

EMÍLIA MARIA GOMES AGUIAR

**Efeito de quimioterápicos inibidores de histonas deacetilases sobre
células-tronco tumorais derivadas de linhagens de carcinoma
mucoepidermoide de glândula salivar**

São Paulo

2023

EMÍLIA MARIA GOMES AGUIAR

**Efeito de quimioterápicos inibidores de histonas deacetilases sobre
células-tronco tumorais derivadas de linhagens de carcinoma
mucoepidermoide de glândula salivar**

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. Fabio Daumas Nunes

São Paulo

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Aguiar, Emília Maria Gomes.

Efeito de quimioterápicos inibidores de histonas deacetilases sobre células-tronco tumorais derivadas de linhagens de carcinoma mucoepidermoide de glândula salivar / Emília Maria Gomes Aguiar; orientador Fabio Daumas Nunes. -- São Paulo, 2023.

158 p. : tab., fig. ; 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. Células-tronco tumorais. 2. Carcinoma mucoepidermoide de glândula salivar. 3. Inibidores de histonas deacetilases. 4. Quimioterapia. I. Nunes, Fabio Daumas. II. Título.

Aguiar EMG. Efeito de quimioterápicos inibidores de histonas deacetilases sobre células-tronco tumorais derivadas de linhagens de carcinoma mucoepidermoide de glândula salivar. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 09/03/2023

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Flávia Caló de Aquino Xavier

Instituição: Universidade Federal da Bahia Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Maria Fernanda Setúbal Destro Rodrigues

Instituição: Universidade Nove de Julho Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Luciana Corrêa

Instituição: Universidade de São Paulo Julgamento: Aprovada

Ao meu amado avô Geraldo, meu maior exemplo de amor, resiliência, humildade e superação. Minha maior saudade! Você será, para sempre, a corda do meu coração. Obrigada por tudo e por tanto!

Ao meu avô Celino e meu padrasto Amarildo, que lutaram bravamente pela vida, mas acabaram finalizando a sua jornada terrena durante o desenvolvimento deste trabalho. Sou muito grata por ter tido vocês na minha vida!

Ao Henrique, meu amor, amigo e companheiro, que tem percorrido um longo caminho ao meu lado, sem nunca me deixar desistir. Obrigada por ser você e por acreditar tanto em mim. Sem você, nada disso teria sido possível!

Aos meus pais, Juliano e Graça, e à minha família, por me apoiarem sempre e serem a base de sustentação dos meus sonhos!

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Fabio Daumas Nunes, pela orientação, paciência e generosidade. Você é um exemplo para todos aqueles que tem a oportunidade de conviver com você. Agradeço imensamente por todo o aprendizado, gentileza e cuidado!

À Professora Maria Fernanda, que se tornou, acima de tudo, uma grande amiga. Agradeço imensamente por ter apoiado a execução deste trabalho, desde o início. Você é, sem dúvidas, uma inspiração para mim. Muito obrigada pelo carinho e por me ensinar tanto.

À Prof^a Dr^a Marília Trierveiler Martins, por orientar o meu processo de aprendizagem em Patologia Oral e Maxilofacial desde o início. Agradeço ainda, por compartilhar comigo toda a estrutura do Labitron, para que este trabalho fosse desenvolvido.

Aos Professores da área de Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais (Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior, Prof^a Dr^a Karem Lopez Ortega, Prof^a Dr^a Marina Helena Cury Gallottini, Prof^a Dr^a Suzana Cantanhede Orsini Machado e Prof. Dr. Paulo Henrique Bráz da Silva) e Patologia Geral (Luciana Côrrea), os meus mais sinceros agradecimentos. Vocês me mostraram como a Patologia pode ser feita com excelência e a sua real importância na vida das pessoas. Admiro muito todos vocês.

À Bióloga Adriana, por ter me apresentado o universo das células com tanta maestria. Admiro muito a sua organização, empenho e dedicação. Eu nunca vou me esquecer do que aprendi com você.

Aos Biólogos Elisa e Juvaní, por toda todo apoio, aprendizado e amizade. Vocês foram fundamentais durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Dani, por toda a gentileza e cuidado com o bem-estar de todos. Você e a Catarina foram um lindo presente da FOU SP. Obrigada por fazer meus dias mais leves e mais

felizes, e por “puxar a minha orelha” quando eu comia pizza todo dia (minha mãe agradece!).

À Cidinha, por ser essa pessoa tão generosa e tão carinhosa, sempre preocupada com o bem-estar do próximo. Obrigada por cuidar tão bem de mim e por fazer os meus dias mais felizes. Você é muito especial!

À Edna, por ser tão cuidadosa com o nosso bem-estar, dentro e fora do laboratório. Obrigada pela dedicação e organização com os materiais de pesquisa e por contribuir para que o trabalho do dia a dia fosse menos pesado. Você é incrível!

À Leijiane (Ane), pela amizade e apoio direto no desenvolvimento deste trabalho. Sem você, ele não teria sido possível! Obrigada por se dedicar tanto a esse projeto, por compartilhar comigo a sua *expertise* e pelas considerações que você fez em todas as partes do texto. Saiba que eu aprendi e aprendo muito com você!

Às grandes amigas que ganhei durante a Pós-graduação (Anaeliza, Flavia e Aline) e que compartilharam comigo esta jornada, tanto nos momentos bons, quanto nos mais desafiadores. Obrigada por estarem sempre presentes e por fazerem os meus dias mais alegres, o apoio de vocês foi fundamental nesse período. Espero levá-las para sempre comigo.

Aos meus queridos amigos, vizinhos e compadres, Juliana (minha amiga de longa data) e Rodrigo, por compartilharem grande parte da vida comigo! Obrigada pela presença constante, pelo cuidado diário e pela amizade. Vocês já são minha família.

Aos meus colegas da Pós-graduação, em especial, Thalita, Marcos, Jeff, Cibele, Paulo, Mariana, Juliana Costa, Cristina e Guilherme, por compartilharem comigo momentos únicos, e por me acolherem tão bem em São Paulo. Vocês foram uma parte fundamental desse processo, e, com toda certeza, a parte mais feliz! Obrigada por tudo!

“A ciência é , portanto, uma perversão de si mesma, a menos que tenha como fim último, melhorar a humanidade”.

Nikola Tesla

RESUMO

AGUIAR EMG. Efeito de quimioterápicos inibidores de histonas deacetilases sobre células-tronco tumorais derivadas de linhagens de carcinoma mucoepidermoide de glândula salivar [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2023. Versão Corrigida.

O tratamento quimioterápico para o carcinoma mucoepidermoide de glândula salivar (CME) é, usualmente, reservado para casos agressivos e metastáticos, devido a sua baixa resposta à radio e quimioterapia, a qual é associada à presença de células-tronco de câncer na população intratumoral. Nesse contexto, os fármacos inibidores de histonas deacetilases (iHDACs) surgiram como uma estratégia, em potencial, para o tratamento do câncer, já que a hipoacetilação das histonas tem sido identificada em vários tipos de câncer. Os iHDACs induzem a rápida hiperacetilação das histonas e possuem importantes efeitos antitumorais, incluindo a ação sobre Células-tronco tumorais (CTTs). Desse modo, este estudo se propôs a avaliar os efeitos antitumorais de dois fármacos iHDACs (Panobinostat - PAN e Romidepsin - ROM), isoladamente e em associação com a Cisplatina (CIS), sobre duas linhagens celulares derivadas de CME (UM-HMC1 e UM-HMC3A), com foco na população de CTTs. A ação dos iHDACs foi investigada quanto a capacidade de inibir: (i) viabilidade celular (MTS e sulforodamina B); (ii) migração coletiva (“ferida”) e individual (*transwell*); (iii) invasão (*transwell com matrigel*); (iv) clonogenicidade e autorrenovação (formação de colônias e esferas); (v) expressão de marcadores relacionados ao fenótipo tronco-tumoral (citometria de fluxo, RT-qPCR e qPCR array), após 48h de tratamento prévio com as doses de IC₅₀ dos fármacos. As propriedades de autorrenovação e clonogenicidade, também foram analisadas em condições de desacetilação, obtidas pela manutenção dos fármacos no meio de cultivo por um período prolongado (tratamento concomitante). Os resultados mostraram que o tratamento prévio com os iHDACs induziram efeitos antitumorais, reduzindo a capacidade de migração, invasão e de formação de esferas, em ambas as linhagens celulares; apesar de não terem atuado eficientemente sobre as colônias tumorais, e nem na redução da população com fenótipo tronco-tumoral (ALDH⁺/CD44⁺) na linhagem UM-HMC3A, derivada de tumor recidivante. Já os tratamentos em associação com a Cisplatina (PAN+CIS e

ROM+CIS), reduziram eficientemente o número de esferas e, ainda, potencializaram o efeito inibitório dos iHDACs sobre a capacidade de migração e invasão celular. Contudo, a redução da resistência a CIS só foi constatada quando os fármacos em associação, permaneceram em contato com as células por um período mais prolongado. Apesar de não ter havido alterações relevantes na expressão de genes relacionados à autorrenovação e pluripotência celular, após 48h de tratamento, os resultados obtidos em um “*screening*” com 84 genes, realizado com placas de qPCR array, revelaram a expressão diferencial de diversos genes relacionados à CTTs humanas. Coletivamente, os resultados obtidos nesse estudo, evidenciaram os efeitos antitumorais da monoterapia dos iHDACs (PAN e ROM) sobre linhagens de CME, apesar dos tratamentos em associação com a CIS, não terem reduzido efetivamente a resistência das células à ação da Cisplatina. Portanto, os dados aqui apresentados, ao mesmo tempo que comprovam os efeitos *in vitro* dos dois iHDACs em linhagens de CME, ressaltam a necessidade de outros estudos, visando identificar combinações terapêuticas mais efetivas na erradicação das CTTs e, conseqüentemente, no tratamento dos pacientes acometidos pelo CME de glândula salivar. Therefore, the data presented here, while confirming *in vitro* effects of the two iHDACs in CME cell lines, highlight the need for further studies to identify more effective therapeutic combinations in the eradication of CTT and, consequently, in the treatment of affected patients by MEC.

Palavras-chave: Células-tronco tumorais. Carcinoma mucoepidermoide de glândula salivar. Inibidores de histonas deacetilases. Quimioterapia.

ABSTRACT

Aguiar EMG. Effects of chemotherapy with histone deacetylases inhibitors on cancer stem cells derived from cell lines of mucoepidermoid carcinoma of salivary gland [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2023. Versão Corrigida.

Chemotherapy treatment for mucoepidermoid carcinoma of the salivary gland (CME) is usually reserved for aggressive and metastatic cases due to its low response to radio and chemotherapy, which is associated with the presence of cancer stem cells in the intratumoral population. In this context, histone deacetylases (iHDAC) inhibitor drugs have emerged as a potential strategy for cancer treatment since histone hypoacetylation has been identified in several types of cancer. The iHDACs induce rapid histone hyperacetylation and have significant antitumor effects, including action on Cancer Stem Cells (CTTs). Thus, this study aimed to evaluate the antitumor effects of two iHDACs drugs (Panobinostat - PAN and Romidepsin - ROM), isolated and in association with Cisplatin (CIS), on two CME-derived cell lines (UM-HMC1 and UM - HMC3A), focusing on the CTTs population. We investigated iHDACs' abilities to inhibit: (i) cell viability (MTS and sulforhodamine B); (ii) collective ("wound healing assay") and individual (transwells) migration; (iii) invasion (Matrigel-coated transwells); (iv) clonogenicity and self-renewal (colony and sphere formation); (v) expression of markers related to cancer stem-cell phenotype (flow cytometry, RT-qPCR and qPCR array), after 48h of previous treatment with the IC₅₀ doses of the drugs. Self-renewal ability and clonogenicity were also analyzed under deacetylation conditions obtained by maintaining the drugs in the culture medium for an extended period (concomitant treatment). The results showed that previous treatment with iHDACs induced antitumor effects, reducing the ability to migrate, invade and form spheres in both cell lines. However, they did not act efficiently on tumor colonies nor in reducing the population with a stem-cell cancer phenotype (ALDH⁺/CD44⁺) in the UM-HMC3A lineage derived from a recurrent tumor. The treatments in association with Cisplatin (PAN+CIS and ROM+CIS) efficiently reduced the number of spheres and also potentiated the inhibitory effect of iHDACs on the capacity for cell migration and invasion. However, the reduction in resistance to CIS was only observed when the combined drugs

remained in contact with the cells for a more extended period. Although there were no relevant alterations in the expression of genes related to self-renewal and cellular pluripotency, after 48 hours of treatment, the results obtained in the "screening" with 84 genes, carried out in qPCR array plates, revealed the differential expression of several genes related to human CTTs. Collectively, the results obtained in this study showed the antitumor effects of monotherapy with iHDACs (PAN and ROM) in CME cell lines, although treatments in association with CIS have not reduced effectively the resistance of cells to the Cisplatin action.

Keywords: Cancer stem cells. Mucoepidermoid carcinoma of salivary gland. Histone deacetylase inhibitors. Chemotherapy.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1 - Fotomicrografias mostrando os padrões de crescimento e os diferentes tipos celulares que compõe o CME 35
- Figura 2.2 - Esquema ilustrativo do modelo de crescimento tumoral hierárquico, no qual as CTTs ocupam o topo dessa hierarquia 40
- Figura 4.1 - Esquema ilustrando a modalidade de **tratamento prévio** realizado nos ensaios de formação de esferas e colônias.....65
- Figura 4.2 - Esquema ilustrando a modalidade de **tratamento concomitante** realizado nos ensaios de formação de esferas e colônias66
- Figura 4.3 - Desenho esquemático das áreas fotografadas no ensaio de ferida (migração celular)..... 69
- Figura 5.1 - Percentual de proliferação celular (média \pm desvio padrão) das linhagens tumorais derivadas de CME, determinada pelo método da SRB nos períodos de 48h, 72h e 96h, em relação ao período de 24h 82
- Figura 5.2 - Curvas de dose-resposta dos fármacos nas linhagens UM-HMC1 e UM-HC3A, geradas por modelo de regressão não linear, para definição das doses de IC₅₀..... 85
- Figura 5.3 - Percentual de crescimento (SRB) e viabilidade celular (MTS) (média \pm desvio padrão), normalizados em relação ao grupo CTRL, após 48h o tratamento com as doses de IC₅₀ estabelecidas, nas linhagens tumorais derivadas de CME 86
- Figura 5.4 - Número de esferas e colônias formadas (média \pm desvio padrão), após 48h de tratamento prévio com as doses de IC₅₀ dos fármacos selecionados..... 88
- Figura 5.5 - Número de esferas e colônias formadas (média \pm desvio padrão), após o tratamento concomitante com as doses de IC₅₀ dos fármacos selecionados..... 90

Figura 5.6 - Percentual de fechamento das "feridas" (média \pm desvio padrão), normalizadas pelo grupo CTRL, após 48h de tratamento com as doses de IC ₅₀ dos fármacos selecionados.....	92
Figura 5.7 - Percentual de células migratórias (A e B) e invasivas (C e D) (média \pm desvio padrão), normalizadas pelo grupo CTRL, após 48h de tratamento com as doses de IC ₅₀ dos fármacos selecionados (e suas respectivas associações)	94
Figura 5.8 - Frequência (%) de células positivas para marcadores de CTTs na linhagem UM-HMC1.....	97
Figura 5.9 - Frequência (%) de células positivas para marcadores de CTTs na linhagem UM-HMC3A	98
Figura 5.10 - Expressão relativa de genes relacionados à CTTs (média \pm desvio padrão), após 48h de tratamento com as doses de IC ₅₀ dos fármacos selecionados	100
Figura 5.11 - Análise por Componentes Principais (PCA) da expressão diferencial dos genes relacionados à CTTs avaliados por PCR array, após o tratamento com as doses de IC ₅₀ dos fármacos iHDACs e suas associações com a Cisplatina	102

LISTA DE QUADROS

Quadro 4.1 - Características dos pacientes e dos tumores, a partir dos quais as linhagens celulares derivadas de CME, utilizadas neste estudo, foram originadas	60
Quadro 4.2 - Medicamentos selecionados após a triagem da biblioteca de fármacos	63
Quadro 4.3 - Fármacos analisados e doses testadas para determinação do IC ₅₀	64
Quadro 4.4 - Parâmetros de compensação e controle FMO	72
Quadro 4.5 - Reagentes utilizados no preparo das amostras para a corrida do gel de integridade	74
Quadro 4.6 - Sequência de <i>primers</i> utilizados na RT-qPCR, com suas respectivas concentrações e temperaturas de hibridização (° C).....	76
Quadro 4.7 - Genes utilizados para a normalização dos dados brutos da linhagem UM-HMC1	79
Quadro 4.8 - Genes utilizados para a normalização dos dados brutos da linhagem UM-HMC3A	80
Quadro 6.1 - Resumo dos principais resultados encontrados no desenvolvimento das metodologias do presente trabalho.....	110

LISTA DE TABELAS

- Tabela 5.1 - Expressão gênica (*fold change*) dos genes identificados pela análise de PCA na linhagem UM-HMC1, após o tratamento com as doses de IC₅₀ dos fármacos iHDACs e suas associações com a Cisplatina, em relação ao grupo controle.....104
- Tabela 5.2- Expressão gênica (*fold change*) dos genes selecionados pela análise de PCA na linhagem UM-HMC3A, após o tratamento com as doses de IC₅₀ dos fármacos iHDACs e suas associações com a Cisplatina, em relação ao grupo controle.....106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	transportadores ABC, do inglês “ <i>ATP-binding cassette</i> ”
AKT	do inglês “protein kinase B”
ALDH	aldeído desidrogenase, do inglês “ <i>aldehyde dehydrogenase</i> ”
APE1	endonuclease apurínica/apirimidínica 1, do inglês “ <i>human apurinic/aprimidinic endonuclease 1</i> ”
BMI-1	do inglês “ <i>B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog</i> ”
BMP7	do inglês “ <i>Bone Morphogenetic Protein 7</i> ”
Cat. No.	Catálogo de número
CD10	marcador de diferenciação 10, do inglês “ <i>cluster of differentiation 10</i> ”
CD24	marcador de diferenciação 24, do inglês “ <i>cluster of differentiation 24</i> ”
CD34	marcador de diferenciação 34, do inglês “ <i>cluster of differentiation 34</i> ”
CD38	marcador de diferenciação 38, do inglês “ <i>cluster of differentiation 38</i> ”
CD44	marcador de diferenciação 44, do inglês “ <i>cluster of differentiation</i> ”
cDNA	DNA complementar
CECP	carcinomas epidermoides de cabeça e pescoço
CIS	Cisplatina
CME	Carcinoma mucoepidermoide de glândula salivar
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO ₂	dióxido de carbono
CRTC1	do inglês “ <i>CREB Regulated Transcription Coactivator 1</i> ”
CRTC3	do inglês “ <i>CREB Regulated Transcription Coactivator 3</i> ”
Ct	do inglês “ <i>cycle threshold</i> ”
CTTs	células-tronco tumorais
CXCL8	do inglês “ <i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 8</i> ”
DACH1	do inglês “ <i>Dachshund Family Transcription Factor 1</i> ”
DAPI	do inglês “ <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i> ”
DEAB	do inglês “ <i>dietilaminobenzalde</i> ”
DLL1	do inglês “ <i>Delta Like Canonical Notch Ligand 1</i> ”
DMEM	meio <i>Eagle</i> modificado por Dulbeco, do inglês “ <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> ”

DMSO	do inglês “ <i>dimethyl sulfoxide</i> ”
DNA	ácido desoxirribonucleico, do inglês “ <i>Deoxyribonucleic acid</i> ”
DO	densidade óptica
EGF	fator de crescimento epitelial humano, do inglês “ <i>Epidermal growth factor</i> ”
EGFR	receptor do fator de crescimento epidérmico, do inglês “ <i>epidermal growth factor receptor</i> ”
ENG	do inglês “ <i>Endoglin</i> ”
ERCC1	proteína do grupo 1 de complementação cruzada do reparo por excisão, do inglês “ <i>excision repair cross complementing-group 1</i> ”
ERK	do inglês “ <i>extracellular signal-regulated kinases</i> ”
EUA	Estados Unidos da América
FDA	do inglês “ <i>fluorescence-minus-one</i> ”
FMO	do inglês “ <i>fluorescence-minus-one</i> ”
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
FSC	tamanho relativo da células, do inglês “ <i>Forward Scatter</i> ”
GAPDH	do inglês “ <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> ”
HATs	histonas acetiltransferases
HDACs	histonas deacetilases
HER-2	do inglês “ <i>human epidermal growth factor receptor 2</i> ”
HPRT	do inglês “ <i>hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase</i> ”
IC ₅₀	concentração inibitória média
iHDACs	inibidores de histonas deacetilases
ITGA4	do inglês “ <i>Integrin alpha-4</i> ”
KLF4	do inglês “ <i>Krüppel-like factor 4</i> ”
M	ausência ou presença de metástase à distância
MA	do inglês “ <i>Massachusetts</i> ”
MAML2	do inglês “ <i>mastermind like transcriptional coactivator 2</i> ”
MEF2	fator potenciador do miócitos 2, do inglês “ <i>myocyte enhancer factor-2</i> ”
MERTK	inglês “ <i>MER Proto-Oncogene, Tyrosine Kinase</i> ”
MO	do inglês “ <i>Missouri</i> ”
MTS	biorredução do composto de sal tetrazólio, do inglês “ <i>3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-5-[3-carboxymethoxy-phenyl]-2-[4-sulfophenyl]-2H-tetrazolium</i> ”

MTT	brometo tiazolil azul de tetrazólio, do inglês “3-(4,5- dimetiltiazol-2yl)-2,5- difenil brometo de tetrazolina”
N	ausência ou presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais
NAD ⁺	dinucleótido de nicotinamida e adenina, do inglês “ <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i> ”
NANOG	do inglês “ <i>Nanog Homeobox</i> ”
NCI	do inglês “ <i>Division of Cancer Treatment and Diagnosis</i> ”
NF-kB	inibidor do fator nuclear kappa B, do inglês “ <i>nuclear factor kappa B</i> ”
NIH	do inglês “ <i>National Cancer Institute</i> ”
NRW	do inglês “ <i>Nordrhein-Westfalen</i> ”
NY	do inglês “ <i>New York</i> ”
OCT-4	do inglês “ <i>octamer- 4</i> ”
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAN	Panobinostat
PAN+CIS	associação entre Panobinostat e Cisplatina
PAS-D	ácido periódico + reativo de Schiff com Diastase, do inglês “ <i>Periodic acid– Schiff–diástase</i> ”
PBS	solução salina tamponada com fosfato, do inglês “ <i>phosphate buffered saline</i> ”
PCA	Análise de Componentes Principais, do inglês “ <i>Principal Component Analysis</i> ”
PCR	reação em cadeia da polimerase
PECAM1	do inglês “ <i>Platelet And Endothelial Cell Adhesion Molecule 1</i> ”
PET	polietileno tereftalato
PFA	paraformaldeído
PI3K	do inglês “ <i>phosphoinositide 3-kinase</i> ”
PROM1	do inglês “ <i>Prominin 1</i> ”
RNA	ácido ribonucleico, do inglês “ <i>Ribonucleic acid</i> ”
ROM	Romidepsin
ROM+CIS	associação entre Romidepsin e Cisplatina
RUNX2	fator de transcrição relacionado à Runt, do inglês “ <i>RUNX Family Transcription Factor 2</i> ”
SFB	soro fetal bovino

SIRT	sirtuínas
SOX2	do inglês “SRY-Box Transcription Factor 2”
SP	população lateral, do inglês “ <i>side population</i> ”
SP	São Paulo
SRB	sulforodamina B
SSC	granulosidade e complexidade da células, do inglês “ <i>Side Scatter</i> ”
T	extensão do tumor primário
TA	temperatura ambiente
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TCA	ácido tricloroacético, do inglês “ <i>trichloroacetic acid</i> ”
TEM	transição epitélio-mesênquima
TGF- β	fator de crescimento transformador Beta, do inglês “ <i>transforming growth factor beta</i> ”
VT	do inglês “ <i>Vermont</i> ”
WI	do inglês “ <i>Wisconsin</i> ”
Wnt	do inglês “ <i>wingless</i> ” e “ <i>integrated</i> ”
XFP	xeroderma pigmentoso tipo F
XRCC1	proteína 1 de complementação cruzada de reparo de raios-x, do inglês “ <i>X-Ray Repair Cross Complementing 1</i> ”

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
>	maior que
Gy	gray
Zn ²⁺	íon zinco
No.	número
ng	nanograma
mL	mililitro
µg	micrograma
°C	graus célsius
cm ²	centímetros quadrados
µL	microlitro
m/v	massa por volume
vol/vol	volume por volume
h	hora
≥	maior ou igual
nm	nanômetro
mM	milimolar
µM	micromolar
mg/mL	miligramas por mililitros
nM	nanomolar
mm	milimetro
µm	micrômetro
rpm	rotações por minuto
x g	força g = força centrífuga relativa
V	volt (tensão)
Δ	diferença
<	menor que

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
2	REVISÃO DA LITERATURA	33
3	PROPOSIÇÃO	57
4	MATERIAL E MÉTODOS	59
5	RESULTADOS	81
6	DISCUSSÃO	107
7	CONCLUSÕES	125
	REFERÊNCIAS	127
	APÊNDICES	151
	ANEXOS	153

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, os tumores malignos de glândula salivar estão entre os 30 tipos de câncer mais frequentes, com uma estimativa de aumento de mais de 45% entre os anos de 2020 – 2040 (1). Dentre os mais de 20 subtipos morfológicos distintos de câncer de glândula salivar reconhecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (2), o carcinoma mucoepidermoide de glândula salivar (CME), é o subtipo mais frequente, representando quase 1/3 de todos os tumores malignos diagnosticados nas glândulas salivares (3).

Apesar da relativa baixa incidência, o CME representa um desafio clínico importante, em virtude da heterogeneidade microscópica e aspectos clínicos variáveis, que tendem a retardar o seu diagnóstico (1). Portanto, o estágio clínico da doença, no momento do diagnóstico inicial, influencia diretamente o prognóstico do paciente, tornando o diagnóstico precoce de fundamental importância (4). A graduação histológica do CME representa, também, um indicador de prognóstico, na medida em que tumores de graus baixo e intermediário apresentam melhores taxas de sobrevida em 5 anos (>90%) (5). Por outro lado, em tumores de alto grau, essa taxa cai para 40%, podendo diminuir ainda mais na presença de metástase nodal ou à distância (4).

O tratamento de primeira linha para o CME é a cirurgia ressectiva, seguida ou não por radioterapia. Porém, além de promover danos graves (deformidades) na face do paciente, essa modalidade de tratamento não impede a recorrência local, tão pouco, o desenvolvimento de metástases (6). A quimioterapia, por sua vez, é utilizada de forma paliativa, como terapia adjuvante, e está reservada apenas para casos mais avançados de CME (7). Nesse sentido, agentes antitumorais baseados em platina, além do Metotrexato, Paclitaxel e Doxorrubicina, são exemplos de regimes terapêuticos bastante utilizados em tumores malignos de glândula salivar; contudo, sem melhorar a sobrevida dos pacientes (8). Estima-se que aproximadamente 17% dos pacientes com CME apresentam recidivas tardias, o que torna este cenário ainda mais preocupante, visto que pacientes com tumores recorrentes ou metastáticos não possuem alternativas terapêuticas efetivas (9).

Evidências científicas têm associado a resistência ao tratamento no CME, à presença de subpopulações intratumorais com características tronco, conhecidas como células-tronco tumorais (CTTs, do inglês “*cancer stem cells*”). Essas células apresentam propriedades e mecanismos para “burlar” e escapar da terapia antitumoral convencional. Capacidade de migração, longos períodos em estado de quiescência, bombas de efluxo, aumento da maquinaria de reparo ao dano de ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês “*Deoxyribonucleic acid*”) e plasticidade são alguns deles (10). Consequentemente, as CTTs são altamente tumorigênicas e participam, não somente, do desenvolvimento do câncer, mas também, dos mecanismos de progressão tumoral e metástase (11).

O desenvolvimento de novas linhagens celulares de CME nos últimos tempos (12), possibilitou a identificação da população de CTTs neste tumor, caracterizada por alta atividade da enzima Aldeído desidrogenase (ALDH, do inglês “Aldehyde dehydrogenase”) e expressão do marcador de diferenciação 44 (CD44, do inglês “cluster of differentiation”) (13). Além disso, a superexpressão de alguns marcadores de células-tronco normais, como NANOG (do inglês “*Nanog Homeobox*”), OCT-4 (do inglês “*octamer- 4*”) e BMI-1 (do Inglês “B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog”) – relacionados à pluripotência e autorrenovação celular – também já foi relatada em tumores de pacientes com CME, quando comparados com tecidos normais das glândulas salivares (14). Mais recentemente, outros trabalhos, não só associaram a presença das CTTs à radio/quimioresistência, como também verificaram o aumento desta população após o regime terapêutico convencional, sinalizando para a real necessidade de novas terapias com alvo nas CTTs (15–17).

Nesse cenário, as 18 isoformas de enzimas pertencentes a superfamília das histonas deacetilases (HDACs), estão envolvidas em diversos processos biológicos, tais como, controle do ciclo celular, diferenciação, motilidade e sobrevivência celular (18,19); além de participarem da manutenção das propriedades de pluripotência e autorrenovação nas CTTs (20). Desse modo, fármacos inibidores de histonas deacetilases (iHDACs) surgiram como uma nova ferramenta terapêutica, em potencial, para o tratamento do CME (21), dado que a hipoacetilação das histonas tem sido associada à carcinogênese, e a superexpressão de enzimas inibidoras de histonas deacetilases, identificadas em diversos tipos de câncer.

No CME, os padrões de acetilação e de expressão de HDACs ainda permanecem desconhecidos ressaltando, ainda mais, a importância de se testar outros fármacos iHDACs. Alguns trabalhos que avaliaram os efeitos, *in vitro*, de iHDACs em linhagens de CME, relataram aumento na acetilação da cromatina, aliado à parada do ciclo celular e a indução de apoptose e autofagia (21,22). O efeito inibitório sobre as CTTs, culminando na redução da quimiorresistência à Cisplatina, também já foi observado (15). Outros trabalhos, avaliaram o efeito da combinação de diferentes terapias-alvo sobre o CME, e encontraram alguns resultados promissores (5,23). Não obstante, apesar dos resultados animadores obtidos com a utilização dos iHDACs frente ao CME, apenas dois fármacos iHDACs já foram testados até o momento (Apicidin e Vorinostat) (5,15,21–23).

Nessa perspectiva, o reposicionamento de fármacos tem sido uma abordagem extremamente pertinente e vantajosa, já que permite uma nova utilização para fármacos, que já foram aprovados por agências regulatórias, para além das indicações iniciais aprovadas para o uso do medicamento. Assim, o conhecimento prévio sobre a farmacocinética, farmacodinâmica e a segurança dessas drogas, permite a identificação de novos alvos terapêuticos para o tratamento do câncer de forma mais segura, rápida e barata (24). Entretanto, ainda não existem estudos que tenham avaliado fármacos reposicionados em linhagens de CME.

O presente estudo foi desenvolvido a partir de dados obtidos em um *screening* inicial, realizado por nosso grupo de pesquisa, em um conjunto de 133 fármacos contidos em placas, as quais foram fornecidas pelo *Drug Synthesis and Chemistry Branch, Developmental Therapeutics Program, Division of Cancer Treatment and Diagnosis, do National Cancer Institute (NCI/NIH)*. Dentre os fármacos citados acima, foram selecionados fármacos iHDACs (Panobinostat e Romidepsin), uma vez que essa classe de medicamentos já demonstrou resultados promissores em CME (15,22); além de terem atendido ao critério inicial de escolha, reduzindo a viabilidade celular, em pelo menos 70%, em ambas as linhagens derivadas de CME analisadas.

Esses fármacos foram, originalmente, aprovados para o tratamento de Mieloma múltiplo recidivante e refratário (Panobinostat) e Linfoma cutâneo/periférico de células T (Romidepsin). Porém, já estão sendo testados em estudos clínicos de fase I e II (como monoterapia, ou em combinação com outros fármacos) para o tratamento de

outros tipos de câncer, inclusive, tumores sólidos (25). A Cisplatina (CIS), apesar de não ter apresentado resultados satisfatórios na triagem inicial, foi incluída no estudo, por se tratar de um fármaco já empregado no tratamento quimioterápico do CME, para ser utilizada em associação com os iHDACs, como uma forma de sensibilizar as células e reduzir a resistência à CIS nas linhagens de CME.

Desse modo, considerando evidências recentes, que destacam a importância de múltiplos alvos terapêuticos, atuando na progressão e na resistência tumoral, a hipótese inicial deste estudo foi a de que os iHDACs (Panobinostat e Romidepsin) seriam capazes de atuar isoladamente ou em associação, especialmente, sobre as CTTs, diminuindo a resistência destas à Cisplatina, nas linhagens de CME. Portanto, este trabalho se propôs a avaliar o efeito terapêutico de dois fármacos iHDACs, Panobinostat e Romidepsin, como terapia única e em associação com a Cisplatina, sobre linhagens de CME, com foco na população de CTTs.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CARCINOMA MUCOEPIDERMÓIDE DE GLÂNDULA SALIVAR (CME)

Atualmente, o câncer representa a 1ª ou 2ª principal causa de morte, antes dos 70 anos, em mais de 60% dos países do mundo (26). Estima-se que mais de 19,3 milhões de novos casos tenham sido diagnosticados em todo o mundo somente em 2020, dos quais cerca de 10 milhões resultaram em mortes (27). Os tumores malignos de glândula salivar ocupam a 30ª posição na classificação dos tipos de câncer mais frequentes, contando com uma incidência anual que varia entre 0,4 - 2,6 casos diagnosticados a cada 100.000 habitantes (28). Não obstante, esses tumores representam cerca de 3% de todos os tumores malignos de cabeça e pescoço (29), e estão divididos em mais de 24 subtipos morfológicos distintos de câncer de glândula salivar, reconhecidos pela OMS (2).

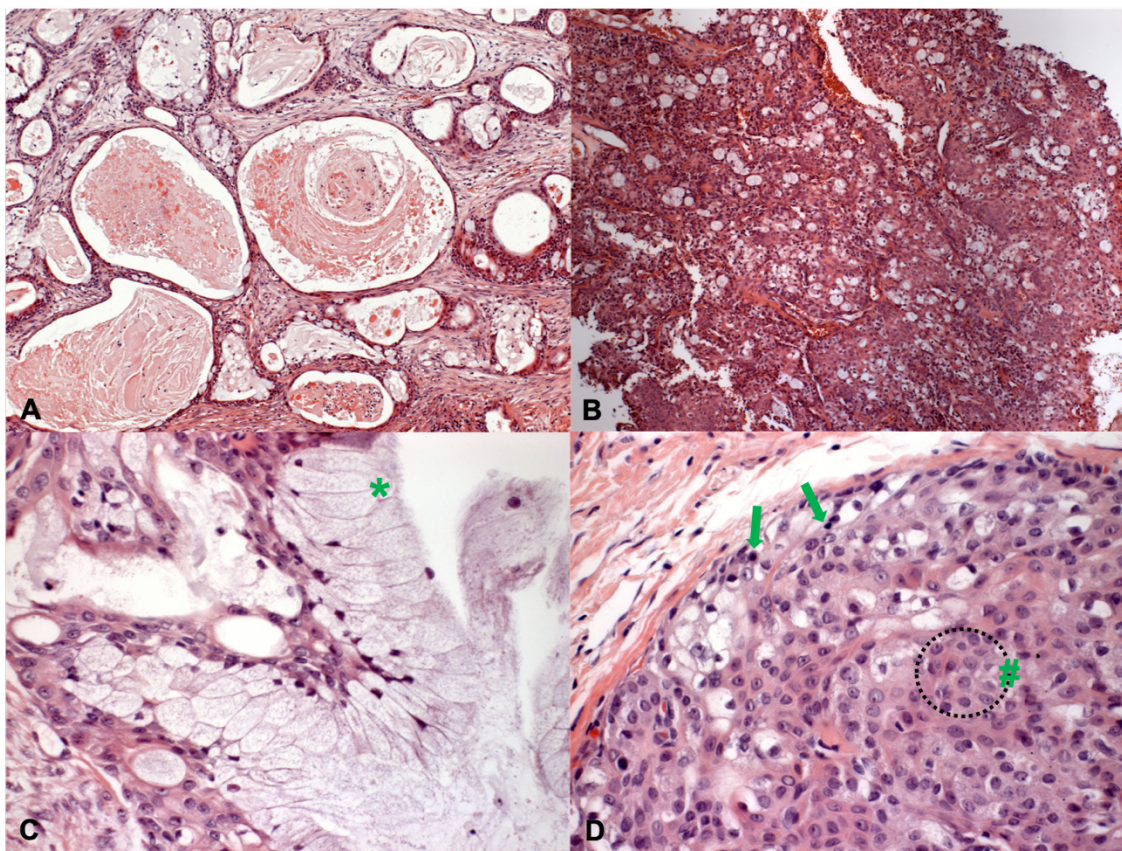
O carcinoma mucoepidermoide de glândula salivar (CME) é o subtipo mais frequente em adultos e crianças, representando cerca de 30% de todos os tumores malignos de glândula salivar (3). O CME acomete, principalmente, mulheres na sexta década de vida, embora também seja a neoplasia maligna de glândula salivar mais frequente em jovens (30–33). Estudos recentes têm mostrado que as glândulas salivares menores são os locais mais acometidos pelo CME (56%), seguido pela parótida (34%), glândula submandibular (7%) e glândula sublingual (3%) (34,35). Contudo, outros trabalhos já relataram a Parótida como sendo o local de maior acometimento do CME (36,37).

O diagnóstico do CME é baseado na identificação microscópica de células pouco atípicas, lembrando o epitélio da mucosa oral. Essas células estão presentes em diferentes arranjos e proporções, podendo assumir um padrão cístico ou sólido (2). As características individuais de cada tipo celular, estão descritas a seguir e exemplificadas na Figura 2.1:

- Células epiteliais: Células semelhantes aos queratinócitos da mucosa oral normal, que assumem um formato poligonal, com pontes intercelulares proeminentes e sem queratinização (38).
- Células intermediárias: Como o próprio nome sugere, essas células exibem um padrão morfológico que pode transitar entre as células epiteliais e mucosas. Assim, podem se apresentar como células pequenas, de aspecto basalóide, ou, até mesmo, como células maiores, de morfologia mais cuboidal, com contornos imprecisos, citoplasma escasso e fracamente eosinofílico. Sua cromatina se encontra dispersa e os nucléolos são imperceptíveis (38,39).
- Células mucosas: Essas células podem se apresentar com formatos variáveis, mas em geral, apresentam uma morfologia piramidal ou esferoidal, podendo assumir a forma de cálice. Essas células, exibem ainda, núcleo pequeno e deslocado para periferia, além de citoplasma espumoso abundante, com acúmulo de mucinas em seu interior, que se coram positivamente para o ácido periódico + reativo de Schiff com Diastase (PAS-D, do inglês "*Periodic acid-Schiff-diástase*") (38).

Apesar de não serem imprescindíveis para o diagnóstico do CME, a presença de grande quantidade de células claras, de forma predominante em alguns casos, além de oncócitos e esclerose do estroma tumoral, também podem ser identificados, caracterizando outras variantes do CME (2).

Figura 2.1 - Fotomicrografias mostrando os padrões de crescimento e os diferentes tipos celulares que compõe o CME.



Fotomicrografias de pequeno aumento mostrando o padrão de crescimento cístico (A) e sólido (B) no CME. (C) e (D) Fotomicrografias de maior aumento mostrando as células mucosas (*), epidermoides (#) e intermediárias (**setas**).

Fonte: Acervo de imagens da Disciplina de Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Nesse sentido, diversos sistemas de graduação histológica já foram propostos para dividir as lesões em grau baixo, intermediário ou alto, na dependência de características citomorfológicas, arquitetônicas, além da presença/ausência de invasão perineural e angiolímfática (40–42). No entanto, apesar de suas vantagens, esses sistemas não são universalmente aceitos, já que também apresentam limitações, principalmente quanto à identificação equivocada do grau intermediário, o que pode interferir diretamente no tratamento dos pacientes. Assim, ao contrário do que foi preconizado pela OMS em 2005 (3), a classificação dos tumores de 2017

apresenta apenas as características gerais dos tumores de baixo, intermediário e alto grau, em virtude dessa falta de consenso (2).

Assim sendo, os CME de baixo grau, em geral, são bem circunscritos e apresentam o predomínio do padrão cístico, com uma grande quantidade de células mucosas. Os de grau intermediário, apesar de sua conhecida variabilidade, exibem um padrão mais sólido e menos circunscrito. Por outro lado, o estabelecimento do correto diagnóstico dos CME de alto grau, deve ser baseado na presença de uma ou mais das seguintes alterações: áreas focais com imuno-positividade para mucina intracelular, áreas de necrose, anaplasia nuclear, além de invasão neoplásica (óssea, perineural ou linfovascular). Além disso, a presença de áreas de baixo grau ou intermediário, também deve ser considerada (2).

Essa heterogeneidade morfológica, aliada à baixa incidência e o comportamento clínico variável, tornam o estabelecimento de fatores prognósticos extremamente desafiadores no CME (43,44) (6,7). Apesar disso, o estágio clínico e o grau de diferenciação do tumor podem apresentar um papel preditivo importante na sobrevivência dos pacientes (45) (8). Os CME de baixo grau acometem principalmente glândulas salivares menores e são diagnosticados logo no início e, portanto, contam com uma alta taxa de sobrevivência em 5 anos (90-100%). Já tumores de alto grau, são encontrados, em sua grande maioria, em estágios mais avançados nas glândulas parótidas, com maior extensão tumoral (T) e *status* linfonodal (N), o que diminui para cerca de 40% a sobrevida dos pacientes em 5 anos (46,47) (9–11).

Estudos envolvendo genética molecular, já mostraram que grande parte dos casos de CME apresentam mutações responsáveis pela formação de genes de fusão *CRTC1-MAML2* (55%-80%) (48–50) e *CRTC3-MAML2* (aproximadamente 5%) (51), resultantes de translocações específicas entre os cromossomos 11 e 19 $t(11;19)(q21;p13)$ e 11 e 15 $t(11;15)(q21;q26)$, respectivamente. Esses rearranjos genéticos, apesar de não serem necessários para o diagnóstico, podem auxiliar, tanto na identificação das diferentes variantes do CME (52–54), quanto no diagnóstico diferencial de lesões que apresentem sobreposição de características histológicas com o CME, tais como: Tumor de Warthin, Linfadenoma, Cistoadenoma Oncocítico, Oncocitoma ou Carcinoma de Células Acinares (55). Essas alterações cromossômicas foram, inicialmente, correlacionadas com tumores menos agressivos,

de grau baixo e intermediário e com o melhor desfecho clínico dos pacientes (56,57). Contudo, evidências recentes sugerem que o status das translocações não impactam no status do tumor, tão pouco, na sobrevivência dos pacientes (58,59).

Em relação aos tratamentos disponíveis, os pacientes acometidos por CME contam com limitadas opções terapêuticas, já que este tipo de tumor apresenta alta resistência à terapia antitumoral convencional (30). Atualmente, o tratamento preconizado para todas as graduações histológicas de CME é a ressecção cirúrgica da área comprometida, com margens livres de doença, seguida ou não de radioterapia, acarretando comprometimento estético e funcional graves da face dos pacientes (30).

A radioterapia pós-operatória, é indicada para os tumores em estágios avançados, de alto grau histológico, e, nos casos em que as margens livre de doença não foram preservadas (ou, em caso de margens pequenas). Para além disso, essa modalidade terapêutica deve ser utilizada quando a lesão se estende para fora da glândula, em casos de metástase nodal, ou, em casos de invasão perineural e linfovascular (60). Em tumores irresssecáveis, o tratamento com altas doses de radiação ($\geq 60\text{Gy}$), isoladamente ou em combinação com a quimioterapia, também está indicado (61,62).

O tratamento quimioterápico, por sua vez, é utilizado apenas em casos de tumores recorrentes, localmente invasivos ou metastáticos, como terapia adjuvante paliativa sem, contudo, melhorar significativamente a sobrevida global dos pacientes (63). De acordo com a *American Cancer Society* (2022), os tratamentos quimioterápicos existentes atualmente para tumores de glândula salivar, incluem: Cisplatina, Mitoxantrone, Doxorubicina (Adriamycin®), Epirubicina (Ellence), Ciclofosfamida (Cytosan), Paclitaxel (Taxol®), Vinorelbina (Navelbine®), Metotrexato e Docetaxel (Taxotere) (64). Especificamente para o tratamento do CME, as associações entre Cisplatina + Gemcitabina (65), Cisplatina + Vinorelbina (66) e Ciclofosfamida + Doxorubicina + Cisplatina (CAP) (67), além do tratamento com Paclitaxel (68), também têm sido avaliados em estudos clínicos, mostrando resultados moderados no tratamento de doenças em estágios avançados ou recorrentes e metástases à distância (62). Contudo, apesar dos tratamentos existentes, a principal

causa de mortalidade nos pacientes com CME, continua sendo por metástases a distância e recorrências loco-regionais (69).

2.2 CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS (CTTs)

A origem do CME ainda não está completamente elucidada, entretanto, alguns autores consideram que a formação desse tumor, seja resultado da proliferação descontrolada de células-tronco normais, residentes nos ductos excretores das glândulas salivares, em condições atípicas (70). Assim, com base no modelo hierárquico de origem, progressão e manutenção do câncer, acredita-se que, tanto as células-tronco adultas, quanto as células progenitoras, podem acumular mutações ao longo do tempo e sofrerem alterações genéticas que levam à desregulação de suas vias de autorrenovação, transformando-as em CTTs (71,72).

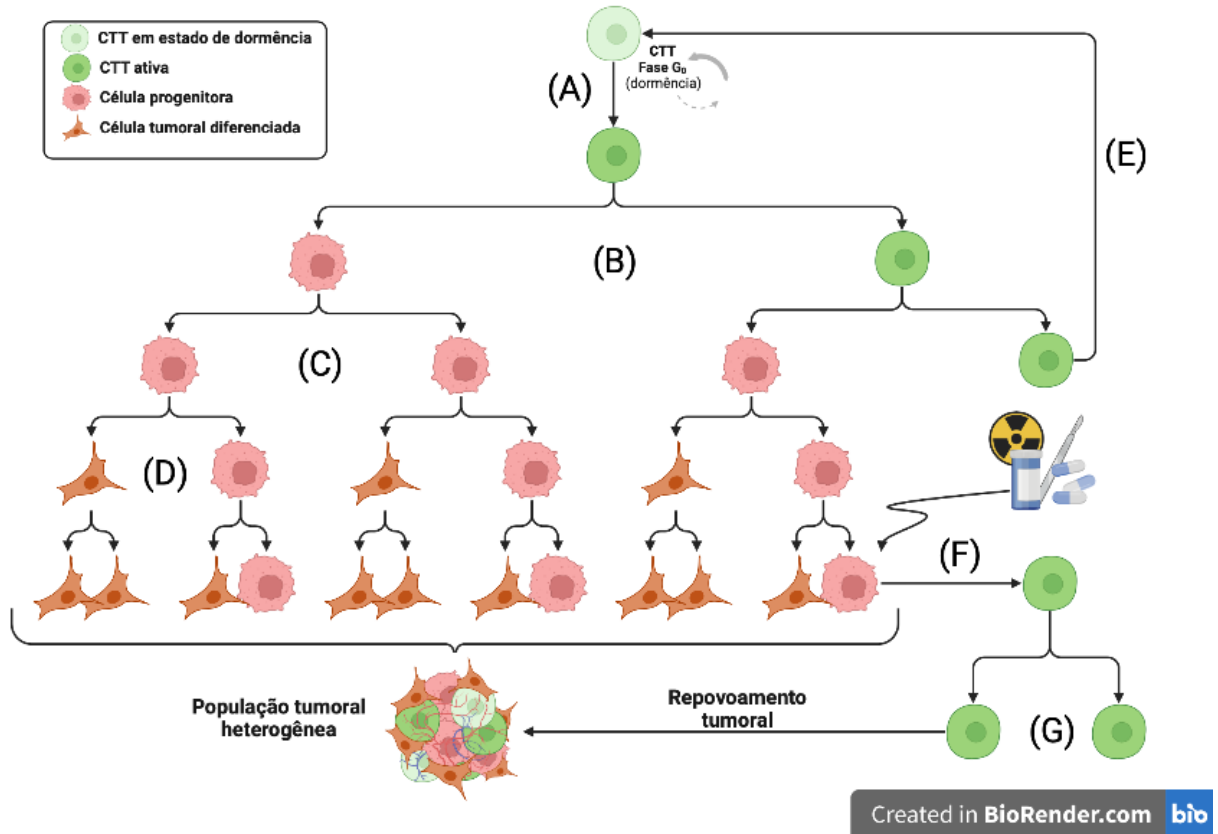
O termo células-tronco tumorais (do inglês, *cancer stem cells*), foi definido no *Workshop* realizado pela *American Association for Cancer Research* (2006), para se referir às células dentro do tumor, responsáveis pela sua sustentação e crescimento rápido (11). As CTTs são capazes de originar um novo tumor *in vivo*, idêntico ao do doador inicial, quando transplantadas em modelos murinos imunodeficientes, evidenciando o seu alto potencial tumorigênico (11). Essas células também compartilham algumas características importantes com as células-tronco normais, como potencial migratório e metastático, indução angiogênica, expressão ativa da telomerase, resistência apoptótica, aumento da atividade de transportadores de membrana (Ex. transportadores ABC, do inglês “ATP-binding cassette”) e longos períodos de vida (73).

As CTTs, assim como as células-tronco normais, também são capazes de se autorrenovar indefinidamente, originando outras células indiferenciadas idênticas. Além disso, essas mesmas células podem se dividir simetricamente, originando duas células progenitoras com capacidade de autorrenovação limitada e potencial de

diferenciação, ou assimetricamente, dando origem a uma CTT e uma célula progenitora (74). O balanço existente entre a autorrenovação e a divisão simétrica/assimétrica, é controlado pelas mesmas vias de ativação que regulam as funções nas células-tronco adultas normais (*Notch*, *Wnt* e *Hedgehog*), e é esse equilíbrio que, em última instância, comanda a heterogeneidade tumoral (75).

Nesse sentido, estudos já demonstraram, que essa heterogeneidade celular encontrada nos tumores, nada mais é, do que o resultado da organização das CTTs, que assim como as células-tronco adultas, se organizam de modo hierárquico (76). Neste modelo de organização hierárquica (Figura 2.2), as células-tronco residentes do tecido, podem acumular mutações e se transformarem em CTTs. As CTTs saem do estado de “dormência” e começam a se proliferar rapidamente, dando origem à população de células progenitoras (mais diferenciadas), com capacidade de renovação limitada. As células progenitoras, por sua vez, passam a se dividir de forma assimétrica, para gerar células tumorais diferenciadas, que originarão o tumor; enquanto as CTTs retornam ao seu estado de quiescência. Assim, à medida que o tumor amadurece, as células progenitoras diminuem sua função (10). Deste modo, acredita-se que a divisão assimétrica possa predominar em estágios iniciais, para formar tumores bem diferenciados (77), enquanto em estágios mais avançados, a autorrenovação (divisão simétrica) se sobressai, para aumentar a população de CTTs e formar um tumor indiferenciado, que em geral, está clinicamente associado a um pior prognóstico (78). Para além disso, evidências mais recentes tem apontado para a existência de um modelo dinâmico de uma plasticidade celular, em que células mais diferenciadas (não-CTTs) possuem a capacidade de serem transformadas em CTTs pelo processo de desdiferenciação (79).

Figura 2.2 - Esquema ilustrativo do modelo de crescimento tumoral hierárquico, no qual as CTTs ocupam o topo dessa hierarquia.



As CTTs saem do estado de dormência, em que passam a maior parte do tempo (A), e começam a se dividir assimetricamente, para manter a população de CTTs e gerar uma nova população de células progenitoras (B). Essa população se expande por divisões simétricas (originando duas células progenitoras novas), até que haja células progenitoras suficientes para continuar o desenvolvimento tumoral (C). Em seguida, passam a se dividir assimetricamente para formar as células diferenciadas, que representarão grande parte da população intra-tumoral (D). As CTTs voltam, então, para o seu estado habitual de dormência (E), podendo ser novamente ativadas em resposta a perturbações geradas ao tumor (remoção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia). As células progenitoras também podem responder à injúria tumoral e se desdiferenciar, originando novas CTTs (F), que por sua vez, irão se dividir simetricamente (G) para promover o rápido repovoamento do tumor.

Fonte: Adaptado de Gasch et al., (10) e Reid et al., (74).

A primeira menção sobre a presença das CTTs no desenvolvimento do câncer, foi levantada por *Rudolf Virchow* (1870), em continuidade com a teoria proposta em 1838 por *Johannes Müller*, que se referia aos tumores como uma “anormalidade no desenvolvimento das células embrionárias”. Mais tarde, *Julius Cohnheim* (1977), que integrava a equipe de *Rudolf Virchow*, admitiu que os "restos embrionários" não utilizados durante o período de desenvolvimento, seriam os responsáveis pela origem do tumor (80). Entretanto, evidências só foram apresentadas, de fato, na década de 90, em pesquisas desenvolvidas por *John E. Dick* e colaboradores. Esses autores conseguiram demonstrar, que apenas uma pequena subpopulação de células, foi capaz de iniciar a Leucemia Mielóide Aguda, quando transplantadas em camundongos imunossuprimidos (81). Utilizando marcadores de superfície para caracterizar as células iniciadoras de tumor (prováveis CTTs), eles verificaram que essa pequena parcela de células, apresentavam o fenótipo CD34⁺/CD38⁻, também encontrado nas células progenitoras hematopoiéticas normais. Verificaram ainda, que a população tumoral presente nos camundongos após o transplante, era heterogênea e idêntica à do doador inicial. Isso confirmou o alto potencial de renovação das CTTs, já que as células iniciadoras de tumor originaram novas CTTs, idênticas às que foram transplantadas. Interessantemente, essas células também foram capazes de produzir uma população mais diferenciada, sem potencial tumorigênico (CD44⁺/CD38⁺ e células CD44⁻) (82), ressaltando ainda mais a sua capacidade pluripotente.

A partir desses achados, a detecção das células iniciadoras de tumor na Leucemia mielóide aguda, possibilitou a identificação e o isolamento de CTTs em vários tipos de câncer, graças a utilização de diferentes marcadores de superfície, sendo o CD44, uns dos mais utilizados (83). CD44 é uma glicoproteína transmembrana de cadeia simples, que atua como receptor para vários ligantes, como ácido hialurônico, metaloproteinases de matriz e colágeno. Esse receptor é expresso, tanto fisiologicamente, quanto em condições patológicas, com significativa importância para o sistema imune, processos inflamatórios e o câncer (84). Isso porque a interação entre o ácido hialurônico e o receptor CD44 pode influenciar, tanto o funcionamento de receptores de sinal como HER2, EGFR, TGF- β , quanto a atividade de proteínas quinases não receptoras. Essa ligação, pode ainda, estimular diversas funções celulares (proliferação, sobrevivência, motilidade e invasão) e a quimiorresistência, através da interferência em vias de sinalização como MAP

Quinase e PI3K/AKT, ou em transportadores de membrana envolvidos na resistência a drogas (84,85).

Em tumores sólidos, o CD44 foi de fundamental importância para a identificação das CTTs, como em um estudo realizado em câncer de mama (86), no qual os autores observaram que apenas a população de células com fenótipo CD44⁺/CD24⁻, foi capaz de originar um novo tumor, quando inoculadas em camundongos imunodeficientes. Ao passo que, as populações CD44⁺/CD24⁺ ou CD44⁻/CD24⁻, não apresentavam potencial tumorigênico, mesmo com uma quantidade de células 10 vezes maior (86). Em 2007, Prince *et al* utilizaram essa mesma proteína (CD44) para demonstrar a existência de uma pequena parcela de células com potencial tumorigênico, em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço (CECP). Essas células, que apresentavam a expressão de CD44, correspondiam à aproximadamente 10% da população total. Os pesquisadores verificaram ainda, que a população CD44⁺ foi capaz de originar um novo tumor em 65% das amostras testadas, enquanto a mesma quantidade de células, com fenótipo CD44⁻, foi capaz de gerar tumor em pouco mais de 2% dos casos. Inesperadamente, essa população CD44⁺ também expressou um marcador de autorrenovação celular, o BMI-1 (87).

Posteriormente, pesquisadores do mesmo laboratório, conseguiram isolar uma nova população celular com potencial tumorigênico, a partir da atividade da isoenzima ALDH. Clay e colaboradores, verificaram que as células com alta atividade de ALDH (ALDH^{high}) foram capazes de gerar 24 tumores, após a implantação em 45 animais, enquanto as células ALDH^{low}, conseguiram originar tumores em apenas 3 de 37 implantações (88). Na mesma época, um trabalho publicado por Krishnamurthy e colaboradores, indicou que as células isoladas pela alta atividade de ALDH e expressão de CD44 (ALDH^{high}/CD44⁺), apresentavam, além do alto potencial tumorigênico, a habilidade de se autorrenovarem, dando origem à outras CTTs idênticas, característica essa, que foi demonstrada pelo ensaio de formação de esferas em placas de baixa adesão (89). As ALDHs fazem parte de uma família de enzimas, responsável pela oxidação dos aldeídos em ácidos carboxílicos. Algumas isoformas citoplasmáticas específicas, participam da produção do ácido retinóico, a partir da oxidação do retinal, função essa, que tem sido associada às características tronco, uma vez que, a difusão do ácido retinóico para o núcleo, pode ativar a

transcrição de genes relacionados à diferenciação, apoptose e parada do ciclo celular (90).

Apesar da atividade ALDH já ter sido apontada como marcador universal de CTTs (90), a heterogeneidade celular encontrada em tumores sólidos, faz com que uma combinação entre marcadores extracelulares e/ou intracelulares, seja necessária. Assim, marcadores intracelulares como OCT-4, NANOG e BMI-1 também têm sido bastante utilizados para a identificação das CTTs em CECP (91,92).

As proteínas NANOG e OCT-4 atuam como fatores de transcrição e são de fundamental importância na embriogênese e na manutenção da homeostase das células-tronco embrionárias (93). Essas células compartilham algumas características com as CTTs, relacionadas à preservação do seu estado tronco, de forma que, NANOG e OCT-4 também participam da regulação dos processos de autorrenovação e manutenção da pluripotência celular nas CTTs (93). Porém, diferente do que ocorre nas células-tronco normais, vários trabalhos já demonstraram a superexpressão desses fatores de transcrição em diversos tipos de câncer, incluindo o carcinoma epidermoide oral; e essa expressão aberrante, já foi associada à tumorigênese, progressão tumoral, invasão e metástase (94,95). Além disso, a superexpressão desses marcadores (NANOG e OCT-4) tem sido associada a um pior prognóstico (96,97) e a resistência à quimioterapia (96).

Já o BMI-1, é uma proteína do grupo *polycomb*, codificada pelo gene *BMI-1*, que atua como repressor de transcrição, através da remodelação das cromatinas e modificação das histonas, podendo levar à parada do ciclo celular (98). BMI-1 também participa da regulação de processos celulares como senescência, apoptose, transição epitélio-mesenquimal (TEM) e manutenção da autorrenovação, tanto nas células-tronco adultas e embrionárias, como nas CTTs (99). Além disso, evidências acumuladas, destacando a superexpressão precoce do BMI-1 na carcinogênese oral, tem sugerido a sua participação na progressão do câncer, através da participação nas principais funções celulares oncogênicas (proliferação, apoptose, senescência e motilidade) (100).

A participação deste marcador no câncer também foi constatada, através da superexpressão de BMI-1 em diversos tumores sólidos, incluindo carcinomas epidermoides orais (101–103), carcinomas de glândulas salivares (14,104), além de

lesões orais potencialmente malignas (102,103). Em um estudo, realizado em carcinomas adenoides císticos, foi encontrada uma associação entre a superexpressão de BMI-1 e marcadores relacionados a TEM em uma grande série de casos, e esses resultados foram significativamente associados a metástases a distância (104). Em carcinomas epidermóides orais, por exemplo, He et al. (2015) encontraram uma associação entre a expressão de BMI-1 e metástases linfonodais, um indicador de pior prognóstico (102). Entretanto, no estudo realizado por Tamatani et al. (2018), a superexpressão do BMI-1 foi considerada como indicador de melhor prognóstico, em virtude da associação encontrada com sobrevivência livre de doença. Da mesma maneira, a falta de expressão do deste marcador foi associada com metástases a distância (105).

2.3 CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS (CTTs) NO CARCINOMA MUCOEPIDERMÓIDE DE GLÂNDULA SALIVAR (CME)

Com relação ao CME, as primeiras células com potencial tronco, foram identificadas por Zhang et al. (2013) (16). Neste trabalho, os autores demonstraram que as células isoladas através da sua capacidade de crescer em condições livre de soro e aderência (oroesferas), apresentavam alta expressão de CD44 e OCT-4 e baixa expressão de CD24, além de serem altamente clonogênicas e tumorigênicas. Entretanto, a população isolada através da eliminação do corante Hoechst 3334 (população lateral – SP), por meio de transportadores de membranas da família ABC, não se diferenciou estatisticamente da população parental, em relação à expressão dos marcadores ABCG2, OCT-4, CD44 e CD24, apesar da sua alta capacidade clonogênica, sugerindo a existência de uma população tronco distinta (16).

Posteriormente, Adams et al. (2015) conseguiram demonstrar, em três linhagens de CME distintas, que as células identificadas pelo fenótipo $ALDH^{high}/CD44^{high}$, apresentavam alta capacidade tumorigênica e de formação de oroesferas, quando comparadas com as células $ALDH^{low}/CD44^{low}$ (106). No mesmo

estudo, os autores verificaram que a população CD44/CD24 não apresentou potencial tronco, enquanto as populações isoladas através da dupla marcação de CD10/CD24 e CD10/CD44, não apresentaram potencial tumorigênico, apesar de terem formado oosferas (106), reforçando a ideia da existência de populações celulares com diferentes potenciais “tronco” em linhagens de CME.

Mais recentemente, outro grupo de pesquisa demonstrou uma desregulação na expressão de alguns marcadores de CTTs (CD44, BMI-1, OCT-4 e NANOG) em casos de CME, quando comparado à expressão em glândulas salivares não neoplásicas (14). Foi observado ainda, uma relação entre a expressão das proteínas NANOG e OCT-4 e as áreas de invasão perineural. Além disso, a expressão de CD44 e BMI-1 foi observada intensamente em regiões de frente de invasão enquanto a expressão de OCT-4 foi também associada a características histopatológicas de CME mais agressivos (14).

Nesse sentido, outros estudos têm apontado que, em geral, a recorrência tumoral após quimioterapia e/ou radioterapia, gera tumores mais agressivos e mais resistentes ao tratamento, fenômenos frequentemente associados à sobrevivência e ao aumento da população de CTTs (107). De fato, diversos trabalhos já demonstraram o enriquecimento da população de CTTs, após a quimioterapia, em diversos tipos de câncer, incluindo o CME (108,109). Zhang et al. (2014), verificaram um aumento da expressão gênica e proteica de marcadores de CTTs (CD44 e OCT-4), em linhagem de CME (110). Além disso, foi também observado que as células resistentes ao tratamento (8%), formaram um maior número de esferas e colônias, apresentaram uma maior taxa de proliferação e um aumento da população SP (110). Posteriormente, Guimarães et al. (2016), não só comprovaram a resistência das CTTs ao tratamento com Cisplatina, como também demonstraram o acúmulo das CTTs em linhagens tumorais derivadas de CME, tratadas com esse quimioterápico (15).

2.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DAS CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS (CTTs)

A fim de explicar a sobrevivência e o aumento da população tronco após os tratamentos com radioterapia e/ou quimioterapia, pesquisadores tem apontado algumas propriedades de resistência, inerentes às CTTs, como responsáveis por esse processo (111). A quiescência, seria uma dessas propriedades, já que as CTTs – que ocupam o topo da hierarquia tumoral – apresentam uma progressão lenta do ciclo celular e permanecem a maior parte do tempo em estado de dormência (10). Dessa forma, os quimioterápicos, que atuam principalmente em células com alta taxa de proliferação, não são eficazes contra as CTTs (87). Além disso, estudos recentes têm mostrado que células quiescentes também são capazes de “monitorar” ativamente os danos ao DNA, além de repará-los, através da sua capacidade de retornar rapidamente ao ciclo celular em casos de agressão (10).

No entanto, além dos mecanismos de reparo de DNA, expressos pelas células quiescentes, existem ainda, os mecanismos ativos de respostas contra danos de ao DNA, induzidos pela quimioterapia e/ou radioterapia. O reparo por excisão de bases, por exemplo, se apresenta como uma via, na qual a endonucleaseapurínica/apirimidínica 1 (APE1), juntamente com a proteína 1 de complementação cruzada de reparo de raios-x (XRCC1), conseguem identificar e preencher regiões danificada no DNA (112). A via do reparo por excisão de nucleotídeos, por sua vez, pode ser acionada em resposta a lesões por radiação UV, toxinas ambientais, além de lesões induzidas por agentes quimioterápicos, como os medicamentos à base de platina. Nesse mecanismo de reparo, a ativação do heterodímero formado pelas nucleases proteína do grupo 1 de complementação cruzada do reparo por excisão (ERCC1), juntamente com xeroderma pigmentoso tipo F (XFP), favorece a excisão e a remoção dos nucleotídeos danificados, fornecendo uma fita simples, não danificada, para ser utilizada como molde pela DNA polimerase (113,114).

As CTTs apresentam ainda mecanismos de efluxo, responsáveis pela desintoxicação das células após a quimioterapia, na tentativa de se evitar o dano ao DNA. Essa capacidade é conferida pela superexpressão de múltiplos transportadores

de resistência às drogas. Dentre eles, os da família ABC (*ATP-Binding Cassette*) são os principais representantes, e além do efluxo de drogas, a atividade desses transportadores também tem sido relacionada ao efluxo de moléculas que podem afetar o estado tronco das CTTs, ou mesmo, levá-las à apoptose (115–117).

Além dos mecanismos citados anteriormente, a adaptação hierárquica também representa um importante mecanismo de resistência das CTTs, já que a injúria promovida pelo tratamento pode alterar o tipo de divisão celular, favorecendo a autorrenovação das CTTs, que passa a ser predominante como mecanismo de repovoamento tumoral (10,74). Assim, quando submetidas a situações de estresse, tanto as células progenitoras, quanto as células diferenciadas, podem se “desdiferenciar” e adquirir características tronco, em virtude da sua plasticidade fenotípica, contribuindo para repovoamento do tumor (74), que por sua vez, pode levar a recidivas e metástases. Diante desse cenário, fica claro que os desafios para a erradicação completa da população de CTTs são enormes, o que evidencia, ainda mais, a necessidade de estudos visando fármacos, que tenham como alvos terapêuticos esta população de células tumorais, e que sejam capazes de driblar os seus intrincados mecanismos de resistência.

2.5 HISTONAS DEACETILASES (HDACs)

O material genético dos mamíferos está alocado em um complexo nucleoproteico conhecido como cromatina; estrutura relacionada com a transcrição gênica e formada por subunidades estruturais básicas de repetição, chamadas de nucleossomos. Os nucleossomos, por sua vez, são formados por aproximadamente 147 pares de bases nitrogenadas de DNA, que se enovelam em torno de 4 pares de proteínas histonas (H2A, H2B, H3 e H4) e são estabilizadas através de histonas ligantes (H1) (118). Essas proteínas são passíveis de sofrer modificações pós-traducionais, podendo alterar a expressão de genes, sem, contudo, modificar as sequências de DNA (119). No processo de acetilação, por exemplo, as enzimas

histonas acetiltransferases (HATs) acetilam resíduos específicos de lisinas, presentes nas extremidades das histonas, mudando a estrutura básica dos nucleossomos. Essa modificação estrutural, promove o relaxamento da cromatina, para facilitar o acesso dos fatores transcricionais ao DNA e, conseqüentemente, ativar a expressão de genes alvo. Além disso, a acetilação dos resíduos de lisina na porção N-terminal, também ocorre em proteínas citoplasmáticas e fatores de transcrição, alterando a expressão de genes que regulam os processos celulares (120).

Em contrapartida, a ativação das enzimas histonas deacetilases (HDACs), cria uma cromatina mais condensada, reprimindo o processo de transcrição (121). Logo, o balanço funcional existente entre as atividades das enzimas HATs e HDACs, é imprescindível para manter a expressão normal de genes envolvidos em diversas atividades celulares (reparo de danos do DNA, controle do ciclo celular, diferenciação, apoptose, inflamação e metabolismo), em resposta ao ambiente. No entanto, o desequilíbrio entre essas funções promove a desregulação do sinal transcricional, alterando a expressão de genes relacionados com a tumorigênese (18,122).

As HDACs fazem parte de uma superfamília de proteínas, composta por 18 isoformas de enzimas, que atuam de maneira oposta às HATs. Elas podem ser divididas em 4 classes, que se agrupam em relação à sua localização nas células (núcleo e/ou citoplasma), dependência do íon zinco para sua ativação (Zn^{2+}) e homologia com as primeiras HDACs identificadas em leveduras (Hda1 e Rpd3). Dentre as enzimas dependentes de ZN^{2+} , conhecida como família clássica, as HDACs de classe I (HDACs 1, 2, 3 e 8) apresentam similaridades com a proteína Rpd3, enquanto as de classe II (a: HDACs 4, 5, 7 e 9; b: HDACs 6 e 10) se assemelham à proteína Hda1. Já as HDACs de classe IV (HDAC 11), compartilham sequências de aminoácidos parecidas, tanto com Hda1, quanto com Rpd3. As proteínas Hda1 e Rpd3, foram identificadas e descritas pela primeira vez em leveduras e participam da regulação transcricional de genes envolvidos com metabólitos de carbono e carboidratos, além da progressão do ciclo celular (123). Além disso, sabe-se que dentre todas as HDACs dependentes de Zn^{2+} , apenas as HDACs 1, 2, 3 e 6 são, de fato, capazes de desacetilar os substratos de lisina das histonas. As outras HDACs, participam do reconhecimento dos substratos de lisina acetilados e são capazes de desacetilar diferentes substratos (124).

As enzimas de classe III (SIRT 1-7), por sua vez, são conhecidas como sirtuínas e também apresentam a capacidade de desacetilar as histonas, contudo, requerem a presença do co-fator NAD⁺ (dinucleótido de nicotinamida e adenina) para a sua ativação. Ao contrário das outras HDACs, as sirtuínas se assemelham à proteína Sir2 – homóloga das HDACs encontrada em leveduras – que por sua vez, regula a expressão de genes relacionados à síntese de aminoácidos e vias metabólicas, através do silenciamento da transcrição (123). As sirtuínas (SIRT) podem estar localizadas no núcleo, citoplasma ou mitocôndria e são conhecidas por regular processos metabólicos, resposta ao estresse, envelhecimento e sobrevivência nas células. As enzimas da classe III apresentam características estruturais e enzimáticas que as tornam particularmente diferentes em relação às outras classes, de modo que os compostos capazes de inibir as HDACs dependentes de Zn²⁺, não conseguem atuar sobre a família das sirtuínas (120).

Essas enzimas são multifuncionais, podendo desacetilar diferentes resíduos de lisinas nas caudas das histonas, além de exercerem atividade catalítica sobre proteínas não-histonas, que atuam como fatores de transcrição. Apesar de expressas em tecidos adultos, essas proteínas exercem um papel fundamental no desenvolvimento embriogênico, participando desde o desenvolvimento neuronal, cardíaco, pulmonar e ósseo, até a diferenciação e sobrevivência dos neurônios adultos e contratilidade das células musculares (123).

As HDACs de classe IIa, por outro lado, conseguem se deslocar entre núcleo e citoplasma, e são expressas seletivamente em tecidos específicos. Essas proteínas (HDACs 4, 5, 7 e 9) apresentam atividade catalítica muito baixa, quando comparado às HDACs de classe I, podendo desacetilar a caudas das histonas, sem, contudo, promover a repressão transcricional (123). Apesar de não exercerem uma atividade fisiológica pela via canônica, as enzimas da classe IIa conseguem promover a repressão transcricional, através dos fatores de transcrição da família MEF2. Também já foi demonstrado que a HDAC4 consegue modular a atividade de fatores de transcrição como RUNX2, além de diversas proteínas envolvidas nas vias metabólicas dos músculos esqueléticos (123). Em vista disso, a participação dessas HDACs tem sido investigada e associada ao processo de desenvolvimento dos ossos, músculos, células imunes, cérebro e sistema vascular (123).

Diferentemente das outras classes, as HDACs de classe IIb são compostas por apenas duas enzimas (HDAC 6 e 10), com localização citoplasmática, que compartilham funções entre si. Elas apresentam atividade catalítica voltada, principalmente, às proteínas citosólicas não-histonas, de forma que, a desacetilação desses substratos participa da regulação dinâmica do citoesqueleto e estabilização dos microtúbulos, além de promover a sobrevivência celular pela modulação da autofagia (123). A classe IV, por sua vez, é representada pela HDAC11, que está localizada no núcleo das células. Essa enzima foi a última HDAC a ser descoberta, e apesar de ser globalmente expressa em todos os tecidos do corpo e participar da repressão das citocinas anti-inflamatórias, sua função biológica ainda precisa ser melhor elucidada (123).

Evidências acumuladas na literatura, têm associado o desenvolvimento do câncer a condições variáveis de hipoacetilação das histonas (125), como resultado do recrutamento aberrante das HDACs, o que torna essas proteínas, um importante alvo terapêutico. Além disso, as diferenças exibidas pelos iHDACs em relação à especificidade para as diferentes classes de HDACs, também são bastante relevantes, já que estas enzimas são variavelmente expressas entre os tipos de câncer (123). Portanto, um mesmo iHDAC pode apresentar eficácia diferencial em diferentes tipos de câncer (123,126).

Alguns trabalhos já relataram, tanto uma diminuição na acetilação de histonas específicas, quanto a superexpressão de algumas HDACs em diversos tipos de câncer, incluindo câncer colorretal (127), câncer de próstata (128), câncer gástrico (129), câncer de ovário (130) e neuroblastoma (131). Entretanto, alterações no padrão de expressão das HDACs em neoplasias malignas de glândula salivar ainda permanecem desconhecidas, já que os fármacos inibidores de histonas deacetilases (iHDACs) vem sendo testados sem avaliação prévia dos tumores e sem conhecimento do padrão de expressão dessas HDACs em glândula salivar. Um dos únicos trabalhos nesse sentido, avaliou, por imunohistoquímica, o nível de acetilação da histona H3 em 84 tumores de glândula salivar, e demonstrou uma hipoacetilação nos tumores malignos, em comparação com os tumores benignos (132). Além disso, uma correlação inversa entre o nível de acetilação e a expressão de Ki67 também foi observada, indicando o papel da acetilação das histonas na proliferação celular em tumores de glândula salivar (132).

2.6 FÁRMACOS INIBIDORES DE HISTONAS DEACETILASES (iHDACs)

Nesse cenário, os fármacos iHDACs surgiram como promissores agentes anticâncer, uma vez que, induzem a rápida hiperacetilação das histonas e a remodelação da cromatina, promovendo a ativação de vias pró-apoptóticas, autofagia, indução da diferenciação celular, aumento da atividade antiangiogênica, além de parada do ciclo celular (20,133–135). Além disso, uma vez que as HDACs apresentam um efeito pleotrópico – expressão de múltiplas características por um único gene – acredita-se que os iHDACs atuem, também, sobre alvos não transcripcionais, podendo agir, inclusive, na replicação e no reparo do dano ao DNA (136). Desse modo, esses fármacos têm ganhado bastante destaque nas pesquisas científicas, por apresentarem uma citotoxicidade específica para as células cancerígenas, em detrimento das células e tecidos normais (136), além de atuarem sobre as CTTs, representando uma importante estratégia para a erradicação desta população celular (20).

Contudo, os mecanismos pelos quais os iHDACs atuam sobre as CTTs são complexos e ainda não foram completamente elucidados. Embora evidências acumuladas na literatura sugiram, por exemplo, que esses fármacos atuem, principalmente, induzindo a diferenciação celular, como forma de aumentar a sensibilidade à quimioterapia e radioterapia (137). Além disso, acredita-se que os iHDACs também sejam capazes de inibir importantes vias relacionadas à manutenção da homeostase celular, através da desacetilação de proteínas não-histonas, conforme mencionado anteriormente (137).

Atualmente, existe um grande número de moléculas pertencentes a classe dos iHDACs sendo avaliadas em estudos clínicos, porém, até o momento, apenas quatro iHDACs foram aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA), para o tratamento de câncer: Vorinostat, Belinostat, Panobinostat e Romidepsin, todos utilizados no tratamento de cânceres hematológicos (25). Os iHDACs apresentam algumas diferenças entre si e, portanto, podem ser classificados quanto às suas especificidades (inibidores de HDACs específicas ou pan-inibidores de HDACs) e estruturas químicas (ácidos hidroxâmicos, ácidos graxos de cadeia curta, benzamidas

e peptídeos cíclicos). Dentre os iHDACs aprovados pela FDA, três deles (Vorinostat, Belinostat e Panobinostat) pertencem ao grupo dos ácidos hidroxâmicos, sendo capazes de quelar o íon Zn^{2+} no sítio ativo das HDACs alvo. Esses compostos também são considerados como pan-inibidores, por atuarem nas HDACs de Classe I, II e IV, e foram pensados para promover uma hiperacetilação global da cromatina, revertendo a repressão transcricional (123). O Romidepsin, por sua vez, pertence ao grupo dos peptídeos cíclicos, caracterizado pela sua alta especificidade em relação às HDACs alvo, e atua na inibição das HDACs de classe I (123).

2.6.1 FÁRMACOS INIBIDORES DE HISTONAS DEACETILASES (iHDACs) NO TRATAMENTO DE CARCINOMA MUCOEPIDERMÓIDE DE GLÂNDULA SALIVAR (CME)

Ainda hoje, grande parte dos esquemas terapêuticos aplicados no tratamento do CME provem dos protocolos utilizados em carcinomas epidermóides orais (138). Contudo, conforme mencionado anteriormente, os tratamentos atualmente disponíveis para o CME, muitas vezes, não impedem as recidivas e metástases, principalmente, em casos diagnosticados tardiamente (69). Além disso, existem diferenças genéticas e morfológicas importantes entre o CME e os carcinomas epidermóides orais, sobretudo, levando-se em conta a diversidade citomorfológica presente no CME (38), o que ressalta a necessidade de novos tratamentos, que contemplem as suas especificidades. Desse modo, a busca por fármacos mais eficazes, em especial, contra as CTTs presentes no CME, tem sido bastante explorada em estudos recentes (23). Nesse contexto, os iHDACs vem sendo amplamente investigados nos carcinomas de cabeça e pescoço (139), já que a acetilação das histonas foi capaz de reverter a resistência tumoral à quimioterapia nesses tumores (109). Contudo, estudos avaliando a ação dessa promissora classe de inibidores frente ao CME, ainda são relativamente escassos.

Em 2015, Ahn et al. (2015) realizaram um dos primeiros estudos envolvendo iHDACs e CME (22). Esses autores avaliaram o efeito antitumoral de Apicidin

(iHDACs), em linhagens celulares de CME, e verificaram que essa droga foi capaz de inibir, significativamente, a proliferação celular e induzir a apoptose e autofagia. Também foi verificada uma redução da atividade das HDACs e o aumento nos níveis de expressão das histonas acetilases H3 e H4 (22). Na sequência, o mesmo grupo de pesquisa investigou sobre quais isoformas de HDACs, o Apicidin atuaria no CME (21). Nesse estudo, foi observado que a HDAC7 teve sua expressão reduzida, após o tratamento com Apicidin, e que o silenciamento desta enzima promoveu uma diminuição da proliferação celular, além de induzir apoptose e autofagia nas células, via inativação da sinalização de ERK (21).

Posteriormente, em um trabalho conduzido por Guimarães et al. (2016), foi mostrado que o tratamento com as doses de IC_{50} da Cisplatina reduziu, significativamente, o número de esferas formadas nas linhagens UM-HMC3A, UM-HMC3B e UM-HMC5, sem, contudo, reduzir a porcentagem de células com alta atividade de ALDH em todas as linhagens (15). Além disso, também foi observado um grande aumento nas células ALDH⁺ na linhagem UM-HMC5, após o tratamento com a Cisplatina. Por outro lado, o tratamento com SAHA (pan inibidor de HDACs) promoveu uma inibição na capacidade de formar esferas em condições livre de aderência, nas 3 linhagens celulares estudadas. Embora, a atividade enzimática de ALDH tenha sido reduzida, significativamente, após o tratamento com Vorinostat (SAHA), apenas em células ALDH⁺ presentes nas linhagens UM-HMC3B e UM-UMC5. Interessantemente, as CTTs se mostraram mais sensíveis ao tratamento com SAHA, do que as células cultivadas em monocamada aderente, já que as doses de concentração inibitória média (IC_{50}) definidas para as esferas, foram significativamente menores do que as obtidas em monocamada aderente (15). Foram avaliados ainda, os efeitos da associação entre SAHA e a Cisplatina. Nessas condições, o tratamento prévio com SAHA, foi capaz de sensibilizar as células das linhagens de CME à Cisplatina, uma vez que houve redução tanto no número de esferas, quanto nas células com alta atividade de ALDH⁺ após o tratamento associado, em todas as linhagens avaliadas, diferentemente do que foi observado nos tratamentos isolados (15).

Outro estudo recente, avaliou o efeito da associação entre um iHDAC (Vorinostat) e um fármaco inibidor do fator nuclear kappa B (NF- κ B, do inglês "*Nuclear factor kappa B*") (Emetine) sobre linhagens de CME e demonstrou uma seletividade

do SAHA contra as CTTs, enquanto o Emetine reduziu as populações tumorais não-tronco (23). Quando combinados, esses fármacos foram capazes de atuar sobre ambas as populações tumorais, reduzindo tanto o número de esferas, quanto de colônias (23). Assim, sabendo que a radiorresistência no CME é NF-kB-dependente, e que o tratamento prévio com Emetine conseguiu sensibilizar as populações tumorais não-tronco e de CTTs à radioterapia (17), é possível que a associação entre iHDACs e fármacos com mecanismos de ação distintos, tais como Emetine, possam aumentar a eficiência do tratamento radioterápico, por atuar na resistência do CME à radioterapia.

Mais recentemente, Parag-Sharma et al. (2021) avaliaram o efeito da terapia combinada entre um inibidor de EGFR (Erlotinib) e Vorinostat, sobre linhagens celulares derivadas de CME (UM-HMC1, 3A e 3B) (5). Os autores confirmaram a tolerância do CME à monoterapia anti-EGFR, uma vez que, as células tratadas com Erlotinib retomaram rapidamente a sua taxa de proliferação após a retirada da droga, além de não ter havido efeito citotóxico importante nas linhagens tumorais avaliadas. Eles verificaram ainda, que embora o tratamento com SAHA tenha elevado os níveis de acetilação das histonas, de maneira dose-dependente, a proliferação celular, o crescimento das esferas e a capacidade de formar colônias foram, apenas minimamente afetadas. Além disso, em baixas doses, o tratamento com SAHA, promoveu crescimento dos esferoides e um aumento expressivo no número de colônias após a retirada da droga, em todas as doses testadas. Por outro lado, o tratamento concomitante com Erlotinib e SAHA mostrou um efeito sinérgico contra as células de CME, potencializando o efeito citotóxico de ambas as drogas, quando comparado a monoterapia (5). Em linha com isso, nesse mesmo estudo, a utilização de uma molécula bifuncional (CUDC-101), com capacidade de inibir EGFR e HDACs, também promoveu um efeito inibitório sobre a formação de esferas, além de exercer uma atividade citotóxica robusta e permanente sobre as células de CME (5).

Desse modo, os benefícios da utilização de uma terapia combinada, têm sido refletidos na busca por moléculas, que possam ser, eventualmente, combinadas entre si, visando atingir múltiplos alvos envolvidos na progressão do câncer e na resistência à terapia (23). Entretanto, o processo de descobrimento de novas drogas está longe de ser uma prática trivial, podendo demandar entre 10-17 anos, e demandar investimentos de mais de 2 bilhões de dólares, para cada fórmula desenvolvida. Além

disso, estima-se que apenas 5% dos medicamentos que entram nos ensaios clínicos de fase I, conseguem ser realmente aprovados para uso terapêutico (140).

Diante desse cenário, o reposicionamento de fármacos representa uma estratégia valiosa, que permite o uso de fármacos para outras finalidades, além daquelas aprovadas no escopo original do medicamento (141). Uma das principais vantagens desse tipo de estudo, é o ganho de tempo e, conseqüentemente, a economia financeira de aproximadamente 85%. Assim, essa abordagem tem se mostrado uma alternativa mais rápida e igualmente segura para o combate ao câncer, já que o conhecimento prévio dos perfis de farmacocinética, farmacodinâmica e segurança das drogas reposicionadas, em geral, favorecem a sua entrada, diretamente, em ensaios clínicos de fase II e III (140,141).

Seguindo essa linha de raciocínio, os iHDACs tem se destacado no universo dos fármacos reposicionados (25), posto que alterações nos níveis de acetilação das histonas têm sido identificadas em diversos tipos de câncer, incluindo tumores sólidos (142). Assim, embora ainda haja um certo desconhecimento acerca do padrão de expressão das isoformas de HDACs, em determinados tipos de câncer, o fato de que os iHDACs apresentam seletividade direcionada à diferentes tipos HDACs, tem feito com que vários fármacos sejam testados em diferentes tipos de câncer (25).

Panobinostat (LBH589, Farydak®) é um pan-inibidor de HDACs, com alta atividade contra as classes I, II e IV, mesmo em baixas concentrações nanomolares (143). Esse análogo do ácido hidroxâmico foi aprovado pela FDA em 2015, para ser utilizado no tratamento do mieloma múltiplo, em combinação com o Bortezomib e Dexametasona (143) e conta uma taxa de resposta objetiva de aproximadamente 27% (144), embora já tenha sido associado a efeitos adversos graves e potencialmente fatais, como cardiotoxicidade (145). Além disso, apesar de apresentar melhores resultados em neoplasias hematológicas, o Panobinostat tem sido investigado em mais de 50 estudos clínicos, tanto como monoterapia, quanto em combinação com outros compostos, para o tratamento de alguns tumores sólidos, como CECP (146), carcinomas de tireóide, câncer de mama, colorretal, próstata e câncer de pulmão de células não pequenas (142). No câncer oral, um estudo *in vitro*, mostrou que o Panobinostat foi capaz de inibir o crescimento e induzir a apoptose das células neoplásicas, através da diminuição da expressão do fator de transcrição Sp1 e da

indução da clivagem da caspase-3, uma das proteínas envolvidas na apoptose celular (147).

Outro iHDAC de grande relevância é o Romidepsin (FK228, FR901228, depsipeptide, ou Istodax®), um depsipeptídeo bicíclico aprovado pela FDA em 2009 para o tratamento de linfoma cutâneo de células T (148), e em 2011 para o linfoma periférico de células T (149). Esse fármaco é um metabólito secundário da bactéria *Chromobacterium violaceum*, transformado intracelularmente em uma molécula ativa pela Glutathione redutase, com alta especificidade pelas HDACs de classe I (150). Romidepsin apresenta uma taxa de resposta objetiva de 34% no linfoma cutâneo de células T e de 25% no linfoma periférico de células T, mas também tem sido associado a efeitos adversos, incluindo náusea, vômito, mielotoxicidade, astenia e toxicidade cardíaca (150). Assim como o Panobinostat, os efeitos de Romidepsin também têm sido explorados no tratamento de outros tipos de câncer, como leucemia, melanoma, câncer de bexiga, colorretal, mama, ovário e próstata (142). Em CECP, um estudo clínico de fase II avaliou o efeito de Romidepsin sobre tumores recorrentes e metastáticos, mas não observou resposta objetiva ao tratamento (151).

Não obstante, apesar dos diversos estudos clínicos avaliando o tratamento com Panobinostat e Romidepsin em vários tipos de tumores sólidos (25,123), os efeitos anti-tumorais desses fármacos sobre o CME ainda não foram investigados. Além disso, pouco se sabe sobre o padrão de expressão das HDACs neste tumor, tão pouco, a sua contribuição para a carcinogênese e progressão tumoral, devido à escassez de estudos relacionados a essa temática. Nesse sentido, testes realizados por nosso grupo de pesquisa, avaliaram a citotoxicidade de 133 fármacos (já aprovados pela FDA, para o tratamento de diversas doenças humanas) em linhagens pré-estabelecidas de CME de glândula salivar. Após o *screening* inicial, foram selecionados dois iHDACs – Panobinostat e Romidepsin – os quais foram avaliados no presente estudo, quanto aos seus efeitos sobre a expressão gênica e propriedades relacionadas ao fenótipo tronco e metástase tumoral, em duas linhagens celulares de CME. Este estudo está, portanto, vinculado a um projeto de demanda universal CNPq No. 407622/2016-0, e é continuação do projeto aprovado pela Plataforma Brasil (CAAE nº 60778216.0.0000.0075), que tinha como objetivo estudar o reposicionamento de fármacos para o tratamento do CME.

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo se propôs a avaliar, *in vitro*, o efeito dos tratamentos com fármacos iHDACs, como terapia única e em associação com a Cisplatina, sobre o fenótipo tronco-tumoral e a expressão de genes relacionados às CTTs, em linhagens de CME de glândula salivar menor.

Mais especificamente, objetivou-se:

- Verificar se os tratamentos com os iHDACs apresentam efeitos antitumorais sobre linhagens derivadas de CME;
- Analisar o efeito dos tratamentos com os iHDACs, sobre importantes propriedades tronco-tumorais, tais como, a capacidade clonogênica, de autorrenovação, migração e invasão, em células derivadas de CME;
- Investigar se os fármacos iHDACs atuam sobre a população de CTTs, caracterizada pela alta atividade de ALDH e pela expressão do marcador CD44 (ALDH⁺/CD44⁺);
- Avaliar se os iHDACs administrados em associação com a Cisplatina, são capazes de sensibilizar as células derivadas de CME, reduzindo a resistência à Cisplatina;
- Analisar a expressão de genes relacionados às CTTs, após 48h de tratamento com os iHDACs, isoladamente e em associação com a Cisplatina;

4 MATERIAL E MÉTODOS

As metodologias utilizadas neste estudo, e descritas a seguir, envolveram a utilização de células derivadas de CME humanas e, portanto, receberam a apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), parecer No. 2.798.905, conforme anexo A.

4.1 CULTIVO CELULAR

Nesse estudo foram utilizadas duas linhagens celulares derivadas de CME de glândula salivar menor (UM-HMC-1, de tumor primário e UM-HMC-3A, de tumor recorrente), estabelecidas e, gentilmente, cedidas pelo Prof. Jacques Eduardo Nör, da Universidade de Michigan (maiores informações disponíveis no Quadro 4.1). Ambas as linhagens foram cultivadas em meio *Eagle* modificado por Dulbecco (DMEM) (Cat. No. 11995073, Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), suplementado com 1% L-glutamina (GlutaMAX™, Cat. No. 3505006, Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), 1% antibiótico/antimicótico (Cat. No. 15240112, Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), 10% Soro Fetal Bovino (SFB) (Cat. No. 10437028, Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), 20 ng/mL de fator de crescimento epitelial humano (EGF, Cat. No. E9644, Sigma-Aldrich Corporation, San Luis, MO, EUA), 5 µg/mL de insulina recombinante humana (Cat. No. I9278, Sigma-Aldrich Corporation, San Luis, MO, EUA) e 400 ng/mL de hidrocortisona (Cat. No. H6909, Sigma-Aldrich Corporation, San Luis, MO, EUA). Todos os experimentos foram realizados dentro de um intervalo máximo de 10 passagens, tanto para a linhagem UM-HMC1 (P64-P74), quanto para a UM-HMC3A (P74-P84), e ambas as linhagens testaram negativo para *Mycoplasma* spp., no ensaio realizado por reação em cadeia da polimerase – PCR, seguindo as instruções do fabricante (Venor™ GeM Mycoplasma Detection Kit, PCR-based, Cat. No. MP0025, Sigma-Aldrich Corporation, San Luis, MO, EUA). Para o cultivo, as células foram mantidas em incubadora a 37 °C, com atmosfera úmida (95% de umidade), contendo 5% de CO₂. O meio de cultivo foi trocado a cada 2-3 dias, levando-se em consideração

o metabolismo celular, e alíquotas de cada linhagem foram congeladas ou descongeladas conforme a necessidade. As passagens foram realizadas utilizando Tripsina (TrypLE™ Express, Cat. No. 12605028, Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), subcultivando-se 1×10^6 células, ainda em subconfluência, em frascos de cultivo 75 cm² (Cat. No. 430641U, Corning® Incorporated, Corning, NY, EUA). A contagem das células foi realizada, pelo teste de exclusão do Azul de Trypan (Trypan Blue Solution, 0.4% Cat. No. 15250061, Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) em câmara de Neubauer (Neubauer Improved Bright-Line, New Optics, Yangju-si, Gyeonggi-do, Coréia do Sul). A visualização das células foi realizada em um microscópio invertido com contraste de fase (Axio Vert®, Carl Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, Alemanha).

Quadro 4.1 - Características dos pacientes e dos tumores, a partir dos quais as linhagens celulares derivadas de CME, utilizadas neste estudo, foram originadas.

Linhagem celular	Características do paciente	Localização	TNM	Estágio	Grau de diferenciação	Invasão perineural
UM-HMC1	Sexo Masculino, 76 anos de idade, Melanoderma	Glândula salivar menor da mucosa jugal	T4N0M0	IVa	Intermediário	Ausente
UM-HMC3A	Sexo Feminino, 73 anos de idade, Leucoderma	Palato duro (recorrência local)	T4bN	IVb	Intermediário	Presente

Fonte: Adaptado de Warner *et al* (2013, p. 15) (12).

4.2 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Para a análise do perfil de proliferação celular das linhagens UM-HMC1 e UM-HMC3A, 5×10^3 células foram plaqueadas em placas de 96 poços (Cat. No. 3595, Corning® Incorporated, Corning, NY, EUA) e quantificadas após 24h, 48h, 72h e 96h, através do ensaio de Sulforodamina B (SRB). Nesse ensaio, o corante SRB se liga,

em condições ácidas, ao conteúdo proteico da célula de forma que, a quantidade de corante extraído das células, é diretamente proporcional à massa celular (152). Assim, após cada período avaliado, as células foram fixadas, através da incubação com 25 µL de ácido tricloroacético gelado (TCA) (Cat. No. T6399, Sigma-Aldrich Corporation, San Luis, MO, EUA), por 1h a 4 °C. Posteriormente, os poços foram lavados 5 vezes com 200 µL de água da torneira. Após a secagem completa, os poços foram corados com 100 µL de SRB (Cat. No. 230162, Sigma-Aldrich Corporation, San Luis, MO, EUA) a 0,4% (m/v) em ácido acético (Ácido acético glacial P.A – ACS, Cat. No. 1242, Dinâmica Química Contemporânea, Indaiatuba, SP, Brasil), durante 10 minutos, em temperatura ambiente (TA). Em seguida, a SRB foi removida dos poços, através da lavagem com 200 µL de ácido acético 1% (vol/vol), em água destilada, por 4 vezes. Após a secagem completa dos poços, o corante (SRB) foi solubilizado através da adição de 100 µL da solução de Tris base a 10 mM, com pH 10.5 (Cat. No. 154563, Sigma-Aldrich Corporation, San Luis, MO, EUA) sob agitação, por 1h em TA. A leitura da absorbância foi realizada em um leitor de microplacas a 515 nm (Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader, BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA). A análise dos dados foi efetuada, a partir da transformação dos valores de absorbância em porcentagem, comparando-se os períodos de 48h, 72h e 96h, com o período de 24h. Esse ensaio foi conduzido em quintuplicata amostral de dois experimentos independentes.

4.3 ESCANEAMENTO/TRIAGEM DA BIBLIOTECA DE FÁRMACOS

Os quimioterápicos utilizados foram, inicialmente, selecionados através de um escaneamento conduzido com 133 quimioterápicos, aprovados (conjunto VIII placas número 4858 e 4859, NCI/NIH) e fornecidos pelo *Drug Synthesis and Chemistry Branch, Developmental Therapeutics Program, Division of Cancer Treatment and Diagnosis, National Cancer Institute (NCI/NIH)*. Esse *screening* inicial foi conduzido pela Dra. Lucyene Miguita Luiz, colaboradora deste trabalho.

Para o desenvolvimento da metodologia, primeiramente, os princípios ativos (liofilizados) nas placas, foram suspensos em 20 µL de *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO)

(Cat. No. D2650, Sigma-Aldrich Corporation, San Luis, MO, EUA), para uma concentração estoque de 10 mM. Em seguida, as células (UM-HMC1 e UM-HMC3) foram plaqueadas em placas de 96 poços, 5×10^3 células/poço, em triplicata para cada fármaco da placa. Após 24h, as células foram tratadas com 5 μ M de cada medicamento por 48h. Após este período, a citotoxicidade induzida pelos fármacos foi avaliada pela técnica de biorredução do composto de sal tetrazólio MTS (*Cell Titer 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay*, Cat. No. G3580, Promega, Madison, WI, EUA). Para isso, o meio de cultivo foi descartado, os poços foram lavados com 200 μ L de solução salina tamponada com fosfato (PBS 1x) (PBS 10X, pH 7.4, Cat. No. 70011044, Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e, em seguida, 10 μ L de MTS diluídos em 90 μ L de meio DMEM, e adicionados à cada poço (100 μ L/poço). A seguir, as placas foram incubadas a 37 °C, ao abrigo da luz, por 3h e, posteriormente, os valores de densidade óptica (DO) foram mensurados em um espectrofotômetro (ELX 800 Biotek Instruments Inc, Winooski, VT, EUA) a 490 nm. Os resultados de viabilidade celular foram calculados pela seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade celular após 48 horas de tratamento (\%)} = \frac{(\text{DO amostra} * 100\%)}{\text{Média DO controle}}$$

DO amostra: Valores de densidade óptica após 48 horas de tratamento

DO controle: Valores de densidade óptica dos poços controle (sem tratamento)

Após a etapa de triagem, foram selecionados dois fármacos (Romidepsin e Panoibinostat), que reduziram a viabilidade celular em $\geq 70\%$ nas linhagens UM-HMC1 e UM-HMC3A, os quais foram adquiridos (Quadro 4.2) em quantidades suficientes para a realização dos ensaios subsequentes. Inicialmente, os fármacos foram ressuspensos em DMSO, para se obter uma solução estoque de 10 mM e armazenados a -20 °C, até o momento do uso. Além de Romidepsin e Panobinostat, a Cisplatina (C-Platin 100 mg/mL, Blau Farmacêutica, Cotia, SP, Brasil), utilizada como quimioterápico de primeira linha no tratamento de pacientes com lesões avançadas de CME (153), também foi incluída no estudo em associação com os iHDACs. Essa combinação foi utilizada com o objetivo de sensibilizar as células e reduzir a resistência à Cisplatina nas linhagens celulares derivadas de CME.

Quadro 4.2 - Medicamentos selecionados após a triagem da biblioteca de fármacos

Nome do Fármaco	Registro CAS	Peso Molecular	Cat. No.	Empresa
Romidepsin	128517-07-7	540,7	A11920	AdooQ® ¹
Panobinostat	404950-80-7	349,4	NSC 761190	NCI/NIH ²

¹ AdooQ® BioScience, Irvine, CA, EUA

² National Cancer Institute (NCI), National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, EUA

Fonte: O autor.

4.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÉDIA INIBITÓRIA (IC₅₀)

O protocolo descrito a seguir, utilizado para a realização dos ensaios de dose-resposta, foi baseado na metodologia de escaneamento de fármacos adotada pelo NCI/NIH (https://dtp.cancer.gov/discovery_development/nci-60/methodology.htm). Para os ensaios, 5×10^3 células em 100 μ L de meio/poço, foram plaqueadas em placas de 96 poços. Após 24h, as células aderidas foram tratadas com 100 μ L da solução dos compostos, diluídos seriadamente (1:2) para diferentes concentrações (Quadro 4.3). Como controle negativo, utilizou-se células tratadas apenas com o meio de cultivo. Após 48h de tratamento, foi realizado o ensaio de SRB, para avaliar a citotoxicidade de cada fármaco, em suas respectivas concentrações (conforme metodologia descrita no item 4.11.2). Todos os fármacos foram testados em quintuplicata amostral de dois experimentos independentes. A concentração inibitória média (IC₅₀) foi determinada a partir de curvas de regressão sigmoidal, utilizando-se o programa Graph Pad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

Os valores de IC₅₀ encontrados para os fármacos, em cada linhagem foram, posteriormente, confirmados através de ensaios de viabilidade celular, utilizando as técnicas de SRB e MTS, conforme metodologia descrita nos itens 4.2 e 4.3, respectivamente.

Quadro 4.3 - Fármacos analisados e doses testadas para determinação do IC₅₀

Número de doses	Fármacos e doses testadas		
	Cisplatina(µg/mL) (CIS)	Romidepsin (nM) (ROM)	Panobinostat (nM) (PAN)
1	5	5	30
2	2,5	2,5	15
3	1,25	1,25	7,5
4	0,625	0,625	3,75
5	0,312	0,312	1,875
6	0,156	0,156	0,937
7			0,469

Fonte: O autor.

4.5 ASSOCIAÇÃO DOS FÁRMACOS SELECIONADOS COM A CISPLATINA

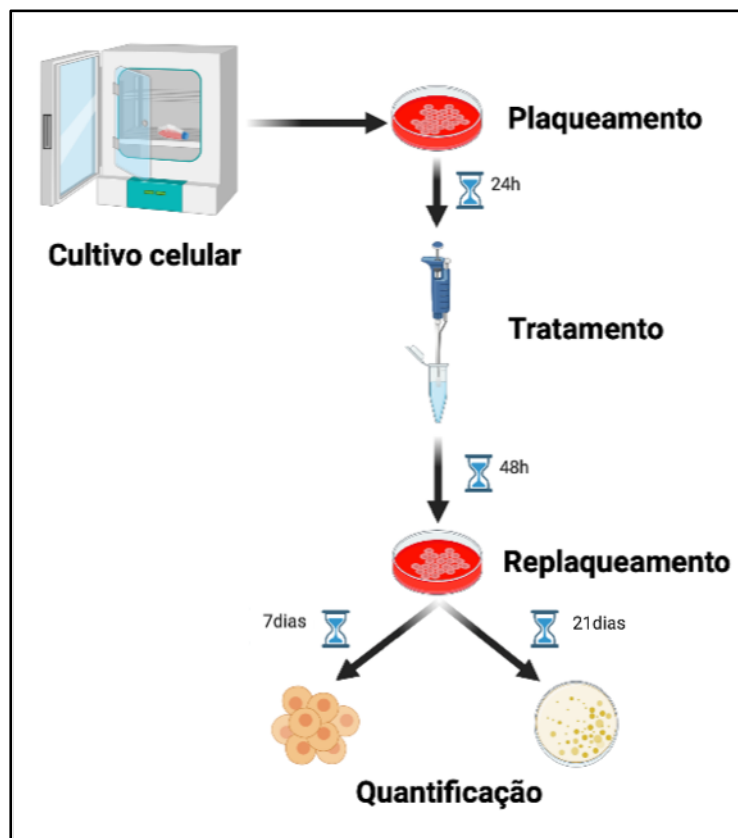
A associação dos fármacos Panobinostat (PAN) e Romidepsin (ROM) com a Cisplatina (CIS) (PAN+CIS e ROM+CIS), foi realizada com o objetivo de avaliar um possível efeito sinérgico na ação dos quimioterápicos (iHDAC + Cisplatina) sobre as subpopulações com e sem fenótipo tronco tumoral. Para tanto, os experimentos descritos a seguir, foram realizados tanto no regime de monoterapia (dose de IC₅₀ de cada fármaco isoladamente), quanto em associação (doses de IC₅₀ determinadas para Panobinostat e Romidepsin associadas com a dose de IC₅₀ da Cisplatina).

4.6 ENSAIOS DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS E ESFERAS

Os ensaios de formação de esferas e colônias foram realizados seguindo dois delineamentos experimentais distintos: **1- tratamento prévio**: para avaliar o potencial de autorrenovação e a clonogenicidade das células remanescentes, ou seja, que sