FERNANDA SALGUEIREDO GIUDICE

**O envolvimento da remodelação da cromatina no controle do comportamento
agressivo dos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço**

São Paulo

2012

FERNANDA SALGUEIREDO GIUDICE

**O envolvimento da remodelação da cromatina no controle do comportamento
agressivo dos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço**

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da
Universidade de São Paulo, para obter o título de
Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em
Odontologia.

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Jr.

Coorientador: Prof. Dr. Rogério Moraes de Castilho

São Paulo

2012

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Giudice, Fernanda Salgueiredo.

O envolvimento da remodelação da cromatina no controle do comportamento agressivo dos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço / Fernanda Salgueiredo Giudice ; orientador Décio dos Santos Pinto Jr.; coorientador Rogério Moraes de Castilho. -- São Paulo, 2012.

135 p. : fig., tab. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Patologia Bucal. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão original.

1. Carcinoma de células escamosas. 2. Cromatina. 3. Células-tronco. I. Pinto Jr., Décio dos Santos. II. Castilho, Rogério Moraes de. III. Título.

Giudice FS. O envolvimento da remodelação da cromatina no controle do comportamento agressivo dos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovado em: ____/____/2012.

Banca Examinadora

Prof(a) Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a) Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a) Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a) Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a) Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Agradeço a Deus por me proteger, guiar e acompanhar em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, Sergio e Custodia, os pilares da minha existência, não imagino como agradecer por todo o apoio e suporte que me deram desde sempre. Vocês foram indispensáveis durante todo o meu período de pós-graduação. Obrigada pelas palavras de incentivo nos momentos mais difíceis e por me ajudarem a tornar possível a realização do meu doutorado-sanduiche nos Estados Unidos, um dos meus maiores sonhos. Simplesmente dizer obrigada é muito pouco perto de tudo que vocês representam para mim.

Ao meu querido irmão Rafael, agradeço pela força e amizade de sempre. Torço imensamente pelo seu sucesso e felicidade.

Ao meu noivo Andrés, obrigada pelo seu carinho, respeito, cumplicidade e paciência em todos os momentos, mesmo quando estávamos fisicamente tão longe um do outro. Agradeço pelas palavras sinceras e constantes de incentivo e amor. Obrigada pela presença permanente em minha vida, torcendo de forma incessante pelo meu sucesso e fazendo com que eu sempre enxergue o que há de melhor em mim.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior, por toda a confiança em mim depositada durante a minha vida acadêmica. Ter sido sua aluna de graduação foi um verdadeiro presente, pois você despertou em mim o interesse pela Patologia. Tudo que sei sobre histopatologia aprendi ao seu lado e agradeço pela sua paciência e, acima de tudo, vontade de ensinar. Obrigada também por me apresentar à pesquisa, acreditando no meu potencial desde a iniciação científica, e agradeço imensamente por ter possibilitado minha ida durante o doutorado para *University of Michigan*. Sua disponibilidade, cumplicidade, apoio, conselhos e, especialmente, amizade durante todos esses anos foram essenciais para minha formação como professora e pesquisadora. Espero que possamos ainda desenvolver muitos trabalhos juntos.

Agradeço ao meu coorientador, Prof. Dr. Rogério Moraes de Castilho, e a Profa. Dra. Cristiane Helena Squarize por terem me recebido em seu laboratório na *University of Michigan*, durante meu período de doutorado-sanduíche, possibilitando o desenvolvimento da minha tese. Não tenho palavras para agradecer por todos os ensinamentos, conselhos e orientações. Obrigada por sempre estarem prontos para esclarecer minhas dúvidas e me ajudarem em tudo, tanto dentro como fora do laboratório. Vocês realmente me mostraram o que é “fazer pesquisa” e me inspiraram a continuar persistindo nesse caminho, apesar das dificuldades, demonstrando a cada dia que quem realmente é esforçado e determinado alcança o sucesso. Para mim vocês são verdadeiros exemplos de dedicação e amor à profissão. Aprendi bastante com a nossa convivência e espero desenvolvermos muitos outros trabalhos juntos. Mais uma vez, obrigada pelo carinho, atenção e disponibilidade. Vocês foram essências para realização do meu desejo de fazer um doutorado-sanduíche nos Estados Unidos.

AGRADECIMENTOS

À minha querida e amada família, em especial meus avós, obrigada por sempre rezarem e torcerem muito pelo meu sucesso.

Agradeço às “minhas” três famílias, Barrera, Câmara e Garcilazo, pelo apoio e incentivo. Em especial, aproveito para agradecer à minha cunhada Ana Vitória pelas palavras de estímulo e carinho.

Agradeço à Profa. Dra. Suzana C. Orsini Machado de Sousa por toda a ajuda, disponibilidade e ensinamentos durante a minha pós-graduação. Espelho-me constantemente em sua diplomacia, paciência, simplicidade, dedicação e inteligência.

Aos professores da disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, Marina Helena Cury Gallottini de Magalhães, Fábio Daumas Nunes, Marília Trierveiler Martins, Karem Lopez Ortega e Andréa Mantesso, meus sinceros agradecimentos pelos conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários da disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, Zilda Natalina Ramos Alves, Néia Barbosa dos Santos, Nair Maria Pereira, Elisa dos Santos, Beatriz Costa, Adriana Fraga Costa Paris e Juvani Lago Saturno, agradeço pela amizade e por sempre me ajudarem a superar os diversos obstáculos do cotidiano. Elisa, muito obrigada pelo carinho, ajuda e incentivo desde as minhas primeiras rotinas e reações de imunoistoquímica.

Agradeço ao meu grande amigo Felipe Fornias Sperandio pela ajuda e, acima de tudo, amizade indispensáveis durante todo o período de pós-graduação. Desde a época de colégio, admiro muito sua inteligência e simplicidade. Tenho certeza que a nossa parceria continuará rendendo muitas publicações.

À amiga Luciana Sassa Marocchio, agradeço por toda a força, apoio e incentivos constantes. Obrigada pela amizade e confiança. Tenho certeza que continuaremos a desenvolver muitos trabalhos juntas.

À querida amiga Fátima Guarizo Klingbeil, muito obrigada pelo seu apoio, incentivo, conselhos e opiniões sinceras. Você não imagina como senti sua falta durante o meu doutorado. Trabalhar ao seu lado é sempre um grande prazer, repleto de ensinamentos, descobertas e muitas risadas.

Agradeço à minha grande amiga Aline Corrêa Abrahão que, mesmo longe, nunca deixou de me apoiar, torcer e vibrar com as minhas conquistas. Obrigada pela amizade e companheirismo. Espero podermos trabalhar juntas muitas outras vezes.

Katiuchia Uzzun Sales, muito obrigada pela amizade e carinho, mesmo que a distância. Não esqueço de todos os seus ensinamentos e orientações transmitidos durante a minha iniciação científica. Seu entusiasmo e determinação ainda me incentivam a continuar na área da pesquisa.

Chiara Zagni, Luciana Kauer e João Brito, muito obrigada por tornarem a minha estadia nos Estados Unidos tão prazerosa e divertida. Com vocês dividi muitas lágrimas, mas, principalmente, risadas e conquistas. Obrigada por toda a ajuda, conselhos, conversas, apoio e incentivos. Vocês tornaram-se grandes amigos que vou levar para o resto da minha vida. Espero revê-los em breve.

A todos os meus colegas de pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, desde o período da minha iniciação científica e mestrado, obrigada pela troca de experiências e convivência agradável.

Agradeço a todos que torceram por mim durante toda a minha pós-graduação, em especial, meus queridos amigos, Carolina V. Teixeira, Priscilla Saluceste, Karen Miers, Érika Kayaki, Camila Salgueiredo e Érika Martins Pereira.

Por fim, agradeço o apoio financeiro recebido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

**"A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém
ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê"
(*Arthur Schopenhauer*)**

Giudice FS. O envolvimento da remodelação da cromatina no controle do comportamento agressivo dos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012. Versão original.

RESUMO

Modificações nas histonas são conhecidas por regular a estrutura conformacional da cromatina e a expressão gênica em células adultas e células-tronco pluripotentes. Tem sido postulado que a acetilação e deacetilação das histonas podem influenciar a expressão de genes envolvidos na iniciação, progressão e metástase tumoral, além de contribuir para o desenvolvimento de resistência à quimioterapia. Assim, buscou-se avaliar a influência das modificações nas histonas sobre a biologia do carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP) e sua respectiva subpopulação de células semelhantes às células-tronco (CSC). Inicialmente, foi checado os níveis de acetilação da histona H3 (membro das histonas nucleares associado à compactação da cromatina) em um painel representativo de linhagens celulares de CECP. Posteriormente, para estudar a influência do estroma tumoral no padrão de acetilação da histona H3, o microambiente do tumor foi mimetizado através da utilização de meio condicionado derivado do cultivo de fibroblastos e cultura primária de células endoteliais humanas. Além disso, validamos esses resultados *in vitro* por meio de amostras humanas de CECP. Finalmente, a acetilação e deacetilação da cromatina foi induzida, respectivamente, pela administração dos inibidores das enzimas histona deacetilase tricostatina A (TSA) e histona acetiltransferase curcumina, em linhagens celulares de CECP. Foi feita a análise da formação de esferas (ensaio funcional de células-tronco), juntamente com a verificação dos níveis de ALDH, marcador de células-tronco (citometria de fluxo - FACS), além da determinação do índice de proliferação tumoral (Ki-67) e realização dos ensaios de invasão e migração celular. Linhagens celulares de CECP apresentaram níveis baixos de acetilação da histona H3 e demonstraram capacidade de retenção de uma subpopulação de CSC. Apenas o meio condicionado de células endoteliais humanas foi capaz de alterar a conformação da cromatina, uma vez que induziu o aumento da acetilação da histona H3. Interessantemente, foi também

notado um concomitante aumento da agressividade de linhagens celulares de CECP (aumento dos níveis de BMI-1 e vimentina). Esses resultados foram confirmados em amostras humanas de CECP que mostraram, apenas no fronte de invasão, células com cromatina acetilada. Curiosamente, essas mesmas células também expressaram vimentina. Os tratamentos com TSA e curcumina resultaram na diminuição significativa da subpopulação de CSC, interrompendo a formação de esferas e reduzindo os níveis de ALDH. Além disso, o tratamento com curcumina mostrou resultados muito interessantes, uma vez que gerou uma redução evidente da invasão celular e impactou por completo o potencial de migração tumoral, sendo nesse sentido mais eficiente que a cisplatina, droga antineoplásica bem estabelecida. Por outro lado, o tratamento com TSA induziu a transição epitélio-mesenquimal nas linhagens celulares de CECP, detectada pelo aumento da expressão de vimentina e indução de um fenótipo fusiforme, juntamente com o aumento da invasão tumoral e os níveis de BMI-1. Portanto, a organização da cromatina está envolvida na modulação da presença de CSC e os altos níveis de acetilação das histonas intensificam o comportamento agressivo de células de CECP.

Palavras-chave: Carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço. Remodelação da cromatina. Histona. Células-tronco. Transição epitélio-mesenquimal. BMI-1. Vimentina.

Giudice FS. The involvement of chromatin remodeling in the control of head and neck squamous cell carcinoma behavior [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012. Versão original.

ABSTRACT

Histone modifications are known to regulate chromatin conformation structure and gene expression in adult cells and pluripotent stem cells. It has been postulated that histone acetylation and deacetylation could influence the expression of genes involved in cancer initiation, progression, metastasis, and development of resistance to chemotherapies. Here, we sought to evaluate the influence of histone modifications over the biology of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) and its stem cell-like subpopulation (CSC). Initially, we checked the status of histone H3 acetylation (a member of the core histones associated to chromatin compaction) in a representative set of HNSCC cell lines. Subsequently, to analyze the influence of tumor stroma over the histone H3 acetylation, we mimicked the tumor microenvironment by using conditioned medium from fibroblasts and primary human endothelial cells. Further we validated these *in vitro* findings through human samples of HNSCC. Finally, we induced chromatin acetylation and deacetylation by the administration of the histone deacetylase inhibitor trichostatin A (TSA) and histone acetyltransferase inhibitor curcumin, respectively, in HNSCC cell lines. The analysis of spheres formation (stem cell functional assay), along with the levels of stem cells marker ALDH (showed by flow cytometry - FACS), tumor proliferation index (Ki-67), invasion and migration cellular potencial were verified. HNSCC cell lines showed lower levels of histone H3 acetylation and ability to retain a subpopulation of CSC. Only conditioned media from human endothelial cells was able to alter the conformation of chromatin, since it induced the increase of histone H3 acetylation. Interestingly, it was also noted a concomitant augment of HNSCC cell lines aggressiveness (enhanced BMI-1 and vimentin levels). These findings were confirmed in human samples of HNSCC that showed, only at the invasive front, cells with acetylated chromatin. Curiously, these same cells also expressed vimentin. TSA and curcumin treatments resulted in significant decrease of the CSC subpopulation by disrupting the spheres and reducing the levels of ALDH. Also, curcumin treatment

showed exciting results since it caused an evident reduction of cellular invasion and it impacted the tumoral migration potential, being more efficient than cisplatin, a well-established antineoplastic drug. However, TSA induced epithelial to mesenchymal transition in HNSCC cell lines detected by the upregulation of vimentin and the induction of a fusiform phenotype along with augmented tumor invasion and the levels of BMI-1. Chromatin organization is involved in the modulation of CSC where high levels of histone acetylation intensify the aggressive behavior of HNSCC cells.

Keywords: Head and neck squamous cell carcinoma. Chromatin remodeling. Histone. Stem cells. Epithelial to mesenchymal transition. BMI-1. Vimentin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1	Representação esquemática das regiões anatômicas que podem ser acometidas por câncer de cabeça e pescoço 28
Figura 2.2	Modelo genético de progressão das etapas da carcinogênese oral. A transformação do epitélio normal pelo acúmulo de múltiplas alterações genéticas leva a displasia e, por fim, o carcinoma. As alterações genéticas que ocorrem na carcinogênese oral incluem, por exemplo, a ativação do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), alterações dos supressores de tumor p53 e p16 e superexpressão de ciclina D1 35
Figura 2.3	Representação esquemática da iniciação tumoral e posterior expansão clonal no carcinoma epidermoide bucal..... 36
Figura 2.4	Representação esquemática das etapas de iniciação e progressão tumoral, enfatizando que durante a fase de expansão clonal ocorrem diferentes mutações que levam a formação de uma massa celular heterogênea composta por células exibindo diferentes graus de tumorigenicidade..... 37
Figura 2.5	Características adquiridas pelas células neoplásicas: evasão a apoptose, angiogênese sustentada, ilimitado potencial de replicação, invasão e metástase tecidual, insensibilidade a sinais antiproliferativo e crescimento autossuficiente 38
Figura 2.6	Representação esquemática de três hipóteses de formação do câncer: (1) a partir de uma mutação em uma célula-tronco; (2) célula progenitora sofre duas ou mais mutações ou (3) uma célula totalmente diferenciada sofre várias mutações que a conduzem a um estado menos diferenciado e mais semelhante à uma célula-tronco. Em todos os três cenários, a célula-tronco de câncer resultante perdeu a capacidade de regular a sua própria divisão celular 39
Figura 2.7	Representação esquemática - Origem da CSC: Podem ser provenientes de células-tronco (SC), células amplificadoras transitórias (TA) ou a partir da população de células diferenciadas... 40
Figura 2.8	Representação esquemática da iniciação e progressão tumoral. (A) Neoplasia maligna originada a partir de célula diferenciada, sendo o tumor composto por células exibindo diferentes fenótipos e com potencial para proliferar extensivamente; (B) Câncer formado a partir de uma célula-tronco, sendo que o potencial proliferativo ilimitado do

tumor está ligado apenas a CSC	41
Figura 2.9	Representação ilustrativa do processo de formação e progressão do tumor primário a partir de uma célula específica, ou seja, célula – tronco 42
Figura 2.10	Representação ilustrativa do possível efeito da terapia convencional antineoplásica versus terapia cujo principal alvo são as células-tronco tumorais 43
Figura 2.11	Representação esquemática dos processos de invasão e metástase: (i) invasão de células neoplásicas em direção aos tecidos circundantes, (ii) angiogênese e invasão do sistema circulatório por células tumorais e (iii) metástase 46
Figura 2.12	O equilíbrio entre a acetilação e deacetilação de histonas determina os níveis de transcrição gênica. A acetilação das histonas relaxa a cromatina, permitindo o recrutamento da RNA polimerase II (Pol II) e a ligação de fatores de transcrição (TF) ao DNA, levando a expressão gênica. Já a deacetilação das histonas compacta a cromatina, bloqueando a transcrição 49
Figura 2.13	i) Deacetilação das histonas pelas HDACs influencia a expressão de genes envolvidos na iniciação e progressão tumoral; ii) HDAC reprime (1) a transcrição de inibidores de quinase dependentes de ciclina (CDKI), permitindo a proliferação continuada, (2) fatores de diferenciação e (3) fatores pró-apoptóticos 49
Figura 2.14	HDACi podem restaurar a expressão de genes chaves, impedindo o crescimento celular descontrolado 50
Figura 4.1	Representação esquemática da câmara bipartida composta por inserto exibindo membrana de policarbonato com poros de 8µm de diâmetro recoberta por fibronectina 62
Figura 4.2	Representação esquemática do princípio do sistema ALDEFLUOR® de detecção dos níveis da enzima ALDH em células viáveis 63
Figura 5.1A	Padrão de acetilação da proteína histona 3 no resíduo de lisina 9 em seis linhagens celulares de CEC e uma linhagem celular de queratinócitos normais (NOK-SI) 74
Figura 5.1B	Padrão de expressão da proteína vimentina em linhagens celulares de CEB exibindo baixa expressão da proteína acetil-Histona H3 Lisina9 (AcH3) 74

Figura 5.1C	Padrão de invasão das linhagens celulares HN6 e HN13 (H&E - 20x). Representação gráfica da média e desvio padrão do número de células invasivas presentes nas linhagens celulares HN6 e HN13. A linhagem celular HN6 apresentou potencial de invasão estatisticamente maior quando comparada a linhagem celular HN13 (* $p < 0.0001$). Círculo pontilhado delimitando uma célula invasiva e círculo contínuo apontando poro do inserto 74
Figura 5.1D	Padrão de expressão da enzima ALDH nas linhagens celulares HN6 e HN13. As linhagens celulares HN6 e HN13 apresentaram 11.68% e 4.23% de células positivas, respectivamente 74
Figura 5.2A	Expressão das proteínas acetil-Histona H3 Lisina9 (AcH3), BMI-1 e vimentina nas linhagens celulares HN6 e HN13 submetidas a tratamento com meio condicionado proveniente do cultivo de células endoteliais (MCE) e de fibroblastos (MCF) 77
Figura 5.2B	Cortes histológicos de mucosa normal (a – aumento 40x) e carcinoma epidermoide (b – aumento 20x) corados pela técnica da hematoxilina-eosina (H&E). Padrão de expressão das proteínas acetil-Histona H3 Lisina9 (AcH3 - verde) e vimentina (vermelho) em cortes histológicos de mucosa normal (c – aumento 40x) e carcinoma epidermoide (d – aumento 40x) submetidos à técnica de imunofluorescência. Notar a dupla marcação (AcH3 e vimentina) apenas nas células localizadas no fronte de invasão do carcinoma epidermoide (d) 77
Figura 5.3A	Representação gráfica da média e desvio padrão da porcentagem de células positivas para proteína Ki67 nas linhagens celulares HN6 e HN13. O tratamento com TSA por 24 hs levou a uma queda significativa da proteína Ki67 em ambas as linhagens celulares (* $p = 0.0136$ e ** $p = 0.0011$) 79
Figura 5.3B	Padrão de expressão da proteína ALDH nas linhagens celulares HN6 e HN13. As linhagens celulares HN6 e HN13 apresentaram, respectivamente, 11.38% e 6.13% de células positivas, sendo que após o tratamento com TSA por 24 hs passaram a expressar 4.3% e 0.59% de positividade, respectivamente 79
Figura 5.3C	Ensaio funcional para identificação da presença de células-tronco tumorais. Após 5 dias de cultivo, notou-se a formação de esferas nas linhagens celulares HN6 e HN13. Após 24 hs de tratamento com TSA, observou-se a ruptura dessas esferas 79
Figura 5.4A	Representação gráfica da média e desvio padrão da área de fechamento da fenda (μM^2) em função do tempo (hs) de tratamento com TSA das linhagens celulares NOK-SI, HN6 e HN13. Após o tratamento com TSA, todas as linhagens celulares mostraram uma

tendência ao aumento do potencial de migração quando comparadas ao controle (veículo), porém apenas a linhagem celular NOK-SI mostrou significância estatística (* $p = 0.0361$; ** $p = 0.0004$; *** $p = 0.0002$)..... 81

Figura 5.4B Padrão de invasão das linhagens celulares HN6 e HN13 após tratamento com TSA (H&E - 20x). Representação gráfica da média e desvio padrão do número de células invasivas encontradas nas linhagens celulares HN6 e HN13 após tratamento com TSA. O tratamento com TSA levou a um aumento significativo do potencial de invasão em ambas as linhagens celulares (* $p = 0.0479$ e ** $p = 0.0008$)..... 81

Figura 5.5A Análise morfológica das linhagens celulares NOK-SI, HN6 e HN13 através da técnica de imunofluorescência. A marcação citoesquelética da proteína faloidina evidencia a mudança de formato poligonal para fusiforme, apenas nas células tumorais (HN6 e HN13), após tratamento com TSA (aumento 40x) 83

Figura 5.5B Análise da expressão da proteína vimentina (vermelho) nas linhagens celulares NOK-SI, HN6 e HN13 por meio da técnica de imunofluorescência. A marcação citoesquelética da proteína citoqueratina 14 (verde) e o aumento da expressão da proteína vimentina evidenciam o fenótipo fusiforme nas linhagens celulares HN6 e HN13 após tratamento com TSA, sugerindo o fenômeno chamado transição epitélio-mesenquimal (aumento 20x, sendo o inserto 40x) 83

Figura 5.6A Representação gráfica da média e desvio padrão da porcentagem de células positivas para proteína vimentina nas linhagens celulares NOK-SI, HN6 e HN13 após tratamento com TSA (* $p = 0.0146$ e ** $p < 0.0001$)..... 84

Figura 5.6B Representação gráfica da média e desvio padrão da porcentagem de células positivas para proteína vimentina e exibindo concomitante formato fusiforme encontradas nas linhagens celulares NOK-SI, HN6 e HN13 após tratamento com TSA (* $p = 0.0004$ e ** $p = 0.0002$) 84

Figura 5.6C Análise da expressão da proteína BMI-1 nas linhagens celulares HN6 e HN13 por meio das técnicas de imunofluorescência (aumento 40x) e western blot. Através da marcação citoesquelética da proteína faloidina (vermelho), a técnica de imunofluorescência evidenciou o fenótipo fusiforme, visualizado em ambas as linhagens celulares, após tratamento com TSA. Tanto a técnica de imunofluorescência quanto de western blot detectaram o aumento da expressão da proteína BMI-1 (verde) após tratamento com TSA, sugerindo aumento da agressividade em ambas as linhagens celulares 84

Figura 5.7A	Análise da expressão das proteínas pS6 e p-p65 na linhagem celular HN6 após tratamento com rapamicina (50nM – 30 min.), EGF (100ng/mL – 15 min.) e diferentes doses de curcumina por 8 hs.....	86
Figura 5.7B	Análise da expressão das proteínas pS6 e p-p65 nas linhagens celulares HN6 e HN13 após tratamento com rapamicina (50nM - 30 min.) e curcumina (75µM - 8 hs)	86
Figura 5.7C	Representação gráfica da média e desvio padrão da porcentagem de células positivas para proteína Ki67 nas linhagens celulares HN6 e HN13. O tratamento com curcumina (75µM por 24 hs) levou a uma queda significativa da proteína Ki67 em ambas as linhagens celulares (* p = 0.0018 e ** p < 0.0001).....	86
Figura 5.8A	Padrão de expressão da proteína ALDH nas linhagens celulares HN6 e HN13. As linhagens celulares HN6 e HN13 apresentaram, respectivamente, 11.38% e 6.13% de células positivas, sendo que após o tratamento com curcumina (75µM por 8 hs) passaram a expressar 1.48% e 0.93% de positividade, respectivamente	87
Figura 5.8B	Ensaio funcional para caracterizar a presença de células-tronco tumorais. Após 5 dias de cultivo, notou-se a formação de esferas nas linhagens celulares HN6 e HN13. Após 8 hs de tratamento com curcumina (75µM), observou-se a ruptura dessas esferas	87
Figura 5.9A	Padrão de invasão das linhagens celulares HN6 e HN13 após tratamento com curcumina (75µM por 8 hs) (H&E - 20x). Representação gráfica da média e desvio padrão do número de células invasivas encontradas nas linhagens celulares HN6 e HN13 após tratamento com curcumina. O tratamento com curcumina levou a uma diminuição significativa do potencial de invasão em ambas as linhagens celulares (* p = 0.0010 e ** p = 0.0351).....	89
Figura 5.9B	Análise da expressão da proteína BMI-1 nas linhagens celulares HN6 e HN13 após tratamento com 75µM de curcumina (8 hs).....	89
Figura 5.9C	Análise da expressão das proteínas p-p65 e BMI-1 nas linhagens celulares HN6 e HN13 após tratamento com cisplatina, curcumina, siRNA_IKKα + cisplatina e siRNA_IKKβ + cisplatina	89
Figura 5.10	Representação gráfica da média e desvio padrão da área de fechamento da fenda (µM ²) em função do tempo (hs) de tratamento com cisplatina, siRNA_IKKα + cisplatina, siRNA_IKKβ + cisplatina e curcumina. Após os diferentes tratamentos, com exceção da linhagem celular HN13 tratada com cisplatina, todas as linhagens celulares mostraram diminuição significativa da migração quando comparadas	

ao controle, sendo que o tratamento com a curcumina foi o único que impactou por completo o potencial migratório de ambas as linhagens celulares..... 91

Figura 6.1 Aspecto negativo do tratamento com HDACi em linhagens celulares de CEB..... 102

Figura 6.2 Processo de ativação do fator de transcrição NFkB 106

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Estimativas para o ano de 2012 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e de número de casos novos por câncer, em homens e mulheres, segundo a região	30
Tabela 2.2	Estimativas para o ano de 2012 de número de casos novos de câncer, por região	31
Tabela 2.3	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para o ano de 2012 por sexo, exceto pele não melanoma.....	31
Tabela 2.4	Sobrevida em relação ao estadiamento tumoral	33
Tabela 4.1	Origem das linhagens celulares de CECp	54
Tabela 4.2	Anticorpos utilizados para as reações de western blot	60
Tabela 4.3	Anticorpos utilizados para reação de imunofluorescência - tecido parafinado	67
Tabela 4.4	Anticorpos utilizados para reação de imunofluorescência - linhagens celulares.....	69
Tabela 5.1	Análise estatística do potencial de migração das linhagens celulares HN6 e HN13 após tratamento com cisplatina, siRNA_IKK α + cisplatina, siRNA_IKK β + cisplatina e curcumina (teste t de <i>Student</i> , sendo o nível de significância considerado quando $p < 0.05$).....	91

LISTA DE ABREVIATURAS

acH3	acetil-Histona H3 Lisina9
Akt	Sinônimo de PKB – proteína quinase B
ALDH	<i>Aldehyde dehydrogenase</i> (Aldeído-desidrogenase)
APS	<i>Ammonium persulfate</i> (Persulfato de amônio)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina sérica bovina)
Cal27	Linhagem celular humana de CECF - Língua
CDKI	<i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor</i> (Inibidor de quinase dependente de ciclina)
CEB	Carcinoma Epidermóide Bucal
CECF	Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço
CK14	Citoqueratina 14
CSC	Células-tronco neoplásicas/mutadas/tumorais ou semelhantes às células-tronco (<i>cancer stem-cells</i>)
DEAB	<i>Diethylaminobenzaldehyde</i> (inibidor da enzima ALDH)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (Meio eagle modificado por dulbecco)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i> (Quimioluminescência aumentada)
4E-BP1	<i>4E-binding protein 1</i>
EBV	<i>Epstein-Barr virus</i> (Vírus Epstein-Barr)
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> (Fator de crescimento epidérmico)
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> (Receptor do fator de crescimento epidérmico)
eIF4E	<i>eukaryotic Initiation Factor 4E</i> (Fator de iniciação eucariótico 4E)
HAT	Histona Acetiltransferase
HATi	inibidor da Histona Acetiltransferase
HDAC	Histona Deacetilase
HDACi	inibidor da Histona Deacetilase

H&E	Hematoxilixa & Eosina
Hep2	Linhagem celular humana de CECP - Laringe
HN6	Linhagem celular humana de CECP – Língua
HN12	Linhagem celular humana de CECP - Linfonodo metastático
HN13	Linhagem celular humana de CECP - Língua
HN30	Linhagem celular humana de CECP – Faringe
HPV	<i>Human Papillomavirus</i> (Papiloma vírus humano)
Hs	Horas
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IκB	Inibidor do NFκB
IKK	IκB <i>kinase</i>
kDa	quilodalton
MB	Membrana Basal
MC	Meio Condicionado
MCE	Meio Condicionado Endotelial
MCF	Meio Condicionado Fibroblástico
MEC	Matriz Extracelular
μg	micrograma
μL	microlitro
μm	micrometro
μM	micromolar
mL	mililitro
mM	milimolar
min	minutos
mTOR	<i>mammalian Target Rapamycin</i> (Alvo da rapamicina em mamíferos)
ng	nanograma
nM	nanomolar
NFκB	<i>Nuclear Factor kappa B</i> (fator nuclear kappa B)
NOK-SI	Linhagem celular normal de queratinócitos humanos
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Solução tampão fosfato-salina)
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i> (Fosfatidilinositol-3-quinase)
p-p65	<i>Phospho-p65</i> (proteína p65 NFκB fosforilada na serina 536)
pS6	<i>Phospho-S6</i> (proteína S6 fosforilada na serina 235/236)

S6K1	<i>p70 S6 Kinase 1 - p70 ribosomal protein S6 kinase 1</i> (proteína quinase ribossomal S6 isoforma I de 70 kDa)
S6	<i>Ribosomal protein S6</i> (proteína ribossomal S6)
PVDF	<i>Polyvinylidene Fluoride</i> (Fluoreto de polivinilideno)
IGF-IR	<i>Insulin-like growth factor I receptor</i> (Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo I)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)
rpm	rotações por minuto
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Dodecil sulfato de sódio)
Ser	Serina
SFB	Soro Fetal Bovino
siRNA	<i>short interfering RNA</i> (Interferência de RNA)
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i> (Transdutores de sinal e ativadores de transcrição)
Swiss 3T3	Linhagem celular de fibroblastos (camundongo)
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> (Solução salina tamponada com tris)
TBS-T	<i>Tris-buffered saline tween 20</i> (Solução salina tamponada com tris contendo o detergente <i>tween 20</i>)
TEM	Transição Epitélio-Mesenquimal
TEMED	<i>Tetramethylethylenediamine</i> (Tetrametiletilenodiamina)
TNF α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TSA	Tricostatina A
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
U/ml	Unidade internacional/mililitro

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
CO_2	Dióxido de carbono
ε	Épsilon
γ	Gama
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
κ	Kappa
®	Marca registrada
>	Maior
<	Menor
%	Porcentagem
pH	potencial Hidrogeniônico
X	Vezes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 REVISÃO DE LITERATURA	28
2.1 Carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço	28
2.1.1 carcinoma epidermoide bucal	29
2.1.1.1 <i>epidemiologia</i>	30
2.1.1.2 <i>tratamento e prognóstico</i>	32
2.2 Carcinogênese do carcinoma epidermoide bucal	33
2.3 Invasão e metástase	43
2.4 Terapia epigenética do câncer	47
3 PROPOSIÇÃO	53
4 MATERIAIS E MÉTODOS	54
4.1 Cultivo Celular	54
4.2 Tratamentos <i>in vitro</i>	55
4.3 Técnica de Western Blot	57
4.3.1 extração proteica	57
4.3.2 reação de western blotting	58
4.4 Ensaio de invasão celular	60
4.5 Identificação da subpopulação de células semelhantes às células-tronco (<i>cancer stem cell</i> – CSC) em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço	62
4.5.1 atividade da enzima aldeído-desidrogenase	62
4.5.2 ensaio de formação de esferas	64
4.6 Imunofluorescência - tecido parafinado	65
4.7 Imunofluorescência - linhagens celulares	67
4.8 Técnica de interferência de RNA por siRNA	69
4.9 Ensaio de migração celular	70
4.10 Análise estatística	71
5 RESULTADOS	72

5.1 Verificação do padrão de acetilação da proteína histona 3 no resíduo de lisina 9 em linhagens celulares de CECF.....	72
5.2 Caracterização do padrão biológico associado a agressividade de células neoplásicas exibindo compactação da cromatina	72
5.3 Influência do microambiente tumoral na remodelação da cromatina de CEB	75
5.4 Resposta tumoral positiva ao tratamento com TSA	78
5.5 Resposta tumoral negativa ao tratamento com TSA	80
5.6 Influência positiva da compactação da cromatina em linhagens celulares de CEB.....	85
6 DISCUSSÃO.....	92
7 CONCLUSÕES.....	110
REFERÊNCIAS	112

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP) é a neoplasia maligna de origem epitelial de maior incidência no trato aerodigestivo superior, sendo considerado uma das seis malignidades mais comuns em todo o mundo. Diversos estudos têm focado no estabelecimento de biomarcadores para diagnóstico precoce e melhora no prognóstico, principalmente devido as elevadas taxas de morbimortalidade associadas ao CECP.

