DOUGLAS MAGNO GUIMARÃES

**Uso de Inibidores de Histona Deacetilase como Estratégia Terapêutica para
Sensibilizar Células-Tronco Tumerais a Quimioterapia – Uma Nova Visão
Terapêutica sobre Carcinomas Mucoepidermóides Bucais**

São Paulo
2015

DOUGLAS MAGNO GUIMARÃES

**Uso de Inibidores de Histona Deacetilase como Estratégia Terapêutica para
Sensibilizar Células-Tronco Tumerais a Quimioterapia – Uma Nova Visão
Terapêutica sobre Carcinomas Mucoepidermoide Bucais**

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de odontologia
da Universidade de São Paulo para obter o
título de doutor pelo programa de pós
graduação Odontologia.

Área de concentração: Patologia e
estomatologia básica e aplicada

Orientador: Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes

Co-orientador: Prof. Dr. Rogerio M. Castilho

São Paulo
2015

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

Guimarães, Douglas Magno.

Uso de inibidores de Histona Deacetilase como estratégia terapêutica para sensibilizar células-tronco tumorais a quimioterapia: uma nova visão terapêutica sobre carcinomas mucoepidermoide bucais / Douglas Magno Guimarães ; orientador Fábio Daumas Nunes; coorientador Rogério M. Castilho. -- São Paulo, 2015.

71 p. : fig., graf. ; 30 cm.

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

Versão corrigida.

1. Carcinoma de células escamosas. 2. Células tronco. 3. Quimioterapia. I. Nunes, Fábio Daumas. II. Castilho, Rogério M. III. Título.

Guimarães DM. Uso de Inibidores de Histona Deacetilase como estratégia terapêutica para Sensibilizar Células-Tronco Tumorais a Quimioterapia – Uma nova visão terapêutica sobre Carcinomas Mucoepidermóides Bucais. Tese apresentada à Faculdade de odontologia da Universidade de São Paulo para obter o título de doutor

Aprovado em: / / 2015

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Cleide e Gilberto, que nunca mediram esforços para que eu pudesse alcançar meus objetivos na vida e sempre colocaram meus estudos em primeiro plano. Sem vocês, nada seria possível.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A minha família, irmãos, avós, e avôs, tios, tias, primos e primas, por todo apoio e carinho dado nessa longa jornada. Em especial para Gustavo Rolim (in memorian), Eliete Guimarães (in memorian) e Antônio Guimarães (in memorian), entes queridos que foram vítimas de câncer, e que me motivaram a busca por um melhor conhecimento dessa doença.

Professor Dr. Fabio Daumas Nunes, além de orientador se tornou um grande amigo, e exemplo a ser seguido por mim. Obrigado pela oportunidade oferecida e por todos os ensinamentos.

Professor Décio dos Santos Pinto Jr, o qual tenho profundo respeito e admiração.

Professor Dr. Rogerio Castilho e Profa. Dra. Cristiane Squarize, por terem me recebido muito bem na Universidade de Michigan, pelos ensinamentos e oportunidades que fizeram esse ano no exterior inesquecível.

Ao Prof. Dr. Helder Pontes, profissional que me espelho muito, responsável direto por eu ter entrado na vida de pesquisa e docência. Sempre me ajudando em tudo que precisei, muito obrigado!

Aos Professores da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo: Profa. Dra. Suzana C.O.M. de Sousa, Profa. Dra. Marília Trierveiler Martins, Profa. Dra. Karem Lopez Ortega, Profa. Dra. Marina Helena C. G. Magalhães, Profa. Dra. Andrea Mantesso.

Aos funcionários do departamento de Patologia Bucal: Zilda Alves, Néia, Edna, Juvani Lago, Elisa e Adriana Paris.

A professora Daniella Moraes Antunes, amiga de todas as horas, por toda ajuda e companheirismo dado durante esse doutorado. Tantas histórias para contar após esse 3 anos e meio juntos. Muito obrigado!

Aos meus grandes amigos que obtive em Michigan, Luciana Almeida, Manoela Martins, Marco Antônio Martins e John Lee, com certeza a minha experiência em Michigan não seria a mesma sem a presença de vocês, muito obrigado por todo apoio e amizade!

A minha grande amiga Ana Maria Hoyos, pessoa que tenho grande admiração por sua determinação e força de vontade.

Aos três grandes irmãos que fiz em São Paulo, Tathiane Harumi, Marco Tullio Silva e Kaue Pavanello. Pessoas muito especiais que compartilhei grandes momentos de alegria, amizades que indubitavelmente levarei por muito anos.

A Tainan, Gefferson e Sandra Quaresma, pessoas que foram minha família por um longo período da minha vida, me ajudando e dando o suporte. Em especial Tainan, que esteve ao meu lado por mais da metade do doutorado, me dando apoio e me orientando, por mais que não estejamos juntos como antigamente, tenho um grande carinho e admiração por você.

To Katherine Miller-Martinez, a great friend that I found in Michigan, was present in the hard and good times, always patient and careful. Thank you very much for the all support offered.

Aos meus Colegas de Pós-graduação: Juliana Seo, Carol Mussi, Priscila Tobouti, Fernanda Pigatti, Nelise Lascane, Carina Esteves, Gabriela Nagata, Karin Fernandes, Frederico Buhatem, Maria Fernanda, Lilia Rocha, Nathalia Andrade, Gabriel Kato, Lourdes Chiok, Flavia Prado, Cibeli Pelissari e Bruno Sedassari.

À CAPES e laboratory of epithelial biology (University of Michigan) pelo apoio financeiro.

RESUMO

Guimarães DM. Uso de Inibidores de Histona Deacetilase como estratégia terapêutica para Sensibilizar Células-Tronco Tumoraes a Quimioterapia – Uma nova visão terapêutica sobre Carcinomas Mucoepidermóides Bucais. Versão Original [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015.

Carcinoma mucoepidermóide (CME) é o tumor maligno de glândulas salivares mais comum, representando cerca de 30% dos tumores malignos. O tratamento do CME é a ressecção cirúrgica com eventual radioterapia. Assim, o tratamento do CME pode levar a varias complicações estéticas e funcionais. A quimioterapia tem sido utilizadas apenas em casos recorrentes ou com metástases à distancia. Vários relatos na literatura tem mostrado que o tratamento com drogas isoladas ou combinadas possuem uma resposta insatisfatória e de curta duração em grande parte devido a aquisição de resistência a quimioterapia. Recentemente, a quimiorresistência tem sido relacionada com a presença de Células-Tronco Tumoraes (CTT). Essa resistência tem sido associada ao fato de que as essa células são quiescentes e possuem altos níveis de proteínas associadas ao reparo do DNA e baixos níveis das proteínas que levam a apoptose. Recentemente mostrou-se que a resistência a quimioterapia tem sido relacionada com modificações de histonas, uma vez que as células quimiorresistentes possuem núcleo pequeno e baixos níveis de acetilação de histonas, adicionalmente as células sensíveis são relacionadas com núcleo aumentado. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos do tratamento com IHDAC e cisplatina sobre a população de CTT de CME. Inicialmente analisamos os níveis de acetilação do histona através da expressão imuno-histoquímica de acetil histona H3 em casos de CME, sendo encontrado altos níveis de acetilação de histona principalmente nas células epiteliais do ducto excretor. Adicionalmente, demonstramos que o tratamento com SAHA (inibidor de histona deacetilase) impacta diretamente a população de CTT, de uma maneira mais eficiente do que a cisplatina ou da combinação de SAHA e cisplatina. É interessante que o tratamento com cisplatina resultou no acúmulo de uma subpopulação especifica de CTT em um processo que inclui o aumento na expressão da via de sinalização do mTOR. Estes

achados sugerem que o uso de IHDAC constitui uma forma eficiente de tratamento de CME através da depleção da população de CTT , porém mais estudos são necessários para validar estes achados para uso clínico.

Palavras-chave: Carcinoma Mucoepidermóide. Células-tronco tumorais. Acetilação de histonas. Cisplatina. SAHA.

ABSTRACT

Guimarães DM. Sensitizing Mucoepidermoid Carcinomas to chemotherapy by disrupting the population of Cancer Stem Cells using HDAC inhibitors. Original version [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015.

Mucoepidermoid carcinoma (MEC) is the most common malignant salivary tumor compromising about 30% of all salivary malignances. Managing MEC patients remain challenging especially due to the heterogeneous response of tumor cells to available therapy. For this reason clinical outcome remains unpredictable. Current treatment of MEC encompasses surgical resection with eventual adjuvant radiotherapy, which frequently leads to functional and aesthetic complications. The use of chemotherapy is often reserved for recurrent and metastatic tumors. Administration of single-agent or combination therapy has showed activity, however overall response rates are unsatisfactory and of short duration. Emerging evidences suggest that the modest response of tumor cells to therapy resulting in high recurrence rates and poor survival, are associated with the presence of cancer stem cells (CSC). Quiescence of CSC is achieved by the reduced levels of transcription in a process that requires tight folding of DNA driven by core histone proteins. Changes in DNA folding are responsible for different cellular phenotypes mediated by a cell type-specific chromatin organization. Of interest, we also found that acetylation of HNSCC tumor histones driven by histone deacetylase (HDAC) inhibitors abrogate tumor resistance to chemotherapy. We investigate the effects of HDACi and cisplatin in the population of CSCs of MEC. Initially, we found that MEC tumors are composed by a heterogeneous population of squamous-like and mucous-like cells presenting distinct acetylation levels of histone 3 (Lys9). Tumor cells where treated with cisplatin and SAHA, a Food and Drug Administration (FDA) approved histone deacetylase inhibitor. Surprisingly, we found that administration of SAHA resulted in complete depletion of MEC CSCs. In facts, SAHA alone surpassed the inhibitory therapeutic effects of cisplatin and the combined therapy using SAHA and cisplatin over the population of CSCs. We also found that administration of cisplatin to MEC tumor cells result in unexpected accumulation of a sub population of CSC (paraclones), suggesting a correlation between the administration of intercalating

agents such as cisplatin to the development of resistance of MEC cells to chemotherapy.

Keywords: Mucoepidermoid Carcinoma. Cancer stem cells. Histone acetylation. Cisplatin. SAHA.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 5.1 - Expressão imuno-histoquímica para acetil histona H3 (lisina 9) em glândulas salivares (A), mostrando ausência de marcação nas células acinares (A#1) e células do ducto intercalar (A#2), e positividade nas células epiteliais do ducto excretor (A#3). Expressão variada nas células neoplásicas do CME (B#1), as células epidermoides (B#2) são mais acetiladas que as células mucosas (B#3).. Análise estatística da expressão de acetil histona H3 (lisina 9) entre células epidermoides e mucosas do CME mostrando, diferença estatística, com $p > 0.001$38
- Figura 5.2- Imagem em H&E dos tumores em xenoenxertos mostrando que as linhagens de CME mantem as mesmas características de tumores humanos, com a população de células epidermoides e células claras no aumento de 5 e 20X. (A). Imunofluorencência para vimentina e Pan de citoqueratina nas linhagens de CME, mostrando que as linhagens mantem perfil epitelial quando cultivadas (B). Western Blot para acetil histona H3 (lisina 9) e GAPDH nas linhagens de CME (C) mostrando diferentes níveis de acetilação entre as linhagens de CME.....40
- Figura 5.3 - Avaliação do número de esferas nas linhagens de CME (A) mostrando que todas as linhagens foram capazes de formar esferas. Representação do tipo de esferas formadas pelas linhagens de CME (B). Avaliação das qualidades das esferas formadas pelas linhagens de CME (C) mostrando que as meroclones é a forma mais comum nas esferas seguido das holoclones e paraclones. Representação da atividade enzimática de ALDH1 em linhagens de CME (D), mostrando que as linhagens utilizadas possuem células com atividades positiva para essa enzima, os pontos pretos são células consideradas negativas para a atividade enzimática e os pontos vermelhos células positivas, e abaixo a quantificação das células positivas em cada linhagem.....42
- Figura 5.4 – Gráficos mostrando o IC50 da cisplatina nas linhagens de CME (A), a concentração capaz de inibir 50% das células foi de 8.47µg/ml para HMC3A, 9.17µg/ml para HMC3B e 10.7µg/ml para HMC5. Representação da atividade enzimática de ALDH1 após o tratamento com cisplatina nas linhagens de CME (B), a direita inferior, gráfico mostrando que o tratamento com a cisplatina foi capaz de reduzir o numero de células positivas. Representação do efeito do tratamento com cisplatina nos diferentes tipos de esferas nas linhagens de CME (C), mostrando que o tratamento com cisplatina reduziu as holoclones, meroclones e paraclones nas linhagens, exceto da HMC3A e 3B, na qual houve um aumento das paraclones.....44

Figura 5.5 - Representação do IC50 de SAHA nas células aderidas de CME (A) mostrando que a concentração para inibir 50% das células nas linhagens HMC3A, 3B e 5, foram respectivamente 1.15µM, 0.3µM e 0.4µM, respectivamente. Representação do IC50 nas células de CME cultivadas em baixa adesão (B), onde a concentração para inibir 50% das esferas foram 0.18µM, 0.09µM e 0.11µM nas linhagens HMC3A, 3B e 5 respectivamente. Representação da atividade enzimática de ALDH1 nas linhagens de CME após o tratamento de SAHA (C), mostrando que o tratamento foi capaz de reduzir significativamente a população positiva. Efeito do tratamento com SAHA nos diferentes tipos de esferas de CME (D), mostrando que o tratamento com SAHA reduziu todos os tipos de clones.....46

Figura 5.6 - Esquema representativo do duplo tratamento de SAHA e cisplatina (A), realizando inicialmente o tratamento com SAHA por 24 horas, seguido de 24 horas de cisplatina. Representação do IC50 de cisplatina em células previamente tratadas com SAHA (B), mostrando que o tratamento com SAHA sensibiliza as células ao tratamento com cisplatina. Representação da atividade enzimática de ALDH1 após o duplo tratamento de SAHA e cisplatina (C), mostrando que o duplo tratamento reduz a população positiva.48

Figura 5.7- Imunofluorescência para BMI-1 e pS6 nas linhagens de CME com e sem o tratamento de cisplatina, mostrando que nas linhagens o tratamento com cisplatina aumenta a expressão de pS6, principalmente nas linhagens HMC3A e 3B.....50

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

CME	Carcinoma mucoepidermoide
CTT	Células-tronco tumorais
IHDAC	Inibidores de acetilação de histona
OMS	Organização Mundial da Saúde
TEM	Transição epitélio-mesênquima
HDAC	Histonas de acetilase
HAT	Histona Acetil transferase (HAT)
FDA	do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
SAHA	Ácido hidroxâmico suberoilânido
TMA	Tissue micro array
ALDH	Aldeído desidrogenase
EGFR	Do inglês <i>epidermal growth factor receptor</i>

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	12
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Glândulas salivares	16
2.2 Tumores de glândulas salivares	17
2.3 Carcinoma Mucoepidermoide	19
2.4 Células-tronco tumorais	22
2.5 Inibidores de deacetilação de histonas	25
2.6 SAHA.....	27
2.7 Cisplatina.....	28
3 PROPOSIÇÃO	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 Linhagens celulares e reagentes.....	32
4.2 Xenoenxerto em camundongos imunodeficientes	32
4.3 Tissue microarray	33
4.4 Imuno-histoquímica	33
4.5 Ensaio de viabilidade celular	34
4.6 Ensaio de formação de esferas	34
4.7 Imunofluorescência	35
4.8 Immunoblotting.....	35
4.9 Citometria de fluxo.....	36
5 RESULTADOS.....	37
5.1 Acetilação de histona H3 em glândulas salivares e CME	37
5.2 Linhagens de CME mantêm as características de tumores humanos quando transplantadas em camundongos imunodeficientes.....	39
5.3 linhagens celulares de CME possuem CTT	41
5.4 Cisplatina induz o acúmulo de subpopulação de CTT	43
5.5 SAHA é mais efetivo na redução de CTT que a cisplatina	45
5.6 O tratamento prévio com SAHA sensibiliza as linhagens de CME à cisplatina e reduz a população de CTT	47
5.7 Resistência à cisplatina pode estar relacionada com pS6 em CTT.....	49
6 DISCUSSÃO	51
7 CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

Lesões malignas de glândulas salivares são relativamente raras, com aproximadamente três mil e trezentos novos casos diagnosticados anualmente no Estados Unidos, representando cerca de 3-6% das neoplasias de cabeça e pescoço. Esse grupo de lesões é histologicamente heterogêneo com variações morfológicas, essa heterogeneidade é devida aos vários tipos celulares da glândula normal que são envolvidos na indução do tumor (1-5).

