LETÍCIA DRUMOND DE ABREU GUIMARÃES

**Entinostat sensibiliza e potencializa o efeito terapêutico da Cisplatina em
Carcinoma Adenoide Cístico de Glândulas Salivares: estudo em modelos de
xenoenxerto derivado do paciente (PDX)**

São Paulo

2020

LETÍCIA DRUMOND DE ABREU GUIMARÃES

**Entinostat sensibiliza e potencializa o efeito terapêutico da Cisplatina em
Carcinoma Adenoide Cístico de Glândulas Salivares: estudo em modelos de
xenoenxerto derivado do paciente (PDX)**

Versão Corrigida

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

Área de Concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais

Orientador: Prof. Dr Décio dos Santos Pinto Júnior

São Paulo

2020

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

Guimarães, Letícia Drumond de Abreu.

Entinostat sensibiliza e potencializa o efeito terapêutico da Cisplatina em Carcinoma Adenoide Cístico de Glândulas Salivares: estudo em modelos de xenoenxerto derivado do paciente (PDX) / Letícia Drumond de Abreu Guimarães; orientador Décio dos Santos Pinto Júnior. -- São Paulo, 2020.

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

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Carcinoma Adenoide Cístico. 2. Inibidoras de Histona Desacetilases. 3. Terapia combinada. 4. Tratamento farmacológico. 5. Epigenoma. 6. Biomarcadores. I. Pinto Júnior, Décio dos Santos. II. Título.

Guimarães LDA. Entinostat sensibiliza e potencializa o efeito terapêutico da Cisplatina em Carcinoma Adenoide Cístico de Glândulas Salivares: estudo em modelos de xenoenxerto derivado do paciente (PDX). Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada em: 17/07/2020

Banca examinadora

Prof(a). Dr(a). Rogério Moraes Castilho

Instituição: Universidade de Michigan

Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Suzana Orsini M de Sousa

Instituição: Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Bruno Sedassari

Instituição: Uninove

Julgamento: Aprovada

Dedico esta tese aos meus pais, Osmany e Mariluce, pelas palavras de conforto nas horas mais difíceis e por apoiar minha caminhada. Ao meu irmão, Gustavo, pelo exemplo.

AGRADECIMENTOS

À Deus que me deu força e capacidade para realização dos meus sonhos.

Aos meus pais pela dedicação, sem vocês não chegaria até aqui.

Ao meu irmão por ser meu companheiro.

À CAPES pela bolsa de estudo e de doutorado sanduíche. “O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

Aos professores Rogério Castilho e Cristiane Squarize pelo aceite e por permitirem o desenvolvimento deste estudo. Vocês permitiram que este trabalho tivesse o valor agora observado.

A Universidade de Michigan por autorizar e aceitar o meu acesso à instituição para a realização do estudo.

Ao Departamento de Estomatologia da FOUSP e Departamento de Periodontia e Medicina Oral da UMich por me receberem tão bem.

Ao meu orientador prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Junior pelo ensinamento e apoio durante minha trajetória. Obrigada pelo carinho durante esses anos de minha jornada!

Ao meu co orientador Rogério Moraes Castilho pela paciência, ensinamentos, e por ser exemplo de pesquisador. É gratificante trabalhar com o senhor!

À todos os professores do departamento, aprendi muito com vocês.

Ao aceite da banca, obrigada pelas considerações. Serão muito úteis para a minha conclusão.

Aos amigos da sala VIP, em especial Stephanie e Rodrigo, muito obrigada pela ajuda e do dia-a-dia mais divertido.

Ao Douglas, Priscilla e Lucyene, amigos que a FOUSP me deu, obrigada por me motivarem fazer o período de estágio de doutorado sanduíche.

Aos amigos que fiz na UMich, Letícia, Gabriel, Kellen, Liana, Carlos, Darcy, Ericka, Gabriell, Marisol, Anusha, por sempre tirarem minhas dúvidas em relação ao laboratório e por permitir a conclusão deste estudo.

Aos companheiros e amigos de Ann Arbor, Letícia, Mariana, Brenda, Camila, Nathalia e Marcos por estarem sempre presentes e por não medirem esforços em poder me ajudar.

Aos companheiros do almoço por deixar o momento mais leve.

À todos amigos do departamento da FOUSP, pela amizade e por me dar força.

Aos companheiros de laboratório, Juvani, Elisa e Adriana, e aos colegas da secretaria e da pós Graduação Cátia e Alessandra pela ajuda e apoio.

À todos meus familiares e amigos que ficaram na torcida para mais esta conquista em minha vida.

RESUMO

Guimarães LDA. Entinostat sensibiliza e potencializa o efeito terapêutico da Cisplatina em Carcinoma Adenoide Cístico de Glândulas Salivares: estudo em modelos de xenoenxerto derivado do paciente (PDX) [tese]. São Paulo. Universidade de São Paulo. Faculdade de Odontologia 2020. Versão Corrigida.

O Carcinoma Adenoide Cístico (CAC) de glândulas salivares é caracterizado por potencial de crescimento lento e metastático, muitas das vezes resistente à quimioterapia. Além disso, verificaram recentemente que NOTCH1 e MYB mutados são sugestivos de mau prognóstico. Por isso, o objetivo do presente estudo é verificar a eficiência de um novo inibidor de histona desacetilase (iHDAC), o Entinostat, em Pacientes Xenoenxertos Derivados (PDX) de CAC de glândulas salivares (ACCx9, ACC5M1, ACCx6). Os modelos PDX foram divididos em Controle, Entinostat, Cisplatina e Entinostat combinada a Cisplatina e a inibição do crescimento tumoral (ICT) foi calculada para cada amostras e todas foram processadas para expressão gênica usando Nanostring e marcadores principais usando imunohistoquímica/imunofluorescência. Todos responderam à terapia combinada de Entinostat/Cisplatina e o ICT observado foi 106%, 63% e 38% para ACCx9, ACC5M1 e ACCx6, respectivamente. Além disso, descobrimos que os tumores que apresentaram melhor resposta à terapia apresentaram baixa expressão de Ki-67, p16^{ink4a}, γH2AX, NFκB, p300, DNMT1 e regulação positiva da caspase3, H3K9, H4K5, H4K8, H4K12, H4K16 e acetil-p53. A expressão reduzida de NGF, NGFR e DLL1 foram associadas a uma melhor resposta à terapia, enquanto altos níveis de MYB, senescência celular e metilação de histonas foram associados a uma resposta reduzida. Portanto, Entinostat sensibiliza e potencializa o efeito terapêutico da Cisplatina no CAC de glândulas salivares inibindo genes associados às modificações de cromatina e ratifica ser uma terapia promissora, porém age de forma distinta devido a heterogeneidade fenotípica e morfológica do CAC.

Palavras-chave: Carcinoma Adenoide Cístico. Inibidores de Histona Desacetilases. Terapia Combinada. Tratamento com Drogras. Epigenoma. Biomarcadores Tumorais.

ABSTRACT

Guimarães LDA. Entinostat sensitizes and potentiates the therapeutic effect of Cisplatin in Adenoid Cystic Carcinoma from Salivary Glands: study in patient-derived xenograft (PDX) models [thesis]. São Paulo. Universidade de São Paulo. Faculdade de Odontologia;2020. Versão Corrigida.

Adenoid Cystic Carcinoma (CAC) from salivary glands is characterized by slow-growing and metastatic potential, often resistant to chemotherapy. In addition, they recently found that NOTCH1 and MYB mutated are suggestive of poor prognosis. Therefore, the aim of the present study is to verify the efficiency of a new histone deacetylase inhibitor (iHDAC), Entinostat, in Patients Derivative Xenografts (PDX) from salivary gland CAC (ACCx9, ACC5M1, ACCx6). The PDX models were divided into Control, Entinostat, Cisplatin and Entinostat combined with Cisplatin and tumor growth inhibition (TGI) was calculated for each samples and all were processed for gene expression using Nanostring and main markers using immunohistochemistry / immunofluorescence. All responded to the combined Entinostat / Cisplatin therapy and the observed TGI was 106%, 63% and 38% for ACCx9, ACC5M1 and ACCx6, respectively. Furthermore, we found that tumors presenting better response to therapy showed low expression of Ki-67, p16ink4a, γH2AX, NFκB, p300, DNMT1 and regulation of caspase3, H3K9, H4K5, H4K8, H4K12, H4K16 and acetyl-p53. The upreduced expression of NGF, NGFR and DLL1 were associated with a better response to therapy, while high levels of MYB, cellular senescence and histone methylation were associated with a reduced response. Therefore, Entinostat sensitizes and potentiates the therapeutic effect of Cisplatin in the CAC of salivary glands by inhibiting genes associated with chromatin modifications and confirms that it is a promising therapy but acts differently due to the phenotypic and morphological heterogeneity of CAC.

Keywords: Adenoid Cystic Carcinoma. Histone Deacetylase Inhibitors. Combined Therapy. Drug Therapy. Epigenome. Tumor Biomarkers

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1 - Processo de carcinogênese oral	22
Figura 1.2 - O efeito dos iHDACs na acetilação e deacetilação de histonas	23
Figura 2.1 - Enzimas/ Lisinas que medeiam as acetilações de histonas	51
Figura 2.2 - Partícula de nucleossomo formada por um octâmero de proteínas de 2 moléculas de cada uma das 4 histonas	51
Figura 2.3 - Mutações de genes reguladores da via de remodelação cromática.....	52
Figura 2.4 - Estruturas das enzimas de HDAC.....	55
Figura 4.1- Metodologia utilizada: A) Proteínas utilizadas nas reações de IHC/IF; B) Esquema da metodologia utilizada.....	63
Figura 5.1 – Resposta do CAC frente as terapias utilizadas A) Através da Inibição do Crescimento Tumoral; B) Através do perfil morfológico em Hematoxilina e Eosina.....	66
Figura 5.2 – Resposta frente as terapias em relação ao fenótipo: proliferação celular, dano do DNA e apoptose. A) Ki67; B) Mitoses atípicas; C) γH2AX; D) caspase3.....	68
Figura 5.3 - Mecanismo de ação epigenética frente as terapias utilizadas em relação a resistência tumoral e senescência celular. A) CBP/p300; B) NFκB; C) p16 ^{ink4a} ;D)FOXO4.....	70
Figura 5.4 -Efeito do iHDAC (Entinostat) nos CACs primário e metastático. A) H3K9ac, B) DNMT1.....	72
Figura 5.5 - Acetilação resultante do iHDAC (Entinostat) no CAC primário expressa em diferentes lisinas em comparação ao CAC metastático. A) H4K5ac; B) H4K8ac; C) H4K12ac; D) H4K16ac.....	74
Figura 5.6 - Diferença resposta entre os CACs primário e metastático em relação a posição da acetilação da histona	75

Figura 5.7 – Mecanismo de ação do iHDAC (Entinostat) em outras proteínas	76
Figura 5.8 – Diferentes vias ativadas entre os CACs primários e metastáticos com as terapias utilizadas. A) Diferença entre a soma dos escores do total de genes relacionados as vias de sinalização em relação as terapias B) CAC primário apresenta uma característica distinta em comparação com o CAC metastático.....	78
Figura 5.9 – Análise das expressões dos genes entre a combinação da terapia de Entinostat e Cisplatina comparada com o controle nas amostras de CAC. A) Heatmap gráfico das expressões de 770 genes analisados nas 3 amostras de CAC comparado entre a terapia combinada (Enti-Cis) e Controle B) Draw gráfico representando os top genes comuns desregulados e regulados entre a análise da terapia combinada e o controle.....	80
Figura 5.10 – Lista dos top genes desregulados e regulados com a terapia combinada em comparação com o controle	81
Figura 5.11 – Marcadores alvo no CAC para a terapia combinada Entinostat e Cisplatina com melhor resposta terapêutica	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	-	Frequentes alterações moleculares no CAC	23
Tabela 2.2	-	Dados variáveis do prognóstico do CAC	42
Tabela 4.1	-	Características dos anticorpos utilizados nos ensaios de Imunohistoquímica e Imunofluorescência	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNOR	Região Nuclear Argirofílica
ATM	Ataxia-Telangiectasia quinase
c-KIT	Receptor do fator de célula-tronca
CAC	Carcinoma Adenóide Cístico
EGFR	Fator de Crescimento Epidérmico humano
EN1	Fator de Transcrição Engrailed Homeobox 1
FGFR1	Receptor 1 do fator de crescimento de fibroblastos
FISH/CISH	Hibridização in situ fluorescente/ cromogênica
FOXO4	Forkhead box 04
H3ac	Acetil Histona 3
H4ac	Acetil Histona 4
HAT	Histona acetiltransferase
HDAC	Histona deacetilase
HGF	Fator de Crescimento de Hepatócitos
ICAM-1	Células intercalares a molécula de adesão-1
IF	Imunofluorescência
IGF	Fator de Crescimento semelhante a insulina
IHC	Imunohistoquímica
iHDAC	Inibidor de Histona deacetilase
ILK	Quinase ligada à integrina
MYB	Mieoloblastose aviária-v-myb
NFkB	Fator nuclear kB
NGF	Fator de crescimento do sistema nervoso

NMGS	Neoplasias Malignas de Glândulas Salivares
PCNA	Antígeno nuclear de célula em proliferação
PM	Perfil molecular
SAHA	Vorinostat
SOX4/SOX10	Região determinante do sexo Y- box4 e 10
	Receptorneutrófico da tirosina quinase associada à
TrKC/NTRK3	neurogênese
VEGFR	Receptor do fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1 CARCINOMA ADENOIDE CÍSTICO (CAC)	25
2.1.1 Introdução Geral e Epidemiologia	25
2.1.2 Características Clínicas	26
2.1.3 Etiopatologia, Características Histológicas e Diagnóstico	26
2.1.4 Marcadores Moleculares	29
2.1.4.1 Marcadores de proliferação baseados no ciclo celular	30
2.1.4.2 Alterações genéticas e epigenéticas	30
2.1.4.3 Proteínas receptoras e ligantes do fator de crescimento	31
2.1.4.4 Oncogenes do ciclo celular	32
2.1.4.5 Proteínas de reparo de danos ao DNA	33
2.1.4.6 Proteínas de adesão celular	33
2.1.4.7 Receptores de estrogênio	34
2.1.4.8 Marcadores para linfangiogênese	34
2.1.4.9 Fatores de transcrição	35
2.1.4.10 Perfil mutacional do CAC	36
2.1.4.11 PD-1 e PD-L1	39
2.1.4.12 Senescência celular	39
2.1.5 Prognóstico	40
2.1.6 Tratamento	42
2.1.6.1 Terapia alvo	45
2.2 MODIFICAÇÕES EPIGENÉTICAS	48
2.3 INIBIDOR DE DEACETILAÇÃO DE HISTONA (IHDAC) – ENTINOSTAT	54
3 PROPOSIÇÃO	57
3.1 OBJETIVO PRINCIPAL	57
3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	57
4 MATERIAL E MÉTODOS	59
4.1 XENOENXERTO DERIVADO DO PACIENTE (PDX)	59
4.2 EXTRAÇÃO DE RNA E ANÁLISE NANOSTRING E CLUSTER 3.0/TREEVIEW	60
4.3 INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO TUMORAL (ICT) E HEMATOXILINA EOSINA	60

4.4 IMUNOHISTOQUÍMICA (IHC)/ IMUNOFLUORESCÊNCIA (IF)	61
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	64
4.6 ÉTICA DO ESTUDO E FUNDING	64
5 RESULTADOS	65
6 DISCUSSÃO	83
7 CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS	89

1 INTRODUÇÃO

O Carcinoma Adenóide Cístico (CAC) das Glândulas Salivares é caracterizado por não responder às terapias disponíveis, devido à heterogeneidade morfológica e diferente comportamento biológico. Além de apresentar crescimento lento, células resistentes à quimioterapia, recorrência e alto potencial metastático locorregional ou para pulmão e osso, que geralmente é indolente, ocorrendo 5 a 10 anos após o diagnóstico (1) (2) (3).

As mutações, metilação e translocação são os principais risco de dano genômico nas células em divisão. Uma vez que estes mecanismos epigenéticos ocorrem, as células podem tentar reparar danos, morrer ou ficar senescentes, dependendo do tipo e quantidade do dano. As condições de desenvolvimento do CAC são estabelecidas quando essas modificações conferem vantagens ao crescimento e à sobrevivência ou quando tornam o genoma instável consequentemente há perda da heterozigosidade (Figura 1.1). E alguns estudos mostraram que a presença da translocação do gene MYB, a mutação do NOTCH1, superexpressão de SOX10 e c-KIT e a metilação da histona têm mau prognóstico favorecendo a resistência ao tratamento convencional, gerando células malignas refratárias (1) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9).

Além disso, apesar do CAC ser raro, estudos com sequenciamento de genoma e exoma que buscam genes promissores demonstraram que vias fundamentais em outros cânceres são compartilhadas no CAC. Em particular, a segunda via mais comum em termos de frequência de modificações genéticas estava relacionada ao remodelamento cromático. Uma vez que a patologia das histonas está significativamente envolvida nessa via, os agentes recém-desenvolvidos visando os biomarcadores relacionados à histona justificam uma investigação mais aprofundada (10) (11) (12).

Em estudos prévios (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) mostraram que esses agentes sensibilizou e aumentou a eficácia de terapia convencional, através da ação do inibidor de histona deacetilase (iHDAC), que atua impedindo a deacetilação das histonas. A acetilação e deacetilação, processos reversíveis, influenciam o grau de compactação da cromatina, interferindo o acesso das terapias antineoplásicas. A compactação da cromatina pode dificultar a passagem da cisplatina ou de outra

quimioterapia para o núcleo, bem como para o DNA, diminuindo seu efeito e favorecendo a resistência do tumor. A acetilação, nada mais é, o acréscimo de um grupo acetil que neutraliza as cargas nas histonas, deixando a cromatina aberta e mais exposta aos fatores de transcrição, facilitando a expressão de proteínas e de genes supressores de tumores (Figura 1.2) (16) (20) (21) (22).

Porém várias outras vias também estão implicadas no CAC, a estratificação com base nos subtipos morfológico, moleculares e histológicos é fundamental para entender melhor as correlações clínico-patológicas-moleculares com os diferentes subtipos e comportamento biológico, através de uma melhor compreensão da patogênese da doença e do desenvolvimento de terapias direcionadas. Embora promissor, não se sabe se o iHDAC afetaria na progressão e no tratamento do CAC. Portanto, o presente estudo busca analisar a sensibilidade à quimioterapia usando o Entinostat, uma nova droga iHDAC, e cisplatina, terapia convencional, combinados e isolados, para o tratamento de CAC de glândulas salivares, individualizando a resposta dos medicamentos e buscando biomarcadores e terapia gênica, para gerar uma terapia de precisão.

Figura 1.1 - Processo de carcinogênese oral

Fonte: A autora

Figura 1.2 - O efeito dos iHDAC na acetilação e deacetilação de histonas

Fonte: A autora

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARCINOMA ADENOIDE CÍSTICO (CAC)

2.1.1 Introdução Geral e Epidemiologia

Neoplasias Malignas de Glândulas Salivares (NMGS) constituem um grupo heterogêneo de neoplasias com comportamento biológico e apresentações microscópicas complexas e equivalem aproximadamente 3-6% de todas as neoplasias diagnosticadas na região de Cabeça e Pescoço (23) (24).

O CAC é o segundo tipo histopatológico de NMGS mais frequente (22,5%) (24). Em um estudo epidemiológico dinamarquês estima-se que o CAC representa 27,9% da incidência geral de NMGS (11/1.000.000/ano), correspondendo a uma incidência anual de 3/1.000.000 / ano (25). Na Nova Escócia, a incidência anual aumenta para 4,5/1.000.000 de casos (26). É importante observar que essas estimativas de incidência são certamente afetadas por desafios do diagnóstico histológico além de reclassificação de nomenclatura no decorrer dos anos, variando de 14% a 29% (25) (2).

A proporção de CAC entre as NMGS varia também de acordo com a localização. Em um estudo brasileiro, o CAC acomete com maior frequência o palato, seguido de parótida e submandibular (37,6%; 20,18% e 12,84%) (24). No estudo holandês de Carcinoma em Parótida, o CAC foi a histologia mais frequente, sendo responsável por 1 em cada 6 cânceres de parótida (27). A probabilidade de CAC é ainda maior na glândula submandibular, onde é responsável por 40% a 42% dos NMGS desta região (24). O CAC é o câncer mais comum nas glândulas salivares menores, onde a proporção varia de 32% a 71% acometendo palato, língua, mucosa jugal, região retromolar, seguido pelos seios paranasais e outros locais da cavidade oral (24) (28).

O CAC ocorre em todas as faixas etárias com alta frequência em pacientes de meia idade e idosos (29) sendo a quinta e a sexta décadas mais afetadas (24) (30). Não há predileção por sexo, fatores de risco distintos, e o tabagismo não afeta a incidência (31).