A iniciação e progressão tumoral são eventos resultantes do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas. As aberrações genéticas compreendem qualquer modificação irreversível que cause uma mudança na sequência da fita de DNA como, por exemplo, mutação pontual, translocação ou deleção. Por outro lado, as anomalias epigenéticas são todas as mudanças hereditárias e reversíveis do genoma que não alteram a sequência de nucleotídeos do DNA. Dentre os mecanismos principais de alterações epigenéticas, a modificação das histonas é um dos processos mais estudados, estando elas sujeitas a um grande número de mudanças pós-traducionais, incluindo acetilação e deacetilação.

Os processos de acetilação e deacetilação influenciam o grau de compactação da cromatina e, assim, desempenham um importante papel regulatório da expressão gênica. No caso da acetilação, a adição de grupos acetil as histonas, pelas enzimas histonas acetiltransferases (HATs), tende a desestabilizar (relaxar e abrir) a estrutura da cromatina, o que facilita o mecanismo de transcrição. De forma oposta, na deacetilação, grupos acetil são retirados pelas enzimas histonas deacetilases (HDACs), gerando uma maior compactação da estrutura nucleossômica, o que limita a atividade gênica.

É relatado que as enzimas HDACs estão superexpressas em diversos cânceres. Por criarem uma cromatina não permissiva, as HDACs encontram-se relacionadas a regulação da expressão e atividade de diversas proteínas envolvidas, por exemplo, na iniciação, progressão e metástase tumoral, além de contribuir significativamente para o desenvolvimento de neoplasias resistentes aos quimioterápicos convencionais. Desse modo, inibidores das histonas deacetilases (HDACi) vêm sendo considerados como potenciais agentes antineoplásicos. No entanto, a literatura reporta que em alguns tumores, o processo de deacetilação

inibe a transcrição de genes promotores da proliferação e antiapoptóticos, sugerindo que a superexpressão da atividade das HDAC ou a inibição da acetilação, por meio dos inibidores das histonas acetiltransferases (HATi), poderiam também ser vantajosas no tratamento do câncer.

O fenótipo agressivo das neoplasias é em grande parte atribuído à presença de células caracterizadas por exibir altas taxas proliferativas, comportamento agressivo, potencial metastático e capacidade de autorrenovação. Essas células, denominadas de células-tronco neoplásicas (*cancer stem-cells* CSC), constituem uma subpopulação de grande interesse terapêutico e que parece sofrer influência dos processos de remodelação da cromatina.

Por fim, encontra-se bem estabelecida a importância que o microambiente tumoral desempenha em relação a progressão do câncer. Entretanto, o papel do microambiente tumoral no controle epigenético da expressão de genes críticos para a progressão neoplásica continua obscuro.

Nesse sentido, cresce cada vez mais a importância de se entender melhor os processos de remodelação da cromatina, uma vez que alvos epigenéticos estão emergindo como uma abordagem eficaz e valiosa para quimioterapia e quimioprevenção do câncer.

Assim, este estudo objetivou relacionar o comportamento *in vitro* de linhagens celulares de CECP com o processo de remodelação da cromatina. Para isso, as células tumorais foram tratadas com meio condicionado de células endoteliais e fibroblastos, além dos inibidores dos eventos de acetilação (HDACi) e deacetilação (HATi), para avaliação do potencial de proliferação, invasão e migração celular. Também foi analisado o impacto desses tratamentos sobre a subpopulação de CSC, morfologia celular e expressão de biomarcadores associados ao aumento da agressividade e pior prognóstico, como vimentina e BMI-1.

Observou-se em um painel de linhagens celulares derivadas de CECP que as células tumorais apresentam cromatina hipoacetilada e exibem uma subpopulação distinta de CSC. Todavia, o padrão de acetilação das células neoplásicas sofreu influência do microambiente tumoral, gerando em uma das linhagens celulares, abertura global da cromatina, verificada pelo aumento dos níveis de acetilação da histona H3, sendo esse achado acompanhado pelo também aumento da expressão de biomarcadores de agressividade. Essas observações sugeriram que a remodelação da cromatina poderia ditar o comportamento biológico dos tumores de

cabeça e pescoço. Assim, por meio de interferência farmacológica das enzimas HDAC e HAT, avaliou-se que tanto a hiper quanto a hipo acetilação das histonas interrompeu o acúmulo e manutenção de CSC nas linhagens celulares de CECP, mas paradoxalmente a indução da abertura da cromatina promoveu o fenômeno da transição epitelial-mesenquimal (TEM), intimamente associado ao aumento da agressividade tumoral e resistência terapêutica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço

As neoplasias malignas localizadas no trato aerodigestivo superior, ou seja, que acometem cavidade bucal, faringe (composta por: nasofaringe, orofaringe e hipofaringe), laringe, cavidade nasal, seios paranasais e glândulas salivares, são descritas pelo termo coletivo “câncer de cabeça e pescoço”⁽¹⁻³⁾ (Figura 2.1).

Figura 2.1 – Representação esquemática das regiões anatômicas que podem ser acometidas por câncer de cabeça e pescoço (National Cancer Institute at National Institutes of Health – Bethesda, MD, EUA - <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Sites-Types/head-and-neck>)⁽⁴⁾

Aproximadamente 40% dos cânceres de cabeça e pescoço ocorrem na boca, 25% na laringe e 15% na faringe, seguidos por outros sítios de menor acometimento como, por exemplo, glândulas salivares⁽¹⁾. O carcinoma epidermoide representa o principal tipo histológico das neoplasias malignas de cabeça e pescoço, correspondendo a cerca de 90% dos casos^(1-3, 5-8).

O carcinoma epidermoide é uma malignidade de origem epitelial que pode

acometer diferentes regiões do corpo, como pele, lábios, boca, faringe, laringe, esôfago, trato urinário, próstata, pulmões, vagina e colo do útero. Desses sítios anatômicos, pele (não melanoma), cabeça e pescoço, esôfago e pulmão, representam a maioria dos casos. Dada a variedade de tecidos em que surge, o carcinoma epidermoide representa o tipo de câncer mais comum capaz de proliferar, invadir e metastatizar⁽⁷⁾.

Com aproximadamente 500 a 550 mil novos casos e 300 mil mortes anualmente, o carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP) representa uma das seis neoplasias malignas mais comuns no mundo^(3, 9, 10). No Brasil, a cada ano, em torno de 20 mil novos casos de CECP são relatados, sendo essa malignidade responsável por 10 a 11 mil mortes⁽⁶⁾.

2.1.1 carcinoma epidermoide bucal

Dos cânceres de cabeça e pescoço, o carcinoma epidermoide bucal (CEB) é o que apresenta maior prevalência, afetando lábios e a região intrabucal propriamente dita^(1, 5, 6, 9, 10). O CEB é considerado o oitavo câncer mais comum no mundo, sendo que no norte da França, leste da Europa, particularmente na Hungria, e em partes da América do Sul e do sudeste Asiático exibe índices de prevalência particularmente elevados^(8, 11-13).

Apesar da *International Classification of Diseases* (Classificação Internacional de Doenças) bem como o Instituto Nacional do Câncer (INCA) agruparem em uma mesma categoria (câncer oral) os casos de carcinoma epidermoide intrabucal e carcinoma epidermoide de lábio^(6, 14), deve-se ressaltar que a epidemiologia (etiologia e incidência global) e comportamento clínico dessas duas lesões são completamente distintos⁽¹¹⁾. Em linhas gerais, a relação entre câncer de lábio e radiação ultravioleta (UV) do sol, particularmente em pessoas de pele clara, já foi bem estabelecida e tem sido amplamente considerada sua principal causa^(11, 15, 16). Em contrapartida, o carcinoma epidermoide intrabucal acomete principalmente tabagistas e os riscos aumentam quando o tabagista é também alcoólatra⁽⁶⁾. Comparado ao carcinoma intrabucal, o carcinoma epidermoide de lábio apresenta prognóstico significativamente mais favorável⁽⁵⁾.

2.1.1.1 epidemiologia

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o número de novos casos de câncer por ano no mundo tende a aumentar de 12 milhões (2007) para 16 milhões, até 2020, sendo que dois terços deles ocorrerão nas nações em desenvolvimento⁽¹⁷⁾. No Brasil, as estimativas para o ano de 2012, segundo o INCA, apontam 518.510 novos casos de câncer, sendo que desse total, 257.870 casos acometerão o sexo masculino e 260.640 o sexo feminino⁽⁶⁾ (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Estimativas para o ano de 2012 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e de número de casos novos por câncer, em homens e mulheres, segundo a região (INCA, 2012)⁽⁶⁾

Região	Estimativa dos Casos Novos		
	Masculino	Feminino	Total
Norte	10.470	11.230	21.700
Nordeste	42.480	45.870	88.350
Centro-Oeste	23.700	20.930	44.630
Sul	48.180	42.760	90.940
Sudeste	133.040	139.850	272.890
BRASIL	257.870	260.640	518.510

Anualmente, são diagnosticados próximo de 300 mil novos casos de CEB em todo o mundo⁽⁸⁻¹⁰⁾. No Brasil, segundo o INCA, o CEB ocupa a sétima posição entre as neoplasias mais frequentes, sendo que para o ano de 2012, são previstos 14.170 novos casos (Tabela 2.2). Além disso, mais da metade desses novos casos (8.340) deverão acontecer na região sudeste (Tabela 2.2), e o sexo masculino será aproximadamente duas vezes mais acometido que o feminino⁽⁶⁾ (Tabela 2.3).

Tabela 2.2 - Estimativas para o ano de 2012 de número de casos novos de câncer, por região (INCA, 2012)⁽⁶⁾

Localização Primária	Norte	Nordeste	Centro-Oeste	Sul	Sudeste
Próstata	2.390	11.550	5.350	9.490	31.400
Mama Feminina	1.530	8.970	3.470	9.350	29.360
Colo do Útero	1.860	5.050	2.020	2.000	6.610
Traqueia, Brônquio e Pulmão	1.030	3.890	1.860	7.820	12.720
Cólon e Reto	690	3.280	2.080	5.370	18.720
Estômago	1.300	3.940	1.480	3.410	9.960
Cavidade Oral	390	2.550	850	2.040	8.340
Laringe	210	1.090	400	1.310	3.100
Bexiga	210	940	610	1.650	5.490
Esôfago	190	1.550	650	2.830	5.200
Ovário	200	1.250	420	1.110	3.210
Linfoma não Hodgkin	290	1.540	610	1.600	5.600
Glândula Tireoide	580	1.670	460	1.480	6.400
Sistema Nervoso Central	290	1.650	740	1.870	4.720
Leucemias	500	1.840	630	1.520	4.020
Corpo do Útero	110	900	320	790	2.400
Pele Melanoma	120	610	390	1.580	3.530
Outras Localizações	3.400	14.040	5.480	14.810	44.110
Subtotal	15.290	66.310	27.820	70.030	204.890
Pele não Melanoma	6.410	22.040	16.810	20.910	68.000
TOTAL	21.700	88.350	44.630	90.940	272.890

Tabela 2.3 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo, exceto pele não melanoma (INCA, 2012)⁽⁶⁾

Localização primária	casos novos	percentual			Localização primária	casos novos	percentual
Próstata	31.400	30,3%			Mama Feminina	29.360	29,0%
Cólon e Reto	8.920	8,6%			Cólon e Reto	9.800	9,7%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	7.950	7,7%			Colo do Útero	6.610	6,5%
Estômago	6.250	6,0%			Glândula Tireoide	6.400	6,3%
Cavidade Oral	5.880	5,7%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	4.770	4,7%
Esôfago	3.940	3,8%			Estômago	3.710	3,7%
Bexiga	3.790	3,7%			Ovário	3.210	3,2%
Laringe	3.100	3,0%			Linfoma não Hodgkin	2.680	2,6%
Linfoma não Hodgkin	2.920	2,8%			Cavidade Oral	2.460	2,4%
Sistema Nervoso Central	2.420	2,3%			Corpo do Útero	2.400	2,4%

Com relação aos agentes etiológicos, o hábito de fumar ou ingerir bebida alcoólica são os principais fatores relacionados ao início do processo de carcinogênese do CEB. Todavia, o seu risco de ocorrência aumenta significativamente quando o uso do tabaco é associado ao etilismo. A exposição a esses fatores parece atuar sinergicamente, ou seja, cada fator por si só pode contribuir para um aumento de duas a três vezes no risco de incidência de CEB, no entanto, esse risco aumenta significativamente (15 vezes mais) quando o uso do tabaco e o consumo de álcool são combinados^(1, 5, 6, 18-21). Entretanto, já que apenas uma parcela do grupo de pessoas com esses vícios desenvolve CEB, existem dados que sugerem outros fatores etiológicos.

Dessa maneira, hereditariedade, medicamentos, poluição ambiental, certas

condições de trabalho, má alimentação, hábito de mascar betel e agentes infecciosos como, por exemplo, HPV (*Human Papillomavirus*), principalmente dos tipos 16 e 18, e o EBV (*Epstein-Barr virus*) são outros fatores que podem contribuir para o aparecimento do CEB mostrando, desse modo, o motivo pelo qual esse tipo de câncer é definido como sendo uma doença de caráter multifatorial^(1, 5, 6, 20, 22).

Vale ressaltar que os fatores etiológicos e a aparência clínica de lesões com potencial de malignização são dados pobres para avaliar o risco real de desenvolvimento e progressão do CEB. Portanto, fazem-se necessários biomarcadores preditores e que também auxiliem no diagnóstico precoce dessa doença⁽²³⁾.

Estudos epidemiológicos mostram que a incidência de CEB aumenta com a idade, sendo que a maioria dos pacientes acometidos por essa neoplasia possui mais de 45 anos^(1, 5, 6, 8). No entanto, nas últimas décadas, alguns trabalhos têm apontado um aumento do número de casos em pessoas com menos de 40 anos de idade^(7, 24-27). Na maioria das vezes, esses pacientes não foram submetidos a reconhecidos fatores de risco, como álcool e/ou tabaco, ou o tempo de exposição a esses fatores foi muito curto para provocar uma transformação maligna. A causa mais provável sugerida, atualmente, é a predisposição genética desses pacientes associada a outros agentes como imunodeficiência, infecções virais e risco ocupacional^(26, 27), todavia, mais trabalhos necessitam ser realizados devido à escassez de informação na literatura.

2.1.1.2 tratamento e prognóstico

O tratamento do CEB resume-se na utilização isolada ou associada de três procedimentos: a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia. Em muitos casos há a necessidade de se combinar essas três modalidades. O protocolo de tratamento depende, em linhas gerais, do estágio em que se encontra a neoplasia no momento do diagnóstico⁽⁶⁾. Infelizmente, ainda hoje, os sobreviventes são marcados por disfunções estéticas e funcionais o que acarreta diretamente em queda da qualidade de vida⁽²⁸⁻³⁰⁾.

O prognóstico de pacientes com CEB depende da área da boca

comprometida e do estadiamento do sistema TNM (Classificação de Tumores Malignos). As lesões iniciais (I-II) têm um prognóstico melhor em comparação com as lesões avançadas (III - IV)^(6, 31) (Tabela 2.4).

Apesar dos avanços terapêuticos para os cânceres de uma maneira geral, os índices de sobrevida para o CEB ainda são considerados baixos^(3, 31, 32). Em média, metade dos pacientes morre em cinco anos⁽³³⁾, sendo esse tempo de sobrevida bem menor do que o de outras neoplasias como mama, cólon, reto, rim e pele/melanoma⁽³⁴⁾. Tais índices, geralmente são consequência do diagnóstico tardio, da falta de marcadores biológicos bem estabelecidos para a detecção precoce da doença e da falha na resposta às terapias atuais⁽³²⁾.

Tabela 2.4 - Sobrevida em relação ao estadiamento tumoral (INCA, 2012)⁽⁶⁾

Sítio primário	Sobrevida em cinco anos Percentual / Estádio			
	I	II	III	IV
Língua oral	35-85	26-77	10-50	0-26
Assoalho da boca	58-75	40-64	21-43	0-15
Rebordo gengival	73	41	17	0-10
Mucosa jugal	77-83	44-65	20-27	0-18
Área retromolar	70	57,8	46,5	0-10
Palato duro	60-80	40-60	20-40	0-30

2.2 Carcinogênese do carcinoma epidermoide bucal

O CEB surge como resultado de múltiplos eventos moleculares que se desenvolvem em um indivíduo susceptível, ou seja, apesar da comprovada influência de fatores carcinogênicos extrínsecos, como fumo e álcool, o CEB é uma doença em que a predisposição genética (por exemplo, existências de disfunções em genes de reparo) exerce um papel importante na sua patogênese^(22, 35).

Dessa maneira, a carcinogênese bucal é um processo composto por várias etapas, sendo modulado por fatores endógenos e ambientais (fatores predisponentes), que podem gerar uma grande variedade de eventos genéticos e epigenéticos, promovendo instabilidade genômica e, consequente, desenvolvimento/progressão tumoral^(36, 37). As alterações genéticas e epigenéticas

frequentemente trabalham em conjunto, afetando múltiplas vias celulares ligadas ao processo de carcinogênese e progressão neoplásica, tais como as relacionadas a regulação do ciclo celular, reparação de DNA, apoptose, angiogênese e adesão célula-a-célula⁽³⁸⁾.

O termo epigenética refere-se a todas as mudanças hereditárias e reversíveis do genoma que não alteram a sequência de nucleotídeos do DNA. Existem três mecanismos principais de alterações epigenéticas: metilação do DNA, modificações de histonas e ação de RNAs não codificadores⁽³⁶⁻⁴¹⁾.

Os eventos epigenéticos são importantes na fisiologia de células normais⁽³⁹⁾. Com pequenas exceções (células B e T do sistema imune), todos os processos de diferenciação celular são acionados e mantidos através de mecanismos epigenéticos⁽³⁶⁾. Sabe-se, por exemplo, que a metilação do DNA desempenha um papel importante no controle da expressão de genes (silenciamento) durante o desenvolvimento embrionário⁽³⁹⁾. Por outro lado, a ativação de genes que controlem o potencial de crescimento de células humanas adultas é de suma importância, de tal forma que, se sem impedimentos, uma única célula pode atingir uma massa de 1kg (10^{12} células) em 40 dias por divisão celular⁽⁴²⁾. Portanto, os eventos epigenéticos governam uma série de “checagens e balanços”, dessa maneira, controlando os vários processos celulares, como diferenciação e proliferação celular, e regulando genes supressores de tumores que devem estar ativos em células normais, mas tornam-se silenciado em cânceres^(36, 38-41, 43).

No CEB, alterações epigenéticas como a metilação do DNA, metilação de histonas e deacetilação têm sido apontadas como responsáveis por silenciar genes chaves participantes do controle da proliferação celular, diferenciação e integridade do genoma⁽³⁹⁾. Assim, estudos mostram o silenciamento epigenético de genes envolvidos, por exemplo, na regulação do ciclo celular (*p16^{INK4a}*, *p15^{INK4b}* e *p14^{ARF}*), na reparação do DNA (*hMLH1* e *MGMT*), na adesão célula-célula/célula-matriz (*E-caderina* e *H-caderina*), apoptose (*DAPK*, *TMS1* e *caspase-8*), na angiogênese (*THBS-1* e *p73*)^(36, 38, 39, 44). Kulkarni e Saranath⁽⁴⁵⁾, Chang et al.⁽⁴⁶⁾ e Wong et al.⁽⁴⁷⁾ são alguns exemplos de trabalhos que mostram a indução de modificações epigenéticas (metilação dos genes *p14* e *p15*) associadas a carcinogênese do CEB.

As alterações genéticas compreendem qualquer modificação irreversível que cause uma mudança na sequência da fita de DNA como, por exemplo, mutação pontual, translocação ou deleção^(36, 48, 49).

O desenvolvimento e progressão de lesões potencialmente malignas e carcinomas na cavidade bucal está associado ao acúmulo de alterações genéticas, incluindo, por exemplo, deleções, amplificações e mutações, que levam tanto a ativação de oncogenes ou a inativação de genes supressores tumorais^(36, 48, 49).

Nesse sentido, a exposição celular crônica a carcinógenos pode danificar genes ou até cromossomos (por exemplo, deleção da região cromossômica 3p, 9p, 13q e 18q ou perda de heterozigosidade da região cromossômica 4q, 8p, 11q, 13q, 14q e 17p) podendo desencadear uma série de mutações genéticas consecutivas, amplificação de oncogenes (por exemplo, *ciclina D1*, *EGFR*) que promovem a proliferação e sobrevivência celular desregulada, bem como a inativação de genes supressores tumorais (por exemplo, *p53*, *p16*) envolvidos na regulação do ciclo celular. O acúmulo dessas alterações genéticas pode levar ao desenvolvimento de lesões potencialmente malignas (displásicas) e posteriormente o câncer propriamente dito^(28, 35, 50-52) (Figura 2.2).

Figura 2.2 – Modelo genético de progressão das etapas da carcinogênese oral. A transformação do epitélio normal pelo acúmulo de múltiplas alterações genéticas leva a displasia e, por fim, o carcinoma. As alterações genéticas que ocorrem na carcinogênese oral incluem, por exemplo, a ativação do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), alterações dos supressores de tumor p53 e p16 e superexpressão de ciclina D1⁽⁵¹⁾. Adaptado de Lippman et al.⁽⁵³⁾

No caso do CEB, estima-se que sejam necessárias 6-10 mutações para as células tornarem-se malignas, o que normalmente requer anos de exposição a carcinógenos para ocorrer uma combinação de mutações apropriadas que culminariam na transformação neoplásica. Dessa maneira, a evolução de uma célula

normal para uma célula maligna define um período de tempo caracterizado como estágio potencialmente maligno, uma fase precoce do processo de carcinogênese⁽⁵⁴⁾.

Desse modo, o CEB é resultado do acúmulo de mutações genéticas/epigenéticas, as quais são transmitidas às gerações celulares subsequentes, até o momento em que uma célula mutada torna-se independente, ou seja, exibe crescimento autossuficiente e autônomo, não respondendo a sinais proliferativos inibitórios, o que resulta em um tumor apresentando crescimento não controlado. As células neoplásicas, portanto, escapam da morte celular programada e replicam-se infinitamente através do processo de imortalização pelo alongamento de seus telômeros. A esse processo proliferativo desenfreado das células mutadas, dá-se o nome de expansão clonal⁽³⁴⁾ (Figura 2.3).

Figura 2.3 - Representação esquemática da iniciação tumoral e posterior expansão clonal no carcinoma epidermoide bucal (National Cancer Institute at National Institutes of Health – Bethesda, MD, EUA - <http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>)⁽⁵⁵⁾

Durante a etapa de expansão clonal acontecem inúmeras outras mutações devido à desregulação dos mecanismos de proliferação e diferenciação celulares. Essas mutações adicionais são responsáveis pela heterogeneidade e progressão tumoral. Dessa maneira, a massa neoplásica torna-se heterogênea e individual^(50, 52).

Em consequência, essas células neoplásicas adquirem características aberrantes como, por exemplo, intenso potencial de proliferação, invasão e metástase⁽⁵⁰⁾ (Figura 2.4).

Hanahan e Weinberg⁽⁵⁰⁾ descreve seis características essenciais das células neoplásicas que as distinguem de suas contrapartes normais (Figura 2.5):

- (i) autossuficiência em relação a sinais de crescimento;
- (ii) insensibilidade aos sinais inibidores de crescimento;
- (iii) evasão da morte celular programada;
- (iv) imortalidade ou ilimitado potencial replicativo;
- (v) angiogênese sustentada;
- (vi) invasão de tecidos e metástases.

Figura 2.4 – Representação esquemática das etapas de iniciação e progressão tumoral, enfatizando que durante a fase de expansão clonal ocorrem diferentes mutações que levam a formação de uma massa celular heterogênea composta por células exibindo diferentes graus de tumorigenicidade⁽⁵²⁾

Figura 2.5 - Características adquiridas pelas células neoplásicas: evasão a apoptose, angiogênese sustentada, ilimitado potencial de replicação, invasão e metástase tecidual, insensibilidade a sinais antiproliferativo e crescimento autossuficiente. Adaptado de Hanahan e Weinberg⁽⁵⁰⁾

Muitos autores acreditam que as células normais diferenciadas não sobrevivam tempo suficiente para acumular alterações genéticas e epigenéticas necessárias para o desenvolvimento tumoral^(56, 57). Dessa maneira, mutações capazes de gerar uma neoplasia maligna ocorreriam em células específicas. Essas células seriam aquelas com características de células-tronco⁽⁵⁷⁻⁶¹⁾. No entanto, alguns pesquisadores preferem a hipótese de que células progenitoras ou adultas diferenciadas sofreriam mutações que as reprogramariam para um estado menos diferenciado tornando-as semelhantes às células-tronco^(57, 61). Independente da teoria sugerida, a célula-tronco mutada (*cancer stem cell* - CSC) perde a capacidade de regular a sua própria divisão celular⁽⁵⁷⁻⁶⁵⁾ (Figura 2.6).

