, N. & Gingras, A. C. (1998). The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Current opinion in cell biology*. 10 (2): 268-275, doi: 10.1016/s0955-0674(98)80150-6;

Tjota, M., *et al.* (2020). Eosinophilic Renal Cell Tumors With a TSC and MTOR Gene Mutations Are Morphologically and Immunohistochemically Heterogenous: Clinicopathologic and Molecular Study. *The American Journal of Surgical Pathology*. 44 (7): 943-954, doi: 10.1097/PAS0000000000001457;

UniProt (2023). <https://www.uniprot.org> (consultado a 06/05/2023);

Wu, S., *et al.* (2021). Clinical characteristics and gene mutation analysis of clear cell tumor of the lung. *Indian Journal of Pathology & Microbiology*. 64 (2): 362-368, doi: 10.4103/IJPM.IJPM_65_19;

Yamaguchi, H., *et al.* (2015). Transforming somatic mutations of mammalian target of rapamycin kinase in human cancer. *Cancer Science*. 106 (12): 1687-1692, doi: 10.1111/cas.12828;

Yecies, J. L. & Manning, B. D. (2011). mTOR links oncogenic signaling to tumor cell metabolism. *Journal of Molecular Medicine*. 89: 221-228, doi: 10.1007/s00109-011-0726-6;

Zhang, H., *et al.* (2022). Novel mutation signatures in the prognosis of EGFR-TKIs targeted therapy for non-small cell lung cancer patients based on the 1000-gene panel sequencing. *Neoplasma*. 69 (2): 352-360, doi: 10-4149/neo_2021_210914N1307;

Zhou, H., *et al.* (2010). Updates of mTOR inhibitors. *Anti-cancer Agents in Medical Chemistry*. 10 (7): 571-581, doi: 10.2174/187152010793498663.

8. Anexos

8.1 Anexo 1

Tabela 8. 1 – PRISMA 2020 *Checklist*

Section and Topic	Item #	Checklist item	Location where item is reported
TITLE			
Title	1	Identify the report as a systematic review.	
ABSTRACT			
Abstract	2	See the PRISMA 2020 for Abstracts checklist.	
INTRODUCTION			
Rationale	3	Describe the rationale for the review in the context of existing knowledge.	
Objectives	4	Provide an explicit statement of the objective(s) or question(s) the review addresses.	
METHODS			
Eligibility criteria	5	Specify the inclusion and exclusion criteria for the review and how studies were grouped for the syntheses.	
Information sources	6	Specify all databases, registers, websites, organisations, reference lists and other sources searched or consulted to identify studies. Specify the date when each source was last searched or consulted.	
Search strategy	7	Present the full search strategies for all databases, registers and websites, including any filters and limits used.	
Selection process	8	Specify the methods used to decide whether a study met the inclusion criteria of the review, including how many reviewers screened each record and each report retrieved, whether they worked independently, and	

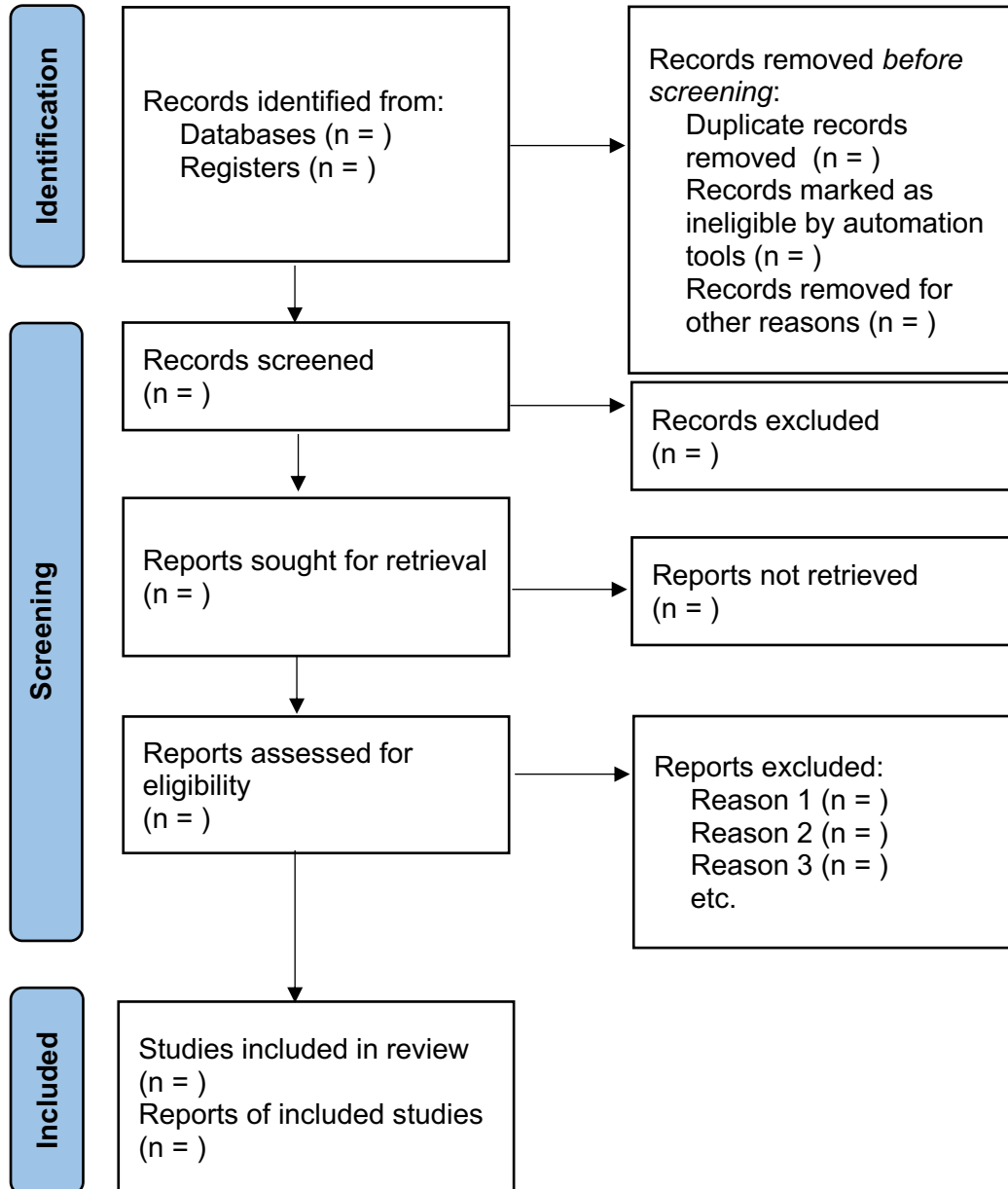
Section and Topic	Item #	Checklist item	Location where item is reported
		if applicable, details of automation tools used in the process.	
Data collection process	9	Specify the methods used to collect data from reports, including how many reviewers collected data from each report, whether they worked independently, any processes for obtaining or confirming data from study investigators, and if applicable, details of automation tools used in the process.	
Data items	10a	List and define all outcomes for which data were sought. Specify whether all results that were compatible with each outcome domain in each study were sought (e.g. for all measures, time points, analyses), and if not, the methods used to decide which results to collect.	
	10b	List and define all other variables for which data were sought (e.g. participant and intervention characteristics, funding sources). Describe any assumptions made about any missing or unclear information.	
Study risk of bias assessment	11	Specify the methods used to assess risk of bias in the included studies, including details of the tool(s) used, how many reviewers assessed each study and whether they worked independently, and if applicable, details of automation tools used in the process.	
Effect measures	12	Specify for each outcome the effect measure(s) (e.g. risk ratio, mean difference) used in the synthesis or presentation of results.	
Synthesis methods	13a	Describe the processes used to decide which studies were eligible for each synthesis (e.g. tabulating the study intervention characteristics and comparing against the planned groups for each synthesis (item #5)).	
	13b	Describe any methods required to prepare the data for presentation or synthesis, such as handling of missing summary statistics, or data conversions.	
	13c	Describe any methods used to tabulate or visually display results of individual studies and syntheses.	
	13d	Describe any methods used to synthesize results and provide a rationale for the choice(s). If meta-analysis was performed, describe the model(s), method(s) to identify the presence and extent of statistical heterogeneity, and software package(s) used.	
	13e	Describe any methods used to explore possible causes of heterogeneity among study results (e.g. subgroup analysis, meta-regression).	
	13f	Describe any sensitivity analyses conducted to assess robustness of the synthesized results.	

Section and Topic	Item #	Checklist item	Location where item is reported
Reporting bias assessment	14	Describe any methods used to assess risk of bias due to missing results in a synthesis (arising from reporting biases).	
Certainty assessment	15	Describe any methods used to assess certainty (or confidence) in the body of evidence for an outcome.	
RESULTS			
Study selection	16a	Describe the results of the search and selection process, from the number of records identified in the search to the number of studies included in the review, ideally using a flow diagram.	
	16b	Cite studies that might appear to meet the inclusion criteria, but which were excluded, and explain why they were excluded.	
Study characteristics	17	Cite each included study and present its characteristics.	
Risk of bias in studies	18	Present assessments of risk of bias for each included study.	
Results of individual studies	19	For all outcomes, present, for each study: (a) summary statistics for each group (where appropriate) and (b) an effect estimate and its precision (e.g. confidence/credible interval), ideally using structured tables or plots.	
Results of syntheses	20a	For each synthesis, briefly summarise the characteristics and risk of bias among contributing studies.	
	20b	Present results of all statistical syntheses conducted. If meta-analysis was done, present for each the summary estimate and its precision (e.g. confidence/credible interval) and measures of statistical heterogeneity. If comparing groups, describe the direction of the effect.	
	20c	Present results of all investigations of possible causes of heterogeneity among study results.	
	20d	Present results of all sensitivity analyses conducted to assess the robustness of the synthesized results.	
Reporting biases	21	Present assessments of risk of bias due to missing results (arising from reporting biases) for each synthesis assessed.	
Certainty of evidence	22	Present assessments of certainty (or confidence) in the body of evidence for each outcome assessed.	
DISCUSSION			
Discussion	23a	Provide a general interpretation of the results in the context of other evidence.	

Section and Topic	Item #	Checklist item	Location where item is reported
	23b	Discuss any limitations of the evidence included in the review.	
	23c	Discuss any limitations of the review processes used.	
	23d	Discuss implications of the results for practice, policy, and future research.	
OTHER INFORMATION			
Registration and protocol	24a	Provide registration information for the review, including register name and registration number, or state that the review was not registered.	
	24b	Indicate where the review protocol can be accessed, or state that a protocol was not prepared.	
	24c	Describe and explain any amendments to information provided at registration or in the protocol.	
Support	25	Describe sources of financial or non-financial support for the review, and the role of the funders or sponsors in the review.	
Competing interests	26	Declare any competing interests of review authors.	
Availability of data, code and other materials	27	Report which of the following are publicly available and where they can be found: template data collection forms; data extracted from included studies; data used for all analyses; analytic code; any other materials used in the review.	

Fonte: Page, *et al.*, 2020.

8.2 Anexo 2



Fonte: Page, *et al.*, 2020.

Figura 8. 1 – PRISMA 2020 *Flow diagram*