2.1.2 Características Clínicas

O CAC é descrito como tendo um comportamento biológico diferente, com padrão de crescimento lento a longo prazo, persistente e recorrente e alto potencial para invasão vascular e neural com início tardio de metástases, locorregionais e a distância, como pulmão, fígado e osso. A apresentação clínica mais comum é uma massa tumoral, endurecida, firme a palpação, fixa em estruturas adjacentes, de crescimento lento, seguida de dor atribuída à invasão perineural e perivascular (2).

No estudo de Nascimento et al. (29) 98% dos pacientes relataram uma massa, 48% tiveram dor, 30% tiveram ulceração e um paciente teve paralisia do nervo facial; esses sintomas estavam presentes entre 1 mês a 4 anos. E no estudo de da Silva et al. (24), 50% apresentaram dor e destes a média do tamanho da massa tumoral era aproximadamente 3,8cm na maior extensão.

Os sintomas apresentados do CAC variam de acordo com o local, tamanho, estadiamento e estágio da doença. Nas glândulas salivares maiores, o tumor produz um nódulo e, quando localizado na parótida, pode ocorrer paralisia do nervo facial e dor; no palato é comum um nódulo, embora possam ser observadas ulceração ou até fístula oro-sinusal; na laringe, dispnéia pode ser o primeiro sintoma de apresentação; no nariz e seios paranasais, obstrução nasal, dor facial profunda, epistaxe e sintomas oculares; na base de língua disfagia, odinofagia e inapetência estão comumente descritos. As metástases nos ossos geralmente causam dor, enquanto as metástases pulmonares são frequentemente achados radiográficos incidentais devido à realização de exames de imagem torácica (28) (32) (33).

2.1.3 Etiopatologia, Características Histopatológicas e Diagnóstico

Independentemente de sua origem: glândula salivar, lacrimal ou mamária, o CAC é considerado originário da região do ducto intercalado caracterizado por tumor bifásico que consiste em células mioepiteliais e ductais. Em cortes histológicos,

observam-se neoplasias assimétricas, com padrões de crescimento invasivamente variados ou lobulados (34).

Morfologicamente, o CAC consiste em grande parte de células não luminais, basalóides, com quantidades pequenas a moderadas de citoplasma e poucas células eosinofílicas, cuboidais curtas. Os núcleos tendem a ser relativamente arredondado, pequeno, com nucléolos imperceptíveis. As células luminais podem ser discretas, embora marcadores imuno-histoquímicos ajudem na sua distinção (32) (34).

Três padrões arquiteturais distintos são descritos: tubular (geralmente túbulos revestidos por células luminais cercadas por células não luminais que geralmente mostram citoplasma "claro"); cribriformes (células basalóides dispostas em massas ovais / arredondadas de tamanho variável perfuradas por espaços luminais, ovais e do tipo cisto (pseudoluminal) que podem conter "cilindros"/glóbulos de material hialino e/ou glicosaminoglicanos mixóides, e pequena luminária verdadeira ocasional revestida por células luminais) que é conhecido com padrão de "queijo suíço"; e sólido (células tumorais basicamente basalóides crescendo em folhas sem formação de lumens) (34).

Padrões tubulares e sólidos são geralmente vistos misturados com áreas cribriformes, mas geralmente em proporções variadas dentro de um único tumor. Áreas especialmente tubulares e cribriformes geralmente ocorrem juntas na mesma amostra e menos frequente dos três, o tipo sólido, focos menores de crescimento tubular ou cribriforme geralmente estão presentes. Sabe-se que o CAC sólido, definido como crescimento sólido em > 30% do tumor, possui um curso clínico particularmente agressivo, associado a pior prognóstico, estágio avançado e desenvolvimento de metástase distante. Szanto et al. (35) propuseram um esquema de classificação histológica com base no grau de padrão sólido em três graus: Grau I, tumores com áreas tubulares e cribriformes, mas sem componentes sólidos; Grau II, tumores cribriformes puramente ou misturados com > 30% das áreas sólidas; e Grau III, tumores com padrão predominantemente sólido.

Já o perfil imuno-histoquímico das células ductais são positivas para CD117, AML e CK. O marcador de proliferação ki-67 é positivo em uma proporção variável de células tumorais e é mais alto no padrão sólido (36).

Em particular, as células epiteliais expressam c-KIT, COX-2 e Bcl-2, enquanto as células mioepiteliais expressam EGFR e MYB. Essa discrepância é provavelmente

importante no entendimento da sua heterogeneidade, da etiologia e da resposta aos tratamentos (37).

A invasão neural pode ser vista mesmo em tumores em estágio inicial e tem sido considerada um fator prognóstico desfavorável, associado a metástases distantes e desfecho final adverso (38). Recentemente, no entanto, uma análise de 495 CAC de 9 coortes de pacientes internacionais indicou que "embora a invasão perineural não tenha impacto na sobrevida, a invasão intraneural é um preditor independente de mau prognóstico" (39).

Outra inferência foi que a invasão neural não predisse disseminação hematogênica. Teymoortash et al. (40) revisaram 22 casos de CAC com invasão perineural documentada e propuseram um novo esquema de classificação para os CAC com base na presença de características na invasão perineural. Eles classificaram os tumores como p1 quando foi observada verdadeira invasão perineural ou intraneural e p2 quando o tumor estava adjacente aos nervos sem invadi-los. Pacientes com tumores p1 apresentaram maior taxa de recorrência em comparação com pacientes com p2.

As metástases na cadeia linfática cervical geralmente são pequenas, o que pode explicar por que o exame clínico ou a imagem podem falhar em detectá-las. No entanto, faltam informações extensas sobre o status de pN no CAC porque as dissecações do pescoço não são comumente realizadas (40).

A citologia por aspiração por agulha fina pode ser usada para fins de diagnóstico. A descoberta de grandes glóbulos da matriz extracelular, parcialmente cercada por células basalóides, sugere CAC (41). No entanto, o diagnóstico de NMGS por agulha fina é notoriamente difícil e muitas vezes é comprometido por avaliações falso-negativas. O diagnóstico histopatológico permanece o "padrão ouro" e é especialmente necessária quando a intervenção terapêutica planejada envolve cirurgia radical (42).

2.1.4 Marcadores Moleculares

A pesquisa atual concentra-se fortemente no potencial papel prognóstico e terapêutico dos marcadores moleculares e as alterações genéticas e moleculares mais relevantes no CAC estão resumidas na Tabela 2.1, a seguir.

Tabela 2.1 - Frequentes alterações moleculares no CAC

Função	Marcador	Relevância Clínica
Proliferação celular	Ki-67	Prognóstico
	PCNA	
	AgNORs	
	c-KIT	
Receptores de crescimento e ligantes	VEGF/VEGFR	Prognóstico
	EphA2/ephrinA1	Prognóstico
	EGFR (HER-1)	Prognóstico e alvo terapêutico
	NGF/HGF	
	c-MET	Potencial alvo terapêutico
	IGF	
	TrKC/NTRK3	
Ciclo celular - oncogenes	Ciclina D1	Prognóstico
	SOX4	Potencial alvo terapêutico
	SOX10	
	via PI3K/AKT	
Reparo de dano DNA	p53	Prognóstico
Alterações epigenéticas	H3ac/ H4ac	Prognóstico e alvo terapêutico
	Metilação de histonas	
Adesão celular	E-caderina	Prognóstico
	ICAM-1	
	Ezrin/CD44v6	
	ILK	
Estrógeno receptor	Receptor estrogênio	Potencial alvo terapêutico
Perfil mutacional (prognóstico e alvo terapêutico)	PIK3CA, TP53, PTEN, SMARCA2, KDM6A, CREBBP	
	SMARCE1, ARID1A, ATRX, SRCAP, KDM6B, JMJD1C, MLL3, FTSDJ1, HIST1H2AL, HIST1H1E, MORF4L1, KAT6A, KANSL1, SETD2, NSD1, BCOR, BCORL1.	
	SPEN, NOTCH1, NOTCH2	
	FOXP2, DTX4, FBXW7, CNTN6, MAML3	

	PTEN, FOXO3, FGF16, FGFR4, IGFBP2, ILR17RD, INSRR, ERBB2IP, HRAS, MAPK2 BRCA1, ATM, TXNIP, PRKDC	
Linfangiogene	Podoplanin	Prognóstico
Fatores de Transcrição	MYB NF-kB EN1	Prognóstico

Fonte/ Referências: (43) – (100)

2.1.4.1 Marcadores de proliferação baseados no ciclo celular

Esses marcadores refletem o número de células cancerígenas que passam pelo ciclo celular em direção à divisão. Nordgård et al. (43) relataram que avaliação do índice Ki-67, um antígeno nuclear nas células em proliferação, é um fator prognóstico independente do comportamento biológico. Cho et al. (44) sugeriram que a alta expressão de PCNA (antígeno nuclear de célula em proliferação) está significativamente associada à menor sobrevida livre de doença e ao total de pacientes diagnosticados com CAC. A expressão da proteína de manutenção de minicromossomos foi considerada um novo marcador para a proliferação de células tumorais e é útil para o diagnóstico diferencial de tumores benignos e malignos da glândula salivar (45). A expressão da proteína organizadora da região nucleolar argirofílica (AgNOR) também foi considerado um fator de proliferação (46).

Desses marcadores, o índice Ki-67 é o teste mais barato e mais amplamente aplicável para avaliar proliferação de células tumorais (47).

2.1.4.2 Alterações genéticas e epigenéticas

A modificação epigenética representa um fator crucial para o desenvolvimento do câncer. Observou-se que a cromatina de tumores de glândulas salivares estava hipoacetilada em comparação com os tumores benignos. Além disso, a expressão de

acetil-Histona3 (H3) estava inversamente correlacionada com o Ki67, mostrando que a modificação de histonas e os mecanismos epigenéticos podem desempenhar um papel no comportamento (48). E em outro estudo, mostrou que hipoacetilação de H3 pode ser considerada um marcador de mau prognóstico (49).

Um complexo de múltiplas proteínas que inclui três fatores de transcrição (NF- κ B, IRFs, ATF-2/c-Jun) recruta o HAT Gcn5, que acetila H4K8 e H3K9. Além disso, um pré-requisito para a acetilação em H3K14 é a fosforilação de H3-S10 por uma quinase desconhecida. Esse código de histona desenvolvido acaba ativando a transcrição pela ligação subsequente dos complexos de acetilação. (49)

2.1.4.3 Proteínas receptoras e ligantes do fator de crescimento

Este grupo inclui o receptor do fator de célula-tronco (c-KIT); a família de receptores de fator de crescimento epidérmico humano EGFR (HER-1, ErbB-1), HER-2 (HER2 / Neu, ErbB2), HER-3 (ErbB3) e HER-4 (ErbB4); receptores do fator de crescimento relacionados à angiogênese (PDGF-R, VEGF-R, bFGF-R, PlGF, IL-8, TGF β , EphA2); fator de crescimento nervoso (NGF); fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF-I / II) e receptor (IGF-1R); e fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e seu receptor tirosina quinase MET.

O c-KIT é detectado em 80-94% do CAC (50). A relação entre a alta expressão de c-KIT (> 50%) e o grau histológico é controversa. Enquanto Holst et al. (51) observaram uma associação significativa da expressão de c-KIT com grau III ou padrão sólido, Freier et al. (52) descreveram uma expressão alta apenas no cribriforme e tubular.

O estudo de Bell et al. (53) mostrou que o c-MET, proteína ligante ao receptor do fator de crescimento hepatócito, foi expresso através de IHC em 25% dos casos de padrão tubular, 61% cribriforme e 14% sólido, porém não foi encontrada correlação com a sobrevida. Por isso, não pode ser usado como marcador de prognóstico.

Dados sobre receptores de fatores de crescimento relacionados a angiogênese de cânceres salivares geralmente sugerem uma associação da expressão do VEGF com estágio avançado e pior sobrevida específica da doença (54). Especificamente

para o CAC foi relatado a superexpressão de EphA2, um receptor tirosina-quinase envolvido na angiogênese, e seu ligante efrina A1. A superexpressão é significativamente maior no padrão sólido do que nos outros tipos (tubular e cribriforme) e se correlaciona com a densidade de microvasos, estadiamento TNM e invasão perineural e vascular (55).

Para a família EGFR humana, EGFR / HER-1 foi identificado em 82% dos pacientes investigados com CAC avançado. Em pacientes que expressam HER-1, o tratamento com cetuximab pareceu resultar em uma melhor resposta e de doença estabilizada (56). Em um outro estudo em 24 casos, a associação de HER-1/CCND1/PIK3CA foi o padrão mais consistentemente observado (29%). O HER-1 correlacionou-se com metástases distantes, e os casos com a associação do HER-1/CCND1/PIK3CA tenderam a uma sobrevida reduzida (57). A agressividade biológica relacionada ao HER-1 observada, no entanto, não pôde ser confirmada por Lee et al. (58).

Estudos demonstraram variabilidade considerável na expressão de HER2, variando de 0 a 58% em pacientes com CAC (59). A expressão é altamente dependente do subtipo do tumor. Por exemplo, um estudo relatou que, enquanto 17% dos pacientes com carcinoma da glândula salivar superexpressam HER2, apenas 4% dos pacientes eram casos de CAC (60). O tratamento com trastuzumab foi relatado em casos de carcinoma de glândula salivar HER positivos (61).

A expressão aumentada de NGF é observada em 79% dos CAC do tipo sólido (ou 68% de todos os casos estudados) e pode estar relacionada ao seu neurotropismo (62).

Nesse contexto, a superexpressão de um cluster de genes neuronais agrupados em torno de TrkC/NTRK3 (um receptor neurotrófico da tirosina quinase associado à neurogênese e câncer) sugere que o CAC expressa genes envolvidos na diferenciação de células-tronco neurais (63).

2.1.4.4 Oncogenes do ciclo celular

A interação fator de crescimento-receptor (comportamento “chave-fechadura”) ativa oncogenes do ciclo celular. Para CAC, incluem ciclina D1 (64); região

determinante do sexo Y-box 4 e 10 (SOX-4, SOX-10) (7), (65) (66), fator nuclear kB (NFkB); fosfatidilinositol 3 fosfato quinase / serina-treonina proteína quinase (PI3K); transdutor de sinal de sarcoma e ativador de transcrição 3 (STAT3); e alvo de rapamicina em mamíferos (mTOR) (67) (68) .

Frierson et al. (69) descobriram que o SOX-4 era o oncogene do ciclo celular mais superexpressado e regulado via NFkB (proteína inibidora I-kB-a) (65). Muito recentemente, o fator transcricional SOX-10, normalmente expresso apenas durante a diferenciação da glândula salivar, foi encontrado marcadamente aumentado em uma maioria das células CAC (70) .

O eixo PI3K/AKT/mTOR é crítico na oncogênese; a desregulação dessa via envolve alterações de vários fatores de crescimento associados a diversos cânceres (EGFR, HER-2, PDGF e VEGF), além de AKT, mTOR e PTEN (71).

2.1.4.5 Proteínas de reparo de danos ao DNA

Expressão de p53 (72) e mutações de p53 no CAC parecem ser associados a pior prognóstico (73).

2.1.4.6 Proteínas de adesão celular

A perda da expressão da E-caderina (devido à hipermetilação do promotor) é frequentemente encontrada no CAC e tem sido correlacionada com mau prognóstico. Também a expressão reduzida de células intercelulares a molécula de adesão-1 (ICAM-1) pode promover invasão e metástase, resultando em um prognóstico ruim. O aumento da expressão do ligante citoesquelético membrana Ezrin e seu parceiro CD44V6 também foi associado a um comportamento mais agressivo (74).

Uma associação recentemente revelada no CAC, a quinase ligada à integrina (ILK) se liga a marcadores de transição epitelial-mesenquimal, onde a ILK desempenha um papel central nas interações da matriz extracelular celular que regulam a proliferação celular, apoptose, diferenciação e migração. A expressão de ILK está fortemente correlacionada com o tipo sólido, estágio TNM avançado e aumento do risco de recorrência. Além disso, a superexpressão da ILK e um fenótipo invasivo neural acompanharam a regulação negativa da E-caderina e a regulação positiva da Snail e da N-caderina; por esse mecanismo, acredita-se que a ILK tenha um papel fundamental na progressão e metástase do CAC (75).

O receptor ativador do plasminogênio do tipo uroquinase influencia a invasão e a metástase do tumor, facilitando a destruição de matrizes extracelulares, de modo que sua expressão parece ser um fator prognóstico negativo (76).

2.1.4.7 Receptores de estrogênio

Os receptores de estrogênio foram descritos em 17-92% dos casos de CAC estudados, sugerindo um papel para a terapia anti-estrogênio com tamoxifeno e apoiando a plausibilidade de uma remissão parcial observada anteriormente em um paciente tratado dessa maneira (77).

2.1.4.8 Marcadores para linfangiogênese

A podoplanina é uma pequena proteína semelhante à mucina relacionada ao desenvolvimento e reparo tecidual. É expresso em células endoteliais linfáticas e é usado como marcador de linfangiogênese. Também é expresso em certas células tumorais e está associado à migração/invasão em Carcinoma epidermoide cervicais e orais. Recentemente, a podoplanina foi encontrada superexpressa em um

subconjunto de CAC salivares (32,5% dos tumores); a superexpressão foi significativamente associada à metástases à distância, embora não tenha sido associada à recorrência e sobrevida global (78).

2.1.4.9 Fatores de transcrição

A translocação recíproca t (6; 9) (6q22-23; 9p23-24), resultando na fusão do gene MYB no cromossomo 6q22 – q23 e o fator de transcrição NFIB no cromossomo 9p23 – p24, foi descrito no CAC como fator de diagnóstico e prognóstico (79).

Foi demonstrado que a fusão regula positivamente a expressão da proteína MYB, que se acredita ser o condutor oncogênico desse tumor. Mitani et al. (6) confirmaram essa fusão, incluindo várias fusões variantes, como específicas do CAC.

A superexpressão de MYB é observada em tumores positivos para fusão, mas também em um subconjunto de tumores negativos para fusão, presumivelmente por meio de diferentes mecanismos, confirmando o papel crítico do MYB em todos os CAC independentemente do status da fusão (6). West et al. (80) encontraram a fusão MYB-NFIB em cerca de metade dos casos, mas também o rearranjo de MYB sem NFIB em 16%, para um total de 65% dos casos mostrando padrões anormais de MYB. Isso sugere parceiros de fusão alternativos para o MYB. Uma tendência para pior resultado em casos positivos para fusão também foi encontrada neste estudo. Recentemente, vários laboratórios estão tentando desenvolver inibidores de MYB, MYB-NFIB e seus alvos moleculares, mas os primeiros resultados não foram promissores. Não está claro se esta translocação no CAC será útil como marcador de diagnóstico, marcador prognóstico (para prognóstico ruim) ou como alvo da terapia (81).

A expressão do fator de transcrição Engrailed Homeobox 1 (EN1) é silenciada por hipermetilação no CAC (82). EN1 é importante para o desenvolvimento do sistema nervoso central. A hipermetilação da EN1 está correlacionada com o grau histológico do tumor, a localização do tumor e o resultado final do paciente. A expressão da proteína EN1 parece típica para CAC sólido e implica em uma taxa de sobrevivência

significativamente menor. Por esse motivo, o EN1 poderia ser um marcador biológico potencialmente útil de prognóstico do CAC.

2.1.4.10 Perfil mutacional do CAC

O exoma e o sequenciamento do genoma de 60 CACs foram relatados e encontrados uma baixa taxa de mutação somática exônica (média de 22 mutações somáticas por amostra, correspondendo a aproximadamente 0,31 eventos não silenciosos por megabase) e ampla diversidade mutacional. Eles identificaram possíveis mutações em PIK3CA, TP53, PTEN, SMARCA2, KDM6A e CREBBP. A análise desses genes demonstrou acentuado enriquecimento nas vias envolvidas na remodelação da cromatina, danos ao DNA, MYB, sinal da proteína quinase A (PKA) e sinalização PI3K. Além disso, eles observaram translocações MYB-NFIB e mutações somáticas nos genes associados ao MYB, solidificando o papel dessas aberrações como eventos críticos no CAC. A descoberta de alterações genômicas em vias segmentáveis sugere caminhos potenciais para novas terapias para esta neoplasia tipicamente quimiorresistente (83).