Figura 2.6 – Representação esquemática de três hipóteses de formação do câncer: (1) a partir de uma mutação em uma célula-tronco; (2) célula progenitora sofre duas ou mais mutações ou (3) uma célula totalmente diferenciada sofre várias mutações que a conduz a um estado menos diferenciado e mais semelhante à uma célula-tronco. Em todos os três cenários, a célula-tronco de câncer resultante perdeu a capacidade de regular a sua própria divisão celular (National Cancer Institute at National Institutes of Health – Bethesda, MD, EUA - http://stemcells.nih.gov/info/Regenerative_Medicine/2006chapter9.htm)⁽⁵⁷⁾

Na cavidade bucal, nota-se a presença de um epitélio pavimentoso estratificado exibindo variações em relação a graus de proliferação, queratinização e diferenciação. Uma pequena população de células-tronco, localizada na camada basal e exibindo ciclagem lenta, é a responsável por manter o potencial proliferativo do tecido enquanto uma porção maior de células apresenta um ritmo rápido de proliferação (células amplificadoras transitórias), estando comprometidas com a diferenciação, após um número finito de divisões. Assim, as células amplificadoras transitórias em dado momento sofrem diferenciação terminal, mantendo, desse modo, no tecido epitelial, uma alta produção de células diferenciadas a partir de um pequeno número de células-tronco. Neste caso, portanto, seguindo a teoria mostrada na Figura 2.6, sugere-se que as CSC podem ter origem na população de

células-tronco, nas células amplificadoras transitórias ou nas células diferenciadas, não havendo ainda nenhum consenso^(61, 62) (Figura 2.7).

Figura 2.7 – Representação esquemática - Origem da CSC: Podem ser provenientes de células-tronco (SC), células amplificadoras transitórias (TA) ou a partir da população de células diferenciadas (Diff)⁽⁶¹⁾

As células-tronco são distinguidas de outras células por três características essenciais: (1) autorrenovação, isto é, na divisão celular, uma ou ambas as células filhas retêm as propriedades biológicas idênticas às da célula-mãe, (2) capacidade de se diferenciar em múltiplas linhagens/tecidos – pluripotentes e (3) potencial para proliferar extensivamente. A combinação dessas três propriedades torna as células-tronco únicas⁽⁶³⁾.

O atributo da autorrenovação é especialmente notável, uma vez que a sua desordem é altamente relevante para o processo de malignização. A autorrenovação aumentada de forma aberrante em combinação com o potencial de crescimento intrínseco das células-tronco podem ser responsáveis por muito do que é considerado como um fenótipo maligno⁽⁶³⁻⁶⁵⁾.

O conceito de CSC foi originalmente baseado no fato de que quando células neoplásicas foram analisadas quanto ao seu potencial proliferativo por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo*, apenas uma minoria de células mostraram extensa proliferação⁽⁵⁸⁾. Essa observação deu origem a ideia de que as neoplasias malignas são heterogêneas, sendo formadas por uma pequena subpopulação de células exibindo grande potencial proliferativo (CSC), bem como por um grupo maior de células mais diferenciadas e apresentando capacidade proliferativa muito mais limitada⁽⁶⁶⁾.

Dessa maneira, tradicionalmente acredita-se que neoplasias malignas são originadas a partir de células diferenciadas, sendo progressivamente compostas por

diferentes tipos celulares exibindo, em sua maioria, potencial para proliferar extensivamente e até formar novos tumores (Figura 2.8A). Já a teoria baseada na CSC, os tumores são formados a partir de mutações em células-tronco, contudo, somente as CSC teriam potencial para proliferar de forma ilimitada e formar novos tumores (Figura 2.8B)⁽⁶⁶⁾.

Figura 2.8 – Representação esquemática da iniciação e progressão tumoral. (A) Neoplasia maligna originada a partir de célula diferenciada, sendo o tumor composto por células exibindo diferentes fenótipos e com potencial para proliferar extensivamente; (B) Câncer formado a partir de uma célula-tronco, sendo que o potencial proliferativo ilimitado do tumor está ligado apenas a CSC⁽⁵⁸⁾

É postulado que, a heterogeneidade dos tumores formados a partir de células-tronco dá-se devido a CSC originar dois tipos de células-filhas^(60, 63, 67) (Figura 2.9):

- ✓ Idênticas = imortalizadas, indiferenciadas e com capacidade de autorrenovação;
- ✓ Não-Idênticas = não-imortalizadas, portanto, exibindo potencial proliferativo limitado e encontradas em diferentes graus de diferenciação (células amplificadoras transitórias), pois relata-se uma falha na diferenciação normal dessas células (parada da maturação), levando ao acúmulo e crescimento do tumor.

Figura 2.9- Representação ilustrativa do processo de formação e progressão do tumor primário a partir de uma célula específica, ou seja, célula-tronco. Adaptado de Jordan et al.⁽⁶³⁾

As células-tronco neoplásicas idênticas permaneceriam em um estado predominantemente quiescente na massa tumoral, porém teriam um importante papel na recorrência do tumor pós-tratamento, pois acredita-se que sejam quimiorresistentes às terapias atuais (Figura 2.10)^(58, 63, 67, 68).

Em geral, as terapias convencionais diminuem o tamanho dos tumores, pois eliminam a maioria das células neoplásicas, ou seja, as que apresentam potencial proliferativo limitado e variados graus de diferenciação. Normalmente, as CSC mostram-se menos sensíveis a essas terapias, continuando viáveis após o tratamento e mantendo o potencial para restabelecer o tumor (recidiva). Em contrapartida, se as terapias forem direcionadas contra as CSC, inicialmente não será observada uma diminuição significativa do tamanho do tumor, entretanto, chances de recidiva serão praticamente excluídas, uma vez que as CSC seriam mais eficazmente eliminadas, tornando os tumores incapazes de manter-se, crescer ou recidivar (Figura 2.10). Assim, novas terapias precisam ser desenvolvidas tendo como alvo células-tronco neoplásicas^(58, 63, 67, 68).

A identificação de CSC em tumores sólidos foi demonstrada pela primeira vez em 2003 pelo isolamento de uma subpopulação rara de células-tronco em tumor de mama primário humano, que foi enriquecida pela sua capacidade de formar tumores em camundongos imunocomprometidos⁽⁶⁹⁾. Subpopulações de células tumorais com características de células-tronco foram também identificadas em neoplasias de próstata, melanoma, CECP, entre outras⁽⁷⁰⁻⁷³⁾.

Figura 2.10- Representação ilustrativa do possível efeito da terapia convencional antineoplásica versus terapia cujo principal alvo são as células-tronco tumorais (CSC)⁽⁵⁸⁾

2.3 Invasão e metástase

De todos os processos envolvidos na carcinogênese, invasão local e posterior formação de metástases são os eventos clinicamente mais relevantes, mas infelizmente os menos bem compreendidos a nível molecular⁽⁷⁴⁾.

Os carcinomas são caracterizados por apresentar invasão de células neoplásicas no tecido conjuntivo subjacente⁽⁷⁵⁾ (Figura 2.11). Na transição do carcinoma *in situ* para carcinoma invasivo há o rompimento da membrana basal (MB), pela proliferação de células epiteliais neoplásicas que possuem elevada capacidade proteolítica. Assim, a travessia das células neoplásicas pelas barreiras da MB é resultado da síntese de proteínas ativas e a aquisição de um fenótipo invasivo⁽⁷⁶⁾.

A MB, visível ao microscópio de luz, é constituída por duas estruturas: lâmina fibrorreticular, formada por pequenos feixes de fibras reticulares, e lâmina basal, que exhibe cinco componentes principais: colágeno tipo IV, laminina, heparan sulfato, entactina e fibronectina. A MB compartimentaliza os tecidos, facilita a ancoragem de células adjacentes, age como filtro seletivo e estoca macromoléculas. Além disso, por não possuir poros que permitem migração passiva celular, é barreira seletiva para qualquer tipo de célula, além de ter um papel importante em uma série de

doenças infecciosas, dermatológicas e tumorais^(77, 78).

O processo de invasão tecidual compreende dois eventos simultâneos: infiltração e posterior destruição dos tecidos normais adjacentes⁽⁷⁹⁾. Ambos os eventos são influenciados pelo estroma tumoral, sendo amplamente aceito que as células neoplásicas mantêm contínua e recíproca comunicação com o microambiente que as envolve, ou seja, a massa tumoral não sobrevive como uma entidade isolada^(80, 81).

O estroma tumoral compreende um compartimento não celular e um celular. O compartimento não celular é composto pelas proteínas da matriz extracelular (MEC), como a laminina, fibronectina, colágeno e vitronectina. Por outro lado, o compartimento celular é formado por fibroblastos, miofibroblastos, endoteliócitos, pericitos, células de músculo liso, adipócitos, macrófagos, linfócitos e mastócitos^(82, 83).

Existem muitas maneiras pelas quais as células tumorais podem interagir e ser influenciadas por seu microambiente: (i) as células tumorais, além de se relacionar umas com as outras por meio de junções intercelulares, podem interagir diretamente com o estroma tumoral aderindo-se a células estromais ou a MEC, (ii) além desses mecanismos baseados em adesão, as células do tumor também podem comunicar-se umas com as outras e com as células do estroma através de secreção de fatores solúveis de forma autócrina ou parácrina⁽⁸²⁾.

Assim, as células mantêm contato entre si e com as células estromais através das junções intercelulares e também se relacionam por intermédio da complexa rede de proteínas e polissacarídeos da MEC, em parte responsável pela diversidade morfológica, funcional e patológica dos diversos tecidos⁽⁸⁴⁾. De acordo com Shrestha et al.⁽⁸¹⁾, os constituintes da MEC contribuem diretamente ou indiretamente no processo de invasão tecidual, pelo fato dessa estrutura conter componentes moduladores de adesão, proliferação e migração/invasão celular.

Como no epitélio da mucosa normal, as células neoplásicas também expressam moléculas que medeiam a adesão célula-MEC (integrinas) e a adesão célula-célula (caderinas e cateninas). Moléculas de adesão são proteínas importantes relacionadas a vias de sinalização envolvidas na promoção da sobrevivência e proliferação celular. Resultados recentes também indicam que integrinas e caderinas/cateninas participam da regulação do comportamento invasivo de tumores, uma vez que durante a invasão do CEB, as células migram ativamente

através da MEC devido a remodelação simultânea de suas adesões intercelulares e indução de alterações citoesqueléticas⁽⁷⁹⁾.

Kudo et al.⁽⁸⁵⁾ isolaram clones invasivos de uma linhagem derivada de CEB usando um método de invasão *in vitro* (câmaras de invasão) e, assim, demonstraram que nesses clones houve uma redução de caderina-E e β -catenina, moléculas responsáveis pela adesão celular, favorecendo, portanto, o processo de invasão devido à ligação célula-célula estar prejudicada. Dessa maneira, as células com maior potencial invasivo, ou seja, células do fronte de invasão tendem a separar-se da massa tumoral devido a serem funcionalmente independentes, além de apresentarem uma significativa perda de sensibilidade a apoptose, o que lhes confere uma maior agressividade^(74, 85).

É importante também ressaltar que, com o desenvolvimento e progressão tumoral, os CEB caracterizam-se por apresentar massa celular heterogênea composta por células exibindo diversos graus de tumorigenicidade. Com isso, células apresentando diferentes potenciais de invasão, por exemplo, podem existir dentro de um mesmo tumor primário. Assim, é necessário considerar as características intrínsecas das células tumorais, sendo que algumas podem mostrar alterações na expressão de moléculas de adesão, por exemplo, levando a um fenótipo altamente invasivo^(50, 52, 79, 86, 87).

A perda da adesão celular, associada à capacidade de degradação da MEC, devido à síntese de proteínas proteolíticas, e ganho de potencial de migração (motilidade) são passos importantes para que ocorra a invasão tecidual^(74, 85). Em alguns carcinomas, essas alterações são acompanhadas de modificações morfológicas, refletidas pela aquisição de um fenótipo fusiforme. Esse fenômeno é denominado de transição epitélio-mesenquimal (TEM) e é resultado direto da expressão de genes epiteliais com concomitante aquisição da expressão de genes mesenquimais. Transformações ligadas a TEM são críticas para o processo de invasão, progressão e metástase⁽⁸⁸⁻⁹⁵⁾. É relatado na literatura que a TEM não somente está relacionada com aumento da invasão e metástase, mas também contribui para resistência às terapias^(68, 96, 97).

Para que ocorra o crescimento e a progressão neoplásica, há a necessidade de um aporte suficiente de sangue a fim das células tumorais poderem obter oxigênio/nutrientes e descartar resíduos. Estudos mostram que a carcinogênese está associada com a formação de novos vasos⁽⁷⁵⁾ (angiogênese – Figura 2.11)

devido ao predomínio de fatores pró-angiogênicos. Além disso, os tumores sólidos necessitam de uma rica rede vascular para alcançarem dimensões clinicamente evidentes e também para adquirirem a capacidade de metastatizar, o que representa um fator-chave na definição da agressividade em geral e para o prognóstico do próprio tumor. Desse modo, para o crescimento, invasão e metástase dos CEB, a formação de novos vasos é crítica. Por essa razão, os tumores com maior densidade de vasos parecem mostrar vantagem em termos de crescimento e progresso acelerado do que os tumores com pobre vascularização^(50, 98-103).

Aproximadamente 90% de todas as mortes por câncer surgem da disseminação metastática dos tumores primários⁽⁷⁴⁾. Por definição, metástase constitui um crescimento neoplásico à distância, sem continuidade e sem dependência do foco primário⁽⁸⁵⁾. Os carcinomas, em geral, exibem células neoplásicas com potencial de invasão e migração em direção a vasos sanguíneos ou linfáticos, objetivando formar metástases regionais ou em locais distantes^(75, 104) (Figura 2.11).

Figura 2.11 – Representação esquemática dos processos de invasão e metástase: (i) invasão de células neoplásicas em direção aos tecidos circundantes, (ii) angiogênese e invasão do sistema circulatório por células tumorais e (iii) metástase (National Cancer Institute at National Institutes of Health – Bethesda, MD, EUA - <http://www.cancer.gov/cancertopics/understandingcancer/cancer/page8>)⁽⁷⁵⁾

Portanto, os processos de invasão e migração fazem com que as células neoplásicas entrem em vasos sanguíneos ou linfáticos, disseminem para dentro da

circulação e proliferem em outros sítios anatômicos^(85, 105). Assim, esses eventos devem ser bem compreendidos, pois o mais importante indicador prognóstico atual para pacientes com CECP é a metástase para linfonodos cervicais ou para órgãos distantes^(86, 105).

A incidência de metástases depende de alguns fatores, como localização e estadiamento (estágio) do tumor primário⁽¹⁰⁶⁾. A presença de metástases regionais (linfonodos cervicais – via linfogênica) em pacientes com CECP é um evento comum e adverso associado com pior prognóstico e alta mortalidade^(105, 107). Já a incidência de metástases à distância (via hematogênica) é relativamente pequena, porém quando presente afeta de forma significativa o planejamento do tratamento e as taxas de sobrevida^(105, 106). Metástases pulmonares são as mais frequentes no CECP, respondendo por 66% de metástases à distância. Outros sítios metastáticos acometidos incluem osso (22%), fígado (10%), pele, mediastino e medula óssea⁽¹⁰⁶⁾.

2.4 Terapia epigenética do câncer

Epigenética é o termo usado para descrever mudanças na expressão gênica, mitoticamente e/ou meioticamente herdáveis, contudo, sem alterações na sequência do DNA. As mudanças epigenéticas são cruciais para o desenvolvimento e diferenciação dos diversos tipos de células de um organismo, bem como para os processos celulares normais, por exemplo inativação de um dos cromossomos X em mamíferos do sexo feminino, replicação, transcrição, recombinação e reparo do DNA. No entanto, os estados epigenéticos podem ser rompidos por influências ambientais ou durante o envelhecimento, um vez que são eventos reversíveis. Dessa maneira, a importância de mudanças epigenéticas no desenvolvimento de cânceres e outras doenças tem sido cada vez mais evidenciada⁽¹⁰⁸⁻¹¹⁰⁾. Dois dos fenômenos epigenéticos mais estudados são metilação do DNA e modificações das histonas⁽¹⁰⁹⁾.

A molécula de DNA é enrolada ao redor de estruturas compostas por oito histonas formando os chamados nucleossomos, unidades fundamentais da cromatina. As histonas funcionam como um importante componente estrutural nuclear e como reguladoras do perfil de expressão gênica em vários tipos de

tecidos. As histonas exibem caudas que se projetam para fora dos nucleossomos estando, desse modo, sujeitas a um número grande de modificações pós-traducionais, incluindo acetilação, deacetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação, SUMOilação, ADP-ribosilação, glicosilação, biotinilação e carbonilação⁽¹¹¹⁾.

As alterações nas caudas N-terminais das histonas são catalisadas por enzimas, como histonas acetiltransferases (HATs), histonas deacetilases (HDACs), histonas metiltransferases (HMTs) e histonas demetilases (HDMs). A modificação das histonas regula padrões de expressão de genes específicos, ou seja, esse processo pode alterar a acessibilidade dos fatores de transcrição a cromatina, bem como recrutar coativadores ou repressores para genes alvo, modulando, assim, a expressão do gênica⁽¹¹²⁾.

Os processos de acetilação e deacetilação influenciam o grau de compactação da cromatina e, assim, desempenham um papel regulatório importante da expressão gênica⁽¹¹³⁾. No caso da acetilação, grupos acetil são adicionados pelas HATs a resíduos de lisina localizados nas caudas das histonas e, de forma oposta, na deacetilação, grupos acetil são retirados pelas HDACs. A acetilação das histonas tende a desestabilizar (relaxar) a estrutura da cromatina, uma vez que, com a adição de um grupo acetil, há a neutralização das cargas positivas sobre as caudas das histonas, enfraquecendo as interações eletrostáticas entre histonas e esqueleto de fosfato do DNA, carregado negativamente. Por outro lado, na deacetilação das histonas, ocorre a remoção de grupos acetil, levando a um aumento das interações iônicas entre as histonas, carregadas positivamente, e o DNA, carregado negativamente, gerando uma maior compactação da estrutura nucleossômica, o que limita a atividade gênica⁽¹¹⁴⁾.

Nesse sentido, a acetilação das histonas (principalmente H3 e H4), catalisadas pelas HATs, está correlacionada com a cromatina ativa ou aberta, o que permite que vários fatores de transcrição acessem os promotores de genes alvo. Em contraste, a deacetilação das histonas (principalmente H3 e H4), através da ação das HDACs, resulta na compactação da cromatina e inativação de genes^(109, 115) (Figura 2.12).

Figura 2.12 – O equilíbrio entre a acetilação e deacetilação de histonas determina os níveis de transcrição gênica. A acetilação das histonas relaxa a cromatina, permitindo o recrutamento da RNA polimerase II (Pol II) e a ligação de fatores de transcrição (TF) ao DNA, levando a expressão gênica. Já a deacetilação das histonas compacta a cromatina, bloqueando a transcrição⁽¹¹⁵⁾

Em muitos tumores malignos, por exemplo, carcinoma de próstata, carcinoma gástrico, carcinoma colorretal, carcinoma cervical, sarcoma do estroma endometrial e o próprio CEB, o silenciamento gênico aberrante é fortemente associado a concomitante deacetilação e compactação da cromatina. Nesse sentido, a superexpressão das enzimas HDACs encontram-se profundamente relacionadas a iniciação e progressão tumoral, eventos envolvidos com a desregulação da proliferação, diferenciação, apoptose, angiogênese, migração e invasão celular⁽¹¹⁵⁻¹²¹⁾ (Figura 2.13).

Figura 2.13 – i) Deacetilação das histonas pelas HDACs influencia a expressão de genes envolvidos na iniciação e progressão tumoral; ii) HDAC reprime (1) a transcrição do inibidor de quinase dependente de ciclina (CDKI), permitindo a proliferação continuada, (2) fatores de diferenciação e (3) fatores pró-apoptóticos⁽¹¹⁵⁾

A observação de que são encontrados, em diferentes tipos de câncer, a superexpressão e aumento da atividade das enzimas HDACs, provocando a compactação global da cromatina e resultados terapêutico ruins, embasam, a utilização clínica de inibidores de HDACs (HDACi) como potenciais agentes quimioterápicos⁽¹¹⁵⁾. O tratamento com HDACi (ex.: tricostatina A - TSA) tem mostrado efeitos antineoplásicos expressivos, incluindo parada do crescimento, apoptose e diferenciação celular⁽¹¹²⁾.

A tricostatina A (TSA) foi originalmente relatada (1976) como uma droga fungistática obtida a partir da cultura de *Streptomyces platensis*⁽¹²²⁾. Em 1987 e 1988, a sua ação antiproliferativa e promotora de diferenciação foi relatada^(123, 124). Dois anos depois, em 1990, um estudo mostrou que o tratamento de linhagens de células normais e tumorais de mamíferos com TSA resultava em um acúmulo de histonas acetiladas⁽¹²⁵⁾. A partir desse momento, diversos trabalhos começaram a surgir, confirmando o significativo efeito inibidor da TSA sobre a atividade das HDACs, apontando-a como uma potente droga anticâncer para quimioterapia de tumores, como carcinomas de mama, pulmão, boca e estômago⁽¹²⁶⁻¹²⁹⁾.

Atualmente, já estão sendo feitos ensaios clínicos com HDACi e os resultados mostram-se positivos em relação ao bloqueio da proliferação de células, promoção da diferenciação e indução da apoptose^(115, 130, 131) (Figura 2.14).

Figura 2.14 – HDACi podem restaurar a expressão de genes chaves, impedindo o crescimento celular descontrolado⁽¹¹⁵⁾

Nesse sentido, ainda que os primeiros estudos já mostrem a participação das HDACs no desenvolvimento e progressão de cânceres em humanos, e os trabalhos atuais apoiarem esses relatos iniciais, o uso de HDACi como quimioterapia ou quimioprevenção, tanto direcionada para o câncer como para outras doenças, embora bem animador^(109, 112, 132-134), deve ser abordado com cautela. Apesar de apresentarem maior sucesso quando empregados para o tratamento de neoplasias hematológicas, o uso de HDACi em tumores sólidos é particularmente controverso⁽¹³⁵⁾.

A literatura relata que em alguns tumores, por exemplo, próstata, o processo de deacetilação inibe a transcrição de genes alvo da proteína STAT3, incluindo genes promotores da proliferação, como ciclina D1, e genes antiapoptóticos, como Bcl-xL^(136, 137). Nesse sentido, a superexpressão da atividade das HDAC ou a inibição da acetilação poderiam ser vantajosas no tratamento do câncer. Esse fato exemplifica a necessidade de vários estudos para determinar o papel da deacetilação em diferentes processos celulares.

Dessa maneira, alguns trabalhos apontam o uso de inibidores do processo de acetilação no tratamento de diferentes doenças, como Alzheimer, diabetes e câncer. Na maioria dessas pesquisas, a família HAT p300/CBP é alvo desses inibidores (HATi)⁽¹³⁸⁻¹⁴²⁾.

As enzimas HAT são recrutadas como coativadores da transcrição, por fatores de transcrição, com o objetivo de gerarem o relaxamento da cromatina, através da acetilação das histonas. Além disso, as enzimas HAT, como PCAF, p300 e CBP, também acetilam diversas proteínas não-histonas, sendo que muitas delas desempenham papéis proeminentes na oncogênese, como é o caso do NFkB e mTOR (*mammalian target of rapamycin*)⁽¹⁴³⁻¹⁴⁸⁾

Em relação ao tratamento de neoplasias malignas, alguns trabalhos sugerem que a família p300/CBP atua como supressor de tumor, sendo que estudos revelaram que os genes p300 e CBP são mutados em > 85% de linhagens celulares ou tumores primários de carcinoma de cólon^(149, 150). Apesar dessas evidências, outros estudos mostram que p300/CBP têm mostrado relação positiva com proliferação e sobrevivência celular, sendo que a diminuição ou a inibição de p300 resulta na parada do crescimento de células neoplásicas (ex.: carcinomas de próstata e mama)^(139, 151). Desse modo, os HATi também representam novos, terapeuticamente relevantes, alvos moleculares para o desenvolvimento de drogas.

Um reconhecido HATi é a curcumina, composto polifenólico natural derivado da planta *Curcuma longa*^(152, 153). A *Curcuma longa* é um arbusto perene que requer um clima quente e úmido, além de bastante água, sendo prevalente nas regiões tropicais e subtropicais, particularmente na Índia, China e Sudeste da Ásia (Indonésia, Tailândia, Vietnã e Filipinas). Seus rizomas são bastante utilizados principalmente devido à presença dos curcuminóides, uma classe de pigmentos amarelos composta essencialmente pela curcumina⁽¹⁵⁴⁾.

A curcumina tem sido relacionada a inibição de proteínas associadas a eventos tumorais importantes, como proliferação celular, crescimento, diferenciação, sobrevivência e motilidade⁽¹⁵⁵⁾. Assim, a literatura relata a curcumina como sendo um inibidor, por exemplo, da proteína mTOR^(148, 156), do fator de transcrição NFkB^(147, 155, 157) e da acetilação das histonas H3 e H4 pelas HATs da família p300/CBP^(152, 153).

Nesse sentido, foi demonstrado que a diminuição da atividade de p300 leva a diminuição do crescimento e ativação de um *checkpoint* direcionado para senescência em melanócitos humanos⁽¹⁵⁸⁾. Entretanto, por outro lado, sabe-se que a atividade da HAT p300/CBP é importante para transição G1/S do ciclo celular^(159, 160). Portanto, estes resultados indicam que o papel de p300/CBP na biologia do câncer é versátil e contexto-dependente.

Vale ressaltar que tanto os inibidores das HATs como das HDACs têm mostrado resultados positivos no tratamento de neoplasias malignas, confirmando o surgimento de novos alvos terapêuticos e o potencial da terapia epigenética. Atualmente, drogas quimioterápicas amplamente utilizadas em tratamento de tumores sólidos, como a cisplatina⁽¹⁶¹⁾, apesar de mostrarem resultados positivos ainda precisam lidar, por exemplo, com o fator resistência tumoral⁽¹⁶²⁾ e com o efeito genotóxico que parece apresentar associação com desenvolvimento de tumores secundários⁽¹⁶³⁾.

3 PROPOSIÇÃO

Baseando-se nas evidências expostas na revisão de literatura, o presente trabalho teve como objetivo:

1. Geral

Relacionar o comportamento agressivo dos CECp, em especial o CEB, com o processo de remodelação da cromatina.

2. Específicos

- 2.1. Verificar o padrão de acetilação da proteína histona 3 em um painel representativo composto por seis linhagens celulares de CECp e uma linhagem celular de queratinócitos normais;
- 2.2. Analisar o potencial de invasão e a presença de subpopulação de células semelhantes às células-tronco em linhagens celulares de CEB exibindo baixos níveis de acetilação;
- 2.3. Examinar em linhagens celulares e fragmentos de biópsia de CEB a influência do microambiente tumoral no padrão de acetilação e na expressão de biomarcadores ligados agressividade;
- 2.4. Em linhagens celulares de CEB, estudar a eficácia dos inibidores da acetilação (HDACi - tricostatina A - TSA) em relação a agressividade tumoral, dessa maneira, avaliando proliferação, presença de células semelhantes às células-tronco, expressão de biomarcadores de agressividade, potencial de migração e invasão celular;
- 2.5. Em linhagens celulares de CEB, avaliar a eficácia dos inibidores da deacetilação (HATi - curcumina) em relação a agressividade tumoral, desse modo, avaliando proliferação, presença de células semelhantes às células-tronco, expressão de biomarcadores de agressividade e potencial de migração celular;
- 2.6. Em linhagens celulares de CEB, comparar o HATi curcumina ao agente genotóxico quimioterápico cisplatina em termos de eficácia terapêutica, avaliando expressão de biomarcadores de agressividade e potencial de migração celular.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório de Biologia Celular da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (USP, São Paulo, SP, Brasil) e no *Laboratory of Epithelial Biology, University of Michigan School of Dentistry (UMICH, Ann Arbor, MI, USA)*.

Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

4.1 Cultivo Celular

Para a realização do estudo foram usadas seis linhagens celulares humanas de CECP (Tabela 4.1) e uma linhagem celular normal de queratinócitos derivados de mucosa bucal humana e espontaneamente imortalizados (NOK-SI).

Tabela 4.1 - Origem das linhagens celulares de CECP

Linhagem celular	Localização
HN6	Língua
HN13	Língua
Cal27	Língua
HN12	Linfonodo metastático proveniente de paciente diagnosticado com carcinoma epidermoide de língua
HN30	Faringe
Hep2	Laringe

As linhagens celulares, acondicionadas em criotubos e meio próprio para congelamento, mantidas em tambor de nitrogênio líquido à temperatura de -180°C, foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 2 min. e transferidas para placas de cultura de 10cm de diâmetro.

Todas as linhagens celulares foram cultivadas em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM - Hyclone, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Hyclone, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (100U/ml penicilina, 100µg/ml estreptomicina e 250ng/ml anfotericina B - Hyclone, Thermo

Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). As células foram mantidas em incubadora sob níveis controlados de temperatura (37°C), umidade e concentração de CO₂ (5%).

O crescimento das células foi monitorado diariamente em microscópio invertido de contraste de fase (Zeiss® Axiovert 25 – Carl Zeiss, Oberköchen, Alemanha) e o meio de cultura trocado de acordo com o metabolismo das células. Todos os procedimentos envolvendo cultivo celular foram realizados em capela de fluxo laminar.

Após ocuparem 70% a 80% da placa de cultura, o que se denomina subconfluência, as células foram subcultivadas. Nesse processo, o meio de cultivo foi removido, separado em tubo de centrifugação, e a monocamada celular lavada (2-3 vezes) com solução tampão fosfato-salina livre de cálcio e magnésio (PBS - *Phosphate Buffered Saline* – Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA), para que em seguida, as células fossem dissociadas (tripsinizadas) usando uma solução contendo 0.5g de tripsina e 0.2g de EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid* - (Trypsin EDTA solution - Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA) durante 5-10 min. e à temperatura de 37°C. Posteriormente, as células em suspensão foram transferidas para o tubo de centrifugação contendo meio de cultura, previamente reservado, centrifugadas a 1500 rpm por 5 min. e à temperatura ambiente. Essa etapa tem por objetivo inativar a função enzimática da tripsina por meio do SFB contido no meio de cultura. O sobrenadante resultante foi aspirado e o precipitado de células ressuspenso em novo meio de cultura para que alíquotas da suspensão fossem distribuídas em placas de cultivo e, novamente, levadas à incubadora (tanto para o subcultivo quanto para os ensaios experimentais).