Carcinoma Mucoepidermoide (CME) é o tumor maligno de glândulas salivares mais comum representando cerca de 30% dos tumores malignos. O CME ocorre principalmente em adultos entre a 3º e 4º década de vida sem preferência por gênero. O diagnóstico é baseado na suas características histopatológicas como a presença de células epidermoides e células mucosas com distribuição variada. O tratamento do CME é a ressecção cirúrgica com eventual radioterapia. Assim, dependendo do tamanho e localização, o tratamento do CME pode levar varias complicações estéticas e funcionais (1, 6-9).

Quimioterapia tem sido utilizada apenas em casos recorrentes ou com metástases à distância. Vários relatos na literatura têm mostrado que o tratamento com drogas isoladas ou combinadas possuem uma resposta insatisfatória e de curta duração (10-12). Recentemente, a quimiorresistência tem sido relacionada com a presença de células-tronco tumorais (CTT) em vários tipos de tumores como próstata, mama, ovário, cabeça e pescoço (13, 14). As CTT são quiescentes e relacionados com altos níveis de proteínas que inibem a apoptose e regulam o reporo do DNA, essas características são importantes no processo de quimiorresistência (15, 16). Adicionalmente, alguns estudos têm demonstrado a presença dessas células em CME e carcinoma adenoide cístico, porém o papel dessas células na quimiorresistência não está muito claro(17) .

Estudos anteriores têm mostrado de que a resistência a quimioterapia tem sido relacionada com modificações de histonas, uma vez que as células quimiorresistentes possuem núcleo pequeno e baixos níveis de acetilação de histonas, bem como as células sensíveis são relacionadas com núcleo aumentado (18, 19). A acetilação da cauda N-terminal das histonas aumenta a afinidade pela dupla fita de DNA, aumentando o grau de compactação da cromatina. A adição de

radical acetil é regulado pela histona deacetilase (HDAC). Assim, tratamento prévio com inibidores de acetilação de histona (IHDAC) ajuda a abrir a cromatina, tornando o núcleo maior, reduzindo a resistência ao quimioterápico (18).

O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos do tratamento com IHDAC e cisplatina no tratamento de CME. Inicialmente foi analisado os níveis de acetilação do histona através da expressão imuno-histoquímica de acetil histona H3 em casos de CME, sendo encontrado altos níveis de acetilação de histona principalmente nas células epidermoide, sugerindo que acetilação de histonas pode ser uma boa estratégia terapêutica para o CME. Assim, foi analisado se o tratamento com IHDAC associado ou não a quimioterapia convencional (cisplatina) seria capaz de sensibilizar as CTT. Foi observado que IHDAC foi capaz de sensibilizar as células à cisplatina, entretanto essa combinação não foi eficaz quando comparado ao tratamento isolado com IHDAC.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Glândulas salivares

As glândulas salivares se originam através do epitélio bucal no início da vida fetal, a glândula parótida se desenvolve entre a quarta e sexta semana de vida intrauterina, a glândula submandibular na sexta semana e posteriormente a sublingual por volta da sétima semana. Todas as glândulas salivares menores se formam posteriormente a partir do revestimento da cavidade oral (20-25).

O desenvolvimento das glândulas salivares pode ser classificado em cinco estágios: pré-botão, botão inicial, pseudoglandular, canalicular e terminal. Na fase de pré-botão acontece a indução da proliferação do epitélio de superfície pelo mesênquima adjacente, resultando na formação dos botões. A fase de botão inicial é caracterizada pela formação e crescimento dos cordões epiteliais, que consiste em duas camadas celulares que individualmente de células cúbicas com numerosos ribossomos e nucléolos proeminentes. Esses cordões estão associados à condensação e à proliferação do mesênquima adjacente. Também na fase de botão que se inicia a diferenciação glandular (22, 25, 26).

No estágio pseudoglandular acontece a proliferação da porção terminal dos cordões epiteliais, se ramificando e formando bulbos de dez a doze células. Nesse processo continua a diferenciação glandular iniciado na fase de botão. No estágio Canalicular, continua a proliferação dos cordões epiteliais formando um processo chamado de arborização, no qual as porções terminais formam lóbulos compostos por um sistema de bulbos ramificados como árvores. Observa-se nos cordões epiteliais a formação de orifício dando origem a um tubo ou ducto. Ainda no estágio canalicular, a cápsula da glândula começa a se formar a partir do mesênquima e circunscreve o parênquima glandular (20, 21, 26, 27).

No estágio de botão terminal a proliferação ocorre principalmente na porção terminal do bulbo, onde as células irão se diferenciar em túbulos terminais e pró-acinares. A maturação dos ácinos é gradual e caracterizada pelo aumento do retículo endoplasmático rugoso e do complexo de Golgi. As células mioepiteliais desenvolve-se simultaneamente a essa citodiferenciação caracterizada pela

agregação de microfilamentos, expressão de actina, miosina e filamentos de pré-queratina (21, 22, 26).

Ao final desse processo as glândulas salivares são compostas pelo lóbulo acinar, ducto intercalar, ducto estriado e ducto excretor. As glândulas salivares são classificadas como glândulas maiores, que compõem todo o conjunto de parótida, sublingual e submandibular, e glândulas menores, que são nomeadas de acordo com a sua localização, como labiais, bucais, linguais, palatinas, gengivais e palatinas. Cerca de 90% da saliva é produzida por glândulas salivares maiores e 10% pelas menores (20, 22, 24, 26).

2.2 Tumores de glândulas salivares

Os tumores de glândulas salivares são raros e representam cerca de 2-6% de todos os tumores da região de cabeça e pescoço. As neoplasias benignas são mais frequentes e ocorrem em 80% dos casos. A relação homens e mulheres é 1:1, porém há diferenças importantes entre os diferentes tipos histológicos. A maioria das lesões ocorrem na glândula parótida, correspondendo cerca de 70% dos casos, em segundo lugar está as glândulas salivares menores, cerca de 15%, seguida da submandibular com 10% dos casos, sendo os 5% restantes ocorrendo na glândula sublingual.

Quando analisado a incidência de tumores malignos em cada glândula salivar observa-se que 80% dos casos na glândula sublingual são malignos, em glândulas menores os casos variam de 40-85%, nas glândulas submandibulares entre 35 a 55% e parótidas entre 15 e 25% (28-30). Os fatores etiológicos permanecem desconhecidos, porém história prévia de câncer, imunossupressão e radiação foram associados com aumento do risco ao câncer de glândulas salivares (3, 28, 31).

O adenoma pleomórfico é a neoplasia benigna de glândula salivar mais comum, correspondendo cerca de 70% das lesões de parótida, 50% dos casos de submandibular e 50% das glândulas menores, e raramente afeta a glândula sublingual. Sendo mais frequente no sexo feminino, com a faixa etária mais acometida entre 30 e 50 anos. Clinicamente é caracterizado como uma massa

indolor nodular bem delimitada de crescimento lento. A nomenclatura pleomórfico é em decorrência da sua variada apresentação microscópica. Classicamente, o adenoma pleomórfico é bifásico e caracterizado por uma mistura de células poligonais (epiteliais) e fusiformes (mioepiteliais) em um estroma que pode ser mixóide, hialino ou cartilagenoso. O componente epitelial pode estar organizado em estruturas semelhantes a ductos ou lençóis epiteliais, podendo esse componente epitelial sofrer metaplasia escamosa. O tratamento do adenoma pleomórfico é a excisão cirúrgica (32-34).

As neoplasias malignas de glândulas salivares são raras, compreendendo apenas 3% dos tumores de cabeça e pescoço, com curso clínico indefinido e com diferentes níveis de metástases locais e a distância. Não há um consenso em qual seja a lesão maligna mais comum na glândulas salivares maiores, no continente Americano e Africano o CME foi o mais comum, em estudo no continente Europeu o carcinoma adenoide cístico foi o mais comum. Quando se estuda as glândulas salivares menores o CME é o mais frequente sendo palato o principal sítio acometido (5, 33).

O carcinoma adenoide cístico é a neoplasia maligna mais comum em glândula submandibular, e as glândulas menores palatinas são as regiões intra-oral mais afetadas. Geralmente afeta pacientes entre a quinta e sexta década de vida sem predileção por sexo. Clinicamente apresenta-se como uma massa indolor de limites incertos, podendo estar associada a erosão do osso adjacente, com baixos índices de metástase regional. Eventualmente pode ocorrer invasão perineural levando a um quadro algíco (35-37).

Histologicamente, o carcinoma adenoide cístico é composto por dois tipos celulares: células ductais e mioepiteliais modificadas, que tipicamente possuem hipercromatismo, núcleo angular e citoplasma claro. Existem três padrões histológicos definidos: tubular, cribiforme e sólido. O padrão tubular consiste de túbulos e ductos bem formados com o centro luminal delimitado por uma camada epitelial e outra mioepitelial. O padrão cribiforme, é o mais comum e é caracterizado por ninhos celulares com espaços microcísticos, preenchido por material mucoso hialino ou basofílico. O padrão sólido ou basalóide é formado por lençóis uniformes de células basalóides sem a formação de espaços tubulares ou microcísticos. Cada um desses componentes podem ser observados como componente dominante ou a mais comum como parte de um tumor. Esse tumor pode se estender ao longo do

nervo, sendo comum a invasão intraneural. Da mesma forma, o tumor pode invadir o osso adjacente (35-37).

O tratamento de escolha é a ressecção cirúrgica podendo ser associada com quimioterapia. Esvaziamento cervical é indicado em casos com comprometimento linfonodal. Os fatores que influenciam o prognóstico incluem o padrão histopatológico, localização, estadiamento clínico, envolvimento ósseo e perineural e as condições das margens cirúrgicas. Em geral, tumores compostos dos padrões tubular e cribiforme possuem um padrão menos agressivo quando comparados ao padrão sólido. Além do padrão histológico, o estadiamento clínico afeta significativamente o prognóstico. A sobrevivência de 5 anos é aproximadamente 35% dos casos, com cerca de 90% de óbitos ocorrendo entre 10-15 anos após o diagnóstico. A recorrência local varia entre 15-85% dos casos, sendo esse fato associado com incurabilidade de doença. Envolvimento linfonodal é incomum, sendo encontrado em cerca de 5% dos casos e usualmente afetando os casos da glândula submandibular (35-38)

2.3 Carcinoma Mucoepidermoide

O CME foi primeiramente descrito por Stewart e colaboradores, em 1945, como um tumor secretor de muco e com componentes epiteliais chamando-o de Tumor Mucoepidermóide (39). Posteriormente, Eversole em 1970 revisou oitocentos e quinze casos de CME e observou que esse tumor afeta principalmente a glândula parótida e glândulas menores do palato (9). Porém o nome CME só foi estabelecido apenas em 1991, quando a Organização Mundial da Saúde (OMS), após uma revisão sistemática de sua histologia e graus de diferenciação recomendou que o nome “tumor Mucoepidermóide” fosse substituído por para CME, tornando evidente o comportamento biológico maligno dessa lesão (1, 6, 7).

O CME é o tumor maligno mais comum em glândulas salivares de adultos e crianças, demonstrando uma ampla faixa etária de distribuição. A média de idade dos pacientes que apresentam a lesão é de 45 anos, sendo o sexo feminino mais acometido que o masculino, na proporção de 3:2. Aproximadamente 53% dos tumores ocorrem em glândulas salivares maiores, sendo o sítio parotídeo o

predominante, o restante dos tumores afetam as glândulas menores, principalmente do palato e mucosa bucal (1, 5, 7, 9).

Nenhum carcinógeno químico ou biológico têm sido relacionados com o CME, porém a exposição previa à radiação ionizante é claramente um fator etiológico importante. Entre os sobreviventes da bomba atômica de Hiroshima e Nagasaki, o CME representa cerca de 44% de todas as lesões de glândulas salivares, usualmente essa porcentagem está em torno de 10%. Adicionalmente, CME tem sido relatado após a radioterapia para carcinoma de tireoide e leucemias (3, 8, 40, 41).

Estudos moleculares em CME são poucos e a amostra é, quase sempre, pequena. Estudos mostram frequente perda genética cromossomos 9p, 8q, 5p, 16q, e 12p. A translocação do cromossomo 11 e 19 (t(11;19)(q21;p13.1)) tem sido relacionado com CME, a clonalidade dessa translocação é relacionada com a formação de um novo gene chamado MECT1, esse gene é um co-ativador da via NOTCH, e tem sido identificada como anormalidades em alguns casos de CME e talvez represente um evento inicial na sua patogênese. (42-44) .

A apresentação clínica do CME pode variar de acordo com a graduação histológica. Lesões de grau baixo e intermediário graus podem se apresentar como massas de crescimento lento, assim como tumores de alto grau tendem a apresentar crescimento rápido. Em função das diversas apresentações clínicas essa lesão pode mimetizar neoplasias benignas e processos inflamatórios. Usualmente lesões de palato são flutuantes, de coloração semelhante a mucosa e com superfície lisa lembrando casos de mucocoele. Dependendo da localização os sintomas podem incluir disfagia, dislalia, dor, ulceração e hemorragia (1, 5-7, 9).