Uma translocação do cromossomo 6q do homólogo de oncogene viral da mieloblastose aviária v-myb (MYB) com o cromossomo 9p do fator nuclear I/B (NFIB) O gene resulta no oncogene fundido MYB-NFIB, uma das anormalidades genéticas mais comuns, presentes em 60% a 80% do CAC. Posteriormente, novas fusões do gene MYBL1-NFIB e MYBL1-RAD51B resultantes de t (8, 9) e t (8,14), respectivamente, ao longo de múltiplas outros rearranjos no gene MYBL1 foram identificados em 35% dos CAC. E também como mutações codificantes foram em vários genes relacionados à via MYB, como MGA, MYCBP2 e MCM4 (83). Como resultado, ocorre a desregulação de mecanismos envolvidos na apoptose, adesão celular e regulação do ciclo celular (79), como comumente observado em vários outros cânceres humanos, o MYB é superexpresso na superfície da célula na maioria dos CACs, geralmente não se correlacionando com a presença de uma translocação

simultânea, indicando que outros mecanismos podem estar envolvidos no desencadeamento de sua expressão (84) (85).

Como é um fator de transcrição, MYB modula múltiplos genes alvos envolvidos também na oncogênese, como COX-2, c-KIT, Bcl2, BclX (86).

Em termos de prognóstico, a alta expressão de MYB foi associada a uma pior sobrevida, independente do padrão histopatológico, embora quando é associado ao padrão sólido mostra pior prognóstico (87).

Ho et al. (83) sequenciaram 60 casos de CACs para analisar mutações associadas a vias de MYB, remodelação de cromatina, tirosina kinase, dano do DNA e checkpoint. Interessante que nem todos os CAC exibiram expressão de MYB, e foram encontrados 35% de mutação em reguladores de cromatina. Por exemplo, SMARCA que participa na transcrição de genes que remodelam a cromatina SWI/SNF. Outras mutações envolvem: SMARCE1, ARID1A, ATRX, SRCAP, KDM6B, JMJD1C, MLL3, FTSDJ1, HIST1H2AL, HIST1H1E, MORF4L1, KAT6A, KANSL1, SETD2, NSD1, BCOR, BCORL1.

Os genes relacionados à histona também participam da remodelação da cromatina. A coordenação da histona acetiltransferase/deacetilase regula a transcrição gênica alterando a estrutura da cromatina. Com base nesse mecanismo, a histona deacetilase (HDAC) tornou-se um novo alvo de agentes terapêuticos. Os genes ligados à atividade de HDAC (por exemplo, ARID4B) foram mostrados mutados nas linhas celulares CAC. Outros genes relacionados à atividade de histonas, como CREBBP, EP300, ARID5B, KDM6A e BRD1, também (83).

Estudos demonstram que um subconjunto de pacientes com CAC apresenta mutações no NOTCH1 sendo assim, ativação significativa maior da via do NOTCH1, conferindo um padrão agressivo a esses tumores em 11% a 29% dos casos(5) (88). Pacientes com essas mutações têm uma probabilidade significativamente maior de apresentar estágio avançado da doença no diagnóstico, desenvolver metástase hepática e óssea e ter pior prognóstico (4). A via de desenvolvimento NOTCH está envolvida em funções relevantes relacionadas ao câncer, incluindo a manutenção de células-tronco tumorais, proliferação e angiogênese. Mutações somáticas de NOTCH1 e NOTCH2 foram relatadas (5). Outro estudo revelou a superexpressão de NOTCH1 no tecido CAC metastático/recorrente em comparação com a glândula salivar normal (89). Verificou-se que o SPEN, outro gene relacionado que regula a sinalização de NOTCH, possui mutações somáticas no CAC tipo sólido (5). Outro

estudo confirmou que o SPEN está localizado no 1q36, que era frequentemente excluído no CAC. A perda desta região também se correlacionou com um mau prognóstico (90). E também ocorre mutações nos genes FOXP2, DTX4, FBXW7, CNTN6 e MAML3 pertencentes a via NOTCH.

Embora a via NOTCH possa ser desregulada, seu papel na evolução e terapêutica não é totalmente compreendido (1).

Mutações em genes importantes para a via FGF/IGF/PI3K foram identificadas em 30% do CAC. Podendo estar mutado PTEN, FOXO3, FGF16, FGFR4, IGFBBP2, ILR17RD, INSRR, ERBB2IP, HRAS, MAPK2 pertencentes a essa via (83).

O PI3KA é um oncogene condutor mutado em vários cânceres e foi identificado em um subconjunto de CAC. Outros genes mutantes associados a essa via incluem PTEN, FGF16, FGFR4 e ILR17RD. O caminho da PKA também é crítico para a sobrevivência das células cancerígenas e foi encontrado mutações em genes relacionados em 27% das amostras. Essa via aumenta a sobrevivência celular em condições estressantes por meio da ativação dependente de AMPc interagindo com o Bcl-2 em outras situações. Mutações recorrentes no RYR2 e RYR3 foram detectadas nessa via, e outros genes associados, PTPRG, PTPRH, PTPRJ e PTPRK, também foram mutados (83).

Erros no sistema de reparo do DNA causam instabilidade genômica, que pode estar associada à transformação maligna das células. O sequenciamento revelou muitos genes mutados envolvidos na via de sinalização de danos ao DNA, com uma prevalência de 27% da amostra de CAC que incluem BRCA1, ATM, TXNIP, PRKDC e TP53. TP53 é um gene supressor de tumor, que regula a morte celular e o reparo do DNA. É o gene mais frequentemente mutado nos cânceres, ocorrendo em até 75% dos cânceres invasivos. Mutações somáticas no TP53, bem como genes relacionados (por exemplo, UHRF1), foram identificados no CAC (83). Além disso, um estudo recente demonstrou que a mutação de p53 induziu aumento da atividade de invasão perineural de tumores CAC, in vitro (91).

2.1.4.11 PD-1 e PD-L1

Sridharan et al. (92) não encontraram pacientes com expressão significativa de PD-L1 nos CACs, mas o PD-L2 é expresso em mais de 60% dos tumores primários e 73% dos locais metastáticos.

2.1.4.12 Senescência Celular

Senescência celular refere-se a uma parada do ciclo celular durante a qual as células são incapazes de entrar novamente no ciclo celular, apesar da presença de fatores de crescimento e metabolismo (93). A senescência é resultado do encurtamento do telômero durante a proliferação celular, que é reconhecido pela célula como quebra de fita dupla. Isso é desencadeado a resposta a danos no DNA, levando à ativação de p53 e parada do ciclo celular mediada por Ataxia-Telangiectasia quinase (ATM) (94). Também foi demonstrado que o sinal oncogênico desencadeia a senescência celular, conhecido como senescência induzida por oncogene (95). Demonstrou-se que três inibidores de quinase dependentes de ciclina (CDKi), p16, p21 e p27 se acumulam em células senescentes e estimulam a senescência celular, que por sua vez ativa a família E2F de fatores de transcrição (96).

Forkhead box O 4 (FOXO4) está correlacionado com um aumento da ativação transcricional de p21 e subsequente ativação da senescência celular. A ativação aberrante do oncogene BRAF levou à senescência induzida por oncogene (97). A forma oncogênica do BRAF fosforila a JNK quinase pela via MEK. Por sua vez, o JNK ativado pode fosforilar e ativar o FOXO4, levando à parada do ciclo celular e indução de senescência celular (96). E também através a ativação de p16^{ink4a} provoca a senescência (98).

Existe também a interação entre p16^{ink4a} e caspase-3 envolvendo o resíduo Ser152 de p16^{ink4a} e é essencial para impedir a ativação da caspase-3, que força a senescência e limita a morte celular apoptótica em resposta à inibição de SPHK2/S1P, e danos subsequentes aos telômeros (99).

Almeida et al. (13) observou que a combinação de inibidor de HDAC e Cisplatina ativou a senescência celular através da expressão de p16^{ink4a} em células de CAC de glândula salivar.

O WIF1 induz também a senescência celular através do aumento da expressão de p53 e p21 e diminuindo a expressão de OCT4, c-Kit, WNT3A e MYB em células de tumores de glândulas salivares (100).

2.1.5 Prognóstico

Em geral, o prognóstico do CAC é ruim, e essa é a razão pela qual muitos autores consideram como uma neoplasia de "cl clinicamente alto grau". O prognóstico relatado varia muito, principalmente porque estudos têm metodologia e duração de acompanhamento diferentes. Em um grande estudo europeu, a taxa de sobrevida em 10 anos foi de 65% (101). Van Weert et al. (102) relataram taxas de sobrevida em 5, 10 e 20 anos de 68%, 52% e 28%, respectivamente, em uma série de 105 pacientes. Huang et al. (103) relataram que as taxas de sobrevida global e livre de recidiva em três anos foram de 84,6% e 58,2%, enquanto a taxa de sobrevida com recidiva foi de 26,4%. Após 15 anos, a taxa de sobrevida global foi de 24,5% e a taxa de sobrevida livre de recorrência foi de 22,6%.

Muitos pesquisadores e clínicos assumem que "a cura nunca é alcançada" no CAC. Ocasionalmente, são relatadas taxas otimistas de sobrevida em 5 anos (por exemplo, 92% em uma série australiana) (104), mas as taxas de sobrevida em 10 e 20 anos caem continuamente. Em uma série do Reino Unido, 40% dos pacientes com CAC estavam vivos após 20 anos e a sobrevivência continuou a cair até 30 anos; a taxa de recorrência no local primário após 30 anos nesse estudo foi de 100% (105) e de 54% na série australiana (104).

A baixa taxa de sobrevida a longo prazo está uniformemente ligada à falha no controle de metástase distantes. É mais provável a ocorrência de metástases à distância se o tumor for de histologia sólida, tamanho primário > 3 cm, de origem na

cavidade oral/ nasal / seios paranasais, linfonodos positivos ou se houver recorrência local (106) (107) (108) (109).

Essa metástase distante ocorre com mais frequência no pulmão. Spiro (107) sugeriu que a incidência de metástase distante em outros locais anatômicos é provavelmente maior do que o anteriormente reconhecido, porque uma vez que as metástases pulmonares são detectadas, nenhuma investigação adicional é realizada. Van der Wal et al. (110) descobriram que o tempo médio entre a ocorrência de metástase pulmonares e a morte foi de 32,3 meses, e entre a ocorrência de metástases em outros lugares e a morte foi de 20,6 meses; hipotetizaram que a metástase fora dos pulmões pudessem ser detectadas mais tarde no curso da doença ou interferir mais rapidamente nas funções vitais. Umeda et al. (111) descobriram que o tempo estimado de metástase pulmonar varia de 86 a 1064 dias, com uma média de 393 dias. Esses achados sugerem que as metástases podem ocorrer antes (em média, 227 meses) da apresentação clínica do sítio primário. Outro local comumente afetado é o osso e, uma vez ocorrido, a doença geralmente progride rapidamente (108) (109). Pelo menos 30% dos pacientes com metástase distante estarão livres de doença no local primário (107).

A tabela a seguir mostra como esses dados realmente são variáveis devido a metodologia e duração de acompanhamento do estudo (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 - Dados variáveis do prognóstico do CAC

CAC de glândula salivar	Estatística
Doença não metastática	3 anos: 73% 5 anos: 68%, 65%, 63%, 35% 10 anos: 65%;52% 15 anos: 45%; 30% 20 anos: 28%; 11%
Início de doença metastática	Geral: 43%; 42%; 38%; 37%; 36%; 29%; 21%
Metástase, média do tempo em meses a partir do diagnóstico do sítio primário	Geral: 36,8 Pulmão: 38,4 Outros lugares: 53,8; 20.6
Média de sobrevida em meses depois da descoberta da metástase	3 anos: 46%, 41%; 26,4% 5 anos: 16%
Sobrevida livre de doença	3 anos: 58,2% 5 anos: 83%, 82%; 79%; 69%; 68%; 58% 10 anos: 74%; 71%; 67%; 59%;52%; 23% 15 anos: 55%; 48%; 46%;22,6% 20 anos: 40%; 38%; 42%; 28%; 22% 25 anos: 27%
Sobrevida global	3 anos: 84,6%; 71% 5 anos: 92%; 73%; 72%; 65% 10 anos: 55%; 46%; 45%; 39% 15 anos: 35%; 34%;28%; 26%; 24,5% 25 anos: 15%

Fonte/referências: (101) (104) (105) (106) (107) (108) (110) (111) (112)

O estágio avançado do tumor primário, comprometimento importante dos nervos, histologia sólida, linfonodos positivos e margens cirúrgicas positivas foram demonstrados em algumas séries como afetando a sobrevivência (105) (106) (109) . O CAC nas glândulas salivares maiores demonstrou ter um resultado mais favorável do que se o primário estivesse em uma glândula salivar menor, principalmente devido à apresentação anterior e viabilidade de remoção completa (30) (105).

2.1.6 Tratamento

O tratamento do CAC é influenciado pela localização do tumor, estágio e estadiamento no diagnóstico e comportamento biológico, conforme refletido no grau histológico (113). O tratamento "padrão ouro" é a ressecção cirúrgica radical, garantindo margens livres e radioterapia pós-operatória. Mendenhall et al. (114) compararam a radioterapia sozinha à radioterapia combinada com a cirurgia e concluíram que o tratamento combinado tem resposta mais favorável. O CAC tem uma alta propensão a se infiltrar nos tecidos adjacentes, especialmente por invasão perineural, portanto, mesmo nos casos 'ressecáveis', muitas vezes não é atingido o objetivo de "margens livres". A ressecção incompleta é tipicamente um problema que surge em locais anatômicos de difícil acesso (115).

Quando está localizada na parótida, o nervo facial deve ser preservado se não estiver envolvido intimamente com o tumor no momento da cirurgia; a radioterapia pós-operatória seria um tratamento adjuvante eficaz para a doença microscópica residual em um ramo nervoso poupado (116).

Devido à incidência historicamente baixa de metástase nodal oculta, a dissecação do pescoço é realizada apenas no caso de linfonodos clinicamente positivos. Metástases linfonodais clinicamente óbvias não são frequentes, especialmente para primárias da glândula parótida (117). No entanto, para Glândula Salivares Menores, a incidência de linfonodos envolvidos parece maior. Min et al. (118) descreveram uma incidência geral de metástases linfonodais nos CAC da cabeça e pescoço de quase 10%, o que foi atribuído principalmente a locais como base da língua, língua e assoalho da boca. Entretanto, observou-se que é mais provável que a invasão linfovascular seja detectada histologicamente em amostras de ressecção em vez de biópsias de diagnóstico, que também são pequenas quando extraídas de locais anatomicamente "difíceis". Lee et al. (119) relataram recentemente que 15,38% dos pacientes que receberam ressecção eletiva do pescoço tinha metástase oculta e recomenda a sua realização eletiva para estadiamento e controle regional. Ainda não está claro se o controle regional, a sobrevida é melhorada com a realização de uma dissecação eletiva do pescoço nesses pacientes. Para o CAC em locais como glândula

submandibular, os linfonodos também podem estar envolvidos pela extensão direta do tumor primário (107).

Infelizmente, as recorrências locais ocorrem apesar do tratamento combinado com cirurgia e radioterapia. Alguns autores postulam que a radiação pós-operatória pode demorar mais do que impedir a recorrência (120). Infelizmente, isso não resulta em benefício de sobrevivência, principalmente por causa de metástase distante (em 2 de 5 pacientes após 51 meses). Além disso, efeitos colaterais tardios graves da radioterapia incluem necrose dos tecidos moles, mandíbula, osso temporal e lobo temporal do cérebro (121).

Em pacientes com fatores prognósticos adversos, a quimiorradioterapia usando vários agentes pode ser considerada, e evidências preliminares sugerem sua utilidade (122). Em uma série de NMGS (43% CAC), Schoenfeld et al. (123) exploraram o uso de carboplatina ou paclitaxel como radiosensibilizador.

A quimioterapia ainda é a opção de tratamento mais popular quando a terapia é necessária, embora não exista um padrão de sistema claro (124). No entanto, eles representam um grupo heterogêneo e são frequentemente refratários à quimioterapia (1). Existem poucos estudos randomizados nesse cenário, e os resultados obtidos com quimioterapia para o CAC são insatisfatórios em geral (125). O regime mais estudado: ciclofosfamida, doxorrubicina e cisplatina, forneceu uma taxa de resposta geral de 27%, com toxicidade significativa (126). Outro regime foi a combinação de cisplatina e vinorelbina, que deu respostas objetivas em 21% dos pacientes (127). Ou com a combinação de cisplatina ou carboplatina como no estudo com 8 pacientes e CAC, cisplatina/carboplatina, epirubicina e 5-FU (128).

A revisão de Dodd & Slevin (129) mostrou que compostos quimioterápicos isolados foram mais eficazes de controle dos sintomas do que propriamente da doença ministrando isolados ou associados derivados de Platina, 5-fluorouracil e antraciclinas. As taxas de resposta mais consistentes para quimioterapia combinada são de 25 a 33% para regimes de platina, antraciclinas e agentes alquilantes. Infelizmente, a duração da resposta parece ser geralmente curta, geralmente de 5 a 13 meses.

O tratamento sistêmico empregando quimioterapia citotóxica ou terapias moleculares direcionadas ainda não resulta na cura do paciente com CAC. Na melhor das hipóteses, a resposta parcial temporária à doença ou a estabilização podem ser alcançadas. Portanto, a quimioterapia deve ser reservada como tratamento paliativo

para pacientes com doença mal controlada ou afetada por metástases sintomáticas (130). E sugerem que o melhor para um cenário futuro para o tratamento é individualizar o paciente tendo marcadores alvos para melhorar a resposta (131).

Portanto, estudos de sequenciamento buscam as mutações que estão envolvidos na patogênese do CAC. E em particular, a segunda via mais comum está relacionada ao remodelamento cromático em que as histonas estão envolvidas, e agentes recém-desenvolvidos estão sendo estudados. Como várias outras vias também estão implicadas no CAC, a estratificação de pacientes e individualização com base nos subtipos moleculares e histológicos será fundamental para entender melhor as correlações clínico-patológicas-moleculares e buscar terapia alvo mais adequada (10).

2.1.6.1 Terapia Alvo

O perfil molecular (PM) de tumores pode ser usado para identificar alvos potenciais para os quais existem terapias disponíveis. Envolve a aplicação de imunohistoquímica (IHC), hibridização in situ fluorescente/cromogênica (FISH / CISH), análises de microarranjos, sequenciamento e reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR). O tratamento com base nos resultados da PM mostrou sucesso em um estudo piloto de uma variedade de cânceres refratários (132). E na revisão sistemática de tumores de glândulas salivares mostrou que o perfil de expressão imuno-histoquímica e o de genes revelaram excelentes chaves para a terapia direcionada na maioria dos subtipos, buscando assim o mapeamento das características do tumor e, portanto, uma ferramenta para otimizar o tratamento, adaptando-o ao paciente (133).

O tratamento baseado no PM pode ser particularmente benéfico para cânceres com heterogeneidade molecular e para cânceres de baixa prevalência, que dificilmente são estudados em ensaios clínicos. Além disso, dado que o PM leva até duas semanas, essa abordagem pode ser mais adequada para doenças com progressão lenta e heterogêneo, como o CAC (11) (134)

Popovtzer et al. (12) estudaram o perfil molecular de CAC de glândulas salivares metastático através de IHC e de análise por microarray e viram que através IHC houve a baixa expressão de TS (75%), ERCC1 (50%), MGMT (21%), a superexpressão de TOPO1 (46%), SPAPC (36%), TOP2A (18%), AR (14%), ER (14%) e foi negativo para HER2 (100%). Já pela análise de microarray observaram a superexpressão de KIT (67%), TOP2B (67%), PDGFRA (50%), PDGFRB (50%), TYMS (33%), VDR (33%), ESR1 (33%), SPARC (33%) e a baixa marcação de MGMT (33%). De acordo com o PM de cada paciente realizou-se a terapia alvo e observaram a sobrevida livre de progressão, em meses, e notaram que quando trataram com Goserelin (AR+) a sobrevida foram 49,5; Tamoxifeno (ER+) 16,1; Paclitaxel + 5FU (baixo ERCC1, TS) 9 meses; Irinotecano (alto TOPO1) 6,4 meses; Tamoxifeno (alto ESR1) 8,2 meses; Gencitabina (alto DCK) 3,1 meses; Sorofenib (alto KIT, PDGFRA) 12,2 meses; Paclitaxel (baixo PGP, TUBB3) 8,2 ; e Everolimus (AKT1 mutado) houve progressão. E concluíram que o perfil molecular expande as opções de tratamento e pode melhorar os resultados clínicos do CAC de glândulas salivares metastático.