Cada procedimento de subcultivo dava origem a uma nova passagem celular. Geralmente, de cada passagem, amostras das células crioprotegidas com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA) eram congeladas e mantidas em tambor contendo nitrogênio líquido.

4.2 Tratamentos *in vitro*

Para mimetizar o microambiente tumoral, as linhagens celulares HN6 e HN13 foram cultivadas por 24 horas com meio condicionado (MC) proveniente de células

endoteliais (MCE) e fibroblastos (MCF). O MCF foi coletado a partir do cultivo celular de fibroblastos (camundongo) da linhagem celular Swiss 3T3 (American Type Culture Collection - ATCC, Rockville, MD, USA) em DMEM (Hyclone, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) suplementado com 10% de SFB (Hyclone, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Hyclone, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) por 3 dias. Já o MCE foi gentilmente cedido pelo laboratório do Prof. Dr. Jacques Nör (*Angiogenesis Lab, University of Michigan School of Dentistry, UMich, Ann Arbor, MI, USA*), sendo obtido tal como descrito por Campos et al.⁽¹⁶⁴⁾.

Para indução da hiperacetilação global da cromatina foi empregado um inibidor do processo de deacetilação, ou seja, um HDACi chamado Tricostatina A (TSA - Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA). Foi utilizada como estoque uma solução de 5mM de TSA diluída em DMSO (Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA). A partir dessa solução estoque foi obtida a concentração de trabalho de 300nM. A literatura relata que a concentração necessária para inibir pela metade (IC50) tanto a atividade das enzimas HDACs como o índice proliferativo celular varia entre 100 e 300nM para carcinomas de boca, cólon, pulmão, e mama, por exemplo ⁽¹⁶⁵⁻¹⁶⁸⁾. Dessa maneira, as linhagens celulares HN6 e HN13 foram tratadas com 300nM por 24 horas, sendo o tempo de tratamento alterado apenas para os ensaios de migração e invasão celular, descritos adiante.

Para a indução da hipoacetilação global da cromatina utilizou-se a curcumina (*bisdemethoxycurcumin* - TCI America, Portland, OR, USA), composto derivado da planta *Curcuma longa*, sendo considerada um inibidor do processo de acetilação, ou seja, um HATi. A curcumina (TCI America, Portland, OR, USA) foi diluída em DMSO (Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA) para a obtenção de uma solução estoque de 100mM. A partir dessa solução estoque, diluições seriadas com o mesmo veículo (DMSO - Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA) foram realizadas para que concentrações menores (0.01µM, 0.1µM, 1µM, 10µM, 25µM, 50µM, 75µM e 100µM) da curcumina (TCI America, Portland, OR, USA) pudessem ser testadas, por meio da técnica de western blot, com o objetivo de se determinar a concentração de trabalho para as linhagens celulares HN6 e HN13. Definiu-se, então, a concentração de trabalho de 75µM por 8 horas, exceto para o ensaio de migração celular e proliferação, descrito adiante.

Os efeitos biológicos (expressão de biomarcadores de agressividade e potencial de migração celular) da indução da hipoacetilação global da cromatina nas linhagens celulares HN6 e HN13 foram comparados aos efeitos gerados pelo tratamento com o agente genotóxico cisplatina (Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA). Foi preparada uma solução estoque de cisplatina de 10mg/mL em DMSO (Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA) para que a partir dela fosse obtida a concentração de trabalho de 2.5µg/mL. A literatura relata concentrações de cisplatina que geram uma inibição de 50% do crescimento celular (IC50) variando entre 0.44 e 5.8µg/mL em carcinomas de cabeça e pescoço^(169, 170). Assim, as linhagens celulares HN6 e HN13 foram tratadas com cisplatina 2.5µg/mL por 24 horas.

Por fim, na técnica de western blot, como controle da expressão dos anticorpos anti- pS6 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) e anti-p-p65 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA), as células foram estimuladas com 100ng/mL de EGF (Life Technologies CO, Carlsbad, CA, USA) e 50nM de rapamicina (LC Laboratories, Woburn, MA, USA) por 15 min. e 30 min., respectivamente, de acordo com a literatura⁽¹⁷¹⁻¹⁷³⁾ e protocolo preestabelecido no *Laboratory of Epithelial Biology, University of Michigan School of Dentistry (UMICH, Ann Arbor, MI, USA)*.

4.3 Western blotting

4.3.1 extração proteica

A extração proteica foi realizada com o auxílio de um tampão de lise (5mL de 0.5M Tris pH 6.8; 4mL SDS20%; 0.4mL; β -mercaptoethanol e 30.5mL água Milli Q) acrescido de uma solução composta por um conjunto de inibidores de protease 1x (solução estoque concentrada 7x em água Milli Q - Protease Inhibitor Cocktail Tablets – Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA). Em geral, para placas de seis poços, utilizou-se 140µL/poço do tampão de lise, ou seja, 120µL do tampão de lise + 20µL da solução de inibidores de protease.

Independente do tratamento celular realizado, a extração proteica tinha sempre início com a remoção de todo o meio de cultura seguida de 3 lavagens com PBS (Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA) e adição de tampão de lise acrescido do coquetel de inibidores de protease. Neste momento, a placa de cultivo celular era apoiada sobre gelo e raspada, sendo seu conteúdo recolhido em tubo de 1.5ml para ser, em seguida, sonicado (Microson™ Ultrasonic cell Disruptor, Misonix, Farmingdale, NY, USA) e, finalmente, armazenado à temperatura de -80°C.

4.3.2 reação de western blot

Alíquotas dos lisados (40µL) foram misturadas à uma solução tampão de amostra (5µL), fervidas por 5 min. à temperatura de 96°C e, em seguida, centrifugadas a 13000 rpm por 1 min à temperatura de 4°C. Como marcador de peso molecular foi utilizado 6µL de *EZ-Run Prestained Rec Protein Ladder* (Fisher Scientific, Hampton, NH, USA).

As mostras foram submetidas à eletroforese em gel de bis-acrilamida e solução tampão Tris-glicina 1x (Fisher Scientific, Hampton, NH, USA) por 120 min., 100 volts e à temperatura ambiente.

O gel de resolução (10 e 15%) foi preparado com água destilada, *resolving buffer* (4X) (National Diagnostics, Atlanta, Georgia, USA), ProtoGel 30% (w/v) *acrylamide/methylene bisacrylamide solution (37.5:1 ratio)* (National Diagnostics, Atlanta, Georgia, USA), 10% persulfato de amônio (*ammonium persulfate* – APS - Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA) e TEMED (Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA). Já o gel de empilhamento foi composto por água destilada, *stacking buffer* (National Diagnostics, Atlanta, Georgia, USA), ProtoGel 30% (w/v) *acrylamide/methylene bisacrylamide solution (37.5:1 ratio)* (National Diagnostics, Atlanta, Georgia, USA), 10% persulfato de amônio (*ammonium persulfate* – APS - Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA) e TEMED (Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA). Ambos os géis foram preparados conforme protocolo do fabricante National Diagnostics (Atlanta, Georgia, USA).

Após a eletroforese, as proteínas do gel foram transferidas, por transferência úmida [metanol, água destilada e tampão Tris-glicina 1x (Fisher Scientific, Hampton,

NH, USA)], para uma membrana de PVDF (Immobilion-P - Millipore, Billerica, MA, USA) por 90 min., 90 volts e à temperatura de 4°C.

Em seguida, a membrana foi bloqueada por 45 min., sob agitação e à temperatura ambiente, com solução de leite desnatado à 5% em TBS-T (TBS pH 7,4 - Fisher Scientific, Hampton, NH, USA e 0.1% de Tween 20 - Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA) ou em solução de BSA (*Bovine Serum Albumin*, Cohn Fraction V - Millipore, Billerica, MA, USA) à 5% em TBS- T (TBS pH 7,4 - Fisher Scientific, Hampton, NH, USA e 0.1% de Tween 20 - Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA). A escolha da solução foi feita em função do tipo de anticorpo primário a ser utilizado, pois para anticorpos não fosforilados utilizou-se solução de bloqueio a base de leite e para anticorpos fosforilados a solução foi feita com BSA.

Em seguida a membrana foi incubada *overnight* à temperatura de 4°C, sob agitação, com o anticorpo primário (Tabela 4.2), diluído na mesma solução usada para bloquear inicialmente a membrana. Seguiram-se, sob agitação e temperatura ambiente, 3 lavagens de 5 min. cada com TBS-T (TBS pH 7,4 - Fisher Scientific, Hampton, NH, USA e 0.1% de Tween 20 - Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA) e, posterior, incubação da membrana, por 45min., sob agitação e à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário (Tabela 4.2), diluído no mesmo tipo de solução utilizada para diluir o anticorpo primário.

Por fim, a membrana foi novamente submetida, sob agitação e à temperatura ambiente, à 3 lavagens de 5 min. cada com TBS-T (TBS pH 7,4 - Fisher Scientific, Hampton, NH, USA e 0.1% de Tween 20 - Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA) e revelada utilizando o reagente ECL SuperSignal West Pico Substrate (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) ou Immobilon™ Western Chemiluminescent AP Substrate (Millipore, Billerica, MA, USA) por meio de um dispositivo chamado UVP (BioSpectrum® Imaging System).

Tabela 4.2 - Anticorpos utilizados para as reações de western blot

Anticorpo	Clone	Tamanho	Origem	Diluição	Companhia
Anti-acetil-Histona H3 Lisina9	C5B11 9649*	17kDa	Rabbit Monoclonal	1:1500	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti-Vimentina	V9 M072501*	57kDa	Mouse Monoclonal	1:500	Dako, Carpinteria, CA, USA
Anti-BMI-1	F6 05-637*	35kDa	Mouse Monoclonal	1:500	Millipore, Billerica, MA, USA
anti-Phospho-NFkB p65 Ser ⁵³⁶ (p-p65)	93H1 3033*	65kDa	Rabbit Monoclonal	1:1500	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti-Phospho-S6 Ribosomal Protein Ser ^{235/236} (pS6)	91B2 4857*	32kDa	Rabbit Monoclonal	1:1500	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti-GAPDH	6C5 CB1001*	36 kDa	Mouse Monoclonal	1:20000	Calbiochem, Gibbstown, NJ, USA
Anti-rabbit IgG HRP	sc-2004*	-	Goat	1:4000	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Anti-mouse IgG HRP	sc-2005*	-	Goat	1:3000	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

*Número do catálogo

4.4 Ensaio de invasão celular

Para a realização do ensaio de invasão celular foram utilizadas câmaras bipartidas. Essas câmaras são poços apresentando insertos que os dividem em dois compartimentos distintos (superior e inferior), pois os insertos apresentam uma membrana de polycarbonato com poros de 8 µm de diâmetro (Individual Millicell cell culture inserts available for 24 well plates – Millipore, Billerica, MA, USA) (Figura 4.1). Esse sistema cria dois ambientes diferentes o que permite a passagem voluntária das células de um lado para o outro da membrana, já que o diâmetro dos poros é consideravelmente menor do que o diâmetro das células.

No fluxo laminar, os insertos de polycarbonato foram cobertos por uma fina camada de fibronectina (BD Biosciences, San Jose, CA USA) (Figura 4.1). Para isso

foi preparada uma solução estoque de 1mg/mL de fibronectina (BD Biosciences, San Jose, CA USA) diluída em água destilada estéril. Em 10 mL de PBS (Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA) foi acrescentada 100µL da solução estoque de fibronectina (BD Biosciences, San Jose, CA USA), sendo essa solução colocada em uma placa de petri de vidro de 10cm de diâmetro, onde os insertos foram mergulhados *overnight*, sob agitação e à temperatura de 4°C. Após esse período, os insertos foram lavados 1x com água destilada estéril e deixados à temperatura ambiente até secarem para poderem ser então utilizados.

As linhagens celulares HN6 e HN13 foram plaqueadas sobre a membrana de polycarbonato recoberta por fibronectina (8×10^4 células/inserto). Foi acrescido, no compartimento superior das câmaras bipartidas, DMEM (Hyclone, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) suplementado com 10% de SFB (Hyclone, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 1% de solução antibiótica – antimicótica (Hyclone, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e, no caso de algum tipo de tratamento, 300nM de TSA (Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA) ou 75µM de curcumina (TCI America, Portland, OR, USA). Por outro lado, no compartimento inferior das câmaras bipartidas, foi adicionado DMEM (Hyclone, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) suplementado com 20% de SFB (Hyclone, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 1% de solução antibiótica – antimicótica (Hyclone, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e, no caso de algum tipo de tratamento, 300nM de TSA (Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA) ou 75µM de curcumina (TCI America, Portland, OR, USA) (Figura 4.1).

Após 8 horas, as células com maior capacidade de invasão atravessaram a membrana de fibronectina e ficaram na parte inferior do inserto. A membrana do inserto foi fixada com metanol por 6 min. a -20°C. À temperatura ambiente, a membrana foi corada com hematoxilina (Fisher Scientific, Hampton, NH, USA) por 5 min. e, em seguida, lavada 2 vezes com água corrente por 5 min./cada para ser corada com eosina (Fisher Scientific, Hampton, NH, USA) por 5 min. e, finalmente, lavada mais 2 vezes com água da torneira por 5 min./cada.

Com um cotonete de algodão, as células localizadas na parte superior do inserto (sem potencial de invasão) foram removidas e a membrana destacada do inserto para ser montada sobre uma lâmina usando o meio de montagem Sigma-Fluoroshield (Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA).

Para análise quantitativa do potencial de invasão celular, imagens foram

capturadas por meio de uma câmera digital QImaging ExiAqua monochrome (QImaging, Surrey, BC, Canada) acoplada a um microscópio Nikon Eclipse 80i (Nikon, Melville, NY, USA) e visualizadas através do software QCapturePro 7 (QImaging, Surrey, BC, Canada). Em um aumento de 20x, quatro campos aleatórios foram capturados de cada grupo experimental para que o número de células invasivas fosse verificado.

Figura 4.1 - Representação esquemática da câmara bipartida composta por inserto exibindo membrana de polycarbonato com poros de 8µm de diâmetro recoberta por fibronectina (Adaptado de BMG LABTECH - <http://www.bmglabtech.com/application-notes/fluorescence-intensity/fluoroblock-fluostar-144.cfm>)⁽¹⁷⁴⁾

4.5 Identificação da subpopulação de células semelhantes às células-tronco (*cancer stem cell* – CSC) em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço

4.5.1 atividade da enzima aldeído-desidrogenase

A aldeído-desidrogenase (ALDH) é uma enzima desintoxicante responsável pela oxidação de aldeídos intracelulares⁽¹⁷⁵⁾. São relatadas diferentes isoformas da enzima ALDH, sendo a isoforma 1 altamente expressa em células com propriedades de células-tronco ou células progenitoras, normais ou malignas. A literatura demonstra a presença da enzima ALDH em linhagens celulares derivadas de tecido hematopoiético, neural, adiposo, mamário, pulmonar, ovariano e provenientes de regiões como tireoide, cabeça e pescoço, cólon e próstata⁽¹⁷⁵⁻¹⁸⁷⁾. Clay et al.⁽¹⁸³⁾

mostraram que somente a atividade da enzima ALDH é um marcador altamente específico para detecção de CSC em CECp.

O sistema ALDEFLUOR® (STEMCELL Technologies, Vancouver, BC, Canada) foi desenvolvido para detectar a atividade da enzima ALDH isoforma 1 em células viáveis, sendo seu princípio descrito como demonstrado no esquema da Figura 4.2.

Figura 4.2 – Representação esquemática do princípio do sistema ALDEFLUOR® (STEMCELL Technologies, Vancouver, BC, Canada) de detecção dos níveis da enzima ALDH em células viáveis

Desse modo, de acordo instruções do fabricante (ALDEFLUOR® Kit from STEMCELL Technologies, Vancouver, BC, Canada), após os tratamentos *in vitro* preconizados [300nM de TSA por 24 horas (Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA) ou 75µM de curcumina por 8 horas (TCI America, Portland, OR, USA)], 6.10^5 células de cada linhagem celular (HN6 e HN13) foram ressuspensas em 1mL de *Aldefluor assay buffer* e, em seguida, foi adicionado 5µL do substrato da enzima ALDH (reagente ALDEFLUOR ativado BAAA). Imediatamente após essa etapa, a amostra foi dividida em dois tubos (500µL em cada tudo), sendo um denominado grupo controle e o outro grupo teste. No grupo controle, foi adicionado ainda 5µL do inibidor da enzima ALDH (DEAB). Ambos os tubos foram incubados por 45 min. à temperatura de 37°C. Por fim, as amostras foram centrifugadas por 5 min. a 250xg, o sobrenadante removido e o *pellet* ressuspensado em 500µL de *Aldefluor assay buffer*. As amostras foram mantidas no escuro e no gelo até serem analisadas por meio do equipamento FACSDiVA Cell Sorter (BD Biosciences, Mountain View, CA, USA) e o software Weasel v.3.0.1 (The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Parkville, Victoria, Australia).

Vale ressaltar que a adição de DEAB ao grupo controle teve por objetivo confirmar que a origem da fluorescência emitida pelo grupo teste era proveniente da reação “substrato BAAA e enzima ALDH” e não do substrato BAAA adicionado em ambos os grupos (controle e teste).

4.5.2 ensaio de formação de esferas

A presença de CSC nas linhagens celulares HN6 e HN13 foi avaliada por meio do ensaio de formação de esferas em placas de cultivo celular exibindo baixa adesão (Corning Incorporated Life Sciences, Tewksbury, MA, USA).

O método de formação de esferas para identificação de CSC tem sido proposto e usado em diferentes linhagens celulares malignas, tais como mama, próstata e de origem neural^(188, 189), sendo adaptado para CECP por Krishnamurthy et al.⁽¹⁸⁷⁾.

Desse modo, para avaliar a capacidade de crescimento em suspensão das linhagens celulares HN6 e HN13 como esferas, 1.10^3 células de cada linhagem

celular foram semeadas em placas de cultivo de baixa adesão (Corning Incorporated Life Sciences, Tewksbury, MA, USA) contendo DMEM (Hyclone, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), suplementado com 10% de SFB (Hyclone, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e 1% de solução antibiótica–antimicótica (Hyclone, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). As células foram mantidas em incubadora sob níveis controlados de temperatura (37°C), umidade e concentração de CO₂ (5%) durante 5 dias. Após esse período, iniciou-se o tratamento com 300nM de TSA por 24 horas (Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA) ou 75µM de curcumina por 8 horas (TCI America, Portland, OR, USA) com o objetivo de analisar a influência da hiperacetilação e hipoacetilação global, respectivamente, na manutenção das esferas.

Imagens foram capturadas por meio de uma câmera digital QImaging ExiAqua monochrome (QImaging, Surrey, BC, Canada) acoplada a um microscópio invertido de contraste de fase (Zeiss® Axiovert 25 – Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) e visualizadas através do software QCapturePro 7 (QImaging, Surrey, BC, Canada).

4.6 Imunofluorescência - tecido parafinado

Para este estudo foram selecionados 11 casos de carcinoma epidermoide bucal e 3 casos de mucosa bucal exibindo características histológicas de normalidade, coletados do arquivo do Serviço de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Foram utilizados cortes de 3µm de espessura a partir do material previamente fixado em formol a 10% e emblocado em parafina. Os cortes foram estendidos em lâminas de vidro anteriormente lavadas em álcool absoluto, secas e mergulhadas por um minuto em solução de 3-aminopropitrieto-silano (Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA) a 10% em álcool absoluto (lâminas silanizadas - aumento da adesão entre lâmina e corte). Os cortes foram armazenados à temperatura de 60°C por no mínimo 24 horas antes de seguirem para a etapa de desparafinização.

A desparafinização foi feita através de 2 banhos de xilol, o primeiro a 60°C por 15 min. e o segundo à temperatura ambiente por 15 min. A seguir, iniciou-se a retirada do xilol e hidratação dos cortes por meio de banhos em cadeia decrescente

de etanóis [álcool absoluto (3 vezes de 3 min. cada), 95% (1 vez de 3 min.) e 85% (1 vez de 3 min.)], passando, na sequência, para a remoção do pigmento formólico através da incubação dos cortes em hidróxido de amônia a 10%, em solução alcoólica 95%, por 10 minutos.

Após lavagem em água corrente por 10 minutos e em água destilada (apenas 2 passagens para tirar o cloro presente na água corrente), as lâminas receberam o tratamento de recuperação dos sítios antigênicos, sendo incubadas em solução de ácido cítrico mono-hidratado (9.14mM, pH 6.0 - Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA) por 30 minutos em banho-maria à temperatura de 95°C.

A seguir, os cortes foram lavados em água corrente por 10 min. e em água destilada (apenas 2 passagens para tirar o cloro presente na água corrente), seguindo para incubação em solução *Sudan Black B* (Merck, Darmstadt, Alemanha) 0.3% diluída em etanol 70%, por 30 min. a temperatura ambiente, para eliminação da autofluorescência e reação de fundo - *background*⁽¹⁹⁰⁾. Seguiram-se 3 banhos de 5 min. cada em etanol 70% e 3 banhos de 5 min. cada em água destilada.

Na sequência, realizou-se a etapa de bloqueio da peroxidase endógena tecidual pela incubação dos cortes em uma solução 1:1 (v/v) de peróxido de hidrogênio a 6% e metanol por 30 min. (2 banhos de 15 min. cada). A seguir, os cortes foram lavados em água destilada por 5 min. e imersos em PBS (Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA), solução tampão da reação, por 15 min. (3 banhos de 5 min. cada), seguindo para o bloqueio dos sítios inespecíficos com solução de BSA (Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA) a 1%, diluído em PBS (Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA), por 45 min., em câmara úmida e à temperatura ambiente.

Os cortes foram incubados com o anticorpo primário (Tabela 4.3), diluído em solução de bloqueio, por 2 horas e 30 min., em câmara úmida e à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram lavados com PBS (Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA) por 15 min. (3 banhos de 5 min. cada) e incubados por 2 horas, em câmara úmida, na ausência de luz e à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário conjugado FITC ou Texas red (Tabela 4.3), também diluído na solução de bloqueio. Por fim, seguiram-se 3 lavagens com PBS (Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA) de 5 min. cada e os cortes foram montados em lâminas de vidro usando o meio de montagem Vecta Shild (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

As lamínulas foram fixadas com o uso de esmalte incolor e armazenadas na geladeira, na ausência de luz. Imagens foram capturadas por meio de uma câmera digital Axio Cam HRc-Zeiss (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) acoplada a um microscópio Axio Imager.A1-Zeiss (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) e visualizadas através do software AxioVision 4.8.1 software (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

Tabela 4.3 - Anticorpos utilizados para reação de imunofluorescência - tecido parafinado

Anticorpo	Clone	Tamanho	Origem	Diluição	Companhia
Anti-acetil-Histona H3 Lisina9	C5B11 9649*	17kDa	Rabbit Monoclonal	1:100	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti-Vimentina	V9 M072501*	57kDa	Mouse Monoclonal	1:50	Dako, Carpinteria, CA, USA
Texas Red Anti-Mouse IgG	TI-2000*	-	Horse	1:100	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Fluorescein Anti-rabbit IgG	FI-1000*	-	Goat	1:100	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

*Número do catálogo

4.7 Imunofluorescência - linhagens celulares

A técnica de imunofluorescência foi realizada sobre lamínulas de vidro com diâmetro compatível com placas de cultivo contendo 12 poços. De cada linhagem celular (HN6 e HN13), 3.10^4 células foram semeadas em placas de 12 poços contendo DMEM (Hyclone, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), suplementado com 10% de SFB (Hyclone, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Hyclone, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Após aproximadamente 12 horas, iniciou-se o tratamento com 300nM de TSA por 24 horas (Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA) ou 75µM de curcumina, neste caso, por 24 horas (TCI America, Portland, OR, USA).

Assim, após os tratamentos *in vitro* preconizados, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas 3 vezes com PBS (Sigma-Aldrich CO, St. Louis,

MO, USA), sendo depois fixadas com metanol por 6 min. a -20°C e lavadas com PBS (3 vezes de 5 min. cada - Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA).

Em seguida, realizou-se o bloqueio dos sítios inespecíficos com solução de BSA (Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA) a 3%, diluído em PBS (Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA), por 45 min., em câmara úmida e à temperatura ambiente.

A seguir, as células foram incubadas, *overnight*, em câmara úmida e a 4°C, com o anticorpo primário (Tabela 4.4), diluído em solução de bloqueio. Após esse passo, as células foram lavadas com PBS (3 vezes de 5 min. cada - Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA) e incubadas por 2 horas, em câmara úmida, à temperatura ambiente e na ausência de luz, com anticorpo secundário conjugado FITC ou Texas red (Tabela 4.4), também diluído em solução de bloqueio.

Posteriormente, as células foram lavadas com PBS (3 vezes de 5 min. cada - Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA) e, no caso de marcação do citoesqueleto de actina, as células foram incubadas com o anticorpo anti-faloidina (Tabela 4.4) por 30 min., em câmara úmida, à temperatura ambiente e na ausência de luz.

Após essa etapa, as células foram lavadas com PBS (3 vezes de 5 min. cada - Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA) e coradas com Hoechst 33342 (marcação DNA - Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA), 1:500 diluído em água destilada a partir de uma solução estoque 1:10 também diluída em água destilada, por 5 min., em câmara úmida, à temperatura ambiente e ausência de luz.

Por fim, as células foram lavadas com PBS (2 vezes de 5 min. cada - Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA), água destilada (1 vez por 5 min.) e montadas sobre lâminas de vidro usando o meio de montagem Sigma-Fluoroshield (Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA).

Imagens foram capturadas por meio de uma câmera digital QImaging ExiAqua monochrome (QImaging, Surrey, BC, Canada) acoplada a um microscópio Nikon Eclipse 80i (Nikon, Melville, NY, USA) e visualizadas através do software QCapturePro 7 (QImaging, Surrey, BC, Canada).

No caso da dupla marcação vimentina-citoqueratina 14, quatro campos aleatórios de cada grupo experimental foram selecionados e fotografados com a mesma magnitude (20x) e resolução para analisar quantitativamente a morfologia e o número de células positivas.

No caso da marcação para Ki67, quatro campos de cada grupo experimental foram selecionados e fotografados com a mesma magnitude (20x) e resolução para

verificação do número de células positivas.

Tabela 4.4 - Anticorpos utilizados para reação de imunofluorescência - linhagens celulares

Anticorpo	Clone	Tamanho	Origem	Diluição	Companhia
Anti-Ki67	MIB-1 M7240*	345 e 395 kDa	Mouse Monoclonal	1:100	Dako, Carpinteria, CA, USA
Anti-Vimentina	V9 M072501*	57kDa	Mouse Monoclonal	1:50	Dako, Carpinteria, CA, USA
Anti-Citoqueratina 14	AF 64 PRB155P*	55kDa	Rabbit Policlonal	1:1000	Covance, Princeton, NJ, USA
Anti-BMI-1	F6 05-637*	35kDa	Mouse Monoclonal	1:50	Millipore, Billerica, MA, USA
Anti-acetil-Histona H3 Lisina9	C5B11 9649*	17kDa	Rabbit Monoclonal	1:100	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Faloidina (rodamina)	PHDR1*	-	-	1:100	Cytoskeleton, Denver, CO, USA
Fluorescein Anti-mouse IgG	FI-2000*	-	Horse	1:100	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Texas Red Anti- Mouse IgG	TI-2000*	-	Horse	1:100	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Fluorescein Anti-rabbit IgG	FI-1000*	-	Goat	1:100	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

*Número do catálogo

4.8 Técnica de interferência de RNA por siRNA

A técnica de interferência de RNA por siRNA (*short interfering RNA*), descrita por Squarize et al.⁽¹⁹¹⁾, foi utilizada para silenciar, nas linhagens celulares HN6 e HN13, a expressão de IKK α e IKK β , proteínas associadas com a ativação do fator de transcrição NF κ B^(191, 192).

Assim, 4.10⁴ células foram semeadas em placas de 6 poços contendo DMEM (Hyclone, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), suplementado com 10% de

SFB (Hyclone, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e 1% de solução antibiótica–antimicótica (Hyclone, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Em seguida, para promover o *knockdown* dos genes codificadores das proteínas IKK α e IKK β foram adicionados oligonucleotídeos sintéticos de RNA de dupla-fita (siRNA) contra IKK α (SI00605115 - Qiagen, Valencia, CA, USA) e IKK β (SI02777376 - Qiagen, Valencia, CA, USA). A transfecção foi realizada com auxílio do agente de transfecção *HiPerFect* (Qiagen, Valencia, CA, USA), de acordo com as recomendações do fabricante.

A concentração e tempo ótimos para cada siRNA (contra IKK α e IKK β) foram determinados por Squarize et al.⁽¹⁹¹⁾, através de curvas de diluição e pela técnica de western blot.

Desse modo, a concentração de siRNA contra IKK α foi de 12.5nM [(SI00605115 - Qiagen, Valencia, CA, USA) NM_001278; forward: 5'- CAG GAG AAG UUC GGU UUA GUAdTdT-3' and reverse: 5'- UAC UAA ACC GAA CUU CUC CUGdTdT-3'] e contra IKK β foi de 25nM [(SI02777376 - Qiagen, Valencia, CA, USA) NM_001556; forward: 5'- CUG GAG AAG UAC AGC GAG CAAdTdT-3' and reverse: 5'- UUG CUC GCU GUA CUU CUC CAGdTdT-3']]. As sequências de oligonucleotídeos sintéticos de RNA de dupla-fita usadas como controle negativo (siRNA não-específico = scrambled siRNA) na concentração de 12.5nM foram: forward: 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UdTdT-3' and reverse: 5'- ACG UGA CAC GUU CGG AGA AdTdT-3' (1027310 - - Qiagen, Valencia, CA, USA).

Depois de 72 horas de tratamento com siRNA, as células foram tratadas com cisplatina 2.5 μ g/mL por mais 24 horas. Após esse período, foi coletado o lisado celular cujas proteínas foram submetidas à técnica de western blot para análise da eficiência do silenciamento.

4.9 Ensaio de migração celular

As linhagens celulares NOK-SI, HN6 e HN13 foram cultivadas em placas de seis poços até atingirem a confluência. A monocamada de células foi raspada em duas linhas retas com a ponta da pipeta p200, gerando uma fenda em cruz. Após essa etapa, as células foram submetidas a diferentes tratamentos:

- a) 300nM de TSA (Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA);
- b) 75µM de curcumina (TCI America, Portland, OR, USA);
- c) 2.5µg/mL de cisplatina (Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA);
- d) siRNA_IKKα (Qiagen, Valencia, CA, USA) + cisplatina (Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA);
- e) siRNA_IKKβ (Qiagen, Valencia, CA, USA) + cisplatina (Sigma-Aldrich CO, St. Louis, MO, USA).

Imagens foram capturadas em 0, 12, 24, 36 e 48 horas por meio de uma câmera digital QImaging ExiAqua monochrome (QImaging, Surrey, BC, Canada) acoplada a um microscópio invertido de contraste de fase (Zeiss®Axiovert 25 – Carl Zeiss, Oberköchen, Alemanha) e visualizadas através do software QCapturePro 7 (QImaging, Surrey, BC, Canada).

As imagens obtidas de cada grupo experimental foram analisadas quantitativamente por medição da área da fenda por meio do AxioVision 4.8.1 software (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA).

4.10 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram feitas por meio do software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Teste t de *Student* foi usado para examinar a associação entre as linhagens celulares e os tratamentos *in vitro* preconizados, sendo o nível de significância considerado quando $p < 0.05$.

5 RESULTADOS

5.1 Verificação do padrão de acetilação da proteína histona 3 no resíduo de lisina 9 em linhagens celulares de CECp

A acetilação no resíduo de lisina 9 da proteína histona 3 é tradicionalmente associada a ativação do processo de transcrição, ou seja, está relacionada com a cromatina ativa ou aberta, sendo, portanto, considerada um marcador dos níveis de expressão gênica^(193, 194).

Por meio da técnica de western blot, analisou-se o padrão de acetilação da proteína histona 3 no resíduo de lisina 9 (acetil-Histona H3 Lisina9) em um painel representativo composto por seis linhagens celulares de CECp e uma linhagem celular normal de queratinócitos bucais (NOK-SI).

Notou-se uma variação nos níveis de expressão da proteína acetil-Histona H3 Lisina9 entre as linhagens celulares de CECp, como pode ser observado na Figura 5.1A.

As linhagens celulares HN6 e HN13 mostram os menores níveis de acetilação quando comparadas ao controle (NOK-SI) ou as outras linhagens celulares de CECp.

5.2 Caracterização do padrão biológico associado a agressividade de células neoplásicas exibindo compactação da cromatina

A literatura afirma que a deacetilação das histonas pode influenciar na expressão de genes envolvidos na iniciação, progressão e metástase tumoral, além de contribuir significativamente para o desenvolvimento de neoplasias resistentes aos quimioterápicos convencionais^(115, 132). Por esse motivo, para a verificação da relação entre padrão de agressividade tumoral e estado conformacional da cromatina, foram selecionadas as linhagens celulares HN6 e HN13, que apresentaram os mais baixos níveis da proteína acetil-Histona H3 Lisina9 em

relação tanto a linhagem celular NOK-SI (queratinócitos normais) quanto as outras linhagens celulares de CECF (Figura 5.1A).

Primeiramente, verificou-se, por meio da técnica de western blot, a expressão da proteína vimentina (correlacionada a um fenótipo invasivo, considerada marcador da TEM e associada a um prognóstico ruim)^(88, 92, 195) nas linhagens celulares HN6 e HN13. Somente a linhagem celular HN6 mostrou-se positiva para proteína vimentina (Figura 5.1B).

Através do ensaio de invasão celular, notou-se que as linhagens celulares HN6 e HN13 apresentaram habilidade para invadir, porém a linhagem celular HN6 apresentou uma população de células com potencial de invasão significativamente maior que a linhagem celular HN13 ($p < 0.0001$), como demonstrado na Figura 5.1C.

Por fim, através da expressão da atividade da enzima ALDH (marcador de células-tronco)^(182, 183), avaliou-se a presença de CSC nas linhagens celulares HN6 e HN13. Ambas as linhagens celulares exibiram uma subpopulação de CSC, sendo a expressão de ALDH significativamente maior na linhagem celular HN6 (11.68% de células positivas) quando comparada a linhagem celular HN13 (4.23% de células positivas) (Figura 5.1D).

Portanto, as linhagens celulares HN6 e HN13 exibiram níveis semelhantes de expressão da proteína acetil-Histona H3 Lisina9, porém a linhagem celular HN6 apresentou um potencial de agressividade significativamente maior que a linhagem celular HN13, que demonstrou características compatíveis com tumores quiescentes pouco agressivos.

Figura 5.1A - Padrão de acetilação da proteína histona 3 no resíduo de lisina 9 em seis linhagens celulares de CECF e uma linhagem celular de queratinócitos normais (NOK-SI)

Figura 5.1B - Padrão de expressão da proteína vimentina em linhagens celulares de CEB exibindo baixa expressão da proteína acetil-Histona H3 Lisina9 (AcH3)

Figura 5.1C - Padrão de invasão das linhagens celulares HN6 e HN13 (H&E - 20x). Representação gráfica da média e desvio padrão do número de células invasivas presentes nas linhagens celulares HN6 e HN13. A linhagem celular HN6 apresentou potencial de invasão estatisticamente maior quando comparada a linhagem celular HN13 (* p < 0.0001). Círculo pontilhado delimitando uma célula invasiva e círculo contínuo apontando poro do inserto

Figura 5.1D - Padrão de expressão da enzima ALDH nas linhagens celulares HN6 e HN13. As linhagens celulares HN6 e HN13 apresentaram 11.68% e 4.23% de células positivas, respectivamente

5.3 Influência do microambiente tumoral na remodelação da cromatina do CEB

Encontra-se bem estabelecida a importância do microambiente tumoral na progressão, invasão e metástase dos cânceres em geral⁽⁸⁰⁻⁸²⁾.

Assim, utilizando meio condicionado proveniente do cultivo de células endoteliais (MCE)⁽¹⁶⁴⁾ e de fibroblastos (MCF), observou-se, em linhagens celulares de CEB exibindo baixos níveis da proteína acetil-Histona H3 Lisina9 (Figura 5.1A), a influência do microambiente tumoral na remodelação da cromatina e, consequente, expressão de biomarcadores associados a agressividade.

As linhagens celulares HN6 e HN13 foram cultivadas com MCE por 24 horas e, após esse período, por meio da técnica de western blot, foi detectado na linhagem celular HN6 um aumento expressivo dos níveis da proteína acetil-Histona H3 Lisina9, em relação ao grupo controle, indicando uma abertura ou relaxamento global da cromatina (Figura 5.2A). Em contrapartida, a linhagem celular HN13 exibiu um decréscimo, em relação ao grupo controle, da expressão da proteína acetil-Histona H3 Lisina9, apontando a indução da compactação ou fechamento global da cromatina (Figura 5.2A).

Em ambas as linhagens celulares, a remodelação da cromatina induzida pelo cultivo celular em MCE, mostrou-se associada a expressão de vimentina e BMI-1, duas proteínas relacionadas a um fenótipo fusiforme e comportamento celular agressivo^(88, 92, 195-197). Por meio da técnica de western blot, notou-se que o relaxamento da cromatina (linhagem celular HN6) levou a um aumento da expressão de vimentina e BMI-1, por outro lado, a sua compactação (linhagem celular HN13) induziu a uma diminuição da proteína BMI-1, sendo que a proteína vimentina continuou a não ser expressa (Figura 5.2A). Nesse sentido, a compactação da cromatina na linhagem celular HN13 induziu um padrão tumoral ainda mais quiescente.

Ambas as linhagens celulares (HN6 e HN13) também foram cultivadas com MCF, porém, através da técnica de western blot, não foi notada nenhuma alteração na expressão das proteínas acetil-Histona H3 Lisina9, vimentina e BMI-1, em relação ao grupo controle (Figura 5.2A).

Por fim, para confirmar *in vivo* a relação entre o relaxamento da cromatina e a agressividade tumoral encontrada *in vitro* (Figura 5.2A), foram selecionados

fragmentos de mucosa bucal normal e CEB, corados pela técnica da hematoxilina-eosina (Figura 5.2B – a/b).

Através da técnica de imunofluorescência, foram observadas células neoplásicas exibindo marcação para acetil-Histona H3 Lisina9 apenas no fronte de invasão do carcinoma epidermoide. Interessantemente, essas células apresentaram concomitante expressão da proteína vimentina (Figura 5.2B – d).

O fragmento de mucosa normal que apesar de demonstrar, distribuídas aleatoriamente por todo o epitélio, numerosas células positivas coradas para acetil-Histona H3 Lisina9, não houve colocalização com a proteína vimentina, encontrada somente nos fibroblastos presentes no tecido conjuntivo subjacente (Figura 5.2B - c).

Figura 5.2A - Expressão das proteínas acetil-Histona H3 Lisina9 (AcH3), BMI-1 e vimentina nas linhagens celulares HN6 e HN13 submetidas a tratamento com meio condicionado proveniente do cultivo de células endoteliais (MCE) e de fibroblastos (MCF)

Figura 5.2B - Cortes histológicos de mucosa normal (a - 40x) e carcinoma epidermoide (b - 20x) corados pela técnica da hematoxilina-eosina (H&E). Padrão de expressão das proteínas acetil-Histona H3 Lisina9 (AcH3 - verde) e vimentina (vermelho) em cortes histológicos de mucosa normal (c - 40x) e carcinoma epidermoide (d - 40x) submetidos à técnica de imunofluorescência. Notar a dupla marcação (AcH3 e vimentina) apenas nas células localizadas no fronte de invasão do carcinoma epidermoide (d)

5.4 Resposta tumoral positiva ao tratamento com TSA

Após serem tratadas com o HDACi TSA, as linhagens celulares HN6 e HN13 exibiram diminuição significativa da proliferação celular ($p = 0.0136$ e $p = 0.0011$, respectivamente), analisada (quantificada) por meio da técnica de imunofluorescência para o biomarcador de proliferação Ki67^(198, 199) (Figura 5.3A).

Além disso, o tratamento das linhagens celulares HN6 e HN13 com TSA também apresentou resultados positivos em relação a subpopulação de CSC, uma vez que ambas as linhagens celulares exibiram uma diminuição evidente da atividade da enzima ALDH (Figura 5.3B). As linhagens celulares HN6 e HN13 apresentaram, respectivamente, 11.38% e 6.13% de células positivas, sendo que após o tratamento com TSA passaram a expressar 4.3% e 0.59% de positividade. Ainda, o tratamento com TSA levou, em ambas as linhagens celulares, a desorganização das esferas formadas em placas de cultivo celular exibindo baixa adesão (Figura 5.3C). Tanto a detecção da atividade da enzima ALDH como o ensaio de formação de esferas são métodos funcionais usados continuamente para a detecção de células-tronco *in vitro*^(182, 183, 187).

Figura 5.3A - Representação gráfica da média e desvio padrão da porcentagem de células positivas para proteína Ki67 nas linhagens celulares HN6 e HN13. O tratamento com TSA por 24 hs levou a uma queda significativa da proteína Ki67 em ambas as linhagens celulares (* $p = 0.0136$ e ** $p = 0.0011$)

Figura 5.3B - Padrão de expressão da proteína ALDH nas linhagens celulares HN6 e HN13. As linhagens celulares HN6 e HN13 apresentaram, respectivamente, 11.38% e 6.13% de células positivas, sendo que após o tratamento com TSA por 24 hs passaram a expressar 4.3% e 0.59% de positividade, respectivamente

Figura 5.3C - Ensaio funcional para identificação da presença de células-tronco tumorais. Após 5 dias de cultivo, notou-se a formação de esferas nas linhagens celulares HN6 e HN13. Após 24 hs de tratamento com TSA, observou-se a ruptura dessas esferas

5.5 Resposta tumoral negativa ao tratamento com TSA

HDACi têm mostrado resultados promissores no tratamento de malignidades hematológicas, no entanto, mecanismos de resistência têm sido relatados em tumores sólidos⁽¹³⁵⁾.

Nesse sentido, primeiramente, verificou-se o potencial de migração de queratinócitos normais e de células neoplásicas após tratamento com TSA. Para tanto, foi produzida uma fenda na monocamada de células das linhagens celulares NOK-SI, HN6 e HN13. No caso da linhagem celular NOK-SI, a fenda se fechou quase que por completo apenas depois de 36 horas (Figura 5.4A). Por outro lado, foram necessárias 24 horas para que a fenda se fechasse nas linhagens celulares HN6 e HN13 (Figura 5.4A). Observou-se que após o tratamento com TSA, as linhagens celulares neoplásicas mostraram um discreto aumento do potencial de migração quando comparadas aos seus respectivos controles (Figura 5.4A). Contudo, apenas a linhagem celular NOK-SI exibiu aumento estatisticamente significativo do seu potencial migratório em relação ao seu controle ($p = 0.0361$ para o tempo de 12 horas, $p = 0.0004$ para o tempo 24 horas e $p = 0.0002$ para o tempo de 36 horas) (Figura 5.4A).

Verificou-se também o potencial de invasão das linhagens celulares HN6 e HN13 após tratamento com TSA. Assim, como consequência da indução da hiperacetilação da proteína acetil-Histona H3 Lisina9, ambas as linhagens celulares neoplásicas exibiram um aumento estatisticamente significativo do número de células invasivas, em relação ao grupo controle (HN6 - $p = 0.0479$ e HN13 - $p = 0.0008$) (Figura 5.4B).

O relaxamento global da cromatina, induzida pelo tratamento com TSA, levou a uma alteração da morfologia apenas nas linhagens celulares tumorais (HN6 e HN13), analisada por meio da marcação do citoesqueleto pela proteína faloidina, verificada através da técnica de imunofluorescência. O relaxamento da cromatina levou a uma mudança de fenótipo poligonal para fusiforme nas linhagens celulares HN6 e HN13 (Figura 5.5A).

Figura 5.4A - Representação gráfica da média e desvio padrão da área de fechamento da fenda (μM^2) em função do tempo (hs) de tratamento com TSA das linhagens celulares NOK-SI, HN6 e HN13. Após o tratamento com TSA, todas as linhagens celulares mostraram uma tendência ao aumento do potencial de migração quando comparadas ao controle (veículo), porém apenas a linhagem celular NOK-SI mostrou significância estatística (* $p = 0.0361$; ** $p = 0.0004$; *** $p = 0.0002$)

Figura 5.4B - Padrão de invasão das linhagens celulares HN6 e HN13 após tratamento com TSA (H&E - 20x). Representação gráfica da média e desvio padrão do número de células invasivas encontradas nas linhagens celulares HN6 e HN13 após tratamento com TSA. O tratamento com TSA levou a um aumento significativo do potencial de invasão em ambas as linhagens celulares (* $p = 0.0479$ e ** $p = 0.0008$)

Além disso, após o tratamento com TSA, foi observado um aumento significativo da proteína vimentina nas linhagens celulares HN6 e HN13 (Figuras 5.5B e 5.6A – HN6 $p = 0.0146$ e HN13 $p < 0.0001$), sendo essa expressão diretamente associada ao aumento evidente do número de células exibindo fenótipo fusiforme (Figuras 5.5B e 5.6B – HN6 $p = 0.0004$ e HN13 $p = 0.0002$). Em linhagens celulares neoplásicas, a expressão da proteína vimentina associada a um fenótipo celular fusiforme são características compatíveis com a TEM^(88, 92, 195).

Finalmente, após o tratamento com TSA, a técnica de imunofluorescência evidenciou, nas linhagens celulares HN6 e HN13, um fenótipo fusiforme, apontado pela marcação do citoesqueleto pela proteína faloidina. Além disso, observou-se um aumento da expressão da proteína BMI-1, que exibiu notável marcação nuclear visualizada através da técnica de imunofluorescência e quantificada por meio da técnica de western blot (Figura 5.6C). A expressão da proteína BMI-1 encontra-se associada a um comportamento celular agressivo^(196, 197).

Figura 5.5A - Análise morfológica das linhagens celulares NOK-SI, HN6 e HN13 através da técnica de imunofluorescência. A marcação citoesquelética da proteína faloidina evidencia a mudança de formato poligonal para fusiforme, apenas nas células tumorais (HN6 e HN13), após tratamento com TSA (aumento 40x)

Figura 5.5B - Análise da expressão da proteína vimentina (vermelho) nas linhagens celulares NOK-SI, HN6 e HN13 por meio da técnica de imunofluorescência. A marcação citoesquelética da proteína citoqueratina 14 (verde) e o aumento da expressão da proteína vimentina evidenciam o fenótipo fusiforme nas linhagens celulares HN6 e HN13 após tratamento com TSA, sugerindo o fenômeno chamado transição epitélio-mesenquimal (aumento 20x, sendo o inserto 40x)

Figura 5.6A - Representação gráfica da média e desvio padrão da porcentagem de células positivas para proteína vimentina nas linhagens celulares NOK-SI, HN6 e HN13 após tratamento com TSA (* $p = 0.0146$ e ** $p < 0.0001$)

Figura 5.6B - Representação gráfica da média e desvio padrão da porcentagem de células positivas para proteína vimentina e exibindo concomitante formato fusiforme, encontradas nas linhagens celulares NOK-SI, HN6 e HN13 após tratamento com TSA (* $p = 0.0004$ e ** $p = 0.0002$)

Figura 5.6C - Análise da expressão da proteína BMI-1 nas linhagens celulares HN6 e HN13 por meio das técnicas de imunofluorescência (aumento 40x) e western blot. Através da marcação citoesquelética da proteína faloidina (vermelho), a técnica de imunofluorescência evidenciou o fenótipo fusiforme, visualizado em ambas as linhagens celulares, após tratamento com TSA. Tanto a técnica de imunofluorescência quanto de western blot detectaram o aumento da expressão da proteína BMI-1 (verde) após tratamento com TSA, sugerindo aumento da agressividade em ambas as linhagens celulares

5.6 Influência positiva da compactação da cromatina em linhagens celulares de CEB

As linhagens celulares HN6 e HN13 foram tratadas com o HATi curcumina^(152, 153) por 8 horas, sendo a dose definida por meio de uma curva de diluição para verificação da melhor concentração de inibição concomitante das proteínas mTOR e NFkB, principais alvos da curcumina⁽¹⁵⁵⁻¹⁵⁷⁾.

A proteína mTOR controla diretamente a atividade da proteína ribossomal S6⁽²⁰⁰⁻²⁰²⁾. Dessa forma, a análise da expressão da proteína ribossomal S6 é um ótimo *readout* da atividade da proteína mTOR.

Nesse sentido, avaliou-se a marcação da proteína ribossomal S6 ativada [Phospho-S6 Ribosomal Protein (pS6)], através da técnica de western blot, nas linhagens celulares HN6 e HN13 tratadas por 8 horas com diferentes concentrações de curcumina. Além disso, nas mesmas condições, também foi verificada a expressão da proteína NFkB ativada [Phospho-NFkB (p-p65)].

Como controle da expressão dos anticorpos pS6 e p-p65, as linhagens celulares HN6 e HN13 foram tratadas com EGF (15 min. – 100ng/mL) e rapamicina (30 min. – 50nM), pois já encontra-se bem estabelecido na literatura que o tratamento com EGF é responsável pelo aumento da expressão de pS6 e p-p65, e o tratamento com rapamicina leva a uma diminuição da expressão de pS6, uma vez que a rapamicina inibe a atividade da proteína mTOR⁽¹⁷¹⁻¹⁷³⁾.

Na Figura 5.7A, notou-se que a concentração de 75µM de curcumina por 8 horas foi ideal para inibição concomitante das proteínas pS6 e p-p65 na linhagem celular HN6, sendo também válida para linhagem celular HN13, conforme Figura 5.7B. A partir dessa análise, para as linhagens celulares HN6 e HN13, estabeleceu-se o tratamento de curcumina na concentração de 75µM.

Inicialmente, foi avaliado o índice proliferativo das linhagens celulares HN6 e HN13, após tratamento com curcumina pelo tempo de 24 horas. Para tanto, por meio da técnica de imunofluorescência, verificou-se a expressão do biomarcador de proliferação Ki67^(198, 199) que demonstrou significativa diminuição da sua marcação em ambas as linhagens celulares tratadas com curcumina (HN6 - $p = 0.0018$ e HN13 - $p = < 0.0001$) (Figura 5.7C).

Figura 5.7A - Análise da expressão das proteínas pS6 e p-p65 na linhagem celular HN6 após tratamento com rapamicina (50nM - 30 min.), EGF (100ng/mL - 15 min.) e diferentes doses de curcumina por 8 hs

Figura 5.7B - Análise da expressão das proteínas pS6 e p-p65 nas linhagens celulares HN6 e HN13 após tratamento com rapamicina (50nM - 30 min.) e curcumina (75μM - 8 hs)

Figura 5.7C - Representação gráfica da média e desvio padrão da porcentagem de células positivas para proteína Ki67 nas linhagens celulares HN6 e HN13. O tratamento com curcumina (75μM por 24 hs) levou a uma queda significativa da proteína Ki67 em ambas as linhagens celulares (* p = 0.0018 e ** p < 0.0001)

A compactação global da cromatina gerada pela curcumina (75 μ M pelo tempo de 8 horas) nas linhagens celulares HN6 e HN13 levou a uma diminuição significativa da atividade da enzima ALDH (Figura 5.8A). As linhagens celulares HN6 e HN13 apresentaram, respectivamente, 11.38% e 6.13% de células positivas, sendo que após o tratamento com curcumina passaram a expressar 1.48% e 0.43% de positividade. Somado a isso, notou-se o rompimento das esferas formadas em placas de cultivo celular exibindo baixa adesão, após 8 horas de tratamento com 75 μ M de curcumina (Figura 5.8B). Tanto a detecção da atividade da enzima ALDH como o ensaio de formação de esferas são métodos funcionais suportados pela literatura para a detecção de células-tronco *in vitro*^(182, 183, 187).

Figura 5.8A - Padrão de expressão da proteína ALDH nas linhagens celulares HN6 e HN13. As linhagens celulares HN6 e HN13 apresentaram, respectivamente, 11.38% e 6.13% de células positivas, sendo que após o tratamento com curcumina (75 μ M por 8 hs) passaram a expressar 1.48% e 0.93% de positividade, respectivamente

Figura 5.8B - Ensaio funcional para caracterizar a presença de células-tronco tumorais. Após 5 dias de cultivo, notou-se a formação de esferas nas linhagens celulares HN6 e HN13. Após 8 hs de tratamento com curcumina (75 μ M), observou-se a ruptura dessas esferas

Verificou-se também o potencial de invasão das linhagens celulares HN6 e HN13 após tratamento com curcumina (75 μ M pelo tempo de 8 horas). Assim, como consequência da indução da hipoacetilação da proteína acetil-Histona H3 Lisina9, ambas as linhagens celulares neoplásicas exibiram uma diminuição expressiva do número de células invasivas, em relação ao grupo controle (HN6 - $p = 0.0010$ e HN13 - $p = 0.0351$) (Figura 5.9A).

Corroborando com o ensaio de invasão, o tratamento das linhagens celulares neoplásicas com curcumina (75 μ M pelo tempo de 8 horas) levou a uma evidente diminuição da expressão da proteína BMI-1 (biomarcador de agressividade)^(196, 197) em ambas as linhagens celulares, verificada por meio da técnica de western blot (Figura 5.9B).

Por fim, observou-se que em linhagens celulares de CEB, o tratamento com curcumina mostrou maior efetividade em termos de diminuição da agressividade tumoral do que o tratamento com cisplatina, droga quimioterápica amplamente utilizada para tratamento de tumores sólidos, como os CECF⁽¹⁶¹⁾.

As linhagens celulares HN6 e HN13 foram tratadas com cisplatina (2.5 μ g/mL – 24 horas) e curcumina (75 μ M pelo tempo de 8 horas). Interessantemente, a cisplatina levou a um aumento das proteínas NF κ B (p-p65) e BMI-1 enquanto que a curcumina foi responsável por uma diminuição expressiva de ambas as proteínas (Figura 5.9C).

Através do ensaio de interferência de RNA por meio de siRNA, pode-se notar, nas linhagens celulares HN6 e HN13, em especial na linhagem celular HN13, que o tratamento com siRNA_IKK α ou siRNA_IKK β foi responsável pela diminuição da ativação da proteína NF κ B (p-p65) pela cisplatina, o que gerou, consequentemente, uma diminuição dos níveis da proteína BMI-1, sendo mais evidente na linhagem celular HN13 tratada com siRNA_IKK β + cisplatina (Figura 5.9C).

Figura 5.9A - Padrão de invasão das linhagens celulares HN6 e HN13 após tratamento com curcumina (75 μ M por 8 hs) (H&E - 20x). Representação gráfica da média e desvio padrão do número de células invasivas encontradas nas linhagens celulares HN6 e HN13 após tratamento com curcumina. O tratamento com curcumina levou a uma diminuição significativa do potencial de invasão em ambas as linhagens celulares (* $p = 0.0010$ e ** $p = 0.0351$)

Figura 5.9B - Análise da expressão da proteína BMI-1 nas linhagens celulares HN6 e HN13 após tratamento com 75 μ M de curcumina (8 hs)

Figura 5.9C - Análise da expressão das proteínas p-p65 e BMI-1 nas linhagens celulares HN6 e HN13 após tratamento com cisplatina, curcumina, siRNA_IKK α + cisplatina e siRNA_IKK β + cisplatina

A diminuição da expressão das proteínas NFkB (p-p65) e BMI-1 foi responsável pela redução significativa da migração celular (Figura 5.10 e Tabela 5.1). Em geral, verificou-se que quanto maior a inibição das proteínas NFkB (p-p65) e BMI-1 (Figura 5.9C) maior o impacto na migração celular.

O tratamento com cisplatina (2.5ug/mL) levou a uma diminuição da migração celular apenas na linhagem celular HN6, corroborando com o resultado encontrado na Figura 5.9C, que mostra, na linhagem celular HN13, uma maior ativação das proteínas NFkB (p-p65) e BMI-1, após o tratamento com cisplatina.

Além disso, pode-se notar que o tratamento com siRNA_IKK α ou siRNA_IKK β , por ser responsável pela diminuição da ativação da proteína NFkB (p-p65) pela cisplatina e gerando, dessa forma, uma redução dos níveis da proteína BMI-1 (Figura 5.9C), levou a uma impactação da migração de ambas as linhagens celulares, sendo mais expressiva na linhagem celular HN13, pois nessa linhagem celular o tratamento com siRNA_IKK β + cisplatina produziu uma diminuição expressivas dos níveis de NFkB (p-p65) e BMI-1 (Figura 5.9C) .

O tratamento com curcumina 75 μ M foi o único capaz de impactar por completo a migração celular nas linhagens celulares HN6 e HN13, confirmando mais uma vez os resultados apresentados na Figura 5.9C, ou seja, quanto maior a inibição das proteínas NFkB (p-p65) e BMI-1 (Figura 5.9C) maior o impacto no processo de migração celular.

A tabela 5.1 descreve a análise estatística do potencial de migração (Figura 5.10) das linhagens celulares HN6 e HN13 após tratamento com cisplatina, siRNA_IKK α + cisplatina, siRNA_IKK β + cisplatina e curcumina (teste t de *Student* pareado, sendo o nível de significância considerado quando $p < 0.05$).

Figura 5.10 - Representação gráfica da média e desvio padrão da área de fechamento da fenda (μM^2) em função do tempo (hs) de tratamento com cisplatina, siRNA_IKK α + cisplatina, siRNA_IKK β + cisplatina e curcumina. Após os diferentes tratamentos, com exceção da linhagem celular HN13 tratada com cisplatina, todas as linhagens celulares mostraram diminuição significativa da migração quando comparadas ao controle, sendo que o tratamento com a curcumina foi o único que impactou por completo o potencial migratório de ambas as linhagens celulares

Tabela 5.1 - Análise estatística do potencial de migração das linhagens celulares HN6 e HN13 após tratamento com cisplatina, siRNA_IKK α + cisplatina, siRNA_IKK β + cisplatina e curcumina (teste t de Student, sendo o nível de significância considerado quando $p < 0.05$)

HN6					HN13				
Tempo (hs)	Veículo x Cisplatina	Veículo x siRNA IKK α + Cisplatina	Veículo x siRNA IKK β + Cisplatina	Veículo x Curcumina	Tempo (hs)	Veículo x Cisplatina	Veículo x siRNA IKK α + Cisplatina	Veículo x siRNA IKK β + Cisplatina	Veículo x Curcumina
0	0.2845	0.7146	0.9468	0.1722	0	0.2644	0.1627	0.1123	0.1834
12	0.0353	0.0093	0.0003	0.0003	12	0.001	0.0002	0.0003	< 0.0001
24	---	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	24	0.0394	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
36	---	---	< 0.0001	< 0.0001	36	---	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
48	---	---	< 0.0001	< 0.0001	48	---	---	---	< 0.0001

6 DISCUSSÃO

Com aproximadamente 500 a 550 mil novos casos e 300 mil mortes anualmente, o carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP) representa uma das seis neoplasias malignas mais comuns no mundo^(3, 9, 10). Dos cânceres de cabeça e pescoço, o carcinoma epidermoide bucal (CEB) é o que apresenta maior prevalência^(1, 5, 6, 9, 10). Apesar dos avanços terapêuticos para os cânceres de uma maneira geral, os índices de sobrevida para o CEB ainda são considerados baixos^(3, 31, 32). Em média, metade dos pacientes morre em cinco anos⁽³³⁾ e, infelizmente, os sobreviventes ainda são marcados por disfunções estéticas e funcionais, acarretando diretamente em queda da qualidade de vida⁽²⁸⁻³⁰⁾. Nesse sentido, novas terapias têm sido propostas com o objetivo de melhorar as taxas de morbimortalidade.

Uma grande variedade de alterações genéticas e genômicas, como amplificações, translocações, deleções e mutações pontuais, têm sido associadas ao desenvolvimento de neoplasias malignas. No entanto, estudos recentes têm demonstrado que alterações epigenéticas, ou seja, mudanças que não alteram a sequência de nucleotídeos do DNA, também desempenham um importante papel na carcinogênese⁽³⁶⁻³⁸⁾. Existem três mecanismos principais de alterações epigenéticas: metilação do DNA, modificações de histonas e ação de RNAs não codificadores. As modificações pós-traducionais das histonas incluem, por exemplo, acetilação, deacetilação, metilação, fosforilação, estando envolvidas na regulação da expressão gênica^(36-41, 111).

Acetilação e deacetilação das histonas desempenham importantes papéis na regulação transcricional de genes em células eucarióticas. O estado de acetilação das histonas é dependente do equilíbrio das atividades das enzimas HAT e HDAC. As HDACs removem grupos acetil de resíduos de lisina localizados na cauda das histonas, tornando a estrutura de cromatina mais condensada, o que resulta na repressão da transcrição gênica por meio da limitação da acessibilidade dos fatores de transcrição. No caso da acetilação, grupos acetil são adicionados pelas HATs a resíduos de lisina localizados nas caudas das histonas levando a desestabilização e relaxamento (abertura) da estrutura da cromatina, desse modo, facilitando a transcrição gênica^(113, 114).

É relatado que as enzimas HDACs estão superexpressas em diversos cânceres, como no caso dos carcinomas gástricos e de próstata^(117, 119). Por criarem uma cromatina não permissiva, as HDACs encontram-se relacionadas a regulação da expressão e atividade de diferentes proteínas envolvidas, por exemplo, tanto na iniciação como progressão do câncer, além de contribuir significativamente para o desenvolvimento de neoplasias resistentes aos quimioterápicos convencionais^(115, 132).

Nesse sentido, foram selecionadas seis linhagens de CECP para análise do estado conformacional da cromatina. Para tanto, os níveis de acetilação da proteína histona 3 no resíduo de lisina 9 presentes nas linhagens celulares HN6 e HN13 foram comparados aos presentes em queratinócitos normais (linhagem celular NOK-SI). A acetilação no resíduo de lisina 9 da proteína histona 3 é tradicionalmente associada a ativação do processo de transcrição, ou seja, está relacionada com a presença de uma cromatina ativa ou aberta, sendo, portanto, considerada um marcador dos níveis de expressão gênica^(193, 194).

De fato, as linhagens celulares neoplásicas exibiram níveis mais baixos da acetil-Histona H3 Lisina9 em relação a células normais (Figura 5.1A), mostrando a maior compactação da cromatina em tumores malignos. Chen et al.⁽²⁰³⁾ também demonstraram a redução da expressão de acetil-Histona H3 Lisina9 em carcinomas epidermóides de esôfago. Song et al.⁽²⁰⁴⁾ e Barlési et al.⁽²⁰⁵⁾ confirmaram a diminuição de acetil-Histona H3 Lisina9 em carcinomas de pulmão.

Esses achados confirmam o aumento da expressão e atividade das enzimas HDACs em neoplasias malignas. Vale ressaltar mais uma vez que a literatura relata a influência da deacetilação das histonas (compactação da cromatina) na expressão de genes envolvidos na iniciação, progressão e metástase tumoral, além de contribuir significativamente para o desenvolvimento de neoplasias resistentes aos quimioterápicos convencionais^(115, 132).

Desse modo, para a verificação da relação entre padrão de agressividade tumoral e estado conformacional da cromatina, foram selecionadas as linhagens celulares HN6 e HN13, ambas CEB de língua, por exibirem os mais baixos níveis de acetil-Histona H3 Lisina9 em relação tanto a linhagem celular NOK-SI (queratinócitos normais) quanto as outras linhagens celulares de CECP (Figura 5.1A).

Inicialmente, detectou-se a expressão da vimentina, proteína correlacionada a um fenótipo invasivo e estando associada a um prognóstico ruim^(88, 92, 195), nas

linhagens celulares HN6 e HN13. Somente a linhagem celular HN6 mostrou-se positiva para proteína vimentina (Figura 5.1B). Esse achado corroborou com o resultado encontrado no ensaio de invasão, uma vez que apesar das linhagens celulares HN6 e HN13 apresentarem habilidade para invadir, apenas a linhagem celular HN6 exibiu uma população de células com potencial de invasão significativamente maior que a linhagem celular HN13 ($p < 0.0001$), como demonstrado na Figura 5.1C, confirmando a influência da expressão da proteína vimentina no padrão de invasão celular.

Por fim, através da expressão da atividade da enzima ALDH (marcador de células-tronco)^(182, 183), avaliou-se a presença de CSC. Ambas as linhagens celulares exibiram uma subpopulação de CSC, sendo a expressão de ALDH significativamente maior na linhagem celular HN6 (11.68% de células positivas) quando comparada a linhagem celular HN13 (4.23% de células positivas) (Figura 5.1D). A diferença de expressão da proteína ALDH entre as linhagens celulares HN6 e HN13 reafirmou, novamente, o padrão mais agressivo da linhagem celular HN6, sendo relatada que a expressão de ALDH encontra-se relacionada a um pior prognóstico⁽²⁰⁶⁾, uma vez que as CSC teriam um importante papel na recorrência tumoral, pois acredita-se que sejam quimiorresistentes às terapias convencionais^(58, 63, 67, 68).

Portanto, apesar das linhagens celulares HN6 e HN13 exibirem níveis semelhantes de expressão da proteína acetil-Histona H3 Lisina9, a linhagem celular HN6 apresentou um potencial de agressividade significativamente maior que a linhagem celular HN13, que, por sua vez, demonstrou características compatíveis com tumores quiescentes pouco agressivos.

A literatura sugere a utilização da proteína acetil-Histona H3 Lisina9 como um biomarcador de prognóstico tumoral⁽²⁰⁷⁾. No entanto, no caso do CECP, diante dos resultados *in vitro* aqui apresentados, a expressão da proteína acetil-Histona H3 Lisina9 não seria indicada como um meio de avaliação prognóstica, uma vez que, apesar de exibirem níveis basais semelhantes da proteína acetil-Histona H3 Lisina9, duas linhagens celulares de CEB de língua (HN6 e HN13) apresentaram comportamentos biológicos completamente distintos (Figuras 5.1B, C, D).

Vale ressaltar que nenhum relato é observado em relação a utilização da proteína acetil-Histona H3 Lisina9 como um biomarcador prognóstico para CECP. Entretanto, em outros tipos de câncer essa sugestão é encontrada, apesar dos

estudos ainda não mostrarem um consenso. Song et al.⁽²⁰⁴⁾, Elsheikh et al.⁽²⁰⁸⁾ e Zhen et al.⁽²⁰⁹⁾, por exemplo, relataram em carcinomas de pulmão, mama e ovário, respectivamente, que a reduzida expressão da proteína acetil-Histona H3 Lisina9 mostra correlação com maior probabilidade de recorrências e, portanto, pior prognóstico. Por outro lado, Barlési et al.⁽²⁰⁵⁾ demonstraram que pacientes com adenocarcinoma de pulmão em estágio I exibindo baixos níveis da proteína acetil-Histona H3 Lisina9 apresentaram melhores taxas de sobrevivência.

Atualmente, o mais importante indicador prognóstico para pacientes com CECP é a metástase para linfonodos cervicais ou para órgãos distantes^(86, 105). Aproximadamente 90% de todas as mortes por câncer surgem da disseminação metastática dos tumores primários⁽⁷⁴⁾. A presença de metástases regionais (linfonodos cervicais – via linfogênica) e à distância (via hematogênica) em pacientes com CECP é um evento comum, sendo associado com pior prognóstico e alta mortalidade⁽¹⁰⁵⁻¹⁰⁷⁾.

Os processos de invasão e migração celular fazem com que as células neoplásicas entrem em vasos sanguíneos ou linfáticos, disseminem para dentro da circulação e proliferem em outros sítios anatômicos^(85, 105). A invasão tecidual pelas células tumorais compreende dois eventos simultâneos: infiltração e posterior destruição dos tecidos normais adjacentes⁽⁷⁹⁾, sendo que ambos os eventos são influenciados pelo estroma tumoral⁽⁸⁰⁻⁸²⁾. Assim, interações entre as células neoplásicas e o microambiente circundante cria um contexto que, além de proteger o tumor contra o ataque do sistema imune, promove crescimento e progressão tumoral devido a presença de componentes moduladores da adesão, proliferação, migração e invasão celular⁽⁸⁰⁻⁸²⁾.

Desse modo, encontra-se bem estabelecido a importância que o microambiente tumoral desempenha em relação a progressão do câncer. Entretanto, o papel do microambiente tumoral no controle epigenético da expressão de genes críticos para a progressão neoplásica continua obscuro⁽²¹⁰⁾.

Nesse sentido, para a melhor compreensão da influência do microambiente tumoral na remodelação da cromatina e, conseqüente, expressão de biomarcadores associados a agressividade, as linhagens celulares HN6 e HN13, que exibiram baixos níveis da proteína acetil-Histona H3 Lisina9 (Figura 5.1A), foram cultivadas com meio condicionado (MC) proveniente de células endoteliais (MCE) e fibroblastos (MCF).

A utilização de MCE e MCF representam um modo de mimetizar o microambiente tumoral baseando-se no fato de que tanto as células endoteliais como os fibroblastos são componentes importantes do estroma que circunda o tumor, uma vez que secretam fatores relacionados com o aumento do crescimento, proliferação, migração e invasão celular^(164, 211-214). Neiva et al.⁽²¹²⁾ e Campos et al.⁽¹⁶⁴⁾ demonstraram que células endoteliais liberam fatores responsáveis pela inibição de apoptose relacionada com perda de adesão (anoikis) em linhagens celulares de CECp.

Assim, as linhagens celulares HN6 e HN13 foram cultivadas com MCE por 24 horas e, após esse período, foi detectado na linhagem celular HN6 um aumento expressivo dos níveis da proteína acetil-Histona H3 Lisina9, em relação ao grupo controle, indicando uma abertura ou relaxamento global da cromatina (Figura 5.2A). Em contrapartida, a linhagem celular HN13 exibiu um decréscimo, em relação ao grupo controle, da expressão da proteína acetil-Histona H3 Lisina9, apontando a indução da compactação ou fechamento global da cromatina (Figura 5.2A). Esses resultados demonstram que alterações no microambiente do tumor podem influenciar no padrão de acetilação e remodelação da cromatina, sendo esse achado confirmado por Bapat et al.⁽²¹⁵⁾, em células neoplásicas de carcinomas de ovário.

Campos et al.⁽¹⁶⁴⁾ relatam que o *crosstalk* microambiente tumoral x células neoplásicas, iniciado por células endoteliais, tem um efeito profundo sobre aspectos chave da patogenicidade dos CECp. De fato, em ambas as linhagens celulares (HN6 e HN13), a remodelação da cromatina induzida pelo MCE, mostrou-se associada a expressão de vimentina e BMI-1, duas proteínas relacionadas a um fenótipo fusiforme e comportamento celular agressivo^(88, 92, 195-197).

Notou-se que o relaxamento da cromatina (linhagem celular HN6) levou a um aumento da expressão de vimentina e BMI-1, por outro lado, a sua compactação (linhagem celular HN13) induziu a uma diminuição da proteína BMI-1, sendo que a proteína vimentina continuou a não ser expressa (Figura 5.2A). Nesse sentido, a compactação da cromatina na linhagem celular HN13 induziu um padrão tumoral ainda mais quiescente e pouco agressivo. Além disso, mais uma vez, observou-se que apesar das linhagens celulares HN6 e HN13 serem CEB derivados de língua e exibirem um padrão basal semelhante de compactação da cromatina, cada uma exibiu um comportamento biológico frente ao tratamento com meio de cultivo condicionado.

Portanto, esses achados confirmam que a capacidade das células de mamíferos de alterar o seu estado de diferenciação está associada a remodelação da cromatina, responsável pela regulação da expressão gênica. Bapat et al.⁽²¹⁵⁾ refere-se a essa capacidade como “plasticidade epigenética” e demonstra a influência de sinais extrínsecos emanados pelo microambiente tumoral na remodelação da cromatina, controlando o padrão de expressão de genes chaves ligados, por exemplo, a agressividade tumoral. Nesse sentido, Bapat et al.⁽²¹⁵⁾ sugerem que um maior entendimento dos mecanismos responsáveis pelas alterações da cromatina influenciadas pelo microambiente tumoral, provavelmente, conduzirá a melhores estratégias epigenéticas para reduzir a adaptação das células tumorais e, possivelmente, até mesmo, diminuir ou reverter as suas características malignas.

Ambas as linhagens celulares (HN6 e HN13) também foram cultivadas com MCF, porém, não foi notada nenhuma alteração na expressão da proteína acetil-Histona H3 Lisina9, em relação ao grupo controle. Observou-se que a não modificação no padrão de marcação da proteína acetil-Histona H3 Lisina9 manteve também inalterados os níveis de expressão das proteínas vimentina e BMI-1, em ambas as linhagens celulares (Figura 5.2A), confirmando, mais uma vez, a influência do microambiente tumoral na remodelação da cromatina e, conseqüentemente, expressão de genes chaves ligados a agressividade, por exemplo.

Kaminski et al.⁽²¹⁴⁾ cultivaram três linhagens celulares de carcinoma de próstata com MCF e verificaram a influência do microambiente tumoral por meio da avaliação de parâmetros importantes para o estabelecimento de metástases, tais como a proliferação e migração celular. Em geral, foi observado que a interação tumor-estroma realmente exerce um papel importante no padrão de agressividade dos carcinomas de próstata, porém as linhagens celulares exibiram diferentes comportamentos biológicos frente ao tratamento com MCF, sendo que não houve aumento significativo da proliferação e migração celular em duas linhagens celulares, corroborando com os achados encontrados nas linhagens celulares HN6 e HN13 após tratamento com MCF, uma vez que não foi notada nenhuma alteração na expressão de vimentina e BMI-1, proteínas relacionadas com um fenótipo fusiforme/invasivo e comportamento celular agressivo^(88, 92, 195-197).

Por fim, para confirmar *in vivo* a relação entre o relaxamento da cromatina e a agressividade tumoral, encontrada *in vitro* na linhagem celular HN6 após tratamento

com MCE (Figura 5.2A), foram selecionados fragmentos de mucosa bucal normal e CEB, corados pela técnica da hematoxilina-eosina (Figura 5.2B – a/b).

Através da técnica de imunofluorescência, foram observadas células neoplásicas exibindo marcação para acetil-Histona H3 Lisina9 apenas no fronte de invasão do carcinoma epidermoide. Interessantemente, essas células apresentaram concomitante expressão da proteína vimentina (Figura 5.2B – d). Vale lembrar mais uma vez que a presença da proteína vimentina em células epiteliais é correlacionada a um fenótipo invasivo, encontrando-se associada a um prognóstico ruim^(88, 92, 195). Esse fato foi confirmando na análise do fragmento de mucosa normal que apesar de demonstrar, distribuídas aleatoriamente por todo o epitélio, numerosas células positivas coradas para acetil-Histona H3 Lisina9, semelhante ao resultado *in vitro*, utilizando queratinócitos normais orais (Figura 5.1A), não houve colocalização com a proteína vimentina, encontrada somente no tecido conjuntivo subjacente (Figura 5.2B - c).

Dessa maneira, confirmou-se tanto *in vitro* quanto *in vivo* a associação entre agressividade tumoral e descompactação global da cromatina em células neoplásicas. Entretanto, como anteriormente descrito, a superexpressão e aumento da atividade das enzimas HDACs são encontradas em diferentes tipos de câncer. A literatura relata que a compactação da cromatina é que encontra-se relacionada a resultados terapêutico ruins, embasando, desse modo, a utilização clínica de inibidores de HDACs (HDACi) como potenciais agentes quimioterápicos^(115, 117, 119).

Essencialmente, o desenvolvimento dos HDACi é um passo importante por acrescentar mais uma alternativa de tratamento, terapia epigenética, ao arsenal antineoplásico. O tratamento com HDACi (ex.: tricostatina A - TSA) tem mostrado efeitos antitumorais expressivos, incluindo parada do crescimento, apoptose e diferenciação celular⁽¹¹²⁾.

Ensaio clínico com HDACi têm sido conduzidos para o tratamento de diferentes tipos de malignidades hematopoiéticas e também tumores sólidos. Respostas promissoras foram encontradas, principalmente, em pacientes portadores de doenças hematológicas, o que levou à aprovação pelo FDA (*U.S.A. Food and Drug Administration*) de dois HDACi, vorinostate e romidepsina, para o tratamento de linfomas cutâneos de células T e linfomas de células T periférico. Por outro lado, os ensaios clínicos com os HDACi em tumores sólidos não têm sido bem sucedidos, mostrando resultados desapontadores^(135, 216-218).

Vários mecanismos celulares que induzem resistência durante o tratamento de tumores sólidos com HDACi têm sido elucidados, incluindo a expressão aumentada do gene de resistência a múltiplas drogas, MDR1 (ABCB1), aumento da expressão de proteínas antiapoptóticas e ativação da via de sobrevivência celular⁽¹³⁵⁾, porém essas descobertas não têm sido traduzidas clinicamente. Assim, uma melhor compreensão dos determinantes moleculares de resistência aos HDACi poderia fornecer a base para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que possam melhorar o resultado do tratamento de pacientes diagnosticados com tumores sólidos.

Nesse sentido, as linhagens celulares HN6 e HN13 (por exibirem uma condensação maior da cromatina – Figura 5.1A) foram tratadas com o HDACi TSA. Atualmente, 18 tipos de HDACs foram identificadas em humanos, sendo a TSA um HDACi não seletivo⁽²¹⁹⁾.

Assim, após serem tratadas com TSA, as linhagens celulares HN6 e HN13 exibiram diminuição significativa da proliferação celular ($p = 0.0136$ e $p = 0.0011$, respectivamente), analisada por meio da quantificação da expressão do biomarcador de proliferação Ki67^(198, 199) (Figura 5.3A). Anh et al.⁽¹⁶⁷⁾, Gan et al.⁽¹²⁸⁾ e Suzuki et al.⁽¹²⁷⁾ também observaram a parada do ciclo celular em linhagens celulares de CEB tratadas com TSA.

Além disso, o tratamento das linhagens celulares HN6 e HN13 com TSA também apresentou resultados positivos em relação a subpopulação de CSC, uma vez que ambas as linhagens celulares exibiram uma diminuição evidente da atividade da enzima ALDH (Figura 5.3B) e rompimento de esferas formadas em placas de cultivo celular exibindo baixa adesão (Figura 5.3C). Tanto a detecção da atividade da enzima ALDH como o ensaio de formação de esferas são métodos funcionais bem estabelecidos para a detecção de células-tronco *in vitro*^(182, 183, 187).

Estudos relatam que as CSC permaneceriam em um estado predominantemente quiescente na massa tumoral, porém teriam um importante papel na recorrência do tumor pós-tratamento, pois acredita-se que sejam quimiorresistentes às terapias atuais^(58, 63, 67, 68). Sharma et al.⁽²²⁰⁾ identificaram em carcinoma de pulmão (linhagem celular PC9) uma subpopulação de CSC resistente a agentes quimioterápicos, como o erlotinibe e a cisplatina. O tratamento com TSA reduziu significativamente a subpopulação de CSC, tornando a massa tumoral mais responsiva aos agentes antineoplásicos.

Diante do exposto, o tratamento de linhagens celulares de CECF com TSA mostrou interessantes e promissores efeitos antitumorais, uma vez que diminuiu o índice de proliferação das células neoplásicas, o que refletiria *in vivo* no tamanho do tumor, e também reduziu de forma expressiva a subpopulação de CSC, relacionada a resistência terapêutica. Entretanto, como já citado, o tratamento com HDACi têm mostrado resultados promissores apenas em malignidades hematológicas, pois mecanismos de resistência têm sido relatados em tumores sólidos⁽¹³⁵⁾.

Nesse sentido, primeiramente, verificou-se o potencial de migração de queratinócitos normais e de células neoplásicas (linhagens celulares HN6 e HN13) após tratamento com TSA. As enzimas HDACs são associadas a várias malignidades e desenvolvimento de metástases⁽²²¹⁾. Em vários casos, a inibição dessas enzimas reduziu a taxa de migração e invasão celular⁽²²²⁻²²⁴⁾.

Gerlitz e Bustin⁽²²²⁾ e Gerlitz et al.⁽²²³⁾ identificaram que o relaxamento global da cromatina correlaciona-se diretamente a uma impactação expressiva do processo de migração celular. Gerlitz e Bustin⁽²²²⁾ demonstraram que o tratamento com TSA levou a uma diminuição da migração de células de melanoma (linhagem celular B16-F1). Entretanto, corroborando com os resultados encontrados em linhagens celulares de próstata, por Kong et al.⁽²¹⁸⁾, foi observado que após o tratamento com TSA, tanto as células neoplásicas de CEB (linhagens celulares HN6 e HN13) quanto os queratinócitos normais (NOK-SI) mostraram uma tendência para o aumento do potencial de migração, sendo esse aumento estatisticamente significativo na linhagem celular NOK-SI ($p = 0.0361$ para o tempo de 12 horas, $p = 0.0004$ para o tempo 24 horas e $p = 0.0002$ para o tempo de 36 horas) (Figura 5.4A).

Em relação ao potencial de invasão celular, as linhagens celulares HN6 e HN13, após tratamento com TSA, exibiram um aumento estatisticamente significativo do número de células invasivas (HN6 - $p = 0.0479$ e HN13 - $p = 0.0008$) (Figura 5.4B). Pulukuri et al.⁽²²⁵⁾ também observaram o aumento da invasão tumoral em linhagens celulares derivadas de neuroblastomas, carcinomas de próstata e meningiomas tratadas com TSA. Todavia, assim como no caso da migração celular, a literatura não apresenta um consenso em relação ao tratamento com os HDACi e invasão celular, pois Kang et al.⁽²²⁴⁾ afirmam que o relaxamento global da cromatina resulta em uma diminuição do potencial invasivo neoplásico.

Portanto, o uso dos HDACi como terapia antitumoral poderia paradoxalmente estabelecer metástases por meio da remodelação da cromatina. Esse fato foi

suportado *in vitro* pela indução do fenômeno de TEM induzido pelo tratamento com TSA em células de CECF.

A descondensação global da cromatina levou a uma alteração da morfologia apenas nas linhagens celulares tumorais (HN6 e HN13). Assim, o relaxamento da cromatina levou a uma mudança de fenótipo poligonal para fusiforme nas linhagens celulares HN6 e HN13 (Figuras 5.5A e 5.5B). Além disso, após o tratamento com TSA, foi observado um aumento significativo da proteína vimentina em ambas as linhagens celulares (Figuras 5.5B e 5.6A – HN6 $p = 0.0146$ e HN13 $p < 0.0001$), sendo essa expressão diretamente associada ao aumento evidente do número de células exibindo fenótipo fusiforme (Figuras 5.5B e 5.6B – HN6 $p = 0.0004$ e HN13 $p = 0.0002$).

Encontra-se bem estabelecido que a expressão da proteína vimentina associada a um fenótipo celular fusiforme são características compatíveis com a TEM^(88, 92, 195). Kong et al.⁽²¹⁸⁾ também observaram a indução da TEM em linhagens celulares de carcinoma de próstata após tratamento com TSA.

Acredita-se que a TEM encontra-se associada com aumento da invasão e metástase tumoral, além de contribuir para resistência a fármacos^(68, 96, 97). De fato, o tratamento com TSA levou a um aumento do potencial invasivo das linhagens HN6 e HN13, demonstrado na Figura 5.4B.

A TEM é um processo de transdiferenciação crucial, ocorrendo durante a embriogênese e em tecidos adultos, após a reparação de feridas ou remodelação de órgãos em resposta a uma injúria. Entretanto, esse fenômeno também ocorre durante a progressão tumoral. Durante a TEM, as células epiteliais adquirirem a morfologia das células mesenquimais através da inibição da expressão de certos marcadores epiteliais (por exemplo, E-caderina) e aquisição da expressão de marcadores mesenquimais (por exemplo, vimentina), resultando em um aumento da capacidade de migração e invasão celular, além do aumento da resistência à radio ou quimioterapia, sendo todos esses eventos envolvidos na progressão tumoral^(68, 88-97). Interessantemente, as células com características fenotípicas de TEM compartilham características com CSC, que também conferem resistência tumoral às drogas, contribuindo para a recorrência e metástase^(226, 227).

Por fim, após o tratamento com TSA, o fenótipo fusiforme, apontado pela marcação citoesquelética da proteína faloidina, encontrou-se associado ao aumento da expressão da proteína BMI-1, que exibiu notável marcação nuclear visualizada

através da técnica de imunofluorescência e quantificada por meio da técnica de western blot (Figura 6.1C). Na literatura, a expressão da proteína BMI-1 encontra-se associada a um comportamento celular invasivo, sendo seu aumento relatado em tumores gástricos, de mama, ovário, endométrio e cérvix, por exemplo^(196, 197, 228). Song et al.⁽²²⁹⁾ verificaram que a expressão ectópica da proteína BMI-1 pode induzir a TEM e aumentar a motilidade e invasividade de células epiteliais humanas da nasofaringe, enquanto que o silenciamento endógeno da expressão de BMI-1 pode reverter a TEM e reduzir o potencial metastático de células de carcinoma nasofaríngeo. Guo et al.⁽²³⁰⁾ confirmaram esses achados em células derivadas de carcinoma de mama, verificando que a repressão de BMI-1 reverte a expressão de marcadores da TEM, como a proteína vimentina.

Em resumo, apesar do sucesso obtido no tratamento de doenças hematológicas, o uso dos HDACi em tumores sólidos deve ser apoiado com cautela, pois verificou-se, em linhagens celulares de CECF, que apesar do relaxamento da cromatina levar a uma diminuição da proliferação e da subpopulação de CSC, o seu uso resultou em um aumento da agressividade tumoral, comprovada pelo aumento da migração, invasão e indução do fenômeno da TEM, associado ao aumento da proteína vimentina e BMI-1 (Figura 6.1).

Figura 6.1 – Aspecto negativo do tratamento com HDACi em linhagens celulares de CEB

Nesse sentido, pelo fato da descompactação da cromatina levar a um aumento da agressividade em linhagens celulares de CEC, procurou-se verificar se a sua compactação poderia trazer resultados terapêuticos mais promissores.

A literatura relata que em alguns tumores, por exemplo próstata, o processo de deacetilação inibe a transcrição de genes alvo da proteína STAT3, incluindo genes promotores da proliferação, como ciclina D1, e genes antiapoptóticos, como Bcl-xL^(136, 137). Nesse sentido, a superexpressão da atividade das HDAC ou a inibição da acetilação poderiam ser vantajosas no tratamento do câncer. Assim, optou-se por avaliar a ação dos HATi em linhagens celulares de CEC que responderam de forma negativa ao tratamento com o HDACi TSA.

As enzimas HAT são recrutadas como coativadores da transcrição, por fatores de transcrição, com o objetivo de gerarem o relaxamento da cromatina, através da acetilação das histonas. Além disso, as enzimas HAT, por exemplo PCAF, p300 e CBP, também acetilam diversas proteínas não-histonas, sendo que muitas delas desempenham papéis importantes na oncogênese, como é o caso do NFkB e mTOR⁽¹⁴³⁻¹⁴⁸⁾.

Recentemente, compostos naturais, tais como a curcumina, têm mostrado capacidade para alterar mecanismos epigenéticos, que podem conduzir ao aumento da sensibilidade das células neoplásicas a agentes terapêuticos convencionais⁽²³¹⁾.

A curcumina tem sido relacionada a inibição de proteínas associadas a eventos tumorais importantes, como proliferação celular, crescimento, diferenciação, sobrevivência e motilidade⁽¹⁵⁵⁾. Assim, a literatura relata a curcumina como sendo um inibidor, por exemplo, da proteína mTOR^(148, 156), do fator de transcrição NFkB^(147, 155, 157) e da acetilação das histonas H3 e H4 pelas HATs da família p300/CBP^(152, 153).