O CME é caracterizado histologicamente por três tipos celulares: células epidermoides, células produtoras de muco e células intermediárias. A proporção dos diferentes tipos celulares e a configuração arquitetural da lesão varia entre os casos e até mesmo dentro da lesão. Usualmente as lesões apresentam-se como multicísticas, com variável quantidade do componente sólido, que algumas vezes pode ser predominante. Os espaços císticos são limitados por células mucosas intercaladas por células intermediárias. As células mucosas são grandes, com citoplasma pálido e com núcleo deslocado para a periferia, possuindo em seu interior sialomucina, sendo positiva nas colorações especiais mucicarmim ou alcian

blue. Normalmente esse tipo celular compõe cerca de 10% da lesão. As células intermediárias são células basais menores com núcleo grande diferentes das células mucosas e epidermóides. As células epidermóides possuem abundante citoplasma eosinofílico, e são ocasionalmente associadas com a formação de queratina, incluindo a formação de pérolas de queratina. Essas células possuem variado pleomorfismo celular, núcleos hipercromáticos, aumento da proporção núcleo/citoplasma. Invasão neural, necrose, aumento no número de mitoses ou anaplasia celular são incomuns (1, 7, 9).

Não há um sistema uniforme de graduação para o CME devido a falta de consenso sobre de quais critérios histológicos são mais úteis para realizar a graduação, tamanho da lesão, estágio clínico, bem como quantos critérios devem ser considerados realizados. Em 1945, Stewart e colaboradores (39) graduaram o CME de acordo com suas características histológicas e curso clínico. Posteriormente, outros estudos propuseram a graduação em dois graus, baixo e alto grau, de acordo com a presença ou ausência de um crescimento invasivo e também pela arquitetura histológica (1, 6). Auclair e colaboradores e Goode e colaboradores padronizaram um método mais uniforme e com reprodutível para a graduação do CME, baseado em critérios histológicos para a graduação do CME. Os critérios são: áreas císticas em menos de 20% do espécime; quatro ou mais figuras de mitose em dez campos de alta magnificação; invasão neural; necrose tumoral e a presença de anaplasia celular (pleomorfismo celular e molecular, aumento nuclear: relação núcleo citoplasma, nucléolos proeminentes e hipercromatismo) (6). Para cada critério foi dado um valor e a soma de cada valor para as cinco variáveis determina irá determinar o grau do tumor. Casos com valores totais entre 0 e 4 era são considerados de baixo grau, somas entre 5 e 6 era consideradas grau intermediário e valores acima de 7 como de alto grau (6). Em 2005, a OMS sugeriu as mesmas critérios histológicas para fazer a graduação do CME, mostrando ser uma maneira viável de graduar o CME. (10).

Tradicionalmente, as diferenças no comportamento biológico dos tumores de baixo e alto grau interferem no tratamento de escolha. Lesões de baixo grau são conhecidas por possuírem um comportamento menos agressivo e assim, são tratadas apenas com excisão cirúrgica apenas. O tratamento do CME de alto grau é a cirurgia radical com exérese de todos os tecidos envolvidos (glândulas, nervos e

músculos). O esvaziamento cervical é indicado em casos com evidência de envolvimento linfonodal, porém é difícil demonstrar ou excluir o envolvimento linfonodal mesmo com as mais modernas técnicas de imagem. Em geral, metástase para os linfonodos são mais frequentes em tumores oriundos da glândula parótida, sendo bastante incomum em glândulas salivares menores. A radioterapia é indicada em casos de alto grau e também em casos com margens cirúrgicas comprometidas (7, 9, 12). Devido a raridade dessa lesão e sua heterogeneidade, não há um protocolo padrão sobre o regime de quimioterapia para os CME, na literatura são encontrados relatos de casos ou series de poucos casos utilizando cisplatina, carboplatina e paclitaxel porém com respostas insatisfatórias ou de baixa duração (10, 11, 45). Mostrando assim a necessidades da padronização de novas modalidades de tratamento, visto que modalidade atual compromete a qualidade de vida do paciente levando a sequelas irreversíveis que prejudicam a estética e, principalmente, a função mastigatória, respiratória e fonética.

2.4 Células-tronco tumorais

Apesar de vários avanços no tratamento do câncer, é muito comum os relatos de insucesso da terapia neoplásica, o que resulta na progressão da doença, recorrência e óbito. Por vários anos os estudos nessa área têm focado em identificar mecanismos genéticos e bioquímicos relacionados com a resistência a vários tipos de terapia. Entretanto, o câncer não é uma simples bolsa de células homogêneas (46-48). O câncer é um complexo sistema contendo vários tipos celulares como células endoteliais, hematopoiéticas e estromais. Além das células do microambiente tumoral, as células malignas podem possuir diferentes populações como variações na taxa de crescimento, apoptose e metabolismo levando a uma variação na população intra-tumoral (16, 46, 49, 50). Adicionalmente, fatores não genéticos criam conjuntos celulares tumorais organizados hierarquicamente, no qual uma subpopulação de células-tronco tumorais (CTT) sustenta a manutenção clonal da neoplasia. Embora seja controversa a literatura sobre como as células são organizadas hierarquicamente e qual a melhor forma de definição de CTT, esse modelo de desenvolvimento/ hierarquia tem demonstrado possuir características

transcricionais que influenciam na sobrevida do paciente, realçando para uma possível relevância clínica (48, 51-56).

A pesquisa de células-tronco começou em 1961 com o estudo de Till e McCulloch que descreveram a re-população clonal *in vivo* de linhagens hematopoiéticas, mostrando que uma única célula hematopoiética possuía um potencial de diferenciação em várias linhagens e ainda mantinha o potencial de autorrenovação (57). A Autorrenovação é um processo importante para manutenção da população celular, considerando dentro da divisão celular, a célula tronco produz uma (divisão assimétrica) ou duas (divisão simétrica) células filhas que possuem a capacidade de autorrenovação. Eventos epigenéticos são responsáveis por promover a autorrenovação celular e a manutenção do potencial replicativo. A literatura o termo fenótipo de células tronco (“*stemness*”) vem sendo utilizado para nomear os mecanismos se referindo a mecanismos moleculares capazes de manter o potencial de célula-tronco (46, 58, 59).

Atualmente existem duas hipóteses que descrevem o papel de CTT no desenvolvimento do câncer. A hipótese original é que o primeiro evento oncogênico ocorre nas células-troncos adultas que são capazes de diferenciar em células neoplásicas. Adicionalmente, mutações ocorrem nas células neoplásicas diferenciadas formando uma massa tumoral heterogênea com diferentes clones em variados graus de proliferação e sobrevivência. Adicionalmente essa teoria afirma que todas as células neoplásicas podem aleatoriamente iniciar e propagar o tumor (47, 48, 59, 60). Outra hipótese alternativa sugere que células normais diferenciadas, chamadas células iniciadoras de tumor, sofrem mutações oncogênicas e adquirem propriedades semelhantes a às células-tronco possibilitando a auto-renovação e a diferenciação. Essas células são capazes em diferenciar na massa tumoral. Após o esgotamento da população das células iniciadoras de tumor, as células diferenciadas são capazes de desdiferenciar através da transição epitélio-mesênquima (TEM). Essa teoria afirma que apenas as CTT possuem a habilidade de formar tumor (61-63).

A caracterização de CTT identificou várias propriedades comuns vistas em células-tronco normais. Por definição tanto as CTT e células-tronco normais possuem a capacidade de autorrenovação, entretanto essa característica é desregulada nas CTT. Os dois tipos celulares possuem mais coisas em comum como expressão de marcadores específicos de superfície, formação de esferas em

superfícies não aderentes, atividades enzimáticas intracelulares e clonogenicidade (46, 47, 53). Assim, vários experimentos *in vitro* identificam CTT como ensaio de formação de esferas, exclusão por corante Hoechst (Side Population cells), detecção da atividade da enzima aldeído dehidrogenase 1 (ALDH1), detecção de marcadores de superfície e ensaios de invasão. Os principais marcadores utilizados para isolar CTT incluem moléculas de adesão celular (CD133, CD24, ácido hialurônico e CD44), enzimas citoprotetoras (ALDH1) e fatores de transcrição (OCT-4, SOX-2). Assim diferentes técnicas baseadas para identificar esses marcadores são amplamente utilizadas para isolar e caracterizar CTT (64, 65).

Células-tronco normais residem em um nicho o qual disponibiliza os sinais necessários para a manutenção das propriedades tronco das células. Da mesma forma, CTT necessitam de um microambiente semelhante que favorece as vias de sinalização que regulam a autorrenovação e processos homeostáticos normais com inflamação e TEM, hipóxia e angiogênese. Mostrando assim que o microambiente é importante para o *stemness* do tumor (46-48, 66, 67). A hipóxia é uma peça chave na progressão do tumor, e microambientes hipóxicos também podem controlar CTT (67-70), Morrison e colaboradores sugeriram que terapias antiangiogênicas pode induzir o nicho CTT a radiorresistência (70). Bem como, Conley e colaboradores demonstraram que agentes antiangiogênicos como sunitinib e bevacizumab pode estimular CTT através de uma hipóxia intra-tumoral (69).

Fortes evidências suportam a relação entre *stemness* e resistência à terapia em glioblastomas, câncer de colo, mama, cabeça e pescoço entre outros, mostrando que a população de CTT são mais resistentes para a terapia que outras populações (18, 52, 54, 58, 61, 71). Além do mais, CTT possuem várias propriedades que distinguem das outras células do tumor, não apenas a resistência ao tratamento, mas também fuga da morte celular e quiescência. As CTT são resistentes a quimioterapia tradicional, em razão de que as drogas atuam tem como alvo o crescimento tumoral através da inibição da síntese de DNA ou divisão celular de células que estão em mitose, entretanto CTT estão frequentemente em estado quiescente. A quiescência protege fisiologicamente células-troncos adultas de injúrias nocivas e previne a exaustão do potencial replicativo. Assim, a permanência das células em um estado quiescente por bloqueando receptores específicos e vias de sinalização dentro do nicho pode inibir tanto a progressão quanto a metástase tumoral (47, 64, 66, 70).

Além de terapias que buscam a eliminação das CTT, outra modalidade tem melhorado a eficácia da quimioterapia buscando controlar a progressão tumoral induzindo a diferenciação das CTT. Esse tipo de terapia pode levar a diferenciação terminal CTT e a perda da capacidade de auto-renovação (50). Embora vários agentes estejam relacionados na terapia de diferenciação, apenas dois tipos de drogas podem afetar a diferenciação celular: ácidos retinóicos e drogas que promovem mudanças epigenéticas (50, 72). O ácido retinoico (vitamina A) e seus análogos podem reverter os processos de progressão maligna através da modulação da sinalização principalmente por receptores retinóicos como mostrado em glioblastomas e câncer de mama (50, 56). Inibidores de acetilação de histonas pode levar a parada do ciclo celular, diferenciação e /ou apoptose de vários tipos tumorais, e tem sido utilizado como agente que induz a diferenciação no câncer. A combinação de inibidores de deacetilação de histonas e quimioterápicos convencionais representa uma nova estratégia para eliminar CTT (18, 73, 74).

2.5 Inibidores de deacetilação de histonas

A estrutura da cromatina é complexa e composta de DNA, histonas e proteínas não histonas. A molécula de DNA é enrolada ao redor de estruturas chamadas de octâmeros de histonas, compostas de duas cópias de cada histona, H2A, H2B, H3 e H4. As histonas exibem caudas que se projetam para fora dos nucleossomos estando sujeitas a um grande número de modificações pós-transducionais como acetilação, metilação e fosforilação (75-77).

As histonas funcionam como importantes componentes estruturais nucleares e como reguladoras do perfil de expressão gênica em vários tipos de tecidos como epitélio, músculo e conjuntivo (19, 77-79). A deacetilação de histonas é associada com repressão transcricional, incluindo a diminuição de expressão de genes supressores de tumor bem como a expressão de genes relacionados com a manutenção do *stemness*. A acetilação é relacionado com a diferenciação celular (19, 78). Assim, enzimas histonas deacetilases responsáveis pelos níveis de acetilação de histona, são uma das principais formas de regulação gênica, participando dos mecanismos de controle epigenético. Os processos de acetilação e

deacetilação influenciam o grau de compactação da cromatina. A adição de um grupo acetil neutraliza as cargas positivas sobre as histonas, enfraquecendo as interações eletrostáticas entre histonas e o esqueleto de fosfato do DNA, desatrelando o DNA da histona ou seja, a cromatina fica mais exposta aos fatores de transcrição facilitando a expressão proteica. A remoção do grupo acetil, realizada pelas enzimas histona acetil transferase, levando à um aumento das interações entre as histonas e o DNA gerando uma maior compactação das estruturas nucleossômicas, o que limitando a atividade gênica dificultando a ligação dos fatores de transcrição e assim a expressão proteica (75-78, 80).

Em mamíferos, as HDAC são responsáveis pela deacetilação dos resíduos de lisina no terminal N das histonas, principalmente das histonas H2A, H2B, H3 e H4. As HDACs são super expressas em algumas neoplasias como colo, mama, cabeça e pescoço e próstata. Uma vez, a inibição da atividade das HDACs pode reverter o silenciamento epigenético que é frequentemente observado no câncer. Em geral, a inibição de HDACs leva à mudanças nos níveis de RNA de um pequeno grupo de genes (entre 2 e 5% do genoma), e frequentemente alguns genes são super regulados outros têm sua atividade reduzida. Isso levou ao desenvolvimento de inibidores de HDAC (IHDAC) para o tratamento anti-neoplásico (73, 75, 76, 81).

Os IHDAC podem ser divididos em quatro classes estruturais: hidroxamatos, peptídeos cíclicos, ácidos alifáticos e benzamidos. O Tricostatin A (TSA) foi o primeiro hidroxamato natural descoberto capaz de inibir as HDAC. O Vorinostat (SAHA) possui estrutura similar ao TSA e foi o primeiro IHDAC aprovado pelo FDA (do inglês Food and Drug Administration) para o tratamento de linfomas de células T cutâneo. Os IHDAC podem possuir uma ótima utilidade clínica potencializando o efeito de várias terapias como radioterapia e quimioterapia convencionais. A classe dos peptídeos cíclicos é a que possui a estrutura mais complexa dentre as outras classes, e inclui o produto natural depsipeptídico, apicidina, e o ácido hidroximaico cíclico. Os ácidos alifáticos, como biturato, fenibutirato e ácido valpróico, são IHDACs relativamente fracos, com atividade em concentrações maiores que os outros grupos de IHDACs. (19, 73, 75, 76, 78).