Em relação a translocação de MYB, resultados ainda são conflitantes ao efeito do seu papel como alvo potencial terapêutico, por ser um fator de transcrição e difícil distinguir como alvo clinicamente (1). Em modelo de xenoenxerto derivado de CAC com NOTCH1 mutado mostrou susceptibilidade a um inibidor de Notch1 e teve resposta favorável a um anticorpo monoclonal específico direcionado-a como parte de um ensaio clínico de fase I. (4) Os resultados preliminares de um ensaio clínico de fase I com o inibidor de pan-Notch LY3039478 mostrou boa resposta e a taxa de controle da doença foi de 73%, com quatro pacientes com doença estável por mais de 6 meses. (135). Esses resultados provocadores justificam uma investigação adicional, atualmente em andamento alguns ensaios clínicos. A via Notch, juntamente com a HMG-box 10 relacionada ao SRY (SOX10) e sua proteína efetiva de ligação a ácidos graxos 7 (FABP7), podem estar intimamente relacionadas ao papel das células-tronco cancerígenas na CAC (136) o estudo de fase 1b/2 com amcasertib, foi bem tolerado e mostrou atividade em 14 pacientes com CAC, sem respostas, mas com controle de doença de 86%, com 50% dos pacientes estabilizados por mais de 6 meses (137).

Nas células primárias do CAC, a cisplatina aumentou a população de células-tronco cancerígenas. A administração de Vorinostat (SAHA), um inibidor da histona desacetilase (HDAC), reduziu o número de células-tronco cancerígenas. Além disso,

a combinação de Vorinostat e Cisplatina foi extremamente eficaz na diminuição de células-tronco cancerígenas e reduziu a viabilidade do tumor (13). O Vorinostat foi então testado em 30 pacientes com CAC em um estudo de fase II, demonstrando uma taxa de 90% livre de progressão (27/30) (14). Existe um estudo fase II, combinando Vorinostat e Pembrolizumab para carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço recorrente ou metastático e de tumores malignos de glândula salivar, em que mostrou resposta parcial em 16% e 56% de doença estável nos tumores malignos de glândula salivar. O acompanhamento foi de 13,1 meses, sendo a média de 14 meses de sobrevida global e 6,9 meses de sobrevida livre de progressão. E concluiu que a combinação mostrou maiores tipos de toxicidade comparando-se de forma de uso sendo isoladas e houve menor resposta nos tumores de glândulas salivares em comparação com carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (138).

Um estudo de fase II comparando o pembrolizumab com ou sem radiação para CAC recorrente ou metastático mostrou que foi bem tolerado portanto não observaram grande resposta e estratégias adicionais são necessárias para retardar ainda mais a progressão e efetuar a resposta (139).

O receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR) e o receptor 1 do fator de crescimento de fibroblastos (FGFR1) são geralmente superexpressos no CAC e representam potenciais alvos terapêuticos. Vários inibidores dessas vias, incluindo sorafenibe, sunitinibe, regorafenibe, dovitinibe, nintedanibe, axitinibe e pazopanibe, foram estudados no CAC (55) (140) (141) (142) (143) (144). Mais recentemente, o inibidor de multiquinase de nova geração lenvatinib, ativo contra VEGFR2, FGFR1-3, KIT, RET e receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) α e β , demonstrou uma taxa de resposta global de 12% a 16% na segunda fase, com 25% a 27% dos pacientes com CAC atingindo pelo menos uma redução de 20% no tamanho das lesões tumorais direcionadas. Embora esses resultados sejam encorajadores, a toxicidade era comum e a redução da dose ocorreu em 72% a 86% dos pacientes (145).

Em um estudo de phase II, testando com lapatinib em CAC, que é um inibidor duplo dos domínios tirosina quinase do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e erbB2, interferindo na ligação e bloqueando a autofosforilação e as atividades de sinalização resultantes, incluindo proliferação e sobrevivência, dos 62 pacientes selecionados, 29 de 33 (88%) CAC expressaram EGFR e / ou erbB2. Entre os 19 pacientes avaliados com CAC, não houve respostas objetivas, 15 pacientes

(79%) apresentaram doença estável, nove pacientes (47%) apresentaram doença estável $\pm$ 6 meses e quatro pacientes (21%) apresentaram doença progressiva. Portanto, mesmo bem tolerado apresentou toxicidade e baixa resposta de controle da doença (146).

Já no estudo phase II (147) utilizou Imatinib em CAC com expressão de c-Kit e dezesseis pacientes foram incluídos no estudo. Deste, 14 pacientes tiveram metástases pulmonares, 14 tiveram radioterapia e 6 tiveram quimioterapia prévia. Em 15 pacientes avaliados para resposta, nenhuma resposta objetiva foi observada. 9 pacientes apresentaram doença estável e 6 pacientes apresentaram doença progressiva após dois ciclos. Portanto, mesmo sendo bem tolerado ainda não apresentou boa resposta de controle da doença.

A superexpressão direcionada do HER2 e c-KIT com agentes como trastuzumabe, lapatinibe, imatinibe e dasatinibe falhou em mostrar melhora da atividade no CAC (148) (149) (150).

A terapia do CAC está passando por importantes descobertas científicas no nível molecular e vários alvos já estão sob investigação clínica e muitos outros ainda precisam ser testados prometendo avanço no seu tratamento (1).

2.2 MODIFICAÇÕES EPIGENÉTICAS

O câncer é uma doença complexa formada por diversos mecanismos e é iniciado e conduzido por mutações genéticas devido à exposição a agentes cancerígenos. Com a conclusão dos projetos Genoma Humano e Genoma do Câncer, sabemos que mais de 100.000 mutações genéticas podem ocorrer em uma única célula cancerígena. Essas mutações genéticas incluem a substituição de base nucleotídica, translocação, fusão de genes e rearranjo cromossômico, resultando na alteração de proteínas relacionadas à genética para perturbar a biologia e o comportamento celular (151).

Além das mutações genéticas, as modificações epigenéticas desempenham um papel importante na expressão e regulação de genes (8). As modificações epigenéticas incluem metilação do DNA, do mecanismo de acetilação-deacetilação e

a modificação de histonas que não alteram a sequência do DNA. Tais modificações epigenéticas resultam em condensação ou afrouxamento da cromatina, regulando assim a expressão gênica (15). Essas alterações epigenéticas promovem carcinogênese e progressão do câncer (152).

Também incluem modificações como acetilação, ubiquitilação, fosforilação e metilação das proteínas das histonas. A acetilação da histona é regularmente associada a promotores ativos, e as histona acetiltransferases (HATs) regulam o processo de acetilação para catalisar e transferir um grupo acetil para as cadeias laterais da histona, nas lisinas. Essa modificação enfraquece a afinidade das histonas com o DNA e afrouxa a estrutura da cromatina, promovendo a transcrição de genes, expondo potenciais locais de ligação para o recrutamento de fatores de transcrição. Esses grupos acetil podem ser removidos por histona desacetilases (HDACs), uma família de proteínas que inverte a acetilação dos resíduos de lisina. Esse tipo de modificador impede a transcrição de genes, condensando a estrutura da cromatina, inibindo assim a interação das proteínas de ligação à cromatina (geralmente fatores de transcrição) com o DNA da cromatina (16). Essas modificações das histonas também afetam o reparo e a replicação de danos no DNA para o início e desenvolvimento do câncer (153). O EZH2, uma enzima histona-lisina N-metiltransferase no grupo de proteínas policometas, é expresso de maneira anormal nos tecidos e células do câncer e induz modificações estruturais e funcionais das histonas para promover a carcinogênese (154).

A modificação das histonas é considerada um importante mecanismo que contribui para a regulação de genes envolvidos na diferenciação, ciclo celular e carcinogênese. A acetilação da lisina é o primeiro passo para a ativação transcricional por meio de mecanismos relacionados a efeitos diretos na estrutura da cromatina (21). Há evidências que mostram hipoacetilação de histonas em diferentes lisinas caracterizam certas doenças (155). Níveis elevados de H3K9ac têm sido associados a um melhor prognóstico (156). Os níveis da marca H3K9ac aumentaram após o tratamento com iHDAC (157). O H4K16ac é considerado um modulador positivo da expressão gênica. O H4K16 hipoacetilado aparece precocemente e se acumula durante o desenvolvimento do tumor em um modelo de carcinogênese in vivo, sugerindo que a perda de acetilação do H4K16 é necessária para a transformação maligna, por exemplo (158). O H4K16ac foi encontrado em níveis baixos ou indetectáveis na maioria do câncer de mama (159). Os papéis importantes dessa

histona marcam a carcinogênese, silenciamento de genes supressores de tumor, vida celular, extensão e a ativação de genes antiapoptóticos (22).

As enzimas que medeiam as acetilações de histonas reconhecem o tipo de modificação e o motivo da sequência para obter especificidade e regulação (Figura 2.1). As acetilações de histonas diferem em termos de comprimento, carga e forma da cadeia de carbono, que constrói a base molecular para o reconhecimento e a catálise específicos da modificação. O motivo de sequência consiste em informações da cadeia lateral e da cadeia principal. A especificidade estrita do local está frequentemente ligada aos reconhecimentos de cadeia lateral das sequências de acetilação, enquanto a seletividade de classe geralmente é resultado do reconhecimento de “backbone”, por exemplo, a seletividade de backbone β do SIRT3 (160). Zhang et al. mostraram que SIRT3 tem como preferência por H3 K4, K9, K16, K18, K23 e K27. E é incapaz de remover e de reconhecer o “backbone” das H4 K5, K8 and K12 (161) .

Quase todos os eucariotos envolvem seu DNA em torno de histonas para formar nucleossomos que compactam o genoma enquanto ainda permitem o acesso a processos ativos, como transcrição, replicação e reparo de DNA. Cada partícula do nucleossomo compreende de um octâmero de proteínas de 2 moléculas de cada uma das 4 histonas altamente conservadas H2A, H2B, H3 e H4 (Figura 2.2) (162). Cada uma das quatro histonas compartilha a estrutura comum de um domínio de dobra de histonas, dobram-se em pares antiparalelos: H3 com H4 e H2A com H2B1, formando fita dupla. H2A.X é semelhante ao H2A, mas distingue-se pelo motivo C-terminal que tem um componente hidrofóbico. Esse motivo pode tornar-se rapidamente fosforilado, produzindo a forma conhecida como γ H2A.X, pelas quinases do tipo fosfo-inositídeo 3-quinase, ataxia telangiectasia mutada (ATM), ataxia telangiectasia e RAD3 (ATR) e DNA dependente de proteína quinase (DNA-PK). A fosforilação ocorre em resposta a quebra de fita dupla, nas quais o γ H2A.X ajuda a recrutar e/ou reter proteínas de reparo do DNA, enzimas modificadoras de histonas e complexos de remodelação da cromatina (163).

Figura 2.1 - Enzimas/ Lisinas que medeiam as acetilações de histonas

Fonte: Ninja Tan, Hao Luo, Sangkyu Lee et al (164)

Figura 2.2 - Partícula de nucleossomo formada por um octâmero de proteínas de 2 moléculas de cada uma das 4 histonas

Fonte: Talbert PB and Henikoff S (165)

Estudos identificaram um número de reguladores epigenéticos mutados em pacientes com câncer como principais promotores/iniciadores da carcinogênese. (Figura 2.3). Mutações de reguladores epigenéticos, como IDH1/2, EZH2 e DNMT3A,

promovem a tumorigênese, enquanto mutações que desativam reguladores de cromatina, como KDMs, CREBBP / EP300 e SMARCB1, inibem a tumorigênese (166).

Figura 2.3 - Mutações de genes reguladores da via de remodelação cromática

Fonte: Ninjia T, Hao L, Sangkyu L et al (164)

O microambiente no interior das neoplasias sólidas é totalmente diferente das neoplasias hematológicas. A rápida proliferação de células cancerígenas no interior de tumores sólidos geralmente induz hipóxia celular e acidificação do tecido no centro, o que resulta em reprogramação metabólica das células cancerígenas, afetando assim a expressão e modificação de moléculas epigenéticas e, portanto, a eficácia de drogas epigenéticas (3). A estrutura tecidual dos tumores sólidos afeta a penetração, distribuição e farmacocinética. O acúmulo reduzido de drogas epigenéticas no interior dos tumores pode reduzir sua resposta (167).

A avaliação de medicamentos epigenéticos com base na redução a curto prazo do volume do tumor após o tratamento pode ser menos favorável do que avaliar a sobrevida global a longo prazo dos pacientes em comparação com a quimioterapia convencional. Os fármacos epigenéticos possuem diferentes mecanismos e requerem biomarcadores específicos para direcionar seu uso clínico (168).

As terapias combinadas que exploram múltiplos inibidores epigenéticos, ou usam medicamentos epigenéticos com outros quimioterápicos ou medicamentos direcionados a moléculas, são um conceito atraente para alcançar efeitos terapêuticos (9).

A terapia combinada de múltiplas drogas epigenéticas mostrou resultados pré-clínicos significativos para tumores sólidos (17). Os iHDACs induziram apoptose, diferenciação e/ou interrupção do crescimento celular nas linhas celulares humanas de câncer de pulmão, mama, torácica, leucemia e cólon (18), trabalhando em conjunto para inibir a expressão de oncogene e ativar os genes supressores de tumor silenciados (169).

Os iHDACs aumentam a sensibilidade das células cancerígenas à cisplatina e doxorrubicina, aumentando a acessibilidade da cromatina através da descompactação da cromatina (19). A terapia combinada com Vorinostat aumentou a eficácia de Carboplatina / Paclitaxel no câncer de pulmão de não pequenas células avançadas, aumentando a taxa de resposta (34% vs. 12,5%), a sobrevida média livre de progressão (6,0 meses a 4,1 meses) e, em geral, sobrevida (13,0 meses v 9,7 meses) (20).

A combinação de drogas epigenéticas com radioterapia também mostrou potencial terapêutico significativo, promovendo dano ao DNA e induzindo apoptose celular. Os inibidores de HDAC sensibilizaram as células cancerígenas à radioterapia, amplificando a sinalização e inibindo o reparo de quebra de DNA de fita dupla (170).

Mostraram que o uso de drogas epigenéticas como tratamento para tumores sólidos tem mostrado bons resultados quando combinados, porém é de importância a identificação de moléculas alvos para melhorar a eficácia terapêutica. E as melhores modalidades terapêuticas combinadas se basearão sim na rede de modificações epigenéticas do câncer (168).

2.3 INIBIDOR DE DEACETILAÇÃO DE HISTONAS (iHDAC) - ENTINOSTAT

Os iHDACs são agentes epigenéticos que foram intensamente estudados por sua capacidade de induzir a hiperacetilação de histonas e de regular positivamente a expressão gênica de diferenciação e controle do ciclo celular. Eles fazem isso inibindo a remoção enzimática, mediada por HDAC, de grupos acetil na cromatina, resultante no silenciamento de importantes genes supressores de tumores. O Entinostat segue uma longa história de desenvolvimento de drogas que começou com derivados do ácido butírico nos anos 80. Os butiratos foram os primeiros agentes para os quais a hiperacetilação de histonas estava ligada à diferenciação - por exemplo, com a indução da síntese de hemoglobina nas células de eritroleucemia (171). A pesquisa de outros agentes diferenciadores levou à identificação do Vorinostat, ácido hidroxâmico, e sua capacidade de inibir HDACs foi relatado em 1998 (172). A Romidepsina foi identificada como também capacidade de inibir HDACs em 1998. (173) A atividade clínica e a aprovação da Food and Drug Administration dos EUA para o Vorinostat em 2006 e a Romidepsina em 2009 desencadearam o desenvolvimento de uma série de inibidores de HDAC, a maioria deles ácidos hidroxâmicos, como o Vorinostat (174). Dois outros ácidos hidroxâmicos obtiveram aprovação da Food and Drug Administration: Belinostat para linfoma de células T periférico e Panobinostat em combinação com bortezomibe e dexametasona para mieloma múltiplo. Uma classe de droga diferente foi adicionada aos iHDACs, as benzamidas, incluindo Entinostat e Mocetinostat, e, posteriormente, Chidamida. Os primeiros ensaios clínicos de Entinostat foram relatados em tumores sólidos, leucemias e linfomas em 2006 e 2007 (175).

Os alvos enzimáticos dos iHDAC são as enzimas HDAC, que são divididas por estrutura em 4 classes: as enzimas 1, 2, 3 e 8 compreendem a classe I; as enzimas 4, 5, 7 e 9 compreendem a classe IIA; as enzimas 6 e 10 compreendem a classe IIB; e o HDAC11 constitui a classe IV. (176). As enzimas são estruturalmente diferentes e possuem diferentes localizações primárias, com a classe I residindo no núcleo e a classe II no citoplasma e também no núcleo. Numerosas proteínas citoplasmáticas são substratos para desacetilação, como as sirtuinas, que compreendem a classe III,

são insensíveis aos iHDAC (177). Assim sendo, o Entinostat inibe a classe I (Figura 2.4).

Figura 2.4. - Estrutura das enzimas de HDAC

Fonte: Ira Surolia and Susan E Bates (178)

Embora todas as células demonstrem acetilação de histona e alteração de cromatina, elas diferem na sensibilidade à morte celular e podem parar em G1, G2 ou vão diretamente à apoptose após a ação do iHDAC dependendo do contexto celular. (177). O Entinostat é único iHDAC ter uma meia-vida longa (34-80 horas) e pode ser administrado semanalmente. Portanto, possui potenciais efeitos epigenéticos mais prolongados e, pode ser mais útil em estudos combinados. O perfil de efeito colateral é semelhante ao dos outros inibidores do HDAC, incluindo trombocitopenia, fadiga e náusea. A trombocitopenia é transitória e rapidamente reversível, e nenhuma evidência de toxicidade cumulativa foi descrita. Os perfis de efeitos colaterais sugerem que a inibição das enzimas HDAC classe I é o efeito dominante de todos os outros iHDAC, pelo menos clinicamente tolerável e reforça a potencial atividade clínica do Entinostat (177). A utilização de iHDAC mostrou superar a resistência e/ou aumentar a sensibilidade a várias classes de agentes, incluindo quimioterapia, terapia hormonal e imunoterapia em câncer de pulmão, de mama, rim, cólon e outros tumores sólidos. (178) (179) (180) (181)

Para avaliar a sua atividade, é comum mensurar as histonas 3 e 4 dado que um acúmulo dessas histonas acetiladas mostra uma consequência direta da ação dos iHDAC (182).

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Analisar a terapia com o Entinostat em combinação a Cisplatina e caracterizando a resposta da progressão dos CAC primários e metastáticos de glândula salivar.

3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Analisar a resposta da combinação de Entinostat com Cisplatina em relação ao efeito de Inibição do Crescimento Tumoral no CAC primário e metastático;
- Examinar o impacto da terapia combinada nos CAC primários e metastático a partir da análise do painel de vias de sinalização e imunoexpressão de marcadores biológicos referentes a dano de DNA, proliferação, apoptose, senescência e resistência tumoral.
- Caracterizar e demonstrar a ação da terapia combinada nos níveis dos marcadores biológicos associados à cromatina e da modificação epigenética;
- Identificar marcadores alvos que podem ser úteis para estratificar os CAC com maior potencial de resposta à terapia.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 XENOENXERTO DERIVADO DO PACIENTE (PDX)

Os modelos de Xenoenxerto Derivado do Paciente (PDX) foram realizados e disponibilizados para o estudo pela South Texas Accelerated Research Therapeutics (START, San Antonio, TX), em que os fragmentos de tumor humano de 3 pacientes diferentes (ACCx9; ACC5M1; ACCx6) foram transplantados por via subcutânea na região dorsal de camundongos machos imunodeficientes. O modelo de tumor ACCx9 derivado de um tumor primário de grau 3 das glândulas parótidas, não metastático; ACC5M1 e ACCx6 com metástase pulmonar de tumores de grau 2 de CAC originados principalmente da cavidade oral e das glândulas parótidas, respectivamente.

Os camundongos que receberam fragmentos do tumor foram randomizados em 4 grupos: Controle, Entinostat (5mg / kg), Cisplatina (5mg / kg) ou a combinação de Entinostat (5mg / kg) e Cisplatina (5mg / kg) por 3 semanas. Para a administração combinada de Entinostat e Cisplatina, os tumores foram sensibilizados com Entinostat 5 dias antes da administração de Cisplatina. Os camundongos PDX receberam administração diária de Entinostat (5 mg / kg), juntamente com uma administração semanal de cisplatina (5 mg / kg) durante 3 semanas. O Entinostat foi diluído em solução de metilcelulose a 0,5% em solução salina sob sonicação. A cisplatina foi diluída em solução de HCL a 0,5%. O crescimento do tumor foi monitorado e medido a cada 3 dias, até 42 dias.

O Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais revisou e aprovou esses procedimentos.

4.2 EXTRAÇÃO DE RNA E ANÁLISE NANOSTRING E CLUSTER 3.0 / TREE VIEW

Amostras de tumor de todos os modelos PDX camundongos foram armazenados a -80°C (OriGene Technologies, Inc., EUA) e foi selecionados 1 amostra de cada braço da terapia aleatório e seccionado em 3mm^3 de volume e processadas para extração de RNA usando o Quick-RNA MicroPrep Kit (Zymo Research, EUA). A quantidade total de RNA foi quantificada usando um fluorímetro Qubit e Nanodrop (ThermoFisher, EUA). O RNA de todas as amostras foi diluído para uma concentração final de 100 ng em um volume total de 5 μL . As amostras foram mantidas a -80°C até seu processamento usando um painel nCounter PanCancer Pathway contendo 770 genes distribuídos em 13 vias de sinalização relacionadas ao câncer: MAPK, STAT, PI3K, RAS, ciclo celular, apoptose, Wnt, danos ao DNA, regulamento transcricional, modificação de cromatina e TGF- β (Nanostring, EUA).

A saída de dados (dados brutos) foi analisada usando o software nSOLVER Analysis, a partir do plug-in Advanced Analysis 2.0 (Nanostring, EUA). A normalização foi realizada automaticamente usando a média geométrica dos controles positivos e os genes de normalização do conteúdo do CodeSet. Os dados normalizados do nSOLVER (Log2) foram importados para o Cluster e centralizados para Genes. O agrupamento hierárquico (não centrado) foi realizado para Genes e Arrays, seguido de ligação média. A saída de dados do Cluster 3.0 foi carregada no software TreeView para visualizar e extrair a lista de genes seguindo os padrões de agrupamento comparando os braços da terapia e controle.

4.3 .INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL (ICT) E HEMATOXILINA EOSINA

A resposta às terapias estudadas em relação ao controle foi monitorada e medida através da inibição do crescimento tumoral (ICT) calculada e mensurada a cada 3 dias até 42 dias, e no final expressa em porcentagem e; também, foi ilustrada

pela coloração de hematoxilina eosina para análise em relação a modificação da morfologia em cada amostra (ACCx6, ACC5M1, ACCx9).

4.4 IMUNOHISTOQUÍMICA (IHC) / IMUNOFLUORESCÊNCIA (IF)

Secções histológicas de 4 µm de cada amostra de PDX foram processadas para imunohistoquímica/imufluorescência, de acordo com o anticorpo em estudo, em lâminas silanizadas. Resumidamente, para a imunohistoquímica: os cortes histológicos foram desparafinizados em xileno e hidratados em graus decrescentes de etanol, seguidos de incubação em PBS e albumina sérica bovina (BSA) a 3% (p / v). O anticorpo primário anti-p16^{ink4a} (1:50, BD Biosciences # 550834, San Jose, CA, EUA) foi incubado overnight seguido pelo anticorpo secundário correspondente, anti-mouse (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), à temperatura ambiente por 60 min. O sistema de detecção de DAB foi utilizado após incubação com tetrahidrocloreto de diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EUA) e contracorada com hematoxilina de Mayer.

A coloração por imunofluorescência foi realizada após as secções histológicas serem desparafinizadas em xileno e hidratadas em graus decrescentes de etanol, seguidas de incubação com Triton X-100 a 0,5% (v / v) em PBS e albumina sérica bovina (BSA) a 3% (p / v). As amostras de tecido foram incubadas overnight usando os anticorpos primários anti-Ki67 (1: 5, DSHB – AFFN – Ki67 – 3EG, Iowa, EUA), anti-NFκB (1:5, RelA, DSHB, Iowa, EUA), anti-CBP/300 (1:50, Cell Signaling #4771S), Danvers, MA, EUA), anti-DNMT1 (1:100, Santa Cruz, #20701, EUA), anti-gama-H2AX (1: 100, EMD Millipore, # 05-636, Burlington, EUA) , anti-caspase 3 (1: 200, Cell Signaling, # 9661S, Danvers, MA, EUA), anti-acetil-p53 (1:50, Cell Signlaing #2525S, Danvers, MA, EUA), anti-acetil-histona H4K5 (1: 200, Thermo Fisher Scientific # PA540085, Waltham, MA), anti-acetil-histona H4K8 (1: 100, Thermo Fisher Scientific, #710828, Waltham, MA), anti-acetil-histona H4K12 (1: 300, Cell Signaling, # 13944, Danvers, MA, EUA), e foram incubadas por 3h em temperatura ambiente anti-acetil-Histona H3K9 – conjugado (1: 400, Cell Signaling # 9649S, Danvers, MA, EUA) e por 1h anti-Acetil-Histona H4K16 (E2B8W) conjugado (1:50, Cell Signaling, # 98789, Danvers , MA, EUA). Em seguida, as lâminas foram incubadas por 60 min em

temperatura ambiente com anticorpo secundário correspondente (anti-rabbit ou anti-mouse) Alexa 488 ou Alexa 568 e coradas com Hoechst 33342 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) para visualização do conteúdo de DNA. As imagens foram capturadas usando uma câmera digital monocromática Qimaging ExiAqua conectada a um microscópio Nikon Eclipse 80i (Nikon, Melville, NY) e visualizadas com o software Nikon NSI e capturadas com ampliação final de 200 × em 10 pontos aleatórios. Cada reação foi feita em duplicata. Resumida na tabela 4.4.1 e ilustrada na figura 4.4.1A

Tabela 4.1 - Características dos anticorpos utilizados nos ensaios de imunohistoquímica e imunofluorescência

Anticorpo	Procedência	Espécie	Recuperação antigênica	Bloqueio	Incubação
anti-p16 (#550834)	BD Biosciences	Camundongo	EDTA	PBS + BSA 3%	1:50 overnight
anti-Ki67 (DSHB-AFFN- Ki67- 3EG)	Iowa	Camundongo	Ácido cítrico	Triton 0,1% + PBS + BSA 3%	1:5 overnight
anti-gamma-H2AX (#05-636)	EMD Milipore	Camundongo	Ácido cítrico	Triton 0,1% + PBS + BSA 3%	1:100 overnight
anti-caspase3 (#9661S)	Cell Signaling	Coelho	Ácido cítrico	Triton 0,1% + PBS + BSA 3%	1:200 overnight
anti-acetil-p53 (#2525S)	Cell Signaling	Coelho	Ácido cítrico	Triton 0,1% + PBS + BSA 3%	1:50 overnight
anti-NFκB (Rela)	Iowa	Camundongo	Ácido cítrico	Triton 0,1% + PBS + BSA 3%	1:5 overnight
anti-CBP/p300 (#4771S)	Cell Signaling	Coelho	Ácido cítrico	Triton 0,1% + PBS + BSA 3%	1:50 overnight
anti-DNMT1 (#20701)	Santa Cruz	Coelho	Ácido cítrico	Triton 0,1% + PBS + BSA 3%	1:100 overnight
anti-acetil-H4K5 (#PA540085)	Thermo Fisher Scientific	Camundongo	Ácido cítrico	Triton 0,1% + PBS + BSA 3%	1:200 overnight
anti-acetil-H4K8 (#710828)	Thermo Fisher Scientific	Coelho	Ácido cítrico	Triton 0,1% + PBS + BSA 3%	1:100 overnight
anti-acetil-H4K12 (#13944)	Cell Signaling	Coelho	Ácido cítrico	Triton 0,1% + PBS + BSA 3%	1:300 overnight
anti-acetil-H4K16 (#98789)	Cell Signaling	Coelho	Ácido cítrico	Triton 0,1% + PBS + BSA 3%	1:50 1h RT
anti-acetil-H3K9 (#98789)	Cell Signaling	Coelho	Ácido cítrico	Triton 0,1% + PBS + BSA 3%	1:400 3h RT

Fonte: A autora

O resumo da metodologia aplicada é ilustrada na figura 4.1B.

Figura 4.1 - Metodologia utilizada: A) Proteínas utilizadas nas reações de IHC/IF; B) Esquema da metodologia utilizada

Fonte: A autora

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística das reações de IHC/IF foram realizadas usando o GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, versão 8). A quantificação por marcação do número total de células positivas foi realizada usando o teste t de Student não pareado e ANOVA, seguido pelos testes de comparação múltipla de Tukey. Asteriscos denotam significância estatística (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ e ns $p > 0,05$).

4.6 ÉTICA DO ESTUDO E FUNDING

Este trabalho foi financiado pela Adenoid Cystic Research Foundation (ACCRF) e pela faculdade da Universidade de Michigan e realizado durante o período sanduíche na Universidade de Michigan com o auxílio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) da Fundação, no Ministério da Educação do Brasil (Grant BEX / 88881.135014 / 2016-01 PDSE)

O componente animal do estudo foi desenvolvido pela companhia "START - South Texas Accelerated Research Therapeutics" sob contrato da ACCR

5 RESULTADOS

Entinostat e Cisplatina juntos mostram ser a melhor resposta através da Inibição do Crescimento Tumoral (ICT) e na mudança nas características morfológicas do CAC

A terapia combinada Entinostat - Cisplatina resultou em Inibição do Crescimento Tumoral após 20 dias em 106%, 63% e 38% nos casos ACCx9, ACC5M1, ACCx6, quando comparados sem terapias medicamentosas (Figura 5.1A).

Quando o Entinostat é usado como monoterapia, ocorre a segunda melhor resposta para redução do volume do tumor (83%, 52%) E a cisplatina sozinha mostra uma diminuição no crescimento do volume do tumor de apenas 21% e 14% em comparação com o controle após 20 dias, mostrando que o Entinostat sozinho também é uma boa escolha para a inibição do crescimento tumoral.

Por outro lado, no ACCx6, quando o Entinostat e a Cisplatina são utilizados isoladamente, não houve resposta inibitória em comparação com o veículo. Isso resultou em aumento do volume do tumor de 20% e 29%, mostrando resistência do tumor a ambas as terapias neste caso.

E essa resposta à inibição de crescimento tumoral é ilustrada através do perfil da morfologia de cada braço estudado. Sendo na amostra do CAC primário, a terapia combinada mostrou mudança significativa na morfologia com a formação de espaços pseudocísticos, E nos casos metastáticos o padrão de manteve (Figura 5.1B).

E em todos os casos, quando tratados apenas com Entinostat e Cisplatina, apresentaram melhor resposta morfológica apenas com Entinostat em comparação com Cisplatina, os espaços pseudocísticos foram mantidos, diferentemente da Cisplatina, que revelou áreas mais sólidas.

Em suma, a combinação foi a melhor terapia alcançada no estudo para a inibição do crescimento tumoral, independente se primário ou metastático. E no perfil morfológico, mostrou melhor resposta na alteração do CAC primário.

Figura 5.1 - Resposta do CAC frente as terapias utilizadas A) Através da Inibição do Crescimento Tumoral; B) Através do perfil morfológico em Hematoxilina e Eosina

Fonte: Liana Webber e Rogério Castilho

Entinostat-Cisplatina reduz proliferação celular, dano do DNA e, aumenta a apoptose

Para demonstrar a resposta em relação ao fenótipo tumoral em relação a todos os braços estudados foram usados biomarcadores de proliferação celular (Ki67), dano do DNA (yH2AX), apoptose (caspase3).

A partir da análise da proliferação celular através da marcação do Ki67 observou-se maior expressão nos casos metastáticos em relação ao primário em todos os braços estudados (ACCx6 > ACC5M1 > ACCx9). (Figura 5.2A). O que também pode ser visualizado através do HE em que apresenta mitoses em todas as amostras. (Figura 5.2B). Interessantemente, quando se trata da Cisplatina sozinha houve aumento da expressão de Ki67 em comparação com o controle ($p < 0,0001$; $p < 0,05$; $p > 0,05$); no entanto, o Entinostat mostrou redução na expressão (ACCx9 $< 0,0001$ e ACC5M1 $p > 0,05$) e aumento expressivo no ACCx6 $p > 0,0001$) em relação ao controle.

Na análise do yH2AX, foram identificadas diferentes respostas em relação ao tipo de amostra e terapia utilizada. No caso do controle, foi gradualmente expressa em ACCx9 > ACCx6 > ACC5M1. Quando analisado o Entinostat sozinho, houve maior expressão no ACCx6, seguido de ACCx9 e ACC5M1 e, em relação ao veículo houve diminuição do dano no DNA no ACCx9 e ACC5M1 ($p < 0,01$) e aumento no ACCx6 ($p > 0,05$). A Cisplatina isolada mostrou maior expressão no ACCx6, seguido pelo ACCx9 e ACC5M1 e em comparação com o controle teve aumento nos casos metastáticos ($p < 0,0001$, $p > 0,05$) e diminuição no primário ($p > 0,05$). E a terapia conjugada em todas as amostras ocorreu baixa expressão, menos que 1%. (Figura 5.2C)

Ao contrário da proliferação celular, a expressão da apoptose revelou uma diminuição gradual da marcação da caspase3 do CAC primário seguida pelos CACs metastáticos em todos os braços avaliados. Porém quando se compara a expressão entre os braços das terapias com o controle, mostrou o aumento quando usado Entinostat sozinho ou combinada nas amostras de ACCx9, ACC5M1. Porém no ACCx6 a monoterapia teve melhor resposta em relação a apoptose. E diferentemente, a Cisplatina isolada não teve resposta significativa em nenhum caso quanto a apoptose (Figura 5.2D)

Finalmente, ao comparar Entinostat-Cisplatina com o Controle, a marcação da caspase3 mostrou aumento no CAC primário e manteve nos CACs metastáticos (p

$<0,0001$, $p > 0,05$), houve diminuição da proliferação celular ($p < 0,0001$, $p < 0,05$, $p > 0,05$), e também do dano do DNA ($p < 0,01$, $p < 0,05$), independente se primário ou metastático (Figura 5.2)

Figura 5.2. - Resposta frente as terapias em relação ao fenótipo: proliferação celular, dano do DNA e apoptose. A) Ki67; B) Mitoses atípicas; C) γ H2AX; D) caspase3

Fonte: A autora

Mecanismo de ação epigenética do Entinostat-Cisplatina diminuindo a resistência tumoral e a senescência celular no CAC

Para analisar a resistência do CAC frente as terapias estudadas, avaliou-se a marcação de CBP/p300 e observou-se que a resistência tumoral permaneceu muito semelhante, com maior expressão, independentemente da terapia utilizada, na amostra dos CACs metastáticos seguido do CAC primário. No controle, a marcação média de células positivas nos CACs metastáticos foi de 5% e no CAC primário de 0,5%. Quando analisado o Entinostat sozinho em relação ao controle, diminuiu somente no ACC5M1 a expressão ($p < 0,01$). Ao contrário da Cisplatina isolada, que aumentou a resistência tumoral com esta terapia em todos os CACs ($p < 0,0001$; $p < 0,05$). Ao comparar a resposta do Entinostat-Cisplatina com o controle, diminuiu a resistência tumoral nos ACCx9 e no ACC5M1 e aumentou no ACCx6 ($p < 0,0001$; $p > 0,05$) (Figura 5.3A).

Em relação ao NFkB, mostrou um padrão de expressão uniforme em relação às amostras estudadas e à terapia analisada, com expressão gradual no ACCx9, seguido pelo ACC5M1 e ACCx6. No controle, a média de expressão celular positiva foi de 6% no ACCx9, 1,8% no ACC5M1 e 0,2% no ACCx6. Com o uso somente do Entinostat houve hipoexpressão ($p < 0,0001$; $p < 0,05$; $p > 0,05$) e com cisplatina o aumento ($p < 0,0001$; $p > 0,05$) da marcação nos CACs, independente se metastático ou primário. E quando analisados o Entinostat com Cisplatina, teve boa resposta no ACCx9 e ACC5M1 reduzindo ($p < 0,0001$; $p < 0,01$) e mantendo no ACCx6 ($p > 0,05$). (Figura 5.3B).

Utilizamos a expressão de p16^{ink4a} como biomarcador de senescência, com marcação focal e nuclear em todas as amostras testadas. Em relação ao controle, observa-se que houve maior expressão no ACC5M1 (6,8%), seguida pelo ACCx9 (5,6%) e ACCx6 (3%). No grupo com Entinostat isolado, houve diminuição expressiva da senescência ($p < 0,0001$; $p > 0,5$) ao contrário na Cisplatina que aumentou no ACCx6 ($p < 0,0001$) e regrediu no ACCx9 e ACC5M1. Com o Entinostat-Cisplatina, houve um aumento significativo no grupo ACCx6 ($p < 0,0001$) e diminuição no ACCx9 e no ACC5M1 em relação ao controle ($p < 0,0001$; $p < 0,001$) (Figura 5.3C).

A senescência é mediada por FOXO4, ilustrado através da quantificação do RNA realizado pelo sequenciamento no Nanostring, em que se observa a mesma expressão da senescência celular (no controle maior expressão no ACC5M1, seguido

do ACCx9 e ACCx6; e após a terapia combinada observou-se o aumento da expressão no ACCx6 e diminuição nos demais CACs.) corroborando com estudo anterior que o FOXO4 produz células senescentes (Figura 5.3D).

Figura 5.3. - Mecanismo de ação epigenética frente as terapias utilizadas em relação a resistência tumoral e senescência celular. A) CBP/p300; B) NFkB; C) p16^{ink4a}; D) FOXO4

Fonte: A autora e Rogério Moraes Castilho

Entinostat sensibiliza Cisplatina no CAC

Para avaliar o potencial efeito quimiosensibilizante da Entinostat na Cisplatina foram utilizados marcadores de acetilação em diferentes lisinas: H3K9ac, H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac, H4K16ac, e de metilação DNMT1.

A acetilação da histona foi avaliada com o marcador H3K9ac, que mostra respostas diferentes de acordo com a terapia utilizada. No controle, havia maior presença de acetilação de histona no ACCx9 seguida pelo ACC5M1 e ACCx6. No grupo Entinostat, houve uma resposta diferente, onde o ACC5M1 expressou maior expressão seguida pelo ACCx9, mostrando o aumento em relação ao controle e resposta da terapia ($p < 0,0001$, $p < 0,01$), e no ACCx6 foi ausente, reduzindo a acetilação, não sofrendo ação do iHDAC. A Cisplatina isolada mostrou diminuição da acetilação em todos os CACs ($p < 0,01$; $p > 0,05$). E o Entinostat-Cisplatina observa-se melhor resposta quando usado no CAC primário ($p < 0,0001$) que nos metastáticos ($p < 0,001$, $p > 0,05$), em que no ACCx6 houve regressão da acetilação em relação ao controle (Figura 5.4A).

Ao contrário da expressão de H3K9ac, a metilação avaliada com o biomarcador DNMT1, mostrou ser hiperexpressa no controle da amostra ACC5M1 (12%), seguida por ACCx9 (1,8%) e ACCx6 (1,5%). No grupo tratado com Entinostat aumentou no ACCx6 ($p < 0,0001$) e com cisplatina sozinho aumentou no ACCx9 ($p < 0,01$). E ao usar o Entinostat-Cisplatina, houve mais expressão nos CACs metastáticos que o primário, e foi observado o aumento da expressão no ACCx6 ($p > 0,05$) e redução no ACCx9 e ACC5M1 ($p < 0,0001$; $p > 0,05$) comparada ao controle (Figura 5.4B).

Figura 5.4 - Efeito do iHDAC (Entinostat) nos CACs primário e metastático. A) H3K9ac, B) DNMT1

Fonte: A autora

O H4K5ac se comportou de maneira diferente das outras lisinas estudadas nas amostras. Ele mostrou maior expressão na amostra do ACC5M1, seguida pelo ACCx9 e ACCx6 em todas as terapias, exceto na terapia combinada de Entinostat-Cisplatina (ACCx9 > ACC5M1 > ACCx6). Houve diminuição da expressão nas terapias isoladas de Entinostat e Cisplatina quando comparado com o Controle em todas as amostras ($p < 0,0001$, $p < 0,001$, $p < 0,0$, $p > 0,05$). No Entinostat-Cisplatina, o ACCx9 foi que mais expressou acetilação nessa lisina (25%), e ao contrário, no CAC metastático ACCx6 foi 0,8%. E ao comparar as terapias entre elas, mostrou que o Entinostat-Cisplatina aumentou a expressão da acetilação da lisina 5 em comparação com a Cisplatina e o

Controle no ACCx9 e ACC5M1 ($p < 0,0001$; $p > 0,05$). E diminuiu a expressão no ACCx6 ($p < 0,0001$; $p > 0,05$). (Figura 5.5A).

Em relação ao H4K8ac, o controle apresentou maior expressão no CAC primário (8%) seguido dos metastáticos (1% e 0,2%). No Entinostat, houve a diminuição da acetilação ACCx9 e ACCx6 ($p > 0,05$), este último negativo a marcação, e aumento no ACC5M1 ($p < 0,0001$) em relação ao controle. Na Cisplatina isolada, todas as amostras diminuíram a expressão em relação ao controle ($p < 0,001$; $p > 0,05$). No Entinostat-Cisplatina, houve aumento da expressão em todas as amostras em relação ao controle e em relação à Cisplatina ($p < 0,0001$; $p < 0,01$; $p > 0,05$) (Figura 5.5B).

O H4K12ac também seguiu o padrão H4K8ac, o CAC primário foi mais expresso nas terapias estudadas. Ao usar o Entinostat isolado, a expressão do H4K12ac aumentou em ACCx9 e ACC5M1 em comparação com o Controle, porém não significativa ($p > 0,05$). E quando a cisplatina foi usada, a expressão diminuiu em todas as amostras ($p < 0,001$; $p < 0,05$; $p > 0,05$). E em comparação com Enti-Cis, a expressão aumentou expressivamente em comparação com Cisplatina no ACC5M1 ($p < 0,0001$), ao contrário dos outros, em que reduziu; e em relação à Cisplatina este aumento foi significativo no ACCx9 e ACC5M1 ($p < 0,0001$) (Figura 5.5C).

Na expressão do H4K16ac houve uma diminuição gradual da marcação em todas as amostras em relação aos grupos Controle, Entinostat e Cisplatina. Quando utilizado o Entinostat-Cisplatina, observou-se um aumento na expressão dos CACs, independente se primário ou metastático, em relação à cisplatina ($p < 0,0001$) e em relação ao Controle, no ACCx9 e ACCx6 não foram expressivos ($p > 0,05$) (Figura 5.5D).

Figura 5.5 - Acetilação resultante do iHDAC (Entinostat) no CAC primário expressa em diferentes lisinas em comparação ao CAC metastático. A) H4K5ac; B) H4K8ac; C) H4K12ac; D) H4K16ac

Fonte: A autora

Estes resultados mostraram inibição da deacetilação com o uso de Entinostat combinado comparado à Cisplatina isolada, porém com diferentes respostas. No CAC

primário, observou-se melhor resposta a acetilação verificado por todas as lisinas da H4 e H3K9. E nos CACs metastáticos houve diferentes respostas em relação a acetilação: no ACC5M1 a acetilação ocorreu nas histonas H4K12 e H4K16; e, no ACCx6 não houve acetilação significativa em nenhuma das lisinas e sim a deacetilação da H4K5 (Figura 5.6).

Figura 5.6 - Diferença resposta entre os CACs primários e metastático em relação a posição da acetilação da Histona

Fonte: A autora

E a acetilação pode ser verificada com a acetilação de outras proteínas independentes de histona, como por exemplo, p53. Por isso, foi avaliado a acetilação de p53 usando o marcador acetil-p53, em que mostrou aumento expressivo no CAC primário ($p < 0,0001$) quando comparado a terapia conjugada e o controle. E interessante, no ACCx6 houve discreto aumento da expressão nesta mesma comparação ($p < 0,01$), mostrando que o iHDAC age também em outras proteínas (Figura 5.7).

Figura 5.7 - Mecanismo de ação do iHDAC (Entinostat) em outras proteínas no CAC

Fonte: A autora

Os CACs primários e metastáticos apresentam diferente ativação de vias de sinalização

Ao analisar a diferença da soma dos escores do total de genes relacionados as vias de sinalização e de acordo com o tratamento, observa-se que o uso de Entinostat associado à Cisplatina resultou em um número aumentado de vias associadas, apresentando uma desregulação de genes ($n = 7$). A administração de Entinostat isoladamente ficou em segundo lugar ($n = 5$), enquanto a administração de cisplatina esteve envolvida de apenas três vias (Figura 5.9A). É interessante notar que a administração de Entinostat e Cisplatina foi a única terapia que resultou em regulação negativa total do reparo de danos ao DNA (Figura 5.9A). Ou seja, mostrando que a administração de Cisplatina e Entinostat em combinação ou como agente único desencadeia diferencialmente a expressão das vias de sinalização. Verificou então que os tumores primários e metastáticos apresentam diferenças no padrão de ativação das vias de sinalização, separadamente (Figura 5.8B). De fato, o tumor primário do CAC apresenta uma característica distinta das vias ativas relacionadas ao câncer em comparação com os tumores metastáticos (Figura 5.8B). O tumor primário

foi caracterizado pela ativação das vias de apoptose, do ciclo celular e de reparo de danos ao DNA, enquanto os metastáticos mostraram uma regulação aumentada de todas as outras vias (Hedgehog, JAK-STAT, MAPK, Notch, PI3K, Ras, TGF-beta, Regulação de transcrição, Wnt e gene driver) (Figura 5.9B). É interessante notar que o grupo de genes associados às modificações da cromatina foi a única via que apresentou um padrão semelhante entre os CACs (Figura 5.8B). Identificou os genes *TNFRSF10C* e *PPP2R2C*, membros da via do ciclo celular e apoptose, superexpressos no ACCx9 e regulados de forma negativa em todos os metastáticos (Figura 5.8B). Também, identificou-se 15 genes relevantes encontrados com regulação negativa no CAC primário e superexpresso nos metastáticos (Figura 5.8B). Esses genes estão associados às vias de sinalização PI3K, RAS e MAPK.

Figura 5.8. - Diferentes vias ativadas entre os CACs primários e metastáticos com as terapias utilizadas. A) Diferença entre a soma dos escores do total de genes relacionados as vias de sinalização em relação as terapias B) CAC primário apresenta uma característica distinta em comparação com o CAC metastático

Fonte: Autoria Rogério Moraes Castilho

CCR7, FGF8 e SFPR1: potenciais marcadores para terapia alvo de Entinostat combinado a Cisplatina no CAC de glândula salivar

A partir da análise das expressões dos 770 genes da combinação do Entinostat com Cisplatina comparando com o Controle (Figura 5.9A), encontrou-se desregulação de 96 genes no CAC primário e nos CACs metastáticos com padrão semelhantes (59 no ACC5M1 e 57 no ACCx6) (Figura 5.9B e Figura 6). Destes genes, 44,4% do CAC primário e aproximadamente 24% dos CACs metastáticos eram distintos (Figura 5B) mostrando mecanismo diferentes de atuação. Porém, é importante notar que tanto no CAC primário como no metastático houve desregulação de CCR7 e FGF8 em comuns quando utilizado a terapia combinada (Figura 5.9B), sendo potencial oncogenes da resposta a terapia.

Além desses genes alvos, ambos ACCx9 e ACCx6, mesmo tendo respostas diferentes a terapia, apresentaram diminuição da expressão de BMP6 e CCND2. Mostrou-se também quando comparado ACCx9 e ACC5M1 a redução de HGF, PDGFRB, RAC2, COMP, IL1R2. Enquanto comparando os dois CACs metastáticos, houve redução de PPP2R2C, HSPA6, TNFRSF10C, COL11A2 e SOCS2 (Figura 5.9B).

É também possível observar o aumento de expressões genicas (> 1-fold) em 74 genes no ACCx9, e resposta semelhante nos metastáticos (66 no ACC5M1 e 62 no ACCx6), sendo que desses, 38,8% (ACCx9), 24,7% (ACC5M1) e 23,6% (ACCx6) eram diferentes (Figura 5B e Figura 6) e somente o supressor tumoral SFPR1 foi comum nas 3 amostras de CAC estudadas independente de ser primário ou metastático, sendo potencial supressor tumoral para resposta favorável a terapia combinada (Figura 5.9B) Interessante observar, que quando se compara somente os CACs metastáticos há regulação em comum da expressão de ID1, NFATC1, BMP2, COL5A1, PIK3R1, TLX1, CDKN1C, NGFR, NGF, DLL1, IL20RA, WNT5B, TCF7L1, CACNA2D2, PDGFA, GPC4, LTBP1, PLAT sendo potenciais marcadores de pior prognóstico a terapia conjugada (Figura 5.9B). Como também, quando se observa o CAC que apresentou melhor resposta com o que não apresentou resposta significativa

a terapia combinada identificou a regulação do gene MYB que é marcador potencial para resistência a terapia (Figura 5.9B).

Figura 5.9 - Análise das expressões dos genes entre a combinação da terapia de Entinostat e Cisplatina comparada com o controle nas amostras de CAC. A) Heatmap gráfico das expressões de 770 genes analisados nas 3 amostras de CAC comparado entre a terapia combinada (Enti-Cis) e Controle B) Draw gráfico representando os top genes comuns desregulados e regulados entre a análise da terapia combinada e o controle

Fonte: A autora

Figura 5.10. - Lista dos top genes desregulados e regulados com a terapia combinada em comparação com o controle

Genes desregulados			Genes regulados		
ACCx9	ACCx6	ACC5M1	ACCx9	ACCx6	ACC5M1
IDH2	LAMA3	CACNA1G	MYB	ID1	ID1
PBX3	BMP6	HGF	CREB5	FST	NFATC1
ID1	CCND2	MMP9	GNGT1	DTX1	BMP2
FST	CALML5	PDGFRB	COL2A1	CSF2	COL5A1
IL15	SOST	RAC2	BAX	PAX3	PIK3R1
LEPR	SFN	COMP	NTF3	CACNA2D1	TLX1
DTX1	PPP2R2C	IL1R2	PPP2R2C	CEBPA	CDKN1C
FGF1	MMP7	COL3A1	ETV1	CARD11	NGFR
CSF2	LAMB3	MFNG	POLE2	CACNB2	NGF
PAX3	NR4A3	CDC7	KITLG	MAD2L2	DLL1
CACNA2D1	PIM1	AR	ALKBH2	PITX2	IL20RA
CEBPA	RET	CACNA1H	CCNE2	ARNT2	WNT5B
CARD11	MAPK8IP2	PRLR	JUN	NUPR1	TCF7L1
CACNB2	SOX17	COL6A6	PLA2G4C	SOC51	CACNA2D2
MAD2L2	INHBA	NTRK2	MAPK10	PLAU	PDGFA
PITX2	ITGB6	CACNB4	SSX1	NFATC1	GPC4
ARNT2	STAT4	FN1	PCK1	BMP2	LTBP1
NUPR1	UTY	DKK1	CNTFR	COL5A1	LAMA3
SOC51	IL12RB2	FGF5	FEN1	PIK3R1	KLF4
ACVR2A	DUSP10	NODAL	CDK4	TLX1	CREB3L3
PLAU	PLCE1	AMH	DDIT3	CDKN1C	BMP6
FZD2	GNG4	HDAC2	TTK	NGFR	CCND2
NFATC1	CD14	MYB	IL1A	NGF	RNF43
PGF	NR4A1	SHC2	COL11A1	DLL1	ITGB4
BMP2	CCNA1	CREB5	TGFB2	IL20RA	TNFAIP3
COL5A1	MET	GNGT1	NOTCH3	WNT5B	HSPB1
PIK3R1	WNT2B	TP53	IL12RB2	TCF7L1	CDKN2B
TLX1	FGF13	HIST1H3H	DUSP10	CACNA2D2	IGF1R
APH1B	LAMA1	SPP1	PLCE1	PDGFA	CALML5
GNG7	FOSL1	COL2A1	GNG4	GPC4	SPRY1
GLI3	RASAL1	NTF3	CACNA2D4	LTBP1	SOST
VPS33B	HSPA6	PPP2R2C	CD14	COL5A2	SGK2
PDGFRA	TNFRSF10C	ETV1	NR4A1	GHR	SFN
CDKN1C	COL11A2	KITLG	CCNA1	HGF	HSPA1A
NGFR	SOC52	CCNE2	MET	FZD8	ITGA9
NGF	RASGRF2	JUN	WNT2B	KIT	WNT11
CACNA1D	PRKCA	MAPK10	FGF13	THBS4	CACNA1C
DUSP5	MYCN	HIST1H3G	LAMA1	DUSP4	FGF7
DLL1	FASLG	PLA2G4C	LEF1	SMAD9	IL12A
IL20RA	GRIN1	SSX1	FOSL1	COL1A1	PDGFB
WNT5B	PRDM1	H2AFX	EFNA1	RELN	IL1R1
TCF7L1	BMP7	PCK1	RASAL1	FLT3	TNFSF10
EGFR	BIRC3	CNTFR	SYK	PPARG	ITGA2
CACNA2D2	GATA2	FEN1	RPS6KA5	EGF	NFKBIZ
DUSP6	PIK3CB	HIST1H3B	LIF	FGF12	FGF9
PDGFA	SMC1B	VEGFC	HSPA6	MMP9	PDGFC
FGF11	SHC4	CDK4	BAMBI	ITGA7	PLAT
GPC4	TNF	DDIT3	TNFRSF10C	FAS	IKKBK
ETV4	WNT10A	TTK	TPO	EFNA5	JAG2
VEGFA	GATA3	IL1A	CAMK2B	PDGFRB	JAG2
MTOR	MAP3K8	IL13	COL11A2	SIX1	SMAD3
LTBP1	ITGA8	COL11A1	SOC52	RAC2	PLCB1
MAP3K5	CSF3	TGFB2	ETS2	COMP	TLR2
COL5A2	WNT16	HSPA6	RASGRF2	IL1R2	LFNG
GHR	THBS1	TNFRSF10C	PRKCA	PLAT	MMP7
HGF	CCR7	COL11A2	CDKN2C	COL3A1	LAMB3
FZD8	FGF8	SOC52	IL11	CDC7	PIM1
THBS4		CCR7	PLA2G4A	MFNG	MAPK8IP2
SMAD9		FGF8	TMPPRSS2	CACNB4	INHBA
COL1A1			MYCN	DKK1	ITGB6
RELN			FASLG	MYB	HMGA1
FLT3			BMP7	SFPR1	UTY
PPARG			GATA2		B2M
PDGFRB			SMC1B		CASP12
RAC2			SHC4		OSM
COMP			WNT10A		SFPR1
IL1R2			MAP3K8		
BMP6	ITGA2	PLCB1	WNT16		
CCND2	NFKBIZ	IKKBK	B2M		
CDKN2B	FGF9	EFNA5	CASP12		
HSPA1A	TNFSF10	TLR2	OSM		
WNT11	PIK3R2	LFNG	SFPR1		
FGF7	PLAT	PML			
IL12A	TGFB1	ZAK			
PDGFB	DTX4	CCR7			
IL1R1	JAG2	FGF8			
LAT	SMAD3				

*Oncogenes

*Supressores Tumorais

Marcadores alvo para resposta melhor a terapia combinada de Entinostat e Cisplatina no CAC de glândula salivar

Por outro lado, quando analisamos a amostra que respondeu melhor a terapia combinada, o CAC primário, identificamos 11 top genes (oncogenes) como marcadores alvo terapêutico: ID1, CACNA2D1, COL5A1, PIK3R1, TLX1, NGFR, NGF, DLL1, PDGFA, COL5A2, TGFB1. Como também, observamos 5 top genes (supressores tumorais): PPP2R2C, CD14, NR4A1, RASAL1, TNFRSF10C, potenciais marcadores terapêuticos da utilização de Entinostat e Cisplatina (Figura 5.11).

Figura 5.11 - Marcadores alvo do CAC para terapia combinada Entinostat e Cisplatina com melhor resposta terapêutica

Fonte: A autora

6 DISCUSSÃO

Este estudo é o primeiro desenvolvido com intuito de analisar o mecanismo de ação do Entinostat, novo iHDAC, na terapia do CAC de glândulas salivares, utilizado isolado ou combinado e verificar o seu potencial para sensibilizar o efeito da Cisplatina através de modelos de PDX. Mostra-se ser uma nova terapia promissora, já que não induz efeitos adversos diferentes dos outros iHDAC (177).

O Entinostat em combinação com a Cisplatina apresentou melhor resposta do que na forma isolada nos CACs primários e metastáticos. Como observamos, nos padrões sólido e cribriforme houve maior inibição do crescimento tumoral em curto prazo (20 dias) com a utilização dessa combinação, percebido também pela alteração morfológica com acréscimo de espaços pseudocistos. Interessante dessa resposta é que mesmo o padrão sólido ser mais resistente a terapia com comportamento mais agressivo e refratário e pior prognóstico (34), neste estudo o uso desta combinação com Entinostat e Cisplatina foi mais efetiva no controle e inibição da progressão, sensibilizando e potencializando o efeito da Cisplatina, o que pode ser confirmada através da comparação com a Cisplatina isolada (Figura 5.1).

Esta resposta, também foi confirmada no CAC primário pelo aumento de expressão da apoptose e diminuição da proliferação, expressa pela caspase3 e pelo Ki67 nos ensaios realizados, bem como, pela análise somatória total das expressões dos genes que ativaram as vias de apoptose, ciclo celular e reparo de dano do DNA. Além do que, houve aumento expressivo dos genes TNFRSF10C e PPP2RC ambos membros da via do ciclo celular e apoptose.

Ao contrário, nos CACs metastáticos, esta resposta foi diferente, essas expressões gênicas foram reduzidas e todas as outras vias de sinalização de proliferação foram ativas (Figura 5.8). Além de mostrarem o aumento da expressão de proliferação celular, mitoses e por não expressarem significativamente aumento da apoptose.

Isso revela que a terapia combinada sensibiliza a Cisplatina porém de forma distinta entre a heterogeneidade morfológica e fenotípica dos CACs. Essa diferença é ratificada pela diminuição da expressão da resistência tumoral caracterizada pelos fatores de transcrição NFkB e p300 no CAC primário averiguando a melhor resposta a terapia conjugada. O que não foi encontrado nos CACs metastáticos, principalmente

no ACCx6, que mostrou maior resistência devido aumento expressivo de p300 que está diretamente relacionado a atividade da histona (83) e decorrente da produção de células senescentes provocadas pelo acúmulo do gene FOXO4 (97).)

No entanto, os genes associados às modificações da cromatina foi a única via que apresentou um padrão semelhante entre os CACs primários e metastáticos validado através da diminuição expressiva γ H2AX em todas as amostras, confirmando o mecanismo de ação da terapia epigenética, corroborando com estudos anteriores (10) (11) (12).

O efeito da atuação do Entinostat é verificado pela análise da acetilação de H3 e H4, como mostrado em estudo anterior (183), porém o mecanismo da acetilação das histonas é realizado em lisinas determinadas seguindo uma sequência apropriada (21) (161) (164), por isso, foi observado diferenças entre a acetilação das histonas nos CACs primários e metastáticos.

Interessante, no CAC primário, onde observou melhor resposta, foi identificado acetilação de todas as lisinas da H4 como também acetilação da lisina 9 da H3 (H3K9). No entanto, entre os CACs metastáticos houve resposta distinta, o ACC5M1 acetilou as lisinas 12 e 16 da H4 (H4K12 e H4K16) e ao contrário, no ACCx6 não houve a acetilação e sim a deacetilação principalmente da H4K16, que mostra pior prognóstico, ratificado pela resistência tumoral (p300) e aumento de células senescentes. Curioso observar, que o perfil fenotípico do ACC5M1 apresenta expressivamente metilação da histona, correlacionado a pior prognóstico (Figura 5.4), alteração epigenética, que pode ser o motivo para apresentar resistência a acetilação induzida pelo Entinostat nesta amostra.

Como também, o ACCx6 possui diferentes mutações envolvidas em modificações epigenéticas, no BRD2, que é conhecido por se ligar à histona H4K12, e no CREBBP, que contém a atividade da histona acetiltransferase. Essas mutações podem estar relacionadas a incapacidade do Entinostat de induzir a acetilação da histona em qualquer uma das lisinas estudadas (83).

Porém, a atividade do Entinostat mostrou acetilar não somente as histonas, conforme esperado, mas também outras proteínas, como o p53, gene supressor tumoral e de reparo de DNA, em todas as três amostras CACs, independente se primário ou metastático, o que confirma a ativação da via de remodelação de cromatina e diminuição do dano do DNA nas três amostras.

Estudos recentes que buscam o entendimento do panorama genético dos CACs ajudaram a revelar alta prevalência de translocação do MYB, bem como algumas mutações no NOTCH1 como fatores de pior prognóstico (1) (5) (83) (87) (89). Todas as três amostras de tumor têm translocações que envolvem o gene MYB. Os tumores ACCx9 e ACC5M1 apresentam a translocação clássica do MYB-NFIB, a padrão, enquanto o ACCx6 apresenta o MYB-TGFBR3. E o gene MYB, após a combinação do Entinostat com Cisplatina mostrou regulado e superexpresso mais no ACCx6 comparado com as outras duas amostras, ratificando ser marcador de resistência a esta terapia e pior prognóstico.

O ACCx9 é o único modelo usado neste estudo que apresenta mutação no NOTCH1, no entanto o modelo ACC5M1 apresenta a mutação MAML2 que está envolvida na ativação da via de sinalização do NOTCH e também identificado como fator de pior prognóstico (90), e ambos casos foram o que responderam melhores a terapia combinada. E a partir da análise do Nanostring, reconhecemos a diminuição de expressão do oncogene CCR7 receptor das vias de PI3/AKT e de NOTCH, sendo, portanto, marcador potencial da atividade dessa terapia.

Bem como o FGF8 que é fator de crescimento correlacionado as vias de FGF e Wnt que também pode ser mutado em CAC (90) no entanto, apenas o ACCx6 apresenta mutação no FGFRL1, enquanto nenhuma mutação no gene FGF8 foi identificada, desregulado negativamente mais que 2-fold nos 3 CACs do estudo. Portanto, identifica-se ser potencial marcador terapêutico para a utilização da terapia combinada no CAC.

O gene SFPR1, receptor da ativação da sinalização de Wnt, foi o único superexpresso nas três amostras estudadas, sendo marcador de atividade da terapia Entinostat concomitante a Cisplatina, mostrando inibição de outras vias de proliferação.

NGFR e NGF, fatores de crescimentos, identificados como pontos chaves para que ocorra a melhor resposta a terapia combinada utilizada no CAC, mostrando o sítio de inibição da progressão tumoral e ação terapêutica dos medicamentos, são os marcadores hipoexpressos menor que 2-fold somente no ACCx9 diferentemente do ACC5M1 e ACCx6, que são hiperexpressos. Esses genes desempenham o papel de neurotropismo das células cancerígenas do CAC, principalmente no padrão sólido, (62), vinculados a via de PI3K e RAS.

Também se observa a redução expressiva de DLL1, receptor da via NOTCH, no CAC primário o que não ocorre nos CACs metásticos, fazendo com que seja importante alvo terapêutico e de prognóstico para analisar sobre a terapia conjugada.

Em suma, o estudo demonstrou resultados promissores sobre o uso da terapia combinada (Entinostat e Cisplatina) nos CACs. As descobertas identificaram marcadores moleculares que ajudam a estratificar pacientes com melhores chances de responder à terapia. E também identificou a senescência celular e a metilação de histona como potenciais mecanismos de resistência da terapia combinada.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que o Entinostat sensibiliza e potencializa o efeito terapêutico da Cisplatina no Carcinoma Adenoide Cístico de glândulas salivares atuando na inibição do crescimento e progressão tumoral ratificando ser uma terapia promissora, porém age de forma distinta devido a heterogeneidade fenotípica e morfológica do CAC. No geral, inibe genes associados às modificações de cromatina. Além do mais, identifica-se os genes NGFR, NGF e DLL1 como potenciais marcadores para estratificar o paciente para desempenhar e obter melhor resposta terapêutica. No entanto, verifica-se ainda que alta expressão de MYB, senescência celular e a metilação de histonas são fatores de inibição do mecanismo de ação e de resposta desta terapia, o que leva desenvolver estudos futuros para compreender melhor e posteriormente apoiar o uso clínico.

REFERÊNCIAS¹

1. Schvartsman G, Pinto NA, Bell D, Ferrarotto R. Salivary gland tumors: Molecular characterization and therapeutic advances for metastatic disease. *Head & Neck*. 2019; 41:239-247. doi:10.1002/hed.25468
2. Poorlen VLM, Balm AJM, Higers FJM, Tan IB et al. Stage as major long term outcome predictor in minor salivary gland carcinoma. *Cancer*. 2000; 89:1195-204. doi:10.1002/1097-0142(20000915)89:6<1195::aid-cnrcr2>3.3.co;2-a
3. Kinnaird A, Zhao S, Wellen KE, et al. Metabolic control of epigenetics in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2016;16:694-707.
4. Ferrarotto R, Mitani Y, Diao L, et al. Activating NOTCH1 mutations define a distinct subgroup of patients with adenoid cystic carcinoma who have poor prognosis, propensity to bone and liver metastasis and potential responsiveness to NOTCH1 inhibitors. *J Clin Oncol*. 2016; 35:352-360 doi:10.1200/JCO.2016.67.5264
5. Stephens PJ, Davies HR, Mitani Y, et al. Whole exome sequencing of adenoid cystic carcinoma. *J Clin Invest*. 2013 Jul;(7):2965-8. doi: 10.1172/JCI6720
6. Mitani Y, Li J, Rao PH, et al. Comprehensive analysis of the MYB-NFIB gene fusion in salivary adenoid cystic carcinoma: incidence, variability and clinicopathologic significance. *Clin Cancer Res*. 2010;16(19):4722-31. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0463.
7. Frierson Jr HF, El-Naggar AK, Welsh JB, et al. Large scale molecular analysis identifies genes with altered expression in salivary adenoid cystic carcinoma. *Am J Pathol*. 2002;161:1315-23. doi:10.1016/S0002-9440(10)64408-2
8. Liu L, Jin G, Zhou X. Modeling the relationship of epigenetic modifications to transcription factor binding. *Nucleic Acids Res*. 2015 Apr 30;43(8):3873-85. doi: 10.1093/nar/gkv255.
9. Raynal NJ, Da Costa EM, Lee JT, et al. Repositioning FDA-approved drugs in combination with epigenetic drugs to reprogram colon cancer epigenome. *Mol Cancer Ther*. 2017;16(2):397-407. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0588.
10. Chae YK, Chung SY, Davis AA et al. Adenoid cystic carcinoma: current therapy and potential therapeutic advances based on genomic profiling. *Oncotarget*. 2015 Nov 10;6(35):37117-34. doi: 10.18632/oncotarget.5076
11. Keller G, Steinmann D, Quaas A et al. New concepts of personalized therapy in salivary gland carcinomas. *Oral Oncol*. 2017;68:103-113. doi:10.1016/j.oraloncology.2017.02.018

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

12. Popovtzer A, Sarfaty M, Limon D, Marshack G et al. Stemmer Metastatic Salivary Gland Tumors: A Single-Center Study Demonstrating the Feasibility and Potential Clinical Benefit of Molecular-Profiling-Guided Therapy. *Biomed Res Int.* 2015;2015:614845. doi: 10.1155/2015/614845.
13. Almeida LO, Guimarães DM, Martins MD, et al. Unlocking the chromatin of adenoid cystic carcinomas using HDAC inhibitors sensitize cancer stem cells to cisplatin and induces tumor senescence. *Stem Cell Res.* 2017;21:94-105. doi: 10.1016/j.scr.2017.04.003.
14. Goncalves PH, Heilbrun LK, Barrett MT, et al. A phase 2 study of vorinostat in locally advanced, recurrent, or metastatic adenoid cystic carcinoma. *Oncotarget.* 2017; 8: 32918-32929.
15. Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(1):37-50. doi: 10.1038/nrd1930
16. Ntranos A, Casaccia P. Bromodomains: translating the words of lysine acetylation into myelin injury and repair. *Neurosci Lett.* 2016;20;625:4-10. doi: 10.1016/j.neulet.2015.10.015.
17. Nervi C, De Marinis E, Codacci-Pisanelli G. Epigenetic treatment of solid tumors: a review of clinical trials. *Clin Epigenetics.* 2015; 7:127.
18. Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, et al. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nature Genet.* 1999; 21:103-107.
19. Li J, Hao D, Wang L, et al. Epigenetic targeting drugs potentiate chemotherapeutic effects in solid tumor therapy. *Sci Rep.* 2017;22;7(1):4035. doi: 10.1038/s41598-017-04406-0
20. Ramalingam SS, Maitland ML, Frankel P, et al. Carboplatin and paclitaxel in combination with either vorinostat or placebo for first-line therapy of advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2010; 28:56-62.
21. Wang GG, Allis CD, Chi P et al. Chromatin remodeling and cancer Part I: Covalent histone modifications. *Trends Mol Med.* 2007;13(9):363-372. doi:10.1016/j.molmed.2007.07.003
22. Kapoor-Vazirani P, Kagey JD, Powell DR, Vertino PM. Role of hMOF-dependent histone H4 lysine 16 acetylation in the maintenance of TMS1/ASC gene activity. *Cancer Res.* 2008;68(16):6810-21. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0141
23. Fonseca FP, Carvalho MV, de Almeida OP, et al. Clinicopathologic analysis of 493 case of salivary gland tumors in a Southern Brazilian population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012; 34: 230-9.
24. da Silva LP, Serpaa MS, Viveiros SK, Senaa DAC et al. *J Craniomaxillofac Surg.* 2018;46(12):2227-2233. doi: 10.1016/j.jcms.2018.09.028.

25. Bjørndal K, Krogdahl A, Therkildsen MH, et al. Salivary gland carcinoma in Denmark 1990-2005: a national study of incidence, site and histology. Results of the Danish Head and Neck Cancer Group. *Oral Oncol.* 2011;47(7):677-82. doi: 10.1016/j.oraloncology.2011.04.020
26. Bonaparte JP, Hart R, Trites J, Taylor MS. Incidence of adenoid cystic carcinoma in Nova Scotia: 30-year population-based epidemiologic study. *J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008; 37:642-8.
27. Vander Poorten VL, Hart AA, van der Laan BF, et al. Prognostic index for patients with parotid carcinoma: external validation using the nationwide 1985-1994. *Cancer.* 2003; 97:1453-63. doi:10.1002/cncr.11254
28. Vander Poorten V, Hunt J, Bradley PJ, et al. Recent trends in the management of minor salivary gland carcinoma. *Head Neck.* 2014 Mar;36(3):444-55. doi: 10.1002/hed.23249
29. Nascimento AG, Amaral AL, Prado LA, Kligerman J, Silveira TR. Adenoid cystic carcinoma of salivary glands. A study of 61 cases with clinopathologic correlation. *Cancer.* 1986; 57:312-9.
30. Spiro RH, Huvos AG, Strong EW. Adenoid cystic carcinoma of salivary origin. A clinicopathologic study of 242 cases. *Am J Surg.* 1974; 128: 512-20..
31. Zvrko E, Golubovic M. Laryngeal adenoid cystic carcinoma. *Acta Otorhinolaryngol.* 2009; 29: 279-82.
32. Husain Q, Kanumuri VV, Svider PF, et al. Sinusoidal adenoid cystic carcinoma: systematic review of survival and treatment strategies. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2013; 148:29-39.
33. Biswas KD, Saha J, Sen I, et al. Unusual presentations of adenoid cystic carcinoma in extra-salivary gland subsites in head and neck region: a case series. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2014; 66:286-90.
34. Chen JC, Gnepp DR, Bedrossian CW. Adenoid cystic carcinoma of the salivary glands: an immunohistochemical analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1988; 65:316-26.
35. Szanto PA, Luna MA, Tortoledo ME, White RA. histologic grading of adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Cancer.* 1984; 54:1062-9.
36. Chisholm DM, Waterhouse JP, Kraucunas E, Sciubba JJ. A qualitative and quantitative electronmicroscopic study of the structure of the adenoid cystic carcinoma of human minor salivary glands. *J Oral Pathol.* 1975; 4:103-19.
37. Bell D, Roberts D, Kies M, Rao P, Weber RS, El-Naggar AK. Cell type-dependent biomarker expression in adenoid cystic carcinoma: biologic and therapeutic implications. *Cancer.* 2010;116:5749-56.

38. Sequeiros SG, Tapia RJP, Pendás JL, Nieto SC. Prognostic factors in adenoid cystic carcinoma of salivary gland. *Acta Otorringolaringol Esp*. 2005; 8:361-7.
39. Amit M, Binenbaum Y, Trejo-Leider L, et al. International collaborative validation of intraneural invasion as a prognostic marker in adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Head Neck*. 2015 Jul;37(7):1038-45. doi: 10.1002/hed.23710.
40. Teymoortash A, Zieger L, Hoch S, Pagenstecher A, Hofer MJ. Distinct microscopic features of perineural in adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Histopathology*. 2014;64(7):1037-9. doi: 10.1111/his.12210
41. Nagel H, Hotze HJ, Laskawi R, Chilla R, Droese M. Cytologic diagnosis of adenoid cystic carcinoma of salivary glands. *Diagn Cytopathol*. 1999;20:358-66.
42. Daneshbod Y, Daneshbod K, Khademi B. Diagnostic difficulties in the interpretation of fine needle aspirate samples in salivary lesions: diagnostic pitfalls revisited. *Acta Cytol*. 2009;53:53-70. doi:10.1159/000325085
43. Nordgård S, Franzén G, Boysen M, Halvorsen TB. Ki-67 as a prognostic marker in adenoid cystic carcinoma assessed with the monoclonal antibody MIB1 in parafin sections. *Laryngoscope*. 1997;107:532-6.
44. Cho K-J, Lee S-S, Lee Y-S. Proliferating cell nuclear antigen and c-erbB-2 oncoprotein expression in adenoid cystic carcinomas of the salivary glands. 1999;21:414-9.
45. Ghazy SE, Helmy IM, Baghdadi HM. Maspin and MCM2 immunoprofiling in salivary gland carcinomas. *Diagn Pathol*. 2011;6:89. doi: 10.1186/1746-1596-6-89.
46. Xie X, Nordgård S, Halvorsen TB, Franzen G, Boysen M. Prognostic significance of nucleolar organizer regions in adenoid cystic carcinomas of the head and neck. *Arch Otolaryngol*. 1997;123:615-20.
47. Larsen SR, Bjørndal K, Godballe C, Krogdahl A. Prognostic significance of Ki-67 in salivary gland carcinomas. *J Oral Pathol Med*. 2012;41(8):598-602. doi: 10.1111/j.1600-0714.2012.01148.x.
48. Wagner VP, Martins MD, Guimaraes DM, et al. Reduced chromatin acetylation of malignant salivary gland tumors correlates with enhanced proliferation. *J Oral Pathol Med*. 2017 Oct;46(9):792-797. doi: 10.1111/jop.12557.
49. Webber LP, Wagner VP, Curra MC, Vargas PA, Meurer LM et al. Hypoacetylation of acetyl-histone H3 (H3K9ac) as marker of poor prognosis in oral cancer. *Histopathology*. 2017;71(2):278-286. doi: 10.1111/his.13218.
50. Jeng YM, Lin CY, Hsu HC. Expression of the c-kit protein is associated with certain subtypes of salivary gland carcinoma. *Cancer Lett*. 2000;154:107-11.

51. Holst VA, Marshall CE, Moskaluk CA, Frierson Jr HF. KIT protein expression and analysis of c-kit gene mutation in adenoid cystic carcinoma. *Mod Pathol.* 1999;12: 956-60.
52. Freier K, Flechtenmacher C, Walch A, et al. Differential KIT expression in histological subtypes of adenoid cystic carcinoma (ACC) of the salivary gland. *Oral Oncol.* 2005;41:934-9. doi:10.1016/j.oraloncology.2005.05.005
53. Bell D, Ferrarotto R, Fox MD, Roberts D et al. Analysis and significance of c-MET expression in adenoid cystic carcinoma of the salivary gland. *Cancer Biol Ther.* 2015;16(6):834-8. doi: 10.1080/15384047.2015.1030554.
54. Lim JJ, Kang S, Lee MR, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in salivary gland carcinomas and its relation to p53, Ki-67 and prognosis. *J Oral Pathol Med.* 2003; 32:552-61.
55. Shao Z, Zhu F, Song K, Zhang H, Liu K, Shang Z. EphA2/ephrin A1 mRNA expression and protein production in adenoid cystic carcinoma of salivary gland. *J Oral Maxillofac Surg.* 2013;71(5):869-78. doi: 10.1016/j.joms.2012.10.026.
56. Locati LD, Bossi P, Perrone F, et al. Cetuximab in recurrent and/or metastatic salivary gland carcinomas: a phase II study. *Oral Oncol.* 2009; 45:574-8.
57. Sequeiros-Santiago G, García-Carracedo D, Fresno MF, Suarez C, Rodrigo JP, Gonzalez MV. Oncogene amplification pattern in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Oncol Rep.* 2009; 21:1215-22.
58. Lee SK, Kwon MS, Lee YS, et al. Prognostic value of expression of molecular markers in adenoid cystic cancer of the salivary glands compared with lymphnode metastasis: a retrospective study. *World J Surg Oncol.* 2012;10:266.
59. Lagha A, Chraiet N, Ayadi M, Krimi S, Allani B, Rifi H, et al. Systemic therapy in the management of metastatic or advanced salivary gland cancers. *Oral Oncology.* 2012;48:948-57.
60. Glisson B, Colevas AD, Haddad R, Krane J, El-Naggar A, Kies M, et al. HER2 expression in salivary gland carcinomas: dependence on histological subtype. *Clin Cancer Res.* 2004;10:944-6.
61. Haddad R, Colevas AD, Krane JF, Cooper D, Glisson B, Amrein PC, et al. Herceptin in patients with advanced or metastatic salivary gland carcinomas. A phase II study. *Oral Oncology.* 2003;39:724-7.
62. Hao L, Xiao-lin N, Qi C, Yi-ping Y, Jia-quan L, Yan-ning L. Nerve growth factor and vascular endothelial growth factor retrospective analysis of 63 patients with salivary adenoid cystic carcinoma. *Int J Oral Sci.* 2010;2:35-44.
63. Ivanov SV, Panaccione A, Brown B, et al. TrkC signaling is activated in adenoid cystic carcinoma and requires NT-3 to stimulate invasive behavior. *Oncogene.* 2013; 32:3698-710.

64. Sequeiros-Santiago G, García-Carracedo D, Fresno MF, Suarez C, Rodrigo JP, Gonzalez MV. Oncogene amplification pattern in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Oncol Rep.* 2009;21:1215-23.
65. Pramoonjago P, Baras AS, Moskaluk CA. Knockdown of Sox4 expresion by RNAi induces apoptosis in ACC3 cells. *Onconge.* 2006; 25:5626-39.
66. Ivanov SV, Panaccione A, Nonaka D, et al. Diagnostic Sox10 gene signatures in salivary adenoid cystic and breast basal-like carcinomas. *Br J Cancer.* 2013;109:444-51.
67. Sun ZJ, Chen G, Hu X, et al. Activation of PI3K/Akt/IKK-alpha/NF-kappaB signaling pathway is required for the apoptosis-evasion in human salivary adenoid cystic carcinoma:its inhibition by querceptin. *Apoptosis.* 2010;15:850-63.
68. Sun ZJ, Chen G, Zhang W, et al. Mammalian target of rapamycin pathway promotes tumor-induced angiogenesis in adenoid cystic carcinoma:the suppression by isoliquiritigenin through dual activation of c-Jun NH2-terminal kinase and inhibition of extracellular signal-regulated. *J Pharmacol.* 2010;334:500-12.
69. Frierson Jr HF, El-Naggar AK, Welsh JB, et al. Large scale molecular analysis identifies genes with altered expression in salivary adenoid cystic carcinome. *Am J Pathol.* 2002;161:1315-23.
70. Ivanov SV, Panaccione A, Nonaka D, et al. Diagnostic Sox10 gene signatures in salivary adenoid cystic and breast basal-like carcinomas. *Br J Cancer.* 2013;109:444-51.
71. Sun ZJ, Chen G, Hu X, et al. Activation of PI3K/Akt/IKK-alpha/NF-kappaB signaling pathway is required for the apoptosis-evasion in human salivary adenoid cystic carcinoma:its inhibition by quercetin. *Apoptosis.* 2010; 15:850-63.
72. Yamamoto Y, Wistuba II, Kishimoto Y, et al. DNA analysis at p53 locus in adenoid cystic carcinoma: comparasion of molecular study and p53 immnostainnig. *Pathol Int.* 1998; 48:273-80.
73. Preisegger KH, Beham A, Kopp S, Jessernigg G, Gugl A, Stammberger H. Prognostic impact of molecular analyses in adenoid cystic carcinomas of the salivary gland. *Onkologie.* 2001; 24:273-7.
74. Wang YY, Chen WL, Huang ZQ, et al. Expression of the membrane-cytoskeletal linker Ezin in salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011; 112: 96-104.
75. Zhao D, Yang K, Tang XF, Lin NN, Liu JY. Expression of integrin-linked kinase in adenoid cystic carcinoma of salivary glands correlates with epithelial- mesenchymal transition markers and tumor progression. *Med Oncol.* 2013, 30,:619.

76. Doerr TD, Marentette LJ, Flint A, Elner V. Urokinase-type plasminogen activator receptor expression in adenoid cystic carcinoma of the skull base. *Arch Otolaryngol head Neck Surg.* 2003;129:215-8.
77. Barrera JE, Shroyer KR, Said S, et al. Estrogen and progesterone receptor and p53 gene expression in adenoid cystic cancer. *Head Neck Pathol.* 2008;2:13-8.
78. Wu HM, Ren GX, Wang LZ, Zhang CY, Chen WT, Guo W. Expression of podoplanin in salivary gland adenoid cystic carcinoma and its association with distant metastasis and clinical outcomes. *Mol Med Rep.* 2012; 6:271-4.
79. Persson M, Andrén Y, Mark J, Horlings HM, Persson F, Stenman G. Recurrent fusion of MYB and NFIB transcription factor genes in carcinomas of the breast and head and neck. *Proc Nati Acad Sci.* 2009;106:18740-4.
80. West RB, Kong C, Clarke N, et al. MYB expression and translocation in adenoid cystic carcinomas and other salivary gland tumors with clinopathologic correlation. *Am J Surg Pathol.* 2011, 35:92-9.
81. Stenman G, Persson F, Andersson MK. Diagnostic and therapeutic implications of new molecular biomarkers in salivary gland cancers. *Oral Oncol.* 2014;50:683-90.
82. Bell D, Bell A, Roberts D, Weber RS, El-Naggar AK. Developmental transcription factor EN1-a novel biomaker in human salivary adenoid cystic carcinoma. *Cancer.* 2012;118:1288-92.
83. Ho AS, Kannan K, Roy DM, et al. the mutational landscape of adenoid cystic carcinoma. *Nat Genet.* 2013;45:791-8.
84. Mitani Y, Liu B, Rao PH, et al. Novel MYBL1 gene rearrangements with recurrent MYBL1-NFIB fusions in salivary adenoid cystic carcinomas lacking t(6;9) translocations. *Clin Cancer Res.* 2016, 22:725-733.
85. Mitani Y, Rao PH, Futreal PA, et al. Novel chromosomal rearrangements and break points at the t (6;9) in salivary adenoid cystic carcinoma: association with MYB-NFIB chimeric fusion, MYB expression, and clinical out-com. *Clin Cancer Res.* 2011;17: 7003-7014.
86. Bell D, Roberts D, Karpowicz M, Hanna EY, Weber RS, El-Naggar AK. Clinical significance of Myb protein and downstream target genes in salivary adenoid cystic carcinoma. *Cancer biology & therapy.* 2011;12:569-73.
87. Mitani Y, Rao PH, Futreal PA, Roberts DB, Stephens PJ, Zhao YJ, et al. Novel chromossomal rearrangements and break points at the t(6;9) in salivary adenoid cystic carcinoma: association with MYB_NFIB chimeric fusion, MYB expression, and clinical outcome. *Clin Cancer Res.* 2011;17:7003-14.
88. Ross JS, Wang K, Rand JV, et al. Comprehensive genomic profiling of relapsed and metastatic adenoid cystic carcinomas by next-generation sequencing reveals potential new routes to targeted therapies. *Am J Surg Pathol.* 2014;38:235-238.

89. Bo-Hua Su, Jing Qu, Min Song, Xiao-Yu Huang, Xiao-Meng Hu et al. NOTCH1 signaling contributes to cell growth, anti-apoptosis and metastasis in salivary adenoid cystic carcinoma. *Oncotarget*. 2014;5:6885-95.
90. Rao PH, Roberts D, Zhao Y-J, Bell D, P.Harris C, S.Weber R, et al. Deletion of 1p32-p36 is the most Frequent genetic change and poor prognostic marker in adenoid cystic carcinoma of the Salivary Glang. *Clin Cancer Res*. 2008;14:5181-7.
91. Yang X, Jing D, Liu L, Shen Z, Ju J, Ma C, et al. Downregulation of p53 promotes in vitro perineural invasive activity of human salivary adenoid cystic carcinoma cells through epithelial-mesenchymal transition-like changes. *Oncology reposts*. 2015; 33, pp. 1650-6.
92. Sridharan V, Gjini E, Liao X, et al. Immune profiling of adenoid cystic carcinoma; PD-L2 expression and associations with tumor-infiltrating lymphocytes. *Cancer Immnol Res*. 2016;4:679-687.
93. K, Tominaga. The emerging role of senescent cells in tissue homeostasis and pathophysiology. *Relat Dis*. 2015;5:27743.
94. von Zglinicki T, Saretzki G, Ladhoff J, d'Adda di Fagagna F and Jackson SP. Human cell senescence as a DNA damage response. *Mech Ageing Dey*. 2005; 126:111-117.
95. MA, Bansal R and Nikiforov. Pathways of oncogene-induced senescence in human melanocytic cells. *Cell Cycle*. 2010;9:2782-2788.
96. Madl, Benjamin Bourgeois and Tobias. Regulation of cellular senescence via the FOXO-p53 axis. *FEBS Letters*. 2018;592:2083-2097.
97. de Keizer PL, Packer LM, Szypowska AA, Riedl- Polderman PE, van den Broek NJ et al. Activation of forkhead box O transcription factors by oncogenic BRAF promotes p21cip1 - dependent senescence. *Cancer Res*. 2010;70:8526-8536.
98. Wang, J, Y, Brian and Liao Y, Xia Y and Wan X. Forkhead-box A1 induces cell senescence in endometrial cancer by regulating p16. *Oncology reports*. 2016; 36: 795-802.
99. Shanmugam Panneer Selvam, X Braden M. Roth, Rose Nganga et al. Balance between senescence and apoptosis is regulated by telomere damage-induced association between p16 and caspase 3. *J Biol Chem*. 2018;293:9784-9800.
100. Ramachandran, V Ganapathy, E Gillies, I Fonseca, SM Sureban et al. Wnt inhibitory factor 1 suppresses cancer stemness and induces cellular senescence. *Cell Death and Disease*. 2014;5:p. e1246.
101. Ciccolallo L, Licitra L, Cantú G, Gatta G. Survival from salivary adenoid cystic carcinoma in European populations. *Oral Oncol*. 2009;45:669-74.

102. Van Weert S, Bloemena E, van der Waal I, et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: a single-center analysis of 105 consecutive cases over a 30 year period. *Oral Oncol.* 2013;49:824-9.
103. Huang M, Ma D, Sun K, Yu G, Guo C, Gao F. Factors influencing survival rate in adenoid cystic carcinoma of the salivary gland. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1997; 26:435-9.
104. DeAngelis AF, Tsui A, Wiesenfeld D, Chandu A. Outcomes of patients with adenoid cystic carcinoma of the minor salivary glands. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2011; 40:710-4.
105. Jones AS, Hamilton JW, Rowley H, Husband D et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 1997; 22:434-43.
106. Chummun S, McLean NR, Kelly CG et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Br J Plast Surg.* 2001, Vol. 54, pp. 476-80.
107. RH., Spiro. Distant metastases in adenoid cystic carcinoma of salivary origin. *Am J Surg.* 1997;174:495-8.
108. Fordice J, Kershaw C, El-Naggar A, Goepfert H. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck predictors of morbidity and mortality. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1999;125:149-52.
109. Spiro RH, Huvos AG. Stage means more than grade in adenoid cystic carcinoma. *Am J Surg.* 1992;164:623-8.
110. Van der Wal J, Becking AG, Snow GB, et al. Distant metastases of adenoid cystic carcinoma of the salivary glands and the value of diagnostic examinations during follow-up. *Head Neck.* 2002;24:779-83.
111. Umeda M, Nishimatsu N, Masago H, et al. Tumor-doubling time and onset of pulmonary metastasis from adenoid cystic carcinoma of the salivary gland. *Oral Surg Oral Med Oral Radiol Endod.* 1999; 88:473-8.
112. PJ., Bradley. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: a review. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004;12:127-32.
113. Fordice J, Kershaw C, El-Naggar A, Goepfert H. Treatment outcomes and prognosis features in adenoid cystic carcinoma originated from the head and neck. *Oral Oncol.* 2012;48:445-9.
114. Mendenhall WM, Morris CG, Amdur RJ, Werning JW et al. Radiotherapy alone or combined with surgery for adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Head Neck.* 2004, 26:154-62.
115. Casler JD, Conley JJ. Surgical management of adenoid cystic carcinoma in the parotid gland. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1992;106:332-8.

116. Vander Poorten VLM, Balm AJM, Hilgers FJM. Management of cancer of the parotid gland. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002;10:134-44.
117. Ferlito A, Shaha AR, Rinaldo A, Mondin V. Management of clinically negative cervical lymphnodes in patients with malignant neoplasms of parotid gland. *J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2001; 63:123-6.
118. Min R, Siyi L, Wenjun Y, et al. Salivary gland adenoid cystic carcinoma with cervical lymphnode metastasis: a preliminary study of 62 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2012;41:952-7.
119. Lee SY, Kim BH, Choi EC. Ninety-year oncologic outcomes and the benefit of elective neck dissection in salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Head Neck.* 2014;36:1796-801.
120. Katz TS, Mendenhall WM, Morris CG, Amdur RJ et al. Malignant tumors of the nasal cavity and paranasal sinuses. *Head Neck.* 2002;24:821-9.
121. Douglas JG, Lee S, Laramore GE, Austin-Seymour M et al. Neutron radiotherapy for the treatment of locally advanced major salivary gland tumors. *Head Neck.* 1999, 21:255-63.
122. Pederson AW, Salama JK, Haraf DJ, et al. Adjuvant chemoradiotherapy for locoregionally advanced and high-risk salivary gland malignancies. *Head Neck Oncol.* 2011;3(31):31.
123. Schoenfeld JD, Sher DJ, Norris Jr CM, et al. Salivary gland tumors treated with adjuvant intensity-modulated radiotherapy with or without concurrent chemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012;82:308-14.
124. Laurie SA, Ho AL, Fury MG, Sherman E, Pfister DG. Systemic therapy in the management of metastatic or locally recurrent adenoid cystic carcinoma of the salivary glands: a systematic review. *Lancet.* 2011; 12:815-824.
125. Alfieri S, Granata R, Bergamini C, et al. Systemic therapy in metastatic salivary gland carcinomas: a pathology-driven paradigm? *Oral Oncol.* 2017;66:58-63.
126. Licitra L, Cavina R, Grandi C, et al. Cisplatin, doxorubicin and cyclophosphamide in advanced salivary gland carcinoma: a phase II trial of 22 patients. *Ann Oncol.* 1996; 7: 640-642.
127. Airolidi M, Garzaro M, Pedani F, et al. Cisplatin + Vinorelbine treatment of recurrent or metastatic salivary gland malignancies: a final report on 60 cases. *Am J Clin Oncol.* 2017; 40:86-90.
128. Ross PJ, Teoh EM, A'Hern RP, Rhys-Evans PH et al. Epirubicin cisplatin and protracted venous infusion 5-Fluorouracil chemotherapy for advanced salivary adenoid cystic carcinoma. *Clin Oncol.* 2009;21:311-4.

129. R.L. Dodd, N.J. Slevin. Salivary gland adenoid cystic carcinoma: A review of chemotherapy and molecular therapies. *Oral Oncology*. 2006;42:759-769.
130. Dillon PM, Chakraborty S, Moskaluk CA et al. Adenoid cystic carcinoma: a review of recent advances, molecular targets and clinical trials. *Head Neck*. 2014.
131. Ashish V. Chintakuntlawar, Scott H. Okuno and Katharine A. Price Systemic therapy for recurrent or metastatic salivary gland malignancies. *Cancers of the Head & Neck*. 2016;1:e7.
132. Von Hoff D. D., Stephenson J. J., Jr., Rosen P., et al. Pilot study using molecular profiling of patients'tumors to find potential targests and select treatments for their refractory cancers. *Journal of Clinical Oncology*. 2010;28:4877-4883.
133. Gerben Lassche, Wim van Boxtel, Marjolijn J.L. Ligtenberg et al. Advances and challenges in precision medicine in slaivary gland cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 2019;80:101906.
134. Aron Popovtzer, Michal Sarfaty, Dror Limon, Gideon Marshack et al. A single-center study demonstrating the feasibility and potencial clinical benefit of molecular-profiling-guided therapy. *Biomed Res Int*. 2015.
135. Even C, Lassen UN, Merchan JR, et al. Notch pathway inhibition with LY3039478 in adenoid cystic carcinoma (ACC). *J Clin Oncol*. 2017;35:6024-24.
136. Panaccione A, Chang MT, Carbone BE, et al. NOTCH1 and SOX10 are essential for proliferation and radiation resistance of cancer stem-like cells in adenoid cystic carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2016;22:2083-2095.
137. Cote GM, Edenfield WJ, Laurie SA, et al. A phase1b/2 study of amcasertib, a first-in-class cancer stemmess kinase inhibitor, in advanced adenoid cystic carcinoma. *J Clin Oncol*. 2017;35:6036-6036.
138. Rodriguez CP, Wu Q, Voutsinas J, Fromm JR et al. A phase II trial of pembrolizumab and vorinostat in recurrent metastatic head and neck squamous cell carcinomas and salivary gland cancer. *Clin Cancer Res*. 2020.
139. Schoenfeld JD, Mahmood U, Chen YH, Mak RH et al. A randomized phase II study of pembrolizumab with or withou radiation in patients with recurrent or metastatic adenoid cystic carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2019;37.
140. Dillon PM, Petroni GR, Horton BJ, et al. A phase II study of Dovitinib in patients with recurrent or metastatic adenoid cystic carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2017;23:. 4138-4145.
141. Thomson DJ, Silva P, Denton K, et al. Phase II trial of sorafenib in advanced salivary adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Head Neck*. 2015;37:182-187.

142. Ho AL, Sherman EJ, Fury MG, et al. Phase II study of axitinib in patients with progressive, recurrent/ metastatic adenoid cystic carcinoma. *J Clin Oncol*. 2014;32:6093-6093.
143. Locati L, Perrone F, Cortelazzi B, et al. A phase II study of sorafenib in recurrent and/or metastatic salivary gland carcinomas: translational analyses and clinical impact. *Eur J Cancer*. 2016;69:158-165.
144. Ho A, Sherman E, Baxi S, et al. Phase II study of regorafenib in progressive, recurrent/metastatic adenoid cystic carcinoma. *J Clin Oncol*. 2016;34: 6-20.
145. Locati L, Galbiati D, Calareso G, et al. Phase II study on levantinib (LEN) in recurrent and/or metastatic (R/M) adenoid cystic carcinomas (ACC) of the salivary glands (SG) of the upper aerodigestive tract. *J Clin Oncol*. 2018;36:6086-6086.
146. . Mark Agulnik, Ezra W.E. Cohen et al. Phase II Study of Lapatinib in Recurrent or Metastatic Epidermal Growth Factor Receptor and /or erbB2 Expressing Adenoid Cystic Carcinoma ad Non-Adenoid Cystic Carcinoma Malignant Tumors of the Salivary Glands. *Clin Oncol*. 2012;25:3978-3984.
147. de Sébastien JH, Winkquist EW, Lamont E et al. Imatinib Mesylate in Patients with Adenoid Cystic Cancers of the Salivary Glands Expressing c-kit: A princess Margaret Hospital Phase II Consortium Study. *J Clin Oncol*. 585-590.
148. Wong S, Karrison T, Hayes D, et al. Phase II trial of Dasatinib for recurrent or metastatic c-Kit expressing adenoid cystic carcinoma and for non-adenoid cystic malignant salivary tumors. *Ann Oncol*. 2015;27:318-323
149. Pfeffer MR, Talmi Y, Catane R, Symon Z et al. A phase II study of imatinib for advanced adenoid cystic carcinoma of head and neck salivary glands. *Oral Oncol*. 2007;43:33-36.
150. Agulnik M, Cohen EW, Cohen RB, et al. Phase II study of Lapatinib in recurrent or metastatic epidermal growth factor receptor and/or erbB2 expressing adenoid cystic carcinoma and non-adenoid cystic carcinoma malignant tumors of the salivary glands. *J Clin Oncol*. 2007;25:3978-3984.
151. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, et al. Cancer genome landscapes. *Science*. 2013;339:1546-1558.
152. Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell*. 2012;150:12-27.
153. Khan SA, Reddy D, Gupta S. Global histone post-translational modifications and cancer: biomarkers for diagnosis prognosis and treatment. *World J Biol Chem*. 2015, 6:333-345.
154. Keppler BR, Archer TK. Chromatin-modifying enzymes as therapeutic targets part 1. *Expert Opin Ther Targets*. 2008;12:1301-1312.

155. Mosashvilli D, Kahl P, Mertens C, et al. Global histone acetylation levels: prognostic relevance in patients with renal cell carcinoma. *Cancer Sci.* 2010;101: 2664-2669.
156. Seligson DB, Horvath S, McBrien MA, et al. Global levels of histone modifications predict prognosis in different cancers. *Am J Pathol.* 2009;174:1619-1628.
157. Abujamra AL, Dos Santos MP, Roesler R et al. Histone deacetylase inhibitors: a new perspective for the treatment of leukemia. *Leuk Res.* 2010;34:687-695.
158. Sadikovic B, Andrews J, Carter D et al. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet.* 2005, 37:391-400.
159. Pfister S, Rea S, Taipale M, et al. The histone acetyltransferase hMOF is frequently downregulated in primary breast carcinoma and medulloblastoma and constitutes a biomarker for clinical outcome in medulloblastoma. *Int J Cancer.* 2008;122:1207-1213.
160. Shuai Zhao, Xingrun Zhang and Haitao Li. Beyond histone acetylation- writing and erasing histone acylations. *Current Opinion in Structural Biology.* 2018; 53: 169-177.
161. Zhang X, Cao R, Niu J, Yang S et al. Molecular basis for hierarchical histone de-b-hydroxybutyrylation by Sirt3. *Cell Rep.* 2018.
162. Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K. et al. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature.* 1997;389:251-260.
163. Henikoff, Paul B. Talbert and Steven. Histone variants - ancient wrap artists of the epigenome. *Nature Reviews.* 2010;11:264-275.
164. Minjia Tan, Hao Luo, Sangkyu Lee, Fulai Jin et al. Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell.* 2011;146:1016-102.
165. Henikoff, Paul B. Talbert and Steven. Histone variants - ancient wrap artists of the epigenome. *Nature.* 2010, 11:264-275.
166. Roy DM, Walsh LA, Chan TA. Driver mutations of cancer epigenomes. *Protein Cell.* 2014;5:265-296.
167. Nervi C, De Marinis E, Codacci-Pisanelli G. Epigenetic treatment of solid tumors: a review of clinical trials. *Clin Epigenetics.* 2015;7:127
168. Zhenghui Liu, Yingxue Gao & Xiong Li. Cancer epigenetics and the potential of epigenetic drugs for treating solid tumors. *Therapy.* 2018;19:139-149.

169. Zhu WG, Otterson GA. The interaction of histone deacetylase inhibitors and DNA methyltransferase inhibitors in the treatment of human cancer cells. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 2003;3:187-199.
170. Groselj B, Sharma NL, Hamdy FC, et al. histone deacetylase inhibitors as radiosensitisers: effects on DNA damage signalling and repair. *Br J cancer*. 2013; 108:748-754.
171. Ohlsson-Wilhelm BM, Farley BA, Kosciolk B, La Bella S, Rowley PT. K562 human erythroleukemia cell variants resistant to growth inhibition by butyrate have deficient histone acetylation. *Am J Hum Genet*. 1984;36:1225-1238.
172. Richon VM, Emiliani S, Verdin E, et al. A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci*. 1998;95:3003-3007.
173. Nakajima H, Kim YB, Terano H, Yoshida M, Horinouchi S. FR901228, a potent antitumor antibiotic is a novel histone deacetylase inhibitor. *Exp Cell Res*. 1998; 241:126-133.
174. Piekarz RL, Robey R, Sandor V, et al. Inhibitor of histone deacetylation, depsipeptide (FR901228), in the treatment of peripheral and cutaneous T-cell lymphoma: a case report. *Blood*. 2001;98:2865-2868.
175. Kummar S, Gutierrez M, Gardner ER, et al. Phase I trial of MS-275, a histone deacetylase inhibitor, administered weekly in refractory solid tumors and lymphoid malignancies. *Clin Cancer Res*. 2007;13:5411-5417.
176. West AC, Johnstone RW. New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment. *J Clin Invest*. 2014;124:30-39.
177. Bates, Ira Surolia and Susan E. Entinostat Finds a Path: A new study elucidates effects of the histone deacetylase inhibitor on the immune system. *Cancer*. 2018;. 4597-4600.
178. Connolly RM, Li H, Jankowitz RC, et al. Combination epigenetic therapy in advanced breast cancer with 5-azacitidine and entinostat: a phase II National Cancer Institute/Stand up to Cancer study. *Clin Cancer Res*. 2017;23:2691-2701.
179. Azad NS, El-Khoueiry A, Yin J, et al. Combination epigenetic therapy in metastatic colorectal cancer (mCRC) with subcutaneous 5-azacitidine and entinostat: a phase 2 Consortium/Stand up 2 Cancer study. *Oncotarget*. 2017; 8:35326-35338.
180. Juergens RA, Wrangle J, Vendetti FP, et al. Combination epigenetic therapy has efficacy in patients with refractory advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Discov*. 2011;1:598-607.
181. Stéphanie L. Gaillard Marianna Zahurak, Anup Sharma, Jennifer N. Durham et al. A Phase 1 trial of the Oral DNA Methyltransferase inhibitor CC-486 and the

histone deacetylase inhibitor romidepsin in advanced solid tumors. *Cancer*. 2019;2837-2845.

182. Giannini, Cabri, Fattorusso & Rodriguez et al. Histone deacetylase inhibitors in the treatment of cancer: overview and perspectives. *Future Med Chem*. 2012;4:e4.