Desse modo, as linhagens celulares HN6 e HN13 foram tratadas com o HATi curcumina^(152, 153) por 8 horas e na concentração de 75µM, sendo essa dose definida por meio de uma curva de diluição para verificação da melhor concentração de inibição concomitante das proteínas mTOR e NFkB (Figuras 5.7A e B), principais alvos da curcumina⁽¹⁵⁵⁻¹⁵⁷⁾ e relacionadas a progressão tumoral.

A proteína mTOR tem sido reconhecida como um ponto chave terapêutico para a prevenção e/ou tratamento de cânceres, e muitas outras doenças, devido ao fato dela gerenciar a regulação de diversos processos celulares que não são apenas essenciais para a função celular normal, mas também são absolutamente necessários para o desenvolvimento e progressão tumoral^(232, 233).

mTOR é uma serina/treonina quinase *downstream* ao receptor IGF-IR (*insulin-like growth factor I receptor*) e a proteína PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*), atuando como um importante regulador mestre de uma grande variedade de processos celulares, incluindo proliferação, crescimento, diferenciação, sobrevivência e motilidade celular. A proteína mTOR exerce as suas funções principais por meio de dois complexos, mTORC1 e mTORC2. O complexo mTORC1, sensível a rapamicina, regula a fosforilação da proteína p70 S6 Kinase 1 (S6K1) e da proteína 4E-BP1 (*4E-binding protein 1*), reguladora do fator eIF4E (*eukaryotic initiation factor 4E*), comandando, desse modo, funções relacionadas ao controle da iniciação da tradução, proliferação e ganho de massa, por exemplo. O complexo mTORC2, insensível a rapamicina, é responsável pela fosforilação da serina⁴⁷³ da proteína Akt e regulação do citoesqueleto de actina^(201, 202, 232, 233), além de poder sofrer o processo de acetilação pelas enzimas HAT, o que leva a um aumento da sua ativação⁽¹⁴⁸⁾.

Portanto, a ativação oncogênica da via de sinalização mTOR tem a capacidade de induzir diversos processos necessários para o crescimento, sobrevivência e proliferação celular⁽²³³⁾.

A proteína mTOR controla diretamente a atividade da proteína ribossomal S6⁽²⁰⁰⁻²⁰²⁾, através da ativação da p70 S6 Kinase 1 (S6K1)^(202, 232, 233). Dessa forma, a análise da expressão da proteína ribossomal S6 é um ótimo *readout* da atividade da proteína mTOR.

O fator de transcrição NFkB é conhecido por regular processos ligados a proliferação e sobrevivência celular. Evidências crescentes suportam que a desregulação do NFkB pode contribuir para o desenvolvimento de vários eventos patológicos, incluindo o câncer⁽²³⁴⁾.

Na verdade, o fator de transcrição NFkB representa uma família composta por cinco proteínas, p50 (NFkB1), p52 (NFkB2), p65 (RelA ou RELA), c-Rel (REL) e RelB (RELB), que podem formar homo e heterodímeros, sendo p50/p65 ou p52/p65 as formas mais comuns^(235, 236). Após ativação no citoplasma, o fator de transcrição NFkB é translocado para o núcleo, onde é acetilado, da mesma forma que as histonas da cromatina, pelas enzimas HATs. Assim, o processo de acetilação leva a ativação final do NFkB e a abertura da cromatina para que ocorra o processo de transcrição (Figura 6.2). O NFkB participa da expressão de genes envolvidos em

respostas inflamatórias e imunes, bem como na proliferação e sobrevivência celular^(147, 192, 235, 237, 238).

A ativação do NFkB é regulada por uma família de proteínas inibitórias chamada IkB (IkB α , IkB β , bcl-3, IkB ϵ e IkB γ). Assim, o NFkB é reprimido pela sua associação ao IkB no citoplasma, inibindo, dessa forma, a sua translocação para o núcleo, portanto, ficando retido no seu estado inativo no citoplasma^(192, 238-240).

O mecanismo clássico de ativação do NFkB envolve a inativação (fosforilação) das proteínas IkB, levando-as para ubiquitinação e, consequente, degradação via proteossomo. O complexo IkB *kinase* (IKK $\alpha/\beta/\gamma$) é o responsável pela fosforilação das proteínas IkB^(192, 234, 238, 241), sendo ativado por citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em células de CECP, por exemplo⁽¹⁹¹⁾.

A ativação constitutiva do NFkB é um evento frequente em uma variedade de neoplasias humanas, tais como mama, melanoma, próstata, leucemia de células T, linfoma de Hodgkin, linfoma de células B, mieloma múltiplo e CECP^(234, 242). A desregulação do NFkB promove a angiogênese e metástases, além de suprimir o potencial apoptótico de agentes quimioterapêuticos e radiação, levando assim a resistência ao tratamento de diversos tumores^(234, 243, 244). Em CECP, a expressão e atividade do NFkB é muitas vezes exacerbada, sendo os seus níveis aumentados gradualmente a partir de lesões potencialmente malignas em direção a tumores mais invasivos^(242, 245-247).

Figura 6.2 – Processo de ativação do fator de transcrição NFκB. Adaptado de Ghizzoni et al.⁽¹⁴⁷⁾

Após a definição da concentração de trabalho, utilizou-se o HATi curcumina na tentativa de se compreender melhor a contribuição da remodelação da cromatina na agressividade tumoral, estudando, desse modo, eventos ligados a proliferação, migração, invasão e desenvolvimento de resistência às drogas quimioterápicas.

Nesse sentido, inicialmente, foi avaliado o índice proliferativo das linhagens celulares HN6 e HN13, após tratamento com curcumina. Para tanto, por meio da técnica de imunofluorescência, verificou-se a expressão do biomarcador de proliferação Ki67^(198, 199) que, assim como no tratamento com TSA (Figura 5.3A),

demonstrou significativa diminuição da sua marcação em ambas as linhagens celulares tratadas com curcumina (HN6 - $p = 0.0018$ e HN13 - $p = < 0.0001$) (Figura 5.7C). Esses resultados corroboram com os achados de Aggarwal et al.⁽¹⁵⁷⁾, que observaram a inibição da proliferação, parada do ciclo celular na fase G1/S e indução da apoptose em linhagens celulares de CECP tratadas com curcumina.

Assim como no tratamento com TSA (Figuras 5.3B e C), a curcumina gerou nas linhagens celulares HN6 e HN13 resultados promissores em relação a subpopulação de CSC, uma vez que ambas as linhagens celulares exibiram uma diminuição significativa da atividade da enzima ALDH (Figura 5.8A). Somado a isso, notou-se o rompimento das esferas formadas em placas de cultivo celular exibindo baixa adesão (Figura 5.8B). Tanto a detecção da atividade da enzima ALDH como o ensaio de formação de esferas são métodos funcionais suportados pela literatura para a detecção de células-tronco *in vitro*^(182, 183, 187). Kakarala et al.⁽²⁴⁸⁾, Lin et al.⁽²⁴⁹⁾ e Subramaniam et al.⁽²⁵⁰⁾ demonstraram que o tratamento com curcumina inibiu a formação de esferas em carcinomas de mama, cólon e esôfago, respectivamente, portanto, diminuindo a subpopulação de CSC, quimiorresistentes às terapias atuais^(58, 63, 67, 68).

Verificou-se também o potencial de invasão das linhagens celulares HN6 e HN13 após tratamento com curcumina. Ambas as linhagens celulares neoplásicas exibiram uma diminuição expressiva do número de células invasivas (HN6 - $p = 0.0010$ e HN13 - $p = 0.0351$) (Figura 5.9A), sendo esse resultado confirmado por Tsang et al.⁽²⁵¹⁾. Esse achado foi extremamente importante, uma vez que a indução da abertura da cromatina pelo HDACi TSA gerou um aumento expressivo do potencial invasivo nas linhagens celulares HN6 e HN13 (Figura 5.4B).

Interessantemente, corroborando com o ensaio de invasão, o tratamento das linhagens celulares neoplásicas com curcumina levou a uma evidente diminuição da expressão da proteína BMI-1 (biomarcador de agressividade)^(196, 197) em ambas as linhagens celulares (Figura 5.9B), sendo esse um achado novo na literatura. Em contrapartida, o tratamento das linhagens celulares HN6 e HN13 com TSA levou a um aumento da proteína BMI-1 (Figura 5.6C).

Portanto, o tratamento de tumores sólidos com HATi curcumina parece promissor, pois resultados interessantes foram obtidos em linhagens de CECP, uma vez que a ação da curcumina reduziu o potencial de invasão celular e a marcação

da proteína BMI-1, ambos parâmetros relacionados com a indução do fenômeno da TEM e que foram aumentados após o tratamento com o HDACi TSA.

Por fim, observou-se que em linhagens celulares de CECp, o tratamento com curcumina mostrou maior efetividade em termos de diminuição da agressividade tumoral do que o tratamento com cisplatina, droga quimioterápica amplamente utilizada para tratamento de tumores sólidos, como os CECp⁽¹⁶¹⁾.

As linhagens celulares HN6 e HN13 foram tratadas com cisplatina e curcumina, sendo que, interessante, a cisplatina levou a um aumento das proteínas NFkB (p-p65) e BMI-1 enquanto que a curcumina foi responsável por uma diminuição expressiva de ambas as proteínas (Figura 5.9C). A ativação do fator de transcrição NFkB tem sido reportada como um dos mecanismos responsáveis pela resistência de tumores às drogas quimioterápicas^(243, 244, 252).

Nesse sentido, através do ensaio de interferência de RNA por meio de siRNA, pode-se notar, nas linhagens celulares HN6 e HN13, em especial na linhagem celular HN13, que o tratamento com siRNA_IKK α ou siRNA_IKK β foi responsável pela diminuição da ativação da proteína NFkB (p-p65) pela cisplatina, o que gerou, consequentemente, uma diminuição dos níveis da proteína BMI-1, sendo mais evidente na linhagem celular HN13 tratada com siRNA_IKK β + cisplatina (Figura 5.9C).

Assim, por meio desse ensaio, foi possível, primeiramente, mostrar que a ativação da proteína BMI-1 parece ser regulada pela expressão da proteína NFkB (p-p65), como previamente demonstrado por Dutton et al.⁽²⁵³⁾. Além disso, observou-se também que a resistência de muitos tumores ao tratamento com cisplatina encontra-se relacionada a ativação de NFkB, uma vez que essa proteína apresenta relação com aumento da invasão, metástase e recorrência tumoral^(234, 254). Mabuchi et al.⁽²⁵²⁾ demonstraram que a inibição do fator de transcrição NFkB aumentou a eficácia do tratamento com cisplatina em linhagens celulares derivadas de carcinoma de ovário.

A diminuição da expressão das proteínas NFkB (p-p65) e BMI-1 foi responsável pela redução significativa da migração celular (Figura 5.10 e Tabela 5.1). Em geral, verificou-se que quanto maior a inibição das proteínas NFkB (p-p65) e BMI-1 (Figura 5.9C) maior o impacto na migração celular. Assim, o tratamento com curcumina foi a única droga capaz de impactar por completo a migração celular nas linhagens celulares HN6 e HN13, confirmando mais uma vez os resultados

apresentados na Figura 5.9C, ou seja, quanto maior a inibição das proteínas NFkB (p-p65) e BMI-1 (Figura 5.9C) maior o impacto no processo de migração celular.

7 CONCLUSÕES

A remodelação da cromatina influenciou o padrão de agressividade tumoral em linhagens celulares de CECP. Verificou-se que:

1. linhagens celulares de CECP exibiram uma maior compactação da cromatina (baixos níveis de acH3) quando comparadas a linhagem de queratinócitos normais. Assim, tumores de cabeça e pescoço são, em geral, mantidos em um estado hipoacetilado;
2. A compactação da cromatina mostrou correlação com o acúmulo e manutenção de CSC
3. baixos níveis da proteína acetil-Histona H3 Lisina9 não mostraram correlação direta com o padrão de agressividade tumoral em linhagens celulares de CECP;
4. o microambiente tumoral exerceu influência no estado conformacional da cromatina de linhagens celulares de CECP, sendo que o relaxamento da cromatina encontrou-se relacionado ao aumento da expressão de biomarcadores de agressividade. Esse achado foi confirmado em cortes histológicos de CECP humanos;
5. o tratamento com HDACi TSA gerou resultados paradoxais, uma vez que apesar de levar a uma diminuição da proliferação celular e da subpopulação de CSC em linhagens celulares de CECP, o seu uso induziu o fenômeno da TEM, diretamente correlacionado ao aumento da agressividade tumoral, verificada pela elavação do potencial de migração e invasão celular, além do aumento da expressão da proteína BMI-1;
6. a ação do HATi curcumina, em linhagens celulares de CECP, gerou resultados promissores, pois além da inibição conhecida das proteínas NFkB (p-p65) e mTOR (pS6), levou a uma diminuição da proliferação celular, da subpopulação de CSC e do potencial de invasão celular;
7. o quimioterápico cisplatina levou ao aumento das proteínas NFkB (p-p65) e BMI-1;
8. a expressão da proteína BMI-1 apresentou regulação direta pela proteína NFkB;

9. a diminuição da expressão das proteínas NFkB (p-p65) e BMI-1 foi responsável pela redução significativa da migração celular. Em geral, verificou-se que quanto maior a inibição das proteínas NFkB (p-p65) e BMI-1 maior o impacto na migração celular;
10. o tratamento com curcumina foi o único capaz de impactar por completo a migração celular;
11. diante do exposto, a utilização de HATi em tumores sólidos pode ser considerada uma ferramenta de tratamento promissora.

REFERÊNCIAS¹

1. Döbrossy L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer Metastasis Rev.* 2005 Jan;24(1):9-17.
2. Davies L, Welch HG. Epidemiology of head and neck cancer in the United States. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006 Sep;135(3):451-7.
3. Conway DI, Hashibe M, Boffetta P, Wunsch-Filho V, Muscat J, La Vecchia C, et al. Enhancing epidemiologic research on head and neck cancer: INHANCE - The international head and neck cancer epidemiology consortium. *Oral Oncol.* 2009 Sep;45(9):743-6.
4. Cancer.gov/cancertopics/factsheet/Sites-Types/head-and-neck [homepage on the internet]. Bethesda, MD, USA: National Cancer Institute at National Institutes of Health; 2012. Representação esquemática das regiões anatômicas que podem ser acometidas por câncer de cabeça e pescoço [citado 06 set. 2012]. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Sites-Types/head-and-neck>.
5. Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Dis.* 2009 Sep;15(6):388-99.
6. INCA - Instituto Nacional do Câncer 2012 [citado 07 set. 2012]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>.
7. Yan W, Wistuba II, Emmert-Buck MR, Erickson HS. Squamous Cell Carcinoma - Similarities and Differences among Anatomical Sites. *Am J Cancer Res.* 2011 Jan;1(3):275-300.
8. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.* 2009 Apr-May;45(4-5):309-16.

¹De acordo com o Estilo Vancouver.

9. Globocan.iarc.fr/ [homepage on the internet]. Lyon, France: The Section of Cancer Information (CIN) at International Agency for Research on Cancer (IARC); 2008. GLOBOCAN 2008: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide [citado 08 set. 2012]. Disponível em: http://globocan.iarc.fr/summary_table_pop.asp?selection=221900&title=World&age_from=1&age_to=10&sex=0&type=0&window=1&sort=0&submit=%A0Execute%A0.
10. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010 Dec;127(12):2893-917.
11. Moore S, Johnson N, Pierce A, Wilson D. The epidemiology of lip cancer: a review of global incidence and aetiology. *Oral Dis*. 1999 Jul;5(3):185-95.
12. Moore SR, Johnson NW, Pierce AM, Wilson DF. The epidemiology of tongue cancer: a review of global incidence. *Oral Dis*. 2000 Mar;6(2):75-84.
13. Moore SR, Johnson NW, Pierce AM, Wilson DF. The epidemiology of mouth cancer: a review of global incidence. *Oral Dis*. 2000 Mar;6(2):65-74.
14. Who.int/classifications/icd/en/Cancer.gov/cancertopics/factsheet/Sites-Types/head-and-neck [homepage on the internet]. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1994. International Classification of Diseases (ICD) [citado 08 set. 2012]. Disponível em: <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2010/en>.
15. Keller AZ. Cellular types, survival, race, nativity, occupations, habits and associated diseases in the pathogenesis of lip cancers. *Am J Epidemiol*. 1970 May;91(5):486-99.
16. Anderson DL. Cause and prevention of lip cancer. *J Can Dent Assoc (Tor)*. 1971 Apr;37(4):138-42.
17. OMS - Organização Mundial de Saúde [citado 08 set. 2012]. Disponível em: <http://www.who.int>.
18. Tuyns AJ, Estève J, Raymond L, Berrino F, Benhamou E, Blanchet F, et al. Cancer of the larynx/hypopharynx, tobacco and alcohol: IARC international case-control study in Turin and Varese (Italy), Zaragoza and Navarra (Spain), Geneva (Switzerland) and Calvados (France). *Int J Cancer*. 1988 Apr;41(4):483-91.

19. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst.* 2007 May;99(10):777-89.
20. Bagan J, Scully C. Recent advances in Oral Oncology 2007: epidemiology, aetiopathogenesis, diagnosis and prognostication. *Oral Oncol.* 2008 Feb;44(2):103-8.
21. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005 Mar-Apr;55(2):74-108.
22. Ponder BA. Cancer genetics. *Nature.* 2001 May;411(6835):336-41.
23. Pedrero JM, Carracedo DG, Pinto CM, Zapatero AH, Rodrigo JP, Nieto CS, et al. Frequent genetic and biochemical alterations of the PI 3-K/AKT/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2005 Mar;114(2):242-8.
24. Iamaroon A, Pattanaporn K, Pongsiriwet S, Wanachantararak S, Prapayasatok S, Jittidecharaks S, et al. Analysis of 587 cases of oral squamous cell carcinoma in northern Thailand with a focus on young people. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004 Jan;33(1):84-8.
25. Curado MP, Hashibe M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol.* 2009 May;21(3):194-200.
26. Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KA. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people--a comprehensive literature review. *Oral Oncol.* 2001 Jul;37(5):401-18.
27. Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KA. Risk factors for oral cancer in newly diagnosed patients aged 45 years and younger: a case-control study in Southern England. *J Oral Pathol Med.* 2004 Oct;33(9):525-32.
28. Sidransky D. Molecular genetics of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol.* 1995 May;7(3):229-33.
29. Pace-Balzan A, Shaw RJ, Butterworth C. Oral rehabilitation following treatment for oral cancer. *Periodontol* 2000. 2011 Oct;57(1):102-17.

30. Warnakulasuriya S. Living with oral cancer: epidemiology with particular reference to prevalence and life-style changes that influence survival. *Oral Oncol.* 2010 Jun;46(6):407-10.
31. Sklenicka S, Gardiner S, Dierks EJ, Potter BE, Bell RB. Survival analysis and risk factors for recurrence in oral squamous cell carcinoma: does surgical salvage affect outcome? *J Oral Maxillofac Surg.* 2010 Jun;68(6):1270-5.
32. Molinolo AA, Amornphimoltham P, Squarize CH, Castilho RM, Patel V, Gutkind JS. Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. *Oral Oncol.* 2009 Apr-May;45(4-5):324-34.
33. Kademani D. Oral cancer. *Mayo Clin Proc.* 2007 Jul;82(7):878-87.
34. Todd R, Donoff RB, Wong DT. The molecular biology of oral carcinogenesis: toward a tumor progression model. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997 Jun;55(6):613-23; discussion 23-5.
35. Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res.* 1996 Jun;56(11):2488-92.
36. Mascolo M, Siano M, Ilardi G, Russo D, Merolla F, De Rosa G, et al. Epigenetic dysregulation in oral cancer. *Int J Mol Sci.* 2012;13(2):2331-53.
37. Kanwal R, Gupta S. Epigenetic modifications in cancer. *Clin Genet.* 2012 Apr;81(4):303-11.
38. Fan CY. Epigenetic alterations in head and neck cancer: prevalence, clinical significance, and implications. *Curr Oncol Rep.* 2004 Mar;6(2):152-61.
39. Shaw R. The epigenetics of oral cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2006 Feb;35(2):101-8.
40. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer.* 2004 Feb;4(2):143-53.
41. Rountree MR, Bachman KE, Herman JG, Baylin SB. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene.* 2001 May;20(24):3156-65.

42. Momparler RL, Bovenzi V. DNA methylation and cancer. *J Cell Physiol.* 2000 May;183(2):145-54.
43. Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet.* 2006 Jan;7(1):21-33.
44. Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene.* 2002 Aug;21(35):5427-40.
45. Kulkarni V, Saranath D. Concurrent hypermethylation of multiple regulatory genes in chewing tobacco associated oral squamous cell carcinomas and adjacent normal tissues. *Oral Oncol.* 2004 Feb;40(2):145-53.
46. Chang HW, Ling GS, Wei WI, Yuen AP. Smoking and drinking can induce p15 methylation in the upper aerodigestive tract of healthy individuals and patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer.* 2004 Jul;101(1):125-32.
47. Wong TS, Man MW, Lam AK, Wei WI, Kwong YL, Yuen AP. The study of p16 and p15 gene methylation in head and neck squamous cell carcinoma and their quantitative evaluation in plasma by real-time PCR. *Eur J Cancer.* 2003 Sep;39(13):1881-7.
48. Lingen MW, Pinto A, Mendes RA, Franchini R, Czerninski R, Tilakaratne WM, et al. Genetics/epigenetics of oral premalignancy: current status and future research. *Oral Dis.* 2011 Apr;17 Suppl 1:7-22.
49. Saintigny P, Zhang L, Fan YH, El-Naggar AK, Papadimitrakopoulou VA, Feng L, et al. Gene expression profiling predicts the development of oral cancer. *Cancer Prev Res (Phila).* 2011 Feb;4(2):218-29.
50. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan;100(1):57-70.
51. Choi S, Myers JN. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. *J Dent Res.* 2008 Jan;87(1):14-32.
52. Cotran RS, Robbins SL, Kumar V, Schoen FJ. *Pathologic basis of disease.* 5a. ed. Philadelphia: WB Saunders Co; 1994.
53. Lippman SM, Sudbø J, Hong WK. Oral cancer prevention and the evolution of molecular-targeted drug development. *J Clin Oncol.* 2005 Jan;23(2):346-56.

54. Wright JM. A review and update of oral precancerous lesions. *Tex Dent J*. 1998 Jun;115(6):15-9.
55. Cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer [homepage on the internet]. Bethesda, MD, USA: National Cancer Institute at National Institutes of Health; 2012. Representação esquemática da iniciação tumoral e posterior expansão clonal no carcinoma epidermoide bucal [citado 10 set. 2012]. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>.
56. Braakhuis BJ, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic progression model of oral cancer: current evidence and clinical implications. *J Oral Pathol Med*. 2004 Jul;33(6):317-22.
57. Stemcells.nih.gov/info/Regenerative_Medicine/2006chapter9.htm [homepage on the internet]. Bethesda, MD, USA: National Cancer Institute at National Institutes of Health; 2012. Are stem cells involved in cancer? [citado 12 set. 2012]. Disponível em: http://stemcells.nih.gov/info/Regenerative_Medicine/2006chapter9.htm.
58. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001 Nov;414(6859):105-11.
59. Kucia M, Ratajczak MZ. Stem cells as a two edged sword--from regeneration to tumor formation. *J Physiol Pharmacol*. 2006 Nov;57 Suppl 7:5-16.
60. Sell S. On the stem cell origin of cancer. *Am J Pathol*. 2010 Jun;176(6):2584-494. PubMed PMID: 20431026.
61. Monroe MM, Anderson EC, Clayburgh DR, Wong MH. Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *J Oncol*. 2011;2011:762780.
62. Richard V, Pillai MR. The stem cell code in oral epithelial tumorigenesis: 'the cancer stem cell shift hypothesis'. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Dec;1806(2):146-62.
63. Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. *N Engl J Med*. 2006 Sep;355(12):1253-61.
64. Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003 Dec;3(12):895-902.

65. Al-Hajj M, Clarke MF. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene*. 2004 Sep;23(43):7274-82.
66. Huang EH, Heidt DG, Li CW, Simeone DM. Cancer stem cells: a new paradigm for understanding tumor progression and therapeutic resistance. *Surgery*. 2007 Apr;141(4):415-9.
67. Houghton J, Morozov A, Smirnova I, Wang TC. Stem cells and cancer. *Semin Cancer Biol*. 2007 Jun;17(3):191-203.
68. Wang Z, Li Y, Ahmad A, Azmi AS, Kong D, Banerjee S, et al. Targeting miRNAs involved in cancer stem cell and EMT regulation: An emerging concept in overcoming drug resistance. *Drug Resist Updat*. 2010 Aug-Oct;13(4-5):109-18.
69. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr;100(7):3983-8.
70. Costea DE, Tsinkalovsky O, Vintermyr OK, Johannessen AC, Mackenzie IC. Cancer stem cells - new and potentially important targets for the therapy of oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis*. 2006 Sep;12(5):443-54.
71. Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, et al. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res*. 2005 Oct;65(20):9328-37.
72. Chen CY, Chiou SH, Huang CY, Jan CI, Lin SC, Tsai ML, et al. Distinct population of highly malignant cells in a head and neck squamous cell carcinoma cell line established by xenograft model. *J Biomed Sci*. 2009;16:100.
73. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res*. 2005 Dec;65(23):10946-51.
74. Christofori G. New signals from the invasive front. *Nature*. 2006 May;441(7092):444-50.
75. Cancer.gov/cancertopics/understandingcancer/cancer/page8 [homepage on the internet]. Bethesda, MD, USA: National Cancer Institute at National Institutes of Health; 2012. Representação esquemática dos processos de invasão e metástase: (i) invasão de células neoplásicas em direção aos

tecidos circundantes, (ii) angiogênese e invasão do sistema circulatório por células tumorais e (iii) metástase [citado 18 set. 2012]. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/understandingcancer/cancer/page8>.

76. Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Kleiner DE. Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *FASEB J*. 1993 Dec;7(15):1434-41.
77. Paulsson M. Basement membrane proteins: structure, assembly, and cellular interactions. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1992;27(1-2):93-127.
78. Tarquinio SBC. Estudo de componentes da Matriz Extracelular no líquen Plano, Penfigóide benigno da mucosa e Pênfigo Vulgar [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 1999.
79. Kramer RH, Shen X, Zhou H. Tumor cell invasion and survival in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2005 Jan;24(1):35-45.
80. Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer*. 2001 Oct;1(1):46-54.
81. Shrestha P, Sumitomo S, Lee CH, Nagahara K, Kamegai A, Yamanaka T, et al. Tenascin: growth and adhesion modulation--extracellular matrix degrading function: an in vitro study. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1996 Mar;32B(2):106-13.
82. Sebens S, Schafer H. The tumor stroma as mediator of drug resistance - a potential target to improve cancer therapy? *Curr Pharm Biotechnol*. 2012 Sep;13(11):2259-72.
83. Tlsty TD, Coussens LM. Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annu Rev Pathol*. 2006;1:119-50.
84. Alberts B, Bray B, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular biology of the cell*. 3a. ed. New York: Garland Publishing; 1994.
85. Kudo Y, Kitajima S, Ogawa I, Hiraoka M, Sargolzaei S, Keikhaee MR, et al. Invasion and metastasis of oral cancer cells require methylation of E-cadherin and/or degradation of membranous beta-catenin. *Clin Cancer Res*. 2004 Aug;10(16):5455-63.

86. Fidler IJ. Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture. *Cancer Res.* 1990 Oct;50(19):6130-8.
87. Uchida D, Kawamata H, Omotehara F, Nakashiro Ki, Kimura-Yanagawa T, Hino S, et al. Role of HGF/c-met system in invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma cells in vitro and its clinical significance. *Int J Cancer.* 2001 Aug;93(4):489-96.
88. Mandal M, Myers JN, Lippman SM, Johnson FM, Williams MD, Rayala S, et al. Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous carcinoma: association of Src activation with E-cadherin down-regulation, vimentin expression, and aggressive tumor features. *Cancer.* 2008 May;112(9):2088-100.
89. Birchmeier C, Birchmeier W, Brand-Saberi B. Epithelial-mesenchymal transitions in cancer progression. *Acta Anat (Basel).* 1996;156(3):217-26.
90. Boyer B, Vallés AM, Edme N. Induction and regulation of epithelial-mesenchymal transitions. *Biochem Pharmacol.* 2000 Oct;60(8):1091-9.
91. Hugo H, Ackland ML, Blick T, Lawrence MG, Clements JA, Williams ED, et al. Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression. *J Cell Physiol.* 2007 Nov;213(2):374-83.
92. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2002 Jun;2(6):442-54.
93. Kong D, Li Y, Wang Z, Banerjee S, Ahmad A, Kim HR, et al. miR-200 regulates PDGF-D-mediated epithelial-mesenchymal transition, adhesion, and invasion of prostate cancer cells. *Stem Cells.* 2009 Aug;27(8):1712-21.
94. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 Feb;7(2):131-42.
95. Thompson EW, Newgreen DF, Tarin D. Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer Res.* 2005 Jul;65(14):5991-5; discussion 5.
96. Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene.* 2010 Aug;29(34):4741-51.

97. Wang Z, Li Y, Kong D, Banerjee S, Ahmad A, Azmi AS, et al. Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells is linked with activation of the notch signaling pathway. *Cancer Res.* 2009 Mar;69(6):2400-7.
98. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 2000 Apr;6(4):389-95.
99. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst.* 1990 Jan;82(1):4-6.
100. Folkman J. The vascularization of tumors. *Sci Am.* 1976 May;234(5):58-64, 70-3.
101. Weidner N. Tumoural vascularity as a prognostic factor in cancer patients: the evidence continues to grow. *J Pathol.* 1998 Feb;184(2):119-22.
102. Zetter BR. Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu Rev Med.* 1998;49:407-24.
103. Ascani G, Balercia P, Messi M, Lupi L, Goteri G, Filosa A, et al. Angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2005 Feb;25(1):13-7.
104. Lyons AJ, Jones J. Cell adhesion molecules, the extracellular matrix and oral squamous carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2007 Aug;36(8):671-9.
105. Michikawa C, Uzawa N, Kayamori K, Sonoda I, Ohyama Y, Okada N, et al. Clinical significance of lymphatic and blood vessel invasion in oral tongue squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 2012 Apr;48(4):320-4.
106. Ferlito A, Shaha AR, Silver CE, Rinaldo A, Mondin V. Incidence and sites of distant metastases from head and neck cancer. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2001 Jul-Aug;63(4):202-7.
107. Howell GM, Grandis JR. Molecular mediators of metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2005 Aug;27(8):710-7.
108. Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature.* 2007 May;447(7143):396-8.

109. Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov.* 2006 Jan;5(1):37-50.
110. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 2002 Jan;16(1):6-21.
111. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature.* 2000 Jan;403(6765):41-5.
112. Song SH, Han SW, Bang YJ. Epigenetic-based therapies in cancer: progress to date. *Drugs.* 2011 Dec;71(18):2391-403.
113. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science.* 2001 Aug;293(5532):1074-80.
114. Margueron R, Trojer P, Reinberg D. The key to development: interpreting the histone code? *Curr Opin Genet Dev.* 2005 Apr;15(2):163-76.
115. Glozak MA, Seto E. Histone deacetylases and cancer. *Oncogene.* 2007 Aug;26(37):5420-32.
116. Chang HH, Chiang CP, Hung HC, Lin CY, Deng YT, Kuo MY. Histone deacetylase 2 expression predicts poorer prognosis in oral cancer patients. *Oral Oncol.* 2009 Jul;45(7):610-4.
117. Halkidou K, Gaughan L, Cook S, Leung HY, Neal DE, Robson CN. Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *Prostate.* 2004 May;59(2):177-89.
118. Huang BH, Laban M, Leung CH, Lee L, Lee CK, Salto-Tellez M, et al. Inhibition of histone deacetylase 2 increases apoptosis and p21Cip1/WAF1 expression, independent of histone deacetylase 1. *Cell Death Differ.* 2005 Apr;12(4):395-404.
119. Song J, Noh JH, Lee JH, Eun JW, Ahn YM, Kim SY, et al. Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer. *APMIS.* 2005 Apr;113(4):264-8.
120. Hrzenjak A, Moinfar F, Kremser ML, Strohmeier B, Staber PB, Zatloukal K, et al. Valproate inhibition of histone deacetylase 2 affects differentiation and decreases proliferation of endometrial stromal sarcoma cells. *Mol Cancer Ther.* 2006 Sep;5(9):2203-10.

121. Zhu P, Martin E, Mengwasser J, Schlag P, Janssen KP, Göttlicher M. Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2004 May;5(5):455-63.
122. Tsuji N, Kobayashi M, Nagashima K, Wakisaka Y, Koizumi K. A new antifungal antibiotic, trichostatin. *J Antibiot (Tokyo)*. 1976 Jan;29(1):1-6.
123. Yoshida M, Nomura S, Beppu T. Effects of trichostatins on differentiation of murine erythroleukemia cells. *Cancer Res*. 1987 Jul;47(14):3688-91.
124. Yoshida M, Beppu T. Reversible arrest of proliferation of rat 3Y1 fibroblasts in both the G1 and G2 phases by trichostatin A. *Exp Cell Res*. 1988 Jul;177(1):122-31.
125. Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem*. 1990 Oct;265(28):17174-9.
126. Vigushin DM, Ali S, Pace PE, Mirsaidi N, Ito K, Adcock I, et al. Trichostatin A is a histone deacetylase inhibitor with potent antitumor activity against breast cancer in vivo. *Clin Cancer Res*. 2001 Apr;7(4):971-6.
127. Suzuki T, Yokozaki H, Kuniyasu H, Hayashi K, Naka K, Ono S, et al. Effect of trichostatin A on cell growth and expression of cell cycle- and apoptosis-related molecules in human gastric and oral carcinoma cell lines. *Int J Cancer*. 2000 Dec;88(6):992-7.
128. Gan YH, Zhang S. PTEN/AKT pathway involved in histone deacetylases inhibitor induced cell growth inhibition and apoptosis of oral squamous cell carcinoma cells. *Oral Oncol*. 2009 Oct;45(10):e150-4.
129. Kim HR, Kim EJ, Yang SH, Jeong ET, Park C, Lee JH, et al. Trichostatin A induces apoptosis in lung cancer cells via simultaneous activation of the death receptor-mediated and mitochondrial pathway? *Exp Mol Med*. 2006 Dec;38(6):616-24.
130. Banerji U, van Doorn L, Papadatos-Pastos D, Kristeleit R, Debnam P, Tall M, et al. A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of CHR-3996, an oral class I selective histone deacetylase inhibitor in refractory solid tumors. *Clin Cancer Res*. 2012 May;18(9):2687-94.
131. Dong M, Ning ZQ, Xing PY, Xu JL, Cao HX, Dou GF, et al. Phase I study of chidamide (CS055/HBI-8000), a new histone deacetylase inhibitor, in patients

- with advanced solid tumors and lymphomas. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2012 Jun;69(6):1413-22.
132. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*. 2010 Jan;31(1):27-36.
 133. Khan O, La Thangue NB. HDAC inhibitors in cancer biology: emerging mechanisms and clinical applications. *Immunol Cell Biol*. 2012 Jan;90(1):85-94.
 134. Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene*. 2007 Aug;26(37):5541-52.
 135. Robey RW, Chakraborty AR, Basseville A, Luchenko V, Bahr J, Zhan Z, et al. Histone deacetylase inhibitors: emerging mechanisms of resistance. *Mol Pharm*. 2011 Dec;8(6):2021-31.
 136. Wang R, Cherukuri P, Luo J. Activation of Stat3 sequence-specific DNA binding and transcription by p300/CREB-binding protein-mediated acetylation. *J Biol Chem*. 2005 Mar;280(12):11528-34.
 137. Yuan ZL, Guan YJ, Chatterjee D, Chin YE. Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. *Science*. 2005 Jan;307(5707):269-73.
 138. Manzo F, Tambaro FP, Mai A, Altucci L. Histone acetyltransferase inhibitors and preclinical studies. *Expert Opin Ther Pat*. 2009 Jun;19(6):761-74.
 139. Choi KC, Park S, Lim BJ, Seong AR, Sung AR, Lee YH, et al. Procyanidin B3, an inhibitor of histone acetyltransferase, enhances the action of antagonist for prostate cancer cells via inhibition of p300-dependent acetylation of androgen receptor. *Biochem J*. 2011 Jan;433(1):235-44.
 140. Bowers EM, Yan G, Mukherjee C, Orry A, Wang L, Holbert MA, et al. Virtual ligand screening of the p300/CBP histone acetyltransferase: identification of a selective small molecule inhibitor. *Chem Biol*. 2010 May;17(5):471-82.
 141. Ott M, Verdin E. HAT trick: p300, small molecule, inhibitor. *Chem Biol*. 2010 May;17(5):417-8.
 142. Dekker FJ, Haisma HJ. Histone acetyl transferases as emerging drug targets. *Drug Discov Today*. 2009 Oct;14(19-20):942-8.

143. Wang GG, Allis CD, Chi P. Chromatin remodeling and cancer, Part I: Covalent histone modifications. *Trends Mol Med*. 2007 Sep;13(9):363-72.
144. Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene*. 2005 Dec;363:15-23.
145. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007 Feb;128(4):693-705.
146. Davis PK, Brackmann RK. Chromatin remodeling and cancer. *Cancer Biol Ther*. 2003 2003 Jan-Feb;2(1):22-9.
147. Ghizzoni M, Haisma HJ, Maarsingh H, Dekker FJ. Histone acetyltransferases are crucial regulators in NF- κ B mediated inflammation. *Drug Discov Today*. 2011 Jun;16(11-12):504-11.
148. Glidden EJ, Gray LG, Vemuru S, Li D, Harris TE, Mayo MW. Multiple site acetylation of Rictor stimulates mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2)-dependent phosphorylation of Akt protein. *J Biol Chem*. 2012 Jan;287(1):581-8.
149. Gayther SA, Batley SJ, Linger L, Bannister A, Thorpe K, Chin SF, et al. Mutations truncating the EP300 acetylase in human cancers. *Nat Genet*. 2000 Mar;24(3):300-3.
150. Ionov Y, Matsui S, Cowell JK. A role for p300/CREB binding protein genes in promoting cancer progression in colon cancer cell lines with microsatellite instability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Feb;101(5):1273-8.
151. Eliseeva ED, Valkov V, Jung M, Jung MO. Characterization of novel inhibitors of histone acetyltransferases. *Mol Cancer Ther*. 2007 Sep;6(9):2391-8.
152. Marcu MG, Jung YJ, Lee S, Chung EJ, Lee MJ, Trepel J, et al. Curcumin is an inhibitor of p300 histone acetyltransferase. *Med Chem*. 2006 Mar;2(2):169-74.
153. Goel A, Aggarwal BB. Curcumin, the golden spice from Indian saffron, is a chemosensitizer and radiosensitizer for tumors and chemoprotector and radioprotector for normal organs. *Nutr Cancer*. 2010;62(7):919-30.

154. Esatbeyoglu T, Huebbe P, Ernst IM, Chin D, Wagner AE, Rimbach G. Curcumin--from molecule to biological function. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2012 May;51(22):5308-32.
155. Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 2003 2003 Jan-Feb;23(1A):363-98.
156. Beevers CS, Chen L, Liu L, Luo Y, Webster NJ, Huang S. Curcumin disrupts the Mammalian target of rapamycin-raptor complex. *Cancer Res.* 2009 Feb;69(3):1000-8.
157. Aggarwal S, Takada Y, Singh S, Myers JN, Aggarwal BB. Inhibition of growth and survival of human head and neck squamous cell carcinoma cells by curcumin via modulation of nuclear factor-kappaB signaling. *Int J Cancer.* 2004 Sep;111(5):679-92.
158. Bandyopadhyay D, Okan NA, Bales E, Nascimento L, Cole PA, Medrano EE. Down-regulation of p300/CBP histone acetyltransferase activates a senescence checkpoint in human melanocytes. *Cancer Res.* 2002 Nov;62(21):6231-9.
159. Ait-Si-Ali S, Polesskaya A, Filleur S, Ferreira R, Duquet A, Robin P, et al. CBP/p300 histone acetyl-transferase activity is important for the G1/S transition. *Oncogene.* 2000 May;19(20):2430-7.
160. Iyer NG, Xian J, Chin SF, Bannister AJ, Daigo Y, Aparicio S, et al. p300 is required for orderly G1/S transition in human cancer cells. *Oncogene.* 2007 Jan;26(1):21-9.
161. Bourhis J. New approaches to enhance chemotherapy in SCCHN. *Ann Oncol.* 2005;16 Suppl 6:vi20-vi4.
162. Kartalou M, Essigmann JM. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat Res.* 2001 Jul;478(1-2):23-43.
163. Greene MH. Is cisplatin a human carcinogen? *J Natl Cancer Inst.* 1992 Mar;84(5):306-12.
164. Campos MS, Neiva KG, Meyers KA, Krishnamurthy S, Nör JE. Endothelial derived factors inhibit anoikis of head and neck cancer stem cells. *Oral Oncol.* 2012 Jan;48(1):26-32.

165. Hu E, Dul E, Sung CM, Chen Z, Kirkpatrick R, Zhang GF, et al. Identification of novel isoform-selective inhibitors within class I histone deacetylases. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 Nov;307(2):720-8.
166. Wu J, Hu CP, Gu QH, Li YP, Song M. Trichostatin A sensitizes cisplatin-resistant A549 cells to apoptosis by up-regulating death-associated protein kinase. *Acta Pharmacol Sin*. 2010 Jan;31(1):93-101.
167. Anh TD, Ahn MY, Kim SA, Yoon JH, Ahn SG. The histone deacetylase inhibitor, Trichostatin A, induces G2/M phase arrest and apoptosis in YD-10B oral squamous carcinoma cells. *Oncol Rep*. 2012 Feb;27(2):455-60.
168. Park H, Lee YJ, Kim TH, Lee J, Yoon S, Choi WS, et al. Effects of trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, on the regulation of apoptosis in H-ras-transformed breast epithelial cells. *Int J Mol Med*. 2008 Nov;22(5):605-11.
169. Schuler PJ, Trellakis S, Greve J, Bas M, Bergmann C, Bölke E, et al. In vitro chemosensitivity of head and neck cancer cell lines. *Eur J Med Res*. 2010 Aug;15(8):337-44.
170. Takaoka S, Iwase M, Uchida M, Yoshioka S, Kondo G, Watanabe H, et al. Effect of combining epidermal growth factor receptor inhibitors and cisplatin on proliferation and apoptosis of oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Oncol*. 2007 Jun;30(6):1469-76.
171. Sun L, Carpenter G. Epidermal growth factor activation of NF-kappaB is mediated through IkappaBalpha degradation and intracellular free calcium. *Oncogene*. 1998 Apr;16(16):2095-102.
172. Amornphimoltham P, Patel V, Sodhi A, Nikitakis NG, Sauk JJ, Sausville EA, et al. Mammalian target of rapamycin, a molecular target in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res*. 2005 Nov;65(21):9953-61.
173. Liu J, Kuo WL, Seiwert TY, Lingen M, Ciaccio MF, Jones RB, et al. Effect of complementary pathway blockade on efficacy of combination enzastaurin and rapamycin. *Head Neck*. 2011 Dec;33(12):1774-82.
174. Bmglabtech.com/application-notes/fluorescence-intensity/fluoroblock-fluostar-144.cfm [homepage on the internet]. Representação esquemática da câmara bipartida composta por inserto exibindo membrana de policarbonato com poros de 8 µm de diâmetro recoberta por fibronectina [citado 29 set. 2012]. Adaptado de BMG LABTECH - Disponível em:.

<http://www.bmglabtech.com/application-notes/fluorescence-intensity/fluoroblock-fluostar-144.cfm>.

175. Charafe-Jauffret E, Monville F, Ginestier C, Dontu G, Birnbaum D, Wicha MS. Cancer stem cells in breast: current opinion and future challenges. *Pathobiology*. 2008;75(2):75-84.
176. Storms RW, Trujillo AP, Springer JB, Shah L, Colvin OM, Ludeman SM, et al. Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Aug;96(16):9118-23.
177. Lioznov MV, Freiburger P, Kröger N, Zander AR, Fehse B. Aldehyde dehydrogenase activity as a marker for the quality of hematopoietic stem cell transplants. *Bone Marrow Transplant*. 2005 May;35(9):909-14.
178. Cai J, Cheng A, Luo Y, Lu C, Mattson MP, Rao MS, et al. Membrane properties of rat embryonic multipotent neural stem cells. *J Neurochem*. 2004 Jan;88(1):212-26.
179. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells*. 2006 Feb;24(2):376-85.
180. Eirew P, Kannan N, Knapp DJ, Vaillant F, Emerman JT, Lindeman GJ, et al. Aldehyde dehydrogenase activity is a biomarker of primitive normal human mammary luminal cells. *Stem Cells*. 2012 Feb;30(2):344-8.
181. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Tarpin C, Diebel M, Esterni B, et al. Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2010 Jan;16(1):45-55.
182. Zhang Z, Filho MS, Nör JE. The biology of head and neck cancer stem cells. *Oral Oncol*. 2012 Jan;48(1):1-9.
183. Clay MR, Tabor M, Owen JH, Carey TE, Bradford CR, Wolf GT, et al. Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase. *Head Neck*. 2010 Sep;32(9):1195-201.

184. Deng S, Yang X, Lassus H, Liang S, Kaur S, Ye Q, et al. Distinct expression levels and patterns of stem cell marker, aldehyde dehydrogenase isoform 1 (ALDH1), in human epithelial cancers. *PLoS One*. 2010;5(4):e10277.
185. van den Hoogen C, van der Horst G, Cheung H, Buijs JT, Lippitt JM, Guzmán-Ramírez N, et al. High aldehyde dehydrogenase activity identifies tumor-initiating and metastasis-initiating cells in human prostate cancer. *Cancer Res*. 2010 Jun;70(12):5163-73.
186. Todaro M, Iovino F, Eterno V, Cammareri P, Gambarà G, Espina V, et al. Tumorigenic and metastatic activity of human thyroid cancer stem cells. *Cancer Res*. 2010 Nov;70(21):8874-85.
187. Krishnamurthy S, Dong Z, Vodopyanov D, Imai A, Helman JI, Prince ME, et al. Endothelial cell-initiated signaling promotes the survival and self-renewal of cancer stem cells. *Cancer Res*. 2010 Dec;70(23):9969-78.
188. Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, et al. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev*. 2003 May;17(10):1253-70.
189. Pastrana E, Silva-Vargas V, Doetsch F. Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell*. 2011 May;8(5):486-98.
190. Oliveira VC, Carrara RC, Simoes DL, Saggiaro FP, Carlotti CG, Covas DT, et al. Sudan Black B treatment reduces autofluorescence and improves resolution of in situ hybridization specific fluorescent signals of brain sections. *Histol Histopathol*. 2010 Aug;25(8):1017-24.
191. Squarize CH, Castilho RM, Sriuranpong V, Pinto DS, Gutkind JS. Molecular cross-talk between the NF-kappaB and STAT3 signaling pathways in head and neck squamous cell carcinoma. *Neoplasia*. 2006 Sep;8(9):733-46.
192. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*. 2008 Feb;132(3):344-62.
193. Thiagalingam S, Cheng KH, Lee HJ, Mineva N, Thiagalingam A, Ponte JF. Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 Mar;983:84-100.

194. Jayani RS, Ramanujam PL, Galande S. Studying histone modifications and their genomic functions by employing chromatin immunoprecipitation and immunoblotting. *Methods Cell Biol.* 2010;98:35-56.
195. Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci.* 2011 Sep;68(18):3033-46.
196. Li W, Li Y, Tan Y, Ma K, Cui J. Bmi-1 is critical for the proliferation and invasiveness of gastric carcinoma cells. *J Gastroenterol Hepatol.* 2010 Mar;25(3):568-75.
197. Kim JH, Yoon SY, Jeong SH, Kim SY, Moon SK, Joo JH, et al. Overexpression of Bmi-1 oncoprotein correlates with axillary lymph node metastases in invasive ductal breast cancer. *Breast.* 2004 Oct;13(5):383-8.
198. Borre M, Bentzen SM, Nerstrøm B, Overgaard J. Tumor cell proliferation and survival in patients with prostate cancer followed expectantly. *J Urol.* 1998 May;159(5):1609-14.
199. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000 Mar;182(3):311-22.
200. Dufner A, Thomas G. Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation. *Exp Cell Res.* 1999 Nov;253(1):100-9.
201. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* 2004 Aug;18(16):1926-45.
202. Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 May;10(5):307-18.
203. Chen C, Zhao M, Yin N, He B, Wang B, Yuan Y, et al. Abnormal histone acetylation and methylation levels in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer Invest.* 2011 Oct;29(8):548-56.
204. Song JS, Kim YS, Kim DK, Park SI, Jang SJ. Global histone modification pattern associated with recurrence and disease-free survival in non-small cell lung cancer patients. *Pathol Int.* 2012 Mar;62(3):182-90.
205. Barlési F, Giaccone G, Gallegos-Ruiz MI, Loundou A, Span SW, Lefesvre P, et al. Global histone modifications predict prognosis of resected non small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2007 Oct;25(28):4358-64.

206. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*. 2007 Nov;1(5):555-67.
207. Chervona Y, Costa M. Histone modifications and cancer: biomarkers of prognosis? *Am J Cancer Res*. 2012;2(5):589-97.
208. Elsheikh SE, Green AR, Rakha EA, Powe DG, Ahmed RA, Collins HM, et al. Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors, and patient outcome. *Cancer Res*. 2009 May;69(9):3802-9.
209. Zhen L, Gui-lan L, Ping Y, Jin H, Ya-li W. The expression of H3K9Ac, H3K14Ac, and H4K20TriMe in epithelial ovarian tumors and the clinical significance. *Int J Gynecol Cancer*. 2010 Jan;20(1):82-6.
210. DesRochers TM, Shamis Y, Alt-Holland A, Kudo Y, Takata T, Wang G, et al. The 3D tissue microenvironment modulates DNA methylation and E-cadherin expression in squamous cell carcinoma. *Epigenetics*. 2012 Jan;7(1):34-46.
211. Kaneko T, Zhang Z, Mantellini MG, Karl E, Zeitlin B, Verhaegen M, et al. Bcl-2 orchestrates a cross-talk between endothelial and tumor cells that promotes tumor growth. *Cancer Res*. 2007 Oct;67(20):9685-93.
212. Neiva KG, Zhang Z, Miyazawa M, Warner KA, Karl E, Nör JE. Cross talk initiated by endothelial cells enhances migration and inhibits anoikis of squamous cell carcinoma cells through STAT3/Akt/ERK signaling. *Neoplasia*. 2009 Jun;11(6):583-93.
213. Warner KA, Miyazawa M, Cordeiro MM, Love WJ, Pinsky MS, Neiva KG, et al. Endothelial cells enhance tumor cell invasion through a crosstalk mediated by CXC chemokine signaling. *Neoplasia*. 2008 Feb;10(2):131-9.
214. Kaminski A, Hahne JC, Haddouti e-M, Florin A, Wellmann A, Wernert N. Tumour-stroma interactions between metastatic prostate cancer cells and fibroblasts. *Int J Mol Med*. 2006 Nov;18(5):941-50.
215. Bapat SA, Jin V, Berry N, Balch C, Sharma N, Kurrey N, et al. Multivalent epigenetic marks confer microenvironment-responsive epigenetic plasticity to ovarian cancer cells. *Epigenetics*. 2010 Nov-Dec;5(8):716-29.

216. Fantin VR, Richon VM. Mechanisms of resistance to histone deacetylase inhibitors and their therapeutic implications. *Clin Cancer Res*. 2007 Dec;13(24):7237-42.
217. Bertino EM, Otterson GA. Romidepsin: a novel histone deacetylase inhibitor for cancer. *Expert Opin Investig Drugs*. 2011 Aug;20(8):1151-8.
218. Kong D, Ahmad A, Bao B, Li Y, Banerjee S, Sarkar FH. Histone Deacetylase Inhibitors Induce Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Prostate Cancer Cells. *PLoS One*. 2012;7(9):e45045. PubMed PMID: 23024790.
219. Barneda-Zahonero B, Parra M. Histone deacetylases and cancer. *Mol Oncol*. 2012 Aug.
220. Sharma SV, Lee DY, Li B, Quinlan MP, Takahashi F, Maheswaran S, et al. A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell*. 2010 Apr;141(1):69-80.
221. Ellis L, Atadja PW, Johnstone RW. Epigenetics in cancer: targeting chromatin modifications. *Mol Cancer Ther*. 2009 Jun;8(6):1409-20.
222. Gerlitz G, Bustin M. Efficient cell migration requires global chromatin condensation. *J Cell Sci*. 2010 Jul;123(Pt 13):2207-17.
223. Gerlitz G, Livnat I, Ziv C, Yarden O, Bustin M, Reiner O. Migration cues induce chromatin alterations. *Traffic*. 2007 Nov;8(11):1521-9.
224. Kang FW, Que L, Wu M, Wang ZL, Sun J. Effects of trichostatin A on HIF-1 α and VEGF expression in human tongue squamous cell carcinoma cells in vitro. *Oncol Rep*. 2012 Jul;28(1):193-9.
225. Pulukuri SM, Gorantla B, Rao JS. Inhibition of histone deacetylase activity promotes invasion of human cancer cells through activation of urokinase plasminogen activator. *J Biol Chem*. 2007 Dec;282(49):35594-603.
226. Kong D, Banerjee S, Ahmad A, Li Y, Wang Z, Sethi S, et al. Epithelial to mesenchymal transition is mechanistically linked with stem cell signatures in prostate cancer cells. *PLoS One*. 2010;5(8):e12445.
227. Kong D, Li Y, Wang Z, Sarkar FH. Cancer Stem Cells and Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT)-Phenotypic Cells: Are They Cousins or Twins? *Cancers (Basel)*. 2011 Feb;3(1):716-29.

- 228. Honig A, Weidler C, Häusler S, Krockenberger M, Buchholz S, Köster F, et al. Overexpression of polycomb protein BMI-1 in human specimens of breast, ovarian, endometrial and cervical cancer. *Anticancer Res.* 2010 May;30(5):1559-64.
- 229. Song LB, Li J, Liao WT, Feng Y, Yu CP, Hu LJ, et al. The polycomb group protein Bmi-1 represses the tumor suppressor PTEN and induces epithelial-mesenchymal transition in human nasopharyngeal epithelial cells. *J Clin Invest.* 2009 Dec;119(12):3626-36.
- 230. Guo BH, Feng Y, Zhang R, Xu LH, Li MZ, Kung HF, et al. Bmi-1 promotes invasion and metastasis, and its elevated expression is correlated with an advanced stage of breast cancer. *Mol Cancer.* 2011;10(1):10.
- 231. Li Y, Kong D, Wang Z, Sarkar FH. Regulation of microRNAs by natural agents: an emerging field in chemoprevention and chemotherapy research. *Pharm Res.* 2010 Jun;27(6):1027-41.
- 232. Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell.* 2007 Jul;12(1):9-22.
- 233. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell.* 2012 Apr;149(2):274-93.
- 234. Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol.* 2005 Oct;5(10):749-59.
- 235. Li X, Stark GR. NFkappaB-dependent signaling pathways. *Exp Hematol.* 2002 Apr;30(4):285-96.
- 236. Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature.* 2006 May;441(7092):431-6.
- 237. Kumar A, Takada Y, Boriek AM, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *J Mol Med (Berl).* 2004 Jul;82(7):434-48.
- 238. Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X. NF-kB in development and progression of human cancer. *Virchows Arch.* 2005 May;446(5):475-82.
- 239. Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell.* 2004 Sep;6(3):203-8.

240. Ravi R, Bedi A. NF-kappaB in cancer--a friend turned foe. *Drug Resist Updat*. 2004 Feb;7(1):53-67.
241. Chang F, Lee JT, Navolanic PM, Steelman LS, Shelton JG, Blalock WL, et al. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia*. 2003 Mar;17(3):590-603.
242. Ondrey FG, Dong G, Sunwoo J, Chen Z, Wolf JS, Crowl-Bancroft CV, et al. Constitutive activation of transcription factors NF-(kappa)B, AP-1, and NF-IL6 in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines that express pro-inflammatory and pro-angiogenic cytokines. *Mol Carcinog*. 1999 Oct;26(2):119-29.
243. Nakanishi C, Toi M. Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nat Rev Cancer*. 2005 Apr;5(4):297-309.
244. Bentires-Alj M, Barbu V, Fillet M, Chariot A, Relic B, Jacobs N, et al. NF-kappaB transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells. *Oncogene*. 2003 Jan;22(1):90-7.
245. Mishra A, Bharti AC, Varghese P, Saluja D, Das BC. Differential expression and activation of NF-kappaB family proteins during oral carcinogenesis: Role of high risk human papillomavirus infection. *Int J Cancer*. 2006 Dec;119(12):2840-50.
246. Sawhney M, Rohatgi N, Kaur J, Shishodia S, Sethi G, Gupta SD, et al. Expression of NF-kappaB parallels COX-2 expression in oral precancer and cancer: association with smokeless tobacco. *Int J Cancer*. 2007 Jun;120(12):2545-56.
247. Bindhu OS, Ramadas K, Sebastian P, Pillai MR. High expression levels of nuclear factor kappa B and gelatinases in the tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2006 Oct;28(10):916-25.
248. Kakarala M, Brenner DE, Korkaya H, Cheng C, Tazi K, Ginestier C, et al. Targeting breast stem cells with the cancer preventive compounds curcumin and piperine. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Aug;122(3):777-85.
249. Lin L, Liu Y, Li H, Li PK, Fuchs J, Shibata H, et al. Targeting colon cancer stem cells using a new curcumin analogue, GO-Y030. *Br J Cancer*. 2011 Jul;105(2):212-20.

250. Subramaniam D, Ponnurangam S, Ramamoorthy P, Standing D, Battafarano RJ, Anant S, et al. Curcumin induces cell death in esophageal cancer cells through modulating Notch signaling. *PLoS One*. 2012;7(2):e30590.
251. Tsang RK, Tang WW, Gao W, Ho WK, Chan JY, Wei WI, et al. Curcumin inhibits tongue carcinoma cells migration and invasion through downregulation of matrix metalloproteinase 10. *Cancer Invest*. 2012 Aug;30(7):503-12.
252. Mabuchi S, Ohmichi M, Nishio Y, Hayasaka T, Kimura A, Ohta T, et al. Inhibition of NF-kappaB increases the efficacy of cisplatin in in vitro and in vivo ovarian cancer models. *J Biol Chem*. 2004 May;279(22):23477-85.
253. Dutton A, Woodman CB, Chukwuma MB, Last JI, Wei W, Vockerodt M, et al. Bmi-1 is induced by the Epstein-Barr virus oncogene LMP1 and regulates the expression of viral target genes in Hodgkin lymphoma cells. *Blood*. 2007 Mar;109(6):2597-603.
254. Prasad S, Ravindran J, Aggarwal BB. NF-kappaB and cancer: how intimate is this relationship. *Mol Cell Biochem*. 2010 Mar;336(1-2):25-37.