O tratamento com IHDAC tem sido relacionado com ativação da morte celular, geração de espécies reativas de oxigênio, inibição da angiogênese e autofagia. São conhecidas duas grandes formas de morte celular, a extrínseca,

relacionada com a ligação de ligantes à receptores de morte celular, e a intrínseca, ou via mitocondrial, todos os IHDAC têm sido relacionados com uma ou ambas as vias (73, 75). Uma das mais promissoras propriedades dos IHDAC é a habilidade de induzir a apoptose em células neoplásicas enquanto conserva células normais. Uma possível explicação é que os IHDAC promovem a morte celular através de ligantes TRAIL, que por sua vez induzem a apoptose apenas em células transformadas, em geral os ligantes TRAIL são super expressos em células transformadas e não nas normais. Em testes clínicos os IHDAC têm mostrado o aumento da expressão de TRAIL, TRAIL-R2, Fas, Fas-L e TNF- α . O papel dos IHDAC na via intrínseca está relacionado com hiperacetilação de p53, assim estabilizando a proteína e aumentando a atividade transcricional. A proteína p53 ativa a via intrínseca de morte celular através da ativação de várias proteínas pro-apoptóticas, incluindo Bax, Puma e Noxa (73, 75, 76, 82).

Vários estudos mostraram que os IHDAC são capazes de estimular a produção de espécies reativas de oxigênio, porém, a maneira pela qual este estímulo ocorre permanece desconhecida, sugere-se que o acúmulo desses radicais esse acúmulo seja devido ao estresse oxidativo, que por sua vez pode levar à ativação da via intrínseca da apoptose. Outro aspecto importante da função dos IHDAC é a inibição da angiogênese promovida pelos IHDAC, devido a diminuição da expressão de vários fatores angiogênicos como fator de crescimento endotelial vascular e fator indutor de hipóxia 1- α (HIF1 α). Considerando que angiogênese é um fator chave no processo de desenvolvimento do tumor e metástase, a sua inibição é extremamente importante para o tratamento das neoplasias (83).

2.6 SAHA

O ácido hidroxâmico suberoilânilda (SAHA), ou Vorisnostat, é uma molécula de baixo peso molecular (aproximadamente 260mg), derivada do ácido hidroxâmico. Esse ácido liga-se ao sítio ativo das histonas deacetilases causando sua inibição. Vários estudos em modelos animais neoplásicos incluindo linfomas, mielomas, leucemias, melanomas, carcinoma renal e carcinoma pulmonar de células pequenas

mostram que bloqueando a HDAC se bloqueia a proliferação e inibindo o crescimento tumoral (73, 81, 84-86). Os efeitos inibitórios do SAHA também acontecem em células normais de uma forma dose dependente, porém sendo seletivamente tóxico em células transformadas, induzindo a morte nas células tumorais e inibindo o crescimento de células normais deixando-as viáveis (78, 87, 88).

O mecanismo para o efeito antiproliferativo do SAHA é resultado da inibição da atividade das HDAC, resultando na alteração de transcrição em um número finito de genes (2-5% de genes expressos). Assim, o SAHA tem sido relacionado com a expressão de vários genes (p21, TBP-2, gelsolin, metalotioneína) e também com a repressão (ciclina D1, erbB2, importina B) (73, 88-90). A indução de genes que inibem quinases tem sido relacionada à ação de vários IHDAC e assim desempenhando um papel importante na parada do ciclo celular. O SAHA também pode promover a acetilação de vários fatores de transcrição como E2F, Smad7, p53, BCL-6, HIF-1, NF-kappaB e GATA-1. Essa ação pode resultar na mudança de característica e função da proteína. Como por exemplo, a acetilação de p53 leva ao aumento de ligação de p53 ao DNA, aumentando a expressão de genes regulados por essa proteína (75, 78, 79, 90).

Estudos pré-clínicos têm mostrado que o uso de SAHA pode elevar ou ter um efeito sinérgico em outras drogas anti-neoplásicas, incluindo antrocilinas, fludarabinas, flavopiridol, imatinib, bortezomib, agentes anti-angiogênicos e TRAF-L. Embora o SAHA possua um significativo efeito anti-neoplásico isolado, ele pode levar a um tratamento eficaz em combinação com outros regimes terapêuticos (15, 73, 81, 82, 84, 89, 91).

2.7 Cisplatina

A descoberta da Cisplatina por Barnett Rosenberg, um biofísico da Universidade de Michigan que estudava o papel de corrente elétrica na divisão celular, utilizando células de *Escherichia coli* que cresciam em uma solução tampão de cloreto de amônio com eletrodos de platina imersos na solução, e observou a inibição da divisão celular. Após várias pesquisas, foi notado que esse efeito não foi

produzido pela corrente elétrica, mas sim pela hidrólise dos eletrodos da platina. Assim, outros dez metais de transição foram testados na inibição da divisão da *E. coli* e o mais efetivo foi a platina, isso foi relacionado com a forma Cis do complexo da platina, uma vez que a forma trans foi ineficaz (92).

Com esses resultados, o complexo da platina foi sugerido para testes com possíveis efeitos anticâncer. Inicialmente, o complexo de cisplatina foi testados em sarcomas de camundongos brancos suíços. O complexo demonstrou uma potente atividade antiproliferativas, eliminando os tumores e os animais que sobreviveram e estavam saudáveis e após seis meses esses animais os animais curados não mostraram nenhuma recorrência. Baseados nesses resultados e outros resultados, a cisplatina foi aprovada pelo FDA em 1978, e vem sido utilizada em ensaios clínicos e atualmente é umas das drogas mais utilizadas no tratamento anti-neoplásico (93, 94). A cisplatina tem sido utilizada, de forma isolada ou combinada a outros quimioterápicos na terapia de várias neoplasias como a de testículo, ovário, cervix, cabeça e pescoço e pulmão. Além disso, a cisplatina também tem sido utilizada na terapia adjuvante seguida de cirurgia ou radioterapia (93, 95-99)

A cisplatina é um complexo planar quadrado neutro inorgânico que reage com o DNA para produzir seus efeitos biológicos, culminando no reparo ao do dano do DNA e sobrevivência celular ou ativação da apoptose (93, 100). Para se tornar ativo, a cisplatina necessita ser ativada através de reações aquosas que trocam os ligantes de cloro por água. Após a administração na corrente sanguínea, a cisplatina encontra uma alta concentração de cloreto no plasma (aproximadamente 100mM), que limita a mudança de ligantes de cloreto por moléculas de água. A concentração intracelular de cloreto é relativamente baixa (aproximadamente 4-20mM), assim um dos ligantes de cloro é substituído por água, formando a forma reativa, carregada positivamente que não consegue sair da célula, estudos mostram que 98% da platina ligada no DNA é na forma de platina monohidratada. Entretanto, a cisplatina é vulnerável ao ataque de proteínas encontradas no plasma sanguíneo, particularmente aquelas que possuem um grupo tiol, como albumina sérica e aminoácido cisteína. Estudos mostram que após à administração, 65-98% da cisplatina no plasma sanguíneo se encontra ligadas às proteínas, essa ligação tem sido relacionada com a desativação da droga e de vários efeitos colaterais do tratamento. A cisplatina que continua intacta consegue entrar nas células tumorais, principalmente pela difusão através da membrana celular (93, 100, 101).

Essa ligação ocorre nas bases do DNA, normalmente com uma guanina ou purina, formando adutos entre as faixas de DNA, resultando em uma distorção da dupla fita de DNA, esses adutos favorecem a ligação de proteínas relacionadas ao complexo de reparo do DNA inibindo assim sua transcrição. Portanto, os adutos induzidos pela cisplatina atrapalham o processo de replicação e transcrição, esses efeitos podem não necessariamente resultar diretamente na morte celular, devido a sinalizações de sobrevivência celular e anti-apoptóticas (71, 93, 96, 100, 102).

A efetividade do tratamento com cisplatina está relacionada com a resistência do tumor. Vários tumores são intrinsicamente resistentes à cisplatina, enquanto outros adquirem a resistência após a exposição à droga ao longo do tempo. O mecanismo de resistência à cisplatina tem sido identificado como diminuição do acúmulo da droga no compartimento intracelular, e um aumento da capacidade da célula em reparar ou tolerar o dano ao DNA causado pela cisplatina (71, 95). Assim a resistência pode ser adquirida pela exposição crônica à droga ou por um fenômeno intrínseco ao tumor. Os mecanismos de resistência se desenvolvem como consequência de mudanças intracelulares que previnem a interação da cisplatina com o DNA, interferindo no dano e consequentemente na ativação do maquinário de morte celular, como por exemplo a compactação da cromatina (71, 95, 100, 102, 103).

A compactação da cromatina pode dificultar a passagem da cisplatina ao núcleo celular, bem como ao DNA, diminuindo, assim, seu efeito e favorecendo a resistência tumoral. Portanto, o grau de acetilação das histonas, que ocasiona a compactação da cromatina, está diretamente relacionado com a resistência tumoral à cisplatina. Estudos recentes mostram que o uso prévio de SAHA ao tratamento com cisplatina deixa as células neoplásicas mais sensíveis a cisplatina (18, 103). Adicionalmente, a resistência à cisplatina tem sido relacionada com a presença de CTT, que por sua vez possuem altos níveis de acetilação de histonas (61)

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo desse estudo foi avaliar a expressão de acetil histona H3 em glândulas salivares, em casos de CME e em linhagens de CME. Assim como, avaliar os efeitos do tratamento com um inibidor de histona-deacetilases e cisplatina nas linhagens de CME, em relação a seus efeitos na população de CTT, e procurar identificar uma via de sinalização celular relacionada com a resistência à cisplatina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagens celulares e reagentes

As linhagens celulares de carcinoma mucoepidermoide utilizadas foram UM-HMC1, UM-HMC-2, UM-HMC-3A, UM-HMC-3B e UM-HMC-5 originalmente estabelecidas e descritas por Warner et al (104). As células foram mantidas em incubadora a 5% de CO₂ e 37°C e cultivadas em RPMI 1640 (Thermo Scientifics, Waltham, MA, USA), suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (Thermo Scientifics), 1% de antibiótico e antimicótico (Thermo scientific), 1% de L-glutamina (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 20ng/ml de fator de crescimento epitelial (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 400ng/ml de hidrocortisona (Sigma-Aldrich) e 5µg/ml de insulina (Sigma-Aldrich). As linhagens foram tratadas com SAHA (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) e Cisplatina (Sigma-Aldrich). O meio de cultura foi trocado a cada dois dias.

4.2 Xenoenxerto em camundongos imunodeficientes

O estudo com animais foi previamente autorizado pelo comitê de ética em animais da Universidade de Michigan. As linhagens (HMC3A, HMC3B e HMC5) foram colocadas em um *scaffold* biodegradável e implantadas na região dorsal de camundongos com imunodeficiência combinada severa (SCID) (CB-17 SCID; Charles River, Wilmington, MA, USA) sob anestesia (104). Os tumores foram removidos cirurgicamente quando alcançaram um volume aproximado de 800mm³, medidos com um paquímetro. Posteriormente os tumores foram fixados em formaldeído tamponado a 10% durante 18 horas, e emblocados em parafina de acordo com os protocolos usuais e processados para a coloração de hematoxilina e eosina.

4.3 Tissue microarray

As áreas para realização do TMA foram selecionadas e marcadas baseadas nos cortes corados com hematoxilina e eosina, assim os "spots" foram removidos do bloco de parafina original. Os TMAs foram construídos usando manual arrayer e três cortes cilíndricos representativos de 2 mm de diâmetro foram removidos e arranjados sequencialmente de acordo com Fonseca et al., (105). O bloco de TMA foi composto por 15 casos de CME, uma glândula parótida humana normal e um caso de carcinoma de células escamosas para controle de marcação.

4.4 Imuno-histoquímica

Para as reações imuno-histoquímicas foi utilizada a técnica do polímero livre de biotina. Para realização desta metodologia foram preparados, a partir do material embocado em parafina, cortes de 3 μ m de espessura dos espécimes teciduais, estes foram estendidos em lâminas de vidro previamente tratadas com organosilano. Após essa etapa, os cortes foram desparafinados em dois banhos de xilol, sendo um a 60 °C por 30 minutos, e outro em temperatura ambiente por 15 minutos. A seguir, os cortes foram reidratados em cadeia decrescente de etanóis, passando por três banhos de etanol absoluto, etanol a 95%, 90%, 85% e 80% por 3 minutos cada. Após a reidratação foi realizada a remoção do pigmento formólico através de banhos em hidróxido de amônia a 10% em solução alcoólica (etanol 95%), por 5 minutos.

Posteriormente, os cortes foram imersos em água destilada por 10 minutos, seguido por mais duas lavagens com água destilada. Após essa etapa, os cortes receberam tratamento para recuperação antigênica, com ácido cítrico 0.1M. Ao final da recuperação antigênica, os cortes foram imediatamente lavados durante 10 minutos em água destilada, seguida de mais duas lavagens, para posteriormente foi realizada a etapa de bloqueio da peroxidase endógena tecidual.

O bloqueio da peroxidase endógena foi efetuado através da imersão das lâminas, por duas vezes, em uma solução de peróxido de hidrogênio a 6% e metanol na proporção de 1:1, por 15 minutos cada. Em seguida foi realizada a incubação do

anticorpo Acetil Histona H3 (Cell Signaling).

Para a incubação do anticorpo de ligação e do complexo terciário, foi utilizado o sistema do anticorpo secundário (Vectastain, Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) durante noventa minutos. As reações foram reveladas através da incubação por 10 minutos com o corante diaminobenzidina (Liquid DAB+, K3468, Dako). Em seguida, os cortes serão lavados com Tris e água deionizada para remoção de excessos da substância de revelação, seguida pela realização de contra coloração com hematoxilina de Mayer. Os cortes foram então desidratados em cadeias crescentes de etanóis, diafanizados em xilol e montados com lamínulas.

4.5 Ensaio de viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular é uma técnica colorimétrica que possibilita avaliar a viabilidade celular através da redução do sal Tetrazolim para sua forma insolúvel Formazan, onde apenas as células viáveis conseguem fazer essa redução.

Com o objetivo de analisar a concentração de SAHA e cisplatina capaz de inibir a proliferação celular de 50% das células, foi utilizado TACS MTT cell proliferation assay (Trevigen, Gaithersburg, MD, USA) seguindo as instruções do fabricante. Foram plaqueadas dez mil células em cada poço de uma placa de noventa e seis poços para o tratamento com SAHA ou cisplatina por vinte e quatro horas. Para o tratamento de dois-hits inicialmente foi realizado tratamento com SAHA por vinte e quatro horas seguido do tratamento com cisplatina por mais vinte quatro horas. Os resultados foram obtidos por absorbância (Bio-tek EL-311, Bio-Tek instruments) a 595nm (18).

4.6 Ensaio de formação de esferas

Essa técnica possibilita analisar a formação de esferas, na literatura é descrito que apenas células tronco progenitoras são capazes de crescer em suspensão e formar esferas (106, 107). As células foram cultivadas como descrito anteriormente

em placas de ultra baixa adesão de seis poços, em um total de duas mil e quinhentas células por poço durante cinco dias. Para analisar os efeitos dos tratamentos estudados, foi adicionado SAHA no primeiro dia e cisplatina no último dia de cultivo. Após o quinto dia as células foram transferidas para lâminas carregadas magneticamente realizando cytopspin a 1500 rpm, 4°C durante dez minutos,. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina, e realizado a contagem de toda a área da lâmina. As esferas foram classificadas em holoclones, meroclones e paraclones de acordo com estudos anteriores (106, 107).

4.7 Imunofluorescência

Um total de mil células foram aderidas em lamínulas de vidro em uma placa de doze poços e fixadas com metanol absoluto a -20°C por cinco minutos. Para a imunofluorescência nas esferas, as células foram plaqueadas em baixa adesão por 4 dias, tratadas com cisplatina por vinte e quatro horas e então foi realizado o cytopspin, seguido da fixação com paraformaldeído 4%. O bloqueio das ligações inespecíficas foi realizado com 0.5% (v/v) Triton x-100 (Sigma) em PBS (Gibco) e 3% (P/V) de albumina bovina. Foram utilizados os anticorpos anti-Pan-Cytokeratin (cell Signaling), anti-vimentina (Thermo scientific), BMI-1 (cell signaling) e pS6 (cell signaling) durante noventa minutos. As células foram lavadas três vezes e incubadas com anticorpos secundários conjugados com TRITC (Santa Cruz) ou FITC (Santa Cruz) e corados com Hoechst 33342 (Sigma) para a visualização do DNA. As imagens utilizadas foram capturadas usando câmera digital QImaging ExiAqua anexada ao microscópio Nikon Eclipse 80i e visualizada com software QCapturePro.

4.8 Immunoblotting

As células foram tratadas com tampão RIPA e levemente sonicadas. O lisado proteico foi separado através do gel de SDS-PAGE 10-15% e transferido para membrana de Polyvinyl difluorido (immobilon, Merck Millipore). As ligações

inespecíficas da membrana foram bloqueadas utilizando tampão com 0.1M Tris (pH 7.5), 0.9% NaCl e 0.05% Tween-20 (TBS-T) com 5% de leite em pó sem gordura. As membranas foram incubadas com Anti-Acetyl-Histone H3 (Cell Signaling) e GAPDH (Calbiochem, Merk Millipore) como *loading control*. A reação foi realizada usando ACL SuperSignal West Pico Substrate (Pierce Biotechnology) (18, 74).

4.9 Citometria de fluxo

As CTT foram identificadas utilizando *cell sorting* para a atividade enzimática de ALDH. Foi utilizado o *kit Aldefluor* (stemCell Technologies, Durham, NC, USA) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram analisadas no FACS *Canto cell sorter* (BD) (14, 56, 108).

5 RESULTADOS

5.1 Acetilação de histona H3 em glândulas salivares e CME

A acetilação de histonas é controlada pelo balanço da atividade de histonas deacetilases (HDAC) e histonas acetiltransferase (HAT). O mecanismo envolvido na transcrição gênica e acetilação de histonas não é totalmente conhecido, porém a acetilação de histonas constitui uma maneira eficaz de modificações pós-translacionais capaz de influenciar processos relacionados com o DNA como transcrição gênica. Mudanças na acetilação de histonas possuem um efeito direto em várias funções celulares, incluindo morfologia celular e respostas às mudanças extracelulares. Glândulas salivares possuem diferentes padrões de expressão de histona H3 (lisina 9) dentro das diferentes populações celulares. Foi observado que as células acinares (figura 5.1A#1) são em geral hipoacetiladas para histona H3 quando comparadas com as células do ducto intercalar (figura 5.1 A#2) e do ducto excretor (figura 5.1A#3). Assim, células com diferenciação escamosa parecem ser mais susceptíveis à acetilação de histona H3 (lisina 9). De maneira semelhante. Os CME são compostos por uma população heterogênea de células epiteliais apresentando estágios distintos de diferenciação celular e de acetilação de histona H3 (lisina 9) (figura 5.1B). Os CME de alto grau são pobremente diferenciados e são compostos principalmente por células escamosas e intermediárias (figure 5.1B#1 e 2) e possuem altos níveis de acetilação de histona H3 (lisina 9). Os CME de baixo grau são bem diferenciados apresentando células mucosas deacetiladas (figura 5.1B#3) combinadas com células escamosas positivas para acetil histona H3. A quantificação de ambas as populações celulares (células escamosas e mucosas) de CME revelou uma diferença estatística significativa de acetil histona H3 (lisina 9) (** $p < 0.001$)(figure 1C). Além da diversidade populacional das células tumorais, esses achados sugerem uma diferença intrínseca na atividade transcricional entre CME de alto e baixo graus.

5.2 Linhagens de CME mantêm as características de tumores humanos quando transplantadas em camundongos imunodeficientes

As linhagens celulares derivadas de CME primários e metastáticos foram estabilizadas no laboratório de Angiogenesis sob supervisão do Prof. Jacques Nor na Universidade de Michigan. Todas as linhagens estudadas foram capazes de fazer tumor em xenoenxertos em camundongos imunodeficientes (figura 5.2A). Além de serem capazes de formar tumores, as linhagens foram capazes de reproduzir várias características dos seus tumores primários. Em geral, as linhagens enxertadas formaram tumores constituídos de células semelhantes a escamosas e mucosas (figura 5.2A). Bem como, as linhagens expressavam citoqueratinas e vimentina (figura 5.2B). Semelhante aos nossos achados iniciais, células escamosas provenientes do xenoenxerto apresentavam maiores níveis de acetilação de histona H3 (lisina 9) quando comparadas às células mucosas (figura 5.2C). Esses achados juntos sugerem que linhagens de CME mantêm as populações heterogêneas, sendo capazes de diferenciar em células escamosas e células mucosas. Bem como, as linhagens diferem nos níveis de acetilação de sua cromatina (histona H3 lisina 9) sugerindo diferenças na transcrição gênica e comportamento celular (figura 5.2C).

Figura 5.2- Imagem em H&E dos tumores em xenoenxertos mostrando que as linhagens de CME mantêm as mesmas características de tumores humanos, com a população de células epidermóides e células claras no aumento de 5 e 20X. (A). Imunofluorescência para vimentina e Pan de citoqueratina nas linhagens de CME, mostrando que as linhagens mantêm perfil epitelial quando cultivadas (B). Western Blot para acetil histona H3 (lisina 9) e GAPDH nas linhagens de CME (C) mostrando diferentes níveis de acetilação entre as linhagens de CME.

5.3 linhagens celulares de CME possuem CTT

Tumores sólidos são frequentemente refratários para quimioterapia, em particular o que também acontece com o CME. Essa resistência é frequentemente adquirida durante o tratamento e é relacionada com a ativação de sinalizações oncogênicas associadas com a desregulação de morte celular. Estudos recentes vêm mostrando o envolvimento de CTT no desenvolvimento de resistência à quimio e radioterapia. Essas observações têm motivado o interesse em novas modalidades terapêuticas que tem como alvo as CTT. No presente estudo, foi avaliado as CTT nas linhagens de CME. Foi observado que as linhagens de CME são hábeis para formar esferas diante de condições de baixa adesão (figure 5.3A). A habilidade de crescer em baixa adesão foi descrita por Barradon e Green (109), e posteriormente demonstrada em vários tumores malignos. Todas a linhagens estudas foram capazes de gerar esferas distintas chamadas de holoclones, meroclones e paraclones (figura 5.3B). Cada linhagem foi única no número e tipo de esferas formadas (figura 5.3C). Enquanto as linhagens HMC1 e HMC2 possuem um potencial limitado em gerar esferas viáveis, as linhagens HMC3A, HMC3B e HMC5 foram hábeis em gerar um número maior de esferas, em especial meroclones (figura 3C). Ressaltando que a única linhagem metastática (HMC3B) foi que gerou o maior número de esferas, quando comparadas a todas outras linhagens primárias. Posteriormente, a presença de CTT nas linhagens HMC3A, HMC3B e HMC5 foi confirmada através da detecção de ALDH1, um marcador bem conhecido de células tronco tumorais e normais (figura 5.3D). Embora a população de CTT possa ser detectadas nas linhagens de CME, ainda não se sabe o efeito da quimioterapia convencional sobre essa população.

Figura 5.3 - Avaliação do número de esferas nas linhagens de CME (A) mostrando que todas as linhagens foram capazes de formar esferas. Representação do tipo de esferas formadas pelas linhagens de CME (B). Avaliação das qualidades das esferas formadas pelas linhagens de CME (C) mostrando que as meroclones é a forma mais comum nas esferas seguido das holoclones e paraclones. Representação da atividade enzimática de ALDH1 em linhagens de CME (D), mostrando que as linhagens utilizadas possuem células com atividades positiva para essa enzima, os pontos pretos são células consideradas negativas para a atividade enzimática e os pontos vermelhos células positivas, e abaixo a quantificação das células positivas em cada linhagem.

5.4 Cisplatina induz o acúmulo de subpopulação de CTT

Neste estudo tentamos explorar os efeitos da quimioterapia sobre a população CTT do CME. Inicialmente foi determinada a concentração de cisplatina capaz de inibir 50% das células nas linhagens HMC3A, 3B e 5. Foi observado que as três linhagens possuem IC₅₀, variando entre 8.47µg/ml para HMC3A, 9.17µg/ml para HMC3B e 10.7µg/ml para HMC5 (figura 5.4A). Utilizando essas concentrações, foi realizado o tratamento e observado que a cisplatina reduziu a população de CTT, através da avaliação os níveis de ALDH1. A cisplatina reduziu a positividade de ALDH1 de 11.52% de células positivas para 3.96% na HMC3A, 8.76% para 1.35% na HMC3B, e de 8.78% para 3.88% na HMC5 (média dos experimentos em triplicata) (Figura 5.4B). Um fato notável, a linhagem metastática HMC3B que foi responsável pelo formação de um número maior de esferas foi a linhagem mais sensível ao tratamento com cisplatina, sofrendo uma redução de aproximadamente 6.4 vezes, comparado com redução de 2.9 vezes para HMC3A e 2.26 para HMC5. Quando avaliadas as subpopulações de CTT através do ensaio de formação de esferas, O tratamento com cisplatina reduziu as subpopulações de holoclones e meroclones comparadas aos níveis do controle sem tratamento. Porém, o mesmo não foi observado para os paraclones que não houve alteração após vinte e quatro horas de tratamento (figura 5.4C).

Figura 5.4 – Gráficos mostrando o IC50 da cisplatina nas linhagens de CME (A), a concentração capaz de inibir 50% das células foi de 8.47µg/ml para HMC3A, 9.17µg/ml para HMC3B e 10.7µg/ml para HMC5. Representação da atividade enzimática de ALDH1 após o tratamento com cisplatina nas linhagens de CME (B), a direita inferior, gráfico mostrando que o tratamento com a cisplatina foi capaz de reduzir o numero de células positivas. Representação do efeito do tratamento com cisplatina nos diferentes tipos de esferas nas linhagens de CME (C), mostrando que o tratamento com cisplatina reduziu as holoclones, meroclones e paraclones nas linhagens, exceto da HMC3A e 3B, na qual houve um aumento das paraclones.

5.5 SAHA é mais efetivo na redução de CTT que a cisplatina

O uso SAHA tem sido utilizado em vários tipos de tumores podendo causar parada do ciclo celular, diferenciação e apoptose (73, 89, 90, 110). Adicionalmente, a acetilação da cromatina pode induzir a diferenciação celular e restringir a transformação celular de células normais. Inicialmente foi determinada a concentração de SAHA necessária para se inibir 50% das células nas linhagens HMC3A, HMC3B e HMC5. As concentrações variaram de 1.15 μ M para HMC3A, 0.3 μ M para HMC3B e 0.4 μ M para HMC5 (figura 5.5A). Além da concentração de SAHA capaz de inibir 50% das células aderidas, foi pesquisada a concentração capaz de inibir 50% das esferas em baixa adesão, essa concentração seguiu um mesmo padrão das células aderidas porém em concentrações mais baixas. Para HMC3A a concentração foi 0.18 μ M, para HMC3B foi 0.09 μ M e 0.11 μ M para HMC5 (figure 5.5B). Após isso, foi analisado o efeito dessa concentração mais baixa de SAHA na expressão de ALDH1, e foi observada uma redução nas células positivas para ALDH1 de 11.5% para 0.5% na HMC3A, de 8.8% para 0.1% na HMC3B e de 8.8% para 0.4% na HMC5 (Figura 5.5C). Todavia, foi avaliado o efeito dessa concentração nas subpopulações de CTT e foi notado que o tratamento com SAHA foi capaz de eliminar as holoclones e meroclones nas linhagens HMC3A e HMC3B, enquanto restaram poucas holoclones na HMC5. Também ocorreu uma redução no número de paraclones em todas as linhagens (figure 5.5D).

Figura 5.5 - Representação do IC50 de SAHA nas células aderidas de CME (A) mostrando que a concentração para inibir 50% das células na linhagens HMC3A, 3B e 5, foram respectivamente 1.15 μ M, 0.3 μ M e 0.4 μ M, respectivamente. Representação do IC50 nas células de CME cultivadas em baixa adesão (B), onde a concentração para inibir 50% das esferas foram 0.18 μ M, 0.09 μ M e 0.11 μ M nas linhagens HMC3A, 3B e 5, respectivamente. Representação da atividade enzimática de ALDH1 nas linhagens de CME após o tratamento de SAHA (C), mostrando que o tratamento foi capaz de reduzir significativamente as população positiva. Efeito do tratamento com SAHA nos diferentes tipos de esferas de CME (D), mostrando que o tratamento com SAHA reduziu todos os tipos de clones.

5.6 O tratamento prévio com SAHA sensibiliza as linhagens de CME à cisplatina e reduz a população de CTT

Estudos anteriores notaram que o tratamento com SAHA aumenta a sensibilidade das células neoplásicas à cisplatina, mostrando que eventos epigenéticos estão envolvidos na resistência à quimioterapia (18, 82, 89, 111). No presente estudo foi avaliado os efeitos do tratamento com SAHA antes da cisplatina na sensibilização das linhagens de CME, bem como na população de CTT. As linhagens foram tratadas com as concentrações necessárias para inibir 50% das esferas (figura 5.5A) durante vinte e quatro horas, após esse período foi feito o tratamento com cisplatina por mais vinte e quatro horas (figure 5.6A). Os resultados mostraram que o tratamento que com SAHA antes da cisplatina foi capaz de sensibilizar as linhagens de CME, reduzindo o IC50 de cisplatina de 8.4µg/ml para 5.5µg/ml na HMC3A, de 9.1µg/ml para 4.9µg/ml na HMC3B e de 10.7µg/ml para 4.2 µg/ml na HMC5 (figura 5.6B). Após ter acesso à concentração de cisplatina, foi analisado o efeito desse tratamento na população de ALDH1 positiva. Assim após o duplo tratamento, a população de células ALDH1 positivas diminuiu para 2.38%, 4.17% e 3.96% nas linhagens HMC3A, HMC3B e HMC5, respectivamente (figura 5.6C).

Figura 5.6 - Esquema representativo dos duplo tratamento de SAHA e cisplatina (A), realizando inicialmente o tratamento com SAHA por 24 horas, seguido de 24 horas de cisplatina. Representação do IC50 de cisplatina em células previamente tratadas com SAHA (B), mostrando que o tratamento com SAHA sensibiliza as células ao tratamento com cisplatina. Representação da atividade enzimática de ALDH1 após o duplo tratamento de SAHA e cisplatina (C), mostrando que o duplo tratamento reduz a população positiva.

5.7 Resistência à cisplatina pode estar relacionada com pS6 em CTT

As linhagens de CME possuem altos níveis de receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR do inglês *epidermal growth factor receptor*), que é um receptor tireosina quinase trans-membrana. Quando este receptor é ativado leva à fosforilação de múltiplos resíduos de tireosina no domínio intracelular, ativando várias vias de sinalização como a via do PI3k/AKT/mTOR (112-115). Essa sinalização é relacionada com sobrevivência celular e desempenha um papel fundamental em várias funções celulares como proliferação, crescimento e metabolismo. A ativação dessa via se inicia com a ativação do PI3 K convertendo o PIP2 em PIP3, que irá se ligar ao AKT, uma vez o AKT ativado por fosforilação nos resíduos de tireosina 308 e serina 473, pode ativar diretamente o mTOR, formando o complexo RAPTOR para ativar a proteína ribossomal S6, levando à síntese de proteínas. O aumento da fosforilação de S6 tem sido relacionado com resistência à quimioterapia câncer de ovário, pulmão e mama.(112, 113, 116-118). No presente estudo, analisamos a expressão de BMI-1 e pS6 na esferas de CTT após o tratamento com cisplatina. Assim, nas três linhagens foi observado um aumento na expressão de pS6, enquanto a expressão de BMI-1 não foi alterada, além do mais, foi observado esse aumento na expressão nas células periféricas das esferas (figura 5.7).

Figura 5.7 - Imunofluorescência para BMI-1 e pS6 nas linhagens de CME com e sem o tratamento de cisplatina, mostrando que nas linhagens o tratamento com cisplatina aumenta a expressão de pS6, principalmente nas linhagens HMC3A e 3B.

6 DISCUSSÃO

O CME é a neoplasia maligna de glândulas salivares mais frequente e seu tratamento consiste basicamente na ressecção cirúrgica da lesão. Em alguns casos a radioterapia adjuvante é empregada. Na maioria das vezes esse tipo de modalidade terapêutica acaba levando à várias morbidades aos pacientes. O efeito da quimioterapia ainda não é muito bem conhecido, mas sabe-se que esses tumores não respondem bem à quimioterapia convencional. O presente trabalho sugere o emprego de um novo fármaco no tratamento do CME capaz de atingir a CTT, esse tratamento é baseado na utilização de SAHA. Além do mais o trabalho sugere que a resistência à cisplatina nas CTT do CME pode estar relacionado com a fosforilação da proteína ribossomal S6.

Vários avanços ocorreram nos últimos anos visando um melhor entendimento do câncer, porém quando se trata em tumor de glândulas salivares os estudos ainda são controversos. Mesmo com esses avanços não houve uma melhora na sobrevida dos paciente com neoplasias de glândulas salivares, sendo a sobrevida em torno de 20 a 40% em 5 anos (5, 33, 119, 120). Para o CME, a ressecção cirúrgica é a principal forma de tratamento, independente da sua gradação. Ressecção local para tumores de baixo grau é considerada suficiente, enquanto para tumores de alto grau são tratados com ressecção com amplas margens cirúrgicas seguido de radioterapia pós operatória. Esvaziamento cervical é frequentemente utilizado na presença de metástases regionais (1, 5, 9, 12, 33). A quimioterapia tem sido empregada em casos localmente agressivos, metastática ou recorrente. Alguns agente quimioterápicos foram descritos em CME como cisplatina, 5-fluoracil, doxorubicina, paclitaxel, vinorelbine e taxotere (121). Cisplatina é o quimioterápico mais utilizado no tratamento de neoplasias de glândulas salivares, com uma taxa de resposta em torno de 70% em uma serie de 15 casos (121-123). A resposta à quimioterapia é bastante controversa devido a poucos estudos e, adicionalmente, a duração da resposta é curta falhando em um período de 5 a 9 meses (123). O presente estudo sugere a utilização de SAHA no tratamento de CME.

Os resultados desse estudo mostraram inicialmente que as células epidermóides do CME possuem altos níveis de expressão de acetil histona H3 (lisina 9), enquanto as células mucosas são hipoacetiladas. O mesmo foi notado quando

analisadas as glândulas salivares, as células dos ácinos são hipoacetiladas, ao passo que a expressão aumenta quando se aproxima da região inicial dos ductos. Adicionalmente, foi analisada também a expressão de acetil histona H3 (lisina 9) nas linhagens de CME, e foi observado diferentes níveis de expressão entre as linhagens. Dessa forma, entende-se que as linhagens de CME podem ser susceptíveis ao tratamento com SAHA. Diferentemente, estudos anteriores mostraram que linhagens de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço são hipoacetilados quando comparados com linhagens de queratinócitos normais (74).

Apesar de vários avanços no tratamento do câncer, a recorrência, progressão da doença e a baixa taxa de sobrevivência continuam preocupantes na rotina oncológica. O câncer é conhecido como uma doença heterogênea, com vários componentes intratumorais que contribuem para falha na terapia e progressão da doença(124). Dessa forma, o tumor não é apenas uma sacola composta por células neoplásicas homogêneas, mas sim um complexo ecossistema contendo células tumorais, endoteliais, inflamatórias, estromais e outros tipos celulares que podem influenciar o comportamento do tumor de uma forma geral (46, 67, 124). Técnicas avançadas de sequenciamento têm mostrado que o câncer possui uma mistura heterogênea de subclones distintos que se originam em uma ramificação evolutiva, contribuindo assim para a heterogeneidade funcional do tumor (125).

Similarmente, determinantes não genéticos criam um tumor organizado em hierarquias no qual uma subpopulação mantém a autorrenovação, essa população é chamada CTT (67). A ideia de que as CTT podem iniciar a progressão do câncer foi sugerida há mais de 150 anos (17). Entretanto, várias evidências vêm suportando essa hipótese, inicialmente por Lapidot e colaboradores demonstraram que população semelhante à células-tronco de leucemia mielóide aguda possuem um potencial aumentado de formar tumor em modelos xenográficos em comparação a outras populações sem esse perfil (126). Posteriormente, a presença de CTT foi demonstrada em vários outros tipos de neoplasias como pâncreas, cérebro, ovário, colo-retal, fígado e cabeça e pescoço (14, 106, 108, 127-131). Poucos estudos forma realizados buscando identificar a população de CTT em CME, os resultados desse estudo mostraram que todas as linhagens de CME possuem CTT, porém em diferentes proporções, a população de CTT foi identificada através do ensaio de formação de esferas e através da citometria de fluxo para a atividade enzimática de ALDH..

ALDH é uma família de enzimas citosólicas que são responsáveis pela oxidação intracelular de aldeídos e contribuem para a oxidação do ácido retinóico em estágios iniciais de diferenciação de células-tronco (132). Além do mais, a expressão da enzima ALDH1 tem sido relacionada com a resistência de células progenitoras à agente quimioterápicos, e pode ser usada para selecionar população de células progenitoras em medulas ósseas (133). O ALDH1 é um marcador utilizado para distinguir células potencialmente malignas em câncer de cabeça e pescoço (134). Estudos recentes mostraram que essa enzima é um marcador de CTT e sua presença está relacionada com malignidade e propriedades de renovação de células-tronco em vários tumores (56, 108, 135, 136). No presente estudo, os níveis de ALDH1 acompanharam os níveis de formação de esferas sugerindo assim que ALDH1 pode ser um bom marcador de CTT para CME.

Vários estudo mostraram que SAHA inibe todas as HDAC das classes I e II na concentração de 50nM e para o ciclo celular de várias linhagens celulares, alterando assim a expressão de vários genes em linhagens transformadas (137-139). Os mecanismos do efeito anti-neoplásico do SAHA não são completamente compreendidos. Aparentemente o SAHA atua tanto na expressão gênica, regulando a condensação da cromatina, quanto na regulação de proteínas relacionadas com as vias proliferação e apoptose (90). Há várias evidências mostrando que SAHA pode levar ao acúmulo de histonas acetiladas e proteínas não histonas acetiladas, alterando assim a expressão gênica, bem como a acetilação de proteínas que regulam a proliferação celular (por exemplo a proteína Rb), proteínas de estabilidade (HSP90), apoptose (BCL-2), motilidade células (tubulina) e angiogenesis (HIF-1) (137-141).

Dessa forma, há uma necessidade de compreender os mecanismos que determinem as variadas respostas causadas pelo SAHA, algumas vezes aumentando a expressão de genes supressores de tumor e diminuindo a expressão de oncogenes, para assim empregar melhor essa droga na rotina oncológica (110, 142). Da mesma forma que a acetilação de histonas, a acetilação de fatores de transcrição pode resultar na alteração de expressão de certos genes como por exemplo a acetilação de p53 leva a um aumento de ancoragem da proteína ao DNA, que resulta no aumento da expressão de genes regulados pela p53 (143). Os nossos resultados mostraram que o tratamento com SAHA foi mais eficiente em reduzir a população de CTT, quando comparadas as outras modalidades estudadas.

Estudos recentes mostram que o tratamento com SAHA regula a expressão de NANOG. Essa proteína é um fator de transcrição relacionado com o potencial de manter o fenótipo de CTT, bem como participa na resistência a cisplatina. Isso explicaria a maior efetividade do SAHA quando comparado à cisplatina, porém estudos analisando a expressão dessa proteína são necessários para essa confirmação.

A cisplatina é um agente quimioterápico utilizado em uma variedade de tumores, o seu mecanismo de ação envolve a ligação ao DNA levando à formação de adutos que causam danos ao DNA (102). No presente estudo, foi observado que o tratamento com cisplatina foi capaz de reduzir a população de CTT, tanto pela atividade enzimática de ALDH1 quanto a formação de esferas. Porém, na formação de esferas, observou-se que o tratamento não foi capaz de eliminar um subclone específico, os paraclones. A formação de holoclones, meroclones e paraclones é descrita em vários tipos de tumor (19, 107, 144-148). Os holoclones possuem um maior potencial de *stemness*, devido ao fato de serem capazes de formar tumores em xenoenxertos e por expressar vários marcadores de CTT. Os meroclones possuem as mesmas características porém de forma limitada, com um potencial replicativo menor. Enquanto o potencial proliferativo das paraclones é bem limitado, não sendo capaz de produzir tumores em modelos xenográficos (144, 147, 148). Assim, por possuir uma característica mais quiescente, a cromatina das células que formam os paraclones fica mais condensada dificultando a penetração da cisplatina, tornando-os mais resistente a esse fármaco. Adicionalmente, por possuírem uma cromatina mais condensada, os paraclones são mais sensíveis ao SAHA que a cisplatina.

A incorporação da cisplatina ao DNA ativa várias respostas celulares, tais como reparo, parada do ciclo celular, inibição da transcrição e apoptose, enfim, todos os processos que necessitam da remodelação da cromatina (149). Em consequência desse mecanismo de ação, trabalhos anteriores mostraram que o tratamento prévio com IHDAC promove uma sensibilização das células neoplásicas à cisplatina, através do descondensamento da cromatina facilitando a atuação da cisplatina (18, 82, 86). Outros estudos mostraram que o tratamento prévio com IHDAC é capaz de sensibilizar as células tumorais ao tratamento com cisplatina (82, 91, 103). A quimiorresistência à cisplatina está relacionada com a ativação de NFkappaB através de modificações na cromatina, prevenindo a acetilação e induzindo o

condensamento. A resistência à cisplatina foi evitada através do uso prévio de IHDAC e também pela inibição de membros da via do NFkappaB (18). Os nossos resultados mostraram que o tratamento prévio com IHDAC foi capaz de sensibilizar as células de CME ao tratamento com cisplatina, diminuindo o IC50 da cisplatina nas linhagens em torno de 50%. Porém quando comparado à população de CTT, o tratamento prévio não foi capaz de reduzir significativamente essa população.

CME tem sido relacionado com alta expressão de EGFR, e a ativação desse receptor está associada com a ativação de várias vias de sinalização, entre elas a via PI3K/AKT/mTOR (114, 115). Esta sinalização tem sido relacionada com diversas características que favorecem o crescimento tumoral como angiogênese, fuga da apoptose, proliferação e resistência ao tratamento convencional (112, 117). Assim o presente trabalho analisou um dos principais efetores dessa via na quimiorresistência à cisplatina, e foi observado o aumento da expressão de pS6, um dos principais efetores da via PI3K/AKT/mTOR, nas esferas de CTT após o tratamento, sugerindo assim um importante papel dessa via na resistência à cisplatina em CME.

7 CONCLUSÕES

- Foi observado que as células acinares são em geral hipoacetiladas para histona H3 quando comparadas com as células epitelial do ducto intercalar e do ducto excretor. CME de alto grau são pobremente diferenciados e são compostos principalmente por células escamosas e intermediárias e possuem altos níveis de acetilação de histona H3 (lisina 9). Os CME de baixo grau são bem diferenciados apresentando células mucosas deacetiladas combinadas com células escamosas positivas para acetil histona H3. A quantificação de ambas as populações celulares (células escamosas e mucosas) de CME revelou uma diferença estatística significativa de acetil histona H3.
- Nossos resultados mostraram que as linhagens de CME possuem CTT pela atividade enzimática de ALDH1 e por formação de esferas em baixa adesão. Adicionalmente, nós demonstramos que o tratamento com SAHA possui um grande impacto na população de CTT, melhor que cisplatina ou da combinação de SAHA com cisplatina.
- Também sugerimos que o tratamento com cisplatina induz ao acúmulo de uma subpopulação específica de CTT.
- A resistência a cisplatina pode estar relacionado com a expressão de pS6. Esses achados sugerem que IHDAC no tratamento de CME desregulando a população de CTT em CME, porém mais estudos serão necessários para ratifica-lo.

REFERÊNCIAS¹

1. Auclair PL, Goode RK, Ellis GL. Mucoepidermoid carcinoma of intraoral salivary glands. Evaluation and application of grading criteria in 143 cases. *Cancer*. 1992;69(8):2021-30.
2. Bullerdiel J, Vollrath M, Wittekind C, Caselitz J, Bartnitzke S. Mucoepidermoid tumor of the parotid gland showing a translocation (3;8)(p21;q12) and a deletion (5)(q22) as sole chromosome abnormalities. *Cancer Genet Cytogenet*. 1990;50(1):161-4.
3. Horn-Ross PL, Ljung BM, Morrow M. Environmental factors and the risk of salivary gland cancer. *Epidemiology*. 1997;8(4):414-9.
4. Swanson GM, Burns PB. Cancers of the salivary gland: workplace risks among women and men. *Ann Epidemiol*. 1997;7(6):369-74.
5. Vargas PA, Gerhard R, Araujo Filho VJ, de Castro IV. Salivary gland tumors in a Brazilian population: a retrospective study of 124 cases. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 2002;57(6):271-6.
6. Goode RK, Auclair PL, Ellis GL. Mucoepidermoid carcinoma of the major salivary glands: clinical and histopathologic analysis of 234 cases with evaluation of grading criteria. *Cancer*. 1998;82(7):1217-24.
7. Guzzo M, Andreola S, Sirizzotti G, Cantu G. Mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands: clinicopathologic review of 108 patients treated at the National Cancer Institute of Milan. *Ann Surg Oncol*. 2002;9(7):688-95.
8. Spiro RH, Huvos AG, Berk R, Strong EW. Mucoepidermoid carcinoma of salivary gland origin. A clinicopathologic study of 367 cases. *Am J Surg*. 1978;136(4):461-8.
9. Eversole LR. Mucoepidermoid carcinoma: review of 815 reported cases. *J Oral Surg*. 1970;28(7):490-4.
10. Grisanti S, Amoroso V, Buglione M, Rosati A, Gatta R, Pizzocaro C, et al. Cetuximab in the treatment of metastatic mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands: a case report and review of literature. *J Med Case Rep*. 2008;2:320.
11. Posner MR, Ervin TJ, Weichselbaum RR, Fabian RL, Miller D. Chemotherapy of advanced salivary gland neoplasms. *Cancer*. 1982;50(11):2261-4.
12. Pires FR, de Almeida OP, de Araujo VC, Kowalski LP. Prognostic factors in head and neck mucoepidermoid carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004;130(2):174-80.
13. 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;100(7):3983-8.
14. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(3):973-8.
15. Tan MJ, Luo H, Lee S, Jin FL, Yang JS, Montellier E, et al. Identification of 67 Histone Marks and Histone Lysine Crotonylation as a New Type of Histone Modification. *Cell*. 2011;146(6):1015-27.
16. Cheng L, Ramesh AV, Flesken-Nikitin A, Choi J, Nikitin AY. Mouse models for cancer stem cell research. *Toxicol Pathol*. 2010;38(1):62-71.

¹ De acordo com o Estilo Vancouver.

17. Adams A, Warner K, Nor JE. Salivary gland cancer stem cells. *Oral Oncol.* 2013;49(9):845-53.
18. Almeida LO, Abrahao AC, Rosselli-Murai LK, Giudice FS, Zagni C, Leopoldino AM, et al. NFkappaB mediates cisplatin resistance through histone modifications in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *FEBS Open Bio.* 2014;4:96-104.
19. Martins MD, Castilho RM. Histones: Controlling Tumor Signaling Circuitry. *J Carcinog Mutagen.* 2013;1(Suppl 5):1-12.
20. Chi JG. Prenatal development of human major salivary glands. Histological and immunohistochemical characteristics with reference to adult and neoplastic salivary glands. *J Korean Med Sci.* 1996;11(3):203-16.
21. Cutler LS, Gremski W. Epithelial-mesenchymal interactions in the development of salivary glands. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1991;2(1):1-12.
22. Denny PC, Ball WD, Redman RS. Salivary glands: a paradigm for diversity of gland development. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1997;8(1):51-75.
23. Du Plessis DJ. Some important features in the development, structure and function of the parotid salivary glands. *S Afr Med J.* 1957;31(31):773-81.
24. Liu F, Wang S. Molecular cues for development and regeneration of salivary glands. *Histol Histopathol.* 2014;29(3):305-12.
25. Miletich I. Introduction to salivary glands: structure, function and embryonic development. *Front Oral Biol.* 2010;14:1-20.
26. Tucker AS. Salivary gland adaptations: modification of the glands for novel uses. *Front Oral Biol.* 2010;14:21-31.
27. Teshima TH, Ianez RF, Coutinho-Camillo CM, Buim ME, Soares FA, Lourenco SV. Development of human minor salivary glands: expression of mucins according to stage of morphogenesis. *J Anat.* 2011;219(3):410-7.
28. Carvalho AL, Nishimoto IN, Califano JA, Kowalski LP. Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: a site-specific analysis of the SEER database. *Int J Cancer.* 2005;114(5):806-16.
29. Francioso F, Carinci F, Tosi L, Scapoli L, Pezzetti F, Passerella E, et al. Identification of differentially expressed genes in human salivary gland tumors by DNA microarrays. *Mol Cancer Ther.* 2002;1(7):533-8.
30. Koivunen P, Suutala L, Schorsch I, Jokinen K, Alho OP. Malignant epithelial salivary gland tumors in northern Finland: incidence and clinical characteristics. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2002;259(3):146-9.
31. Ioka A, Tsukuma H, Ajiki W, Oshima A. Trends in head and neck cancer incidence in Japan during 1965-1999. *Jpn J Clin Oncol.* 2005;35(1):45-7.
32. Eveson JW, Cawson RA. Salivary-Gland Tumors - a Review of 2410 Cases with Particular Reference to Histological Types, Site, Age and Sex Distribution. *Journal of Pathology.* 1985;146(1):51-8.
33. Waldron CA, el-Mofty SK, Gnepp DR. Tumors of the intraoral minor salivary glands: a demographic and histologic study of 426 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1988;66(3):323-33.
34. Stennert E, Guntinas-Lichius O, Klussmann JP, Arnold G. Histopathology of pleomorphic adenoma in the parotid gland: a prospective unselected series of 100 cases. *Laryngoscope.* 2001;111(12):2195-200.
35. Jaso J, Malhotra R. Adenoid cystic carcinoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135(4):511-5.
36. Spiro RH, Huvos AG, Strong EW. Adenoid cystic carcinoma of salivary origin. A clinicopathologic study of 242 cases. *Am J Surg.* 1974;128(4):512-20.

37. Kokemueller H, Eckardt A, Brachvogel P, Hausamen JE. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck--a 20 years experience. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004;33(1):25-31.
38. Bradley PJ. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: a review. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004;12(2):127-32.
39. Stewart FW, Foote FW, Becker WF. Muco-Epidermoid Tumors of Salivary Glands. *Ann Surg.* 1945;122(5):820-44.
40. Auvinen A, Hietanen M, Luukkonen R, Koskela RS. Brain tumors and salivary gland cancers among cellular telephone users. *Epidemiology.* 2002;13(3):356-9.
41. Castrilli G, Fabiano A, La Torre G, Marigo L, Piantelli C, Perfetti G, et al. Expression of hMSH2 and hMLH1 proteins of the human DNA mismatch repair system in salivary gland tumors. *J Oral Pathol Med.* 2002;31(4):234-8.
42. Horsman DE, Berean K, Durham JS. Translocation (11;19)(q21;p13.1) in mucoepidermoid carcinoma of salivary gland. *Cancer Genet Cytogenet.* 1995;80(2):165-6.
43. O'Neill ID. t(11;19) translocation and CRTC1-MAML2 fusion oncogene in mucoepidermoid carcinoma. *Oral Oncol.* 2009;45(1):2-9.
44. Tonon G, Modi S, Wu L, Kubo A, Coxon AB, Komiyama T, et al. t(11;19)(q21;p13) translocation in mucoepidermoid carcinoma creates a novel fusion product that disrupts a Notch signaling pathway. *Nat Genet.* 2003;33(2):208-13.
45. Sonobe S, Inoue K, Tachibana S, Shiojiri M, Maeda T, Nakanishi N, et al. A case of pulmonary mucoepidermoid carcinoma responding to carboplatin and paclitaxel. *Jpn J Clin Oncol.* 2014;44(5):493-6.
46. Houghton J, Morozov A, Smirnova I, Wang TC. Stem cells and cancer. *Semin Cancer Biol.* 2007;17(3):191-203.
47. Huang EH, Heidt DG, Li CW, Simeone DM. Cancer stem cells: a new paradigm for understanding tumor progression and therapeutic resistance. *Surgery.* 2007;141(4):415-9.
48. Johnsen HE, Kjeldsen MK, Urup T, Fogd K, Pilgaard L, Boegsted M, et al. Cancer stem cells and the cellular hierarchy in haematological malignancies. *Eur J Cancer.* 2009;45 Suppl 1:194-201.
49. Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. *N Engl J Med.* 2006;355(12):1253-61.
50. Soltanian S, Matin MM. Cancer stem cells and cancer therapy. *Tumour Biol.* 2011;32(3):425-40.
51. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* 2005;65(23):10946-51.
52. Kong DS. Cancer stem cells in brain tumors and their lineage hierarchy. *Int J Stem Cells.* 2012;5(1):12-5.
53. Matsuda S, Yan T, Mizutani A, Sota T, Hiramoto Y, Prieto-Vila M, et al. Cancer stem cells maintain a hierarchy of differentiation by creating their niche. *Int J Cancer.* 2014;135(1):27-36.
54. Venere M, Fine HA, Dirks PB, Rich JN. Cancer stem cells in gliomas: identifying and understanding the apex cell in cancer's hierarchy. *Glia.* 2011;59(8):1148-54.
55. 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;32(9):1195-201.

56. 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;1(5):555-67.
57. Till JE, Mc CE. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*. 1961;14:213-22.
58. Yamada T, Abei M, Danjoh I, Shiota R, Yamashita T, Hyodo I, et al. Identification of a unique hepatocellular carcinoma line, Li-7, with CD13(+) cancer stem cells hierarchy and population change upon its differentiation during culture and effects of sorafenib. *BMC Cancer*. 2015;15:260.
59. Dontu G, Al-Hajj M, Abdallah WM, Clarke MF, Wicha MS. Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif*. 2003;36 Suppl 1:59-72.
60. Jordan CT. Searching for leukemia stem cells--not yet the end of the road? *Cancer Cell*. 2006;10(4):253-4.
61. Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*. 2010;29(34):4741-51.
62. 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;13(4-5):109-18.
63. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008;133(4):704-15.
64. Mannelli G, Gallo O. Cancer stem cells hypothesis and stem cells in head and neck cancers. *Cancer Treat Rev*. 2012;38(5):515-39.
65. Szabo AZ, Fong S, Yue L, Zhang K, Strachan LR, Scalapino K, et al. The CD44+ ALDH+ population of human keratinocytes is enriched for epidermal stem cells with long-term repopulating ability. *Stem Cells*. 2013;31(4):786-99.
66. Donnenberg VS, Donnenberg AD. Multiple drug resistance in cancer revisited: the cancer stem cell hypothesis. *J Clin Pharmacol*. 2005;45(8):872-7.
67. Cabarcas SM, Mathews LA, Farrar WL. The cancer stem cell niche--there goes the neighborhood? *Int J Cancer*. 2011;129(10):2315-27.
68. Seidel S, Garvalov BK, Wirta V, von Stechow L, Schanzer A, Meletis K, et al. A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 alpha. *Brain*. 2010;133(Pt 4):983-95.
69. Conley SJ, Gheordunescu E, Kakarala P, Newman B, Korkaya H, Heath AN, et al. Antiangiogenic agents increase breast cancer stem cells via the generation of tumor hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(8):2784-9.
70. Morrison R, Schleicher SM, Sun Y, Niermann KJ, Kim S, Spratt DE, et al. Targeting the mechanisms of resistance to chemotherapy and radiotherapy with the cancer stem cell hypothesis. *J Oncol*. 2011;2011:941876.
71. Bauer JA, Kumar B, Cordell KG, Prince ME, Tran HH, Wolf GT, et al. Targeting apoptosis to overcome cisplatin resistance: a translational study in head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007;69(2 Suppl):S106-8.
72. Massard C, Deutsch E, Soria JC. Tumour stem cell-targeted treatment: elimination or differentiation. *Ann Oncol*. 2006;17(11):1620-4.
73. Butler LM, Zhou X, Xu WS, Scher HI, Rifkind RA, Marks PA, et al. The histone deacetylase inhibitor SAHA arrests cancer cell growth, up-regulates thioredoxin-binding protein-2, and down-regulates thioredoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(18):11700-5.

74. Giudice FS, Pinto DS, Jr., Nor JE, Squarize CH, Castilho RM. Inhibition of histone deacetylase impacts cancer stem cells and induces epithelial-mesenchyme transition of head and neck cancer. *PLoS One*. 2013;8(3):e58672.
75. Carew JS, Giles FJ, Nawrocki ST. Histone deacetylase inhibitors: Mechanisms of cell death and promise in combination cancer therapy. *Cancer Letters*. 2008;269(1):7-17.
76. Carey N, La Thangue NB. Histone deacetylase inhibitors: gathering pace. *Current Opinion in Pharmacology*. 2006;6(4):369-75.
77. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007;128(4):693-705.
78. Le JM, Squarize CH, Castilho RM. Histone modifications: Targeting head and neck cancer stem cells. *World J Stem Cells*. 2014;6(5):511-25.
79. Zhou VW, Goren A, Bernstein BE. Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nat Rev Genet*. 2011;12(1):7-18.
80. Le Beyec J, Xu R, Lee SY, Nelson CM, Rizki A, Alcaraz J, et al. Cell shape regulates global histone acetylation in human mammary epithelial cells. *Exp Cell Res*. 2007;313(14):3066-75.
81. Chen S, Zhao Y, Gou WF, Zhao S, Takano Y, Zheng HC. The anti-tumor effects and molecular mechanisms of suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) on the aggressive phenotypes of ovarian carcinoma cells. *PLoS One*. 2013;8(11):e79781.
82. Ong PS, Wang XQ, Lin HS, Chan SY, Ho PC. Synergistic effects of suberoylanilide hydroxamic acid combined with cisplatin causing cell cycle arrest independent apoptosis in platinum-resistant ovarian cancer cells. *Int J Oncol*. 2012;40(5):1705-13.
83. Lee JH, Jeong EG, Choi MC, Kim SH, Park JH, Song SH, et al. Inhibition of histone deacetylase 10 induces thioredoxin-interacting protein and causes accumulation of reactive oxygen species in SNU-620 human gastric cancer cells. *Mol Cells*. 2010;30(2):107-12.
84. Jin KL, Park JY, Noh EJ, Hoe KL, Lee JH, Kim JH, et al. The effect of combined treatment with cisplatin and histone deacetylase inhibitors on HeLa cells. *J Gynecol Oncol*. 2010;21(4):262-8.
85. Kurayoshi M, Oue N, Yamamoto H, Kishida M, Inoue A, Asahara T, et al. Expression of Wnt-5a is correlated with aggressiveness of gastric cancer by stimulating cell migration and invasion. *Cancer Res*. 2006;66(21):10439-48.
86. Lillehammer T, Engesaeter BO, Prasmickaite L, Maelandsmo GM, Fodstad O, Engebraaten O. Combined treatment with Ad-hTRAIL and DTIC or SAHA is associated with increased mitochondrial-mediated apoptosis in human melanoma cell lines. *J Gene Med*. 2007;9(6):440-51.
87. Karasawa Y, Okisaka S. Inhibition of histone deacetylation by butyrate induces morphological changes in Y79 retinoblastoma cells. *Jpn J Ophthalmol*. 2004;48(6):542-51.
88. Zhang X, Zhang J, Tong L, Luo Y, Su M, Zang Y, et al. The discovery of colchicine-SAHA hybrids as a new class of antitumor agents. *Bioorg Med Chem*. 2013;21(11):3240-4.
89. Chang H, Jeung HC, Jung JJ, Kim TS, Rha SY, Chung HC. Identification of genes associated with chemosensitivity to SAHA/taxane combination treatment in taxane-resistant breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;125(1):55-63.
90. Marks PA. Discovery and development of SAHA as an anticancer agent. *Oncogene*. 2007;26(9):1351-6.

91. Suzuki M, Endo M, Shinohara F, Echigo S, Rikiishi H. Enhancement of cisplatin cytotoxicity by SAHA involves endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2009;64(6):1115-22.
92. Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T. Inhibition of Cell Division in *Escherichia Coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature*. 1965;205:698-9.
93. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*. 2003;22(47):7265-79.
94. Rosenberg B, VanCamp L, Trosko JE, Mansour VH. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature*. 1969;222(5191):385-6.
95. Harrap KR. Preclinical studies identifying carboplatin as a viable cisplatin alternative. *Cancer Treat Rev*. 1985;12 Suppl A:21-33.
96. Aabo K, Adams M, Adnitt P, Alberts DS, Athanazziou A, Barley V, et al. Chemotherapy in advanced ovarian cancer: four systematic meta-analyses of individual patient data from 37 randomized trials. Advanced Ovarian Cancer Trialists' Group. *Br J Cancer*. 1998;78(11):1479-87.
97. Machover D, Diaz-Rubio E, de Gramont A, Schilf A, Gastiaburu JJ, Brienza S, et al. Two consecutive phase II studies of oxaliplatin (L-OHP) for treatment of patients with advanced colorectal carcinoma who were resistant to previous treatment with fluoropyrimidines. *Ann Oncol*. 1996;7(1):95-8.
98. McKeage MJ. Satraplatin in hormone-refractory prostate cancer and other tumour types: pharmacological properties and clinical evaluation. *Drugs*. 2007;67(6):859-69.
99. Levi F, Misset JL, Brienza S, Adam R, Metzger G, Itzakhi M, et al. A chronopharmacologic phase II clinical trial with 5-fluorouracil, folinic acid, and oxaliplatin using an ambulatory multichannel programmable pump. High antitumor effectiveness against metastatic colorectal cancer. *Cancer*. 1992;69(4):893-900.
100. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(8):573-84.
101. Chaney SG, Campbell SL, Temple B, Bassett E, Wu Y, Faldu M. Protein interactions with platinum-DNA adducts: from structure to function. *J Inorg Biochem*. 2004;98(10):1551-9.
102. Nilsson C, Roberg K, Grafstrom RC, Ollinger K. Intrinsic differences in cisplatin sensitivity of head and neck cancer cell lines: Correlation to lysosomal pH. *Head Neck*. 2010;32(9):1185-94.
103. Kewitz S, Bernig T, Staeger MS. Histone deacetylase inhibition restores cisplatin sensitivity of Hodgkin's lymphoma cells. *Leuk Res*. 2012;36(6):773-8.
104. Warner KA, Adams A, Bernardi L, Nor C, Finkel KA, Zhang Z, et al. Characterization of tumorigenic cell lines from the recurrence and lymph node metastasis of a human salivary mucoepidermoid carcinoma. *Oral Oncol*. 2013;49(11):1059-66.
105. Fonseca FP, de Andrade BA, Rangel AL, Della Coletta R, Lopes MA, de Almeida OP, et al. Tissue microarray is a reliable method for immunohistochemical analysis of pleomorphic adenoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2014;117(1):81-8.
106. Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW, et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(24):10158-63.
107. Harper LJ, Piper K, Common J, Fortune F, Mackenzie IC. Stem cell patterns in cell lines derived from head and neck squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2007;36(10):594-603.

108. Huang EH, Hynes MJ, Zhang T, Ginestier C, Dontu G, Appelman H, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res.* 2009;69(8):3382-9.
109. Barrandon Y, Green H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(8):2302-6.
110. Gui CY, Ngo L, Xu WS, Richon VM, Marks PA. Histone deacetylase (HDAC) inhibitor activation of p21WAF1 involves changes in promoter-associated proteins, including HDAC1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(5):1241-6.
111. Komatsu S, Moriya S, Che XF, Yokoyama T, Kohno N, Miyazawa K. Combined treatment with SAHA, bortezomib, and clarithromycin for concomitant targeting of aggresome formation and intracellular proteolytic pathways enhances ER stress-mediated cell death in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;437(1):41-7.
112. Annovazzi L, Mellai M, Caldera V, Valente G, Tessitore L, Schiffer D. mTOR, S6 and AKT expression in relation to proliferation and apoptosis/autophagy in glioma. *Anticancer Res.* 2009;29(8):3087-94.
113. Buck E, Eyzaguirre A, Brown E, Petti F, McCormack S, Haley JD, et al. Rapamycin synergizes with the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib in non-small-cell lung, pancreatic, colon, and breast tumors. *Mol Cancer Ther.* 2006;5(11):2676-84.
114. Gibbons MD, Manne U, Carroll WR, Peters GE, Weiss HL, Grizzle WE. Molecular differences in mucoepidermoid carcinoma and adenoid cystic carcinoma of the major salivary glands. *Laryngoscope.* 2001;111(8):1373-8.
115. Lujan B, Hakim S, Moyano S, Nadal A, Caballero M, Diaz A, et al. Activation of the EGFR/ERK pathway in high-grade mucoepidermoid carcinomas of the salivary glands. *Br J Cancer.* 2010;103(4):510-6.
116. Matheny RW, Jr., Adamo ML. Effects of PI3K catalytic subunit and Akt isoform deficiency on mTOR and p70S6K activation in myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;390(2):252-7.
117. Peng DJ, Wang J, Zhou JY, Wu GS. Role of the Akt/mTOR survival pathway in cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;394(3):600-5.
118. Wang M, Liu ZM, Li XC, Yao YT, Yin ZX. Activation of ERK1/2 and Akt is associated with cisplatin resistance in human lung cancer cells. *J Chemother.* 2013;25(3):162-9.
119. Weber A, Langhanki L, Schutz A, Gerstner A, Bootz F, Wittekind C, et al. Expression profiles of p53, p63, and p73 in benign salivary gland tumors. *Virchows Arch.* 2002;441(5):428-36.
120. Xin W, Paulino AF. Prognostic factors in malignant mixed tumors of the salivary gland: correlation of immunohistochemical markers with histologic classification. *Ann Diagn Pathol.* 2002;6(4):205-10.
121. Lagha A, Chraiet N, Ayadi M, Krime S, Allani B, Rifi H, et al. Systemic therapy in the management of metastatic or advanced salivary gland cancers. *Head Neck Oncol.* 2012;4:19.
122. Licitra L, Cavina R, Grandi C, Palma SD, Guzzo M, Demicheli R, et al. Cisplatin, doxorubicin and cyclophosphamide in advanced salivary gland carcinoma. A phase II trial of 22 patients. *Ann Oncol.* 1996;7(6):640-2.
123. Licitra L, Marchini S, Spinazze S, Rossi A, Rocca A, Grandi C, et al. Cisplatin in advanced salivary gland carcinoma. A phase II study of 25 patients. *Cancer.* 1991;68(9):1874-7.

124. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
125. Burrell RA, McGranahan N, Bartek J, Swanton C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature*. 2013;501(7467):338-45.
126. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994;367(6464):645-8.
127. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*. 2007;1(3):313-23.
128. Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*. 2007;67(3):1030-7.
129. Li C, Lee CJ, Simeone DM. Identification of human pancreatic cancer stem cells. *Methods Mol Biol*. 2009;568:161-73.
130. Beier D, Hau P, Proescholdt M, Lohmeier A, Wischhusen J, Oefner PJ, et al. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res*. 2007;67(9):4010-5.
131. Baba T, Convery PA, Matsumura N, Whitaker RS, Kondoh E, Perry T, et al. Epigenetic regulation of CD133 and tumorigenicity of CD133+ ovarian cancer cells. *Oncogene*. 2009;28(2):209-18.
132. Yoshida A. Molecular genetics of human aldehyde dehydrogenase. *Pharmacogenetics*. 1992;2(4):139-47.
133. Lindahl R. Aldehyde dehydrogenases and their role in carcinogenesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1992;27(4-5):283-335.
134. Visus C, Ito D, Amoscato A, Maciejewska-Franczak M, Abdelsalem A, Dhir R, et al. Identification of human aldehyde dehydrogenase 1 family member A1 as a novel CD8+ T-cell-defined tumor antigen in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res*. 2007;67(21):10538-45.
135. Ma S, Chan KW, Lee TK, Tang KH, Wo JY, Zheng BJ, et al. Aldehyde dehydrogenase discriminates the CD133 liver cancer stem cell populations. *Mol Cancer Res*. 2008;6(7):1146-53.
136. Jiang F, Qiu Q, Khanna A, Todd NW, Deepak J, Xing L, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Mol Cancer Res*. 2009;7(3):330-8.
137. Dokmanovic M, Marks PA. Prospects: histone deacetylase inhibitors. *J Cell Biochem*. 2005;96(2):293-304.
138. Johnstone RW, Licht JD. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: is transcription the primary target? *Cancer Cell*. 2003;4(1):13-8.
139. Bhalla KN. Epigenetic and chromatin modifiers as targeted therapy of hematologic malignancies. *J Clin Oncol*. 2005;23(17):3971-93.
140. Rosato RR, Almenara JA, Dai Y, Grant S. Simultaneous activation of the intrinsic and extrinsic pathways by histone deacetylase (HDAC) inhibitors and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) synergistically induces mitochondrial damage and apoptosis in human leukemia cells. *Mol Cancer Ther*. 2003;2(12):1273-84.
141. Shao Y, Gao Z, Marks PA, Jiang X. Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(52):18030-5.
142. Yamanaka K, Rocchi P, Miyake H, Fazli L, Vessella B, Zangemeister-Wittke U, et al. A novel antisense oligonucleotide inhibiting several antiapoptotic Bcl-2 family members

induces apoptosis and enhances chemosensitivity in androgen-independent human prostate cancer PC3 cells. *Mol Cancer Ther.* 2005;4(11):1689-98.

143. Bereshchenko OR, Gu W, Dalla-Favera R. Acetylation inactivates the transcriptional repressor BCL6. *Nat Genet.* 2002;32(4):606-13.

144. Locke M, Heywood M, Fawell S, Mackenzie IC. Retention of intrinsic stem cell hierarchies in carcinoma-derived cell lines. *Cancer Res.* 2005;65(19):8944-50.

145. Boon-Unge K, Yu Q, Zou T, Zhou A, Govitrapong P, Zhou J. Emetine regulates the alternative splicing of Bcl-x through a protein phosphatase 1-dependent mechanism. *Chem Biol.* 2007;14(12):1386-92.

146. Tan L, Sui X, Deng H, Ding M. Holoclone forming cells from pancreatic cancer cells enrich tumor initiating cells and represent a novel model for study of cancer stem cells. *PLoS One.* 2011;6(8):e23383.

147. Wei C, Guomin W, Yujun L, Ruizhe Q. Cancer stem-like cells in human prostate carcinoma cells DU145: the seeds of the cell line? *Cancer Biol Ther.* 2007;6(5):763-8.

148. Li H, Chen X, Calhoun-Davis T, Claypool K, Tang DG. PC3 human prostate carcinoma cell holoclones contain self-renewing tumor-initiating cells. *Cancer Res.* 2008;68(6):1820-5.

149. Wang D, Lippard SJ. Cisplatin-induced post-translational modification of histones H3 and H4. *J Biol Chem.* 2004;279(20):20622-5.

ANEXO A- Parecer Comitê de Ética em Animais

M

Date: Friday, May 8, 2015 11:31:22 AM

PI: Squarize , Cristiane

ID: PRO00004829

Status: Protocol Approved

Expiration Date: 10/17/2017

Print Close

General Information

Protocol Title:
Developing murine models of head and neck cancer

Explain in non-scientific terms the long-term or overall scientific goals of the proposed work (the ultimate question this project will address).
Head and Neck tumors are very aggressive tumors that poorly respond to therapy. Only 50% of the patients treated survive during the 5 first years after treatment. Often it disseminates to distant sites during a process called metastasis. The process of head and neck tumor formation, progression and dissemination is poorly understood. Our overall or long term goal is to identify novel therapeutic target that could result on improvement of therapy and possibly better outcome of head and neck patients.

Explain in non-scientific terms the long-term or overall scientific objectives of the proposed work, should be specific to the proposed work.
Our overall scientific objects is to investigate how genetic alterations, such as alterations on the PI3K pathway, contribute to head and neck tumor formation, progression, and response to therapy.

Explain in non-scientific terms the ways the proposed animal use might benefit human or animal health, the advancement of knowledge, or the good of society.
There is a urgent need to develop novel approaches to treat head and neck cancer. In order to advance treatment of this disease it is necessary to better understand how head and neck tumors develop and progress. The study of individual molecules and its contribution to tumor formation and progression will contribute to the identification of novel therapeutic targets that may be used to develop novel clinical intervention strategies to treat head and neck cancer, as well as other cancers that use this same molecular pathways.

Explain why animals must be used to accomplish your proposed work. Further explain why cell or tissue culture, isolated organ preparations, or computer simulations cannot be used.
The formation and dissemination of tumors cannot be recapitulated in a isolated system such as cell culture. The tumor is formed by a complex interaction of tumor cells and its microenvironment which originates a necessary 3 dimensional tumor growth and dissemination to distant organs. These crosstalk and interactions are essential to the understanding of cancer pathophysiology and the identification of novel targets to therapy.

Indicate the types of animal use proposed in the application. (Check all that apply)

☒ **Basic / Applied Research**

☐ Field Research

☐ Instruction or Training

☐ Service (breeding, core facility)

☐ Stem Cell Research

For technical issues, contact the ITS Service Center:
- Phone: (734) 764-HELP (4-4357), between 7 AM and 6 PM, Monday through Friday
- Email: 4HELP@umich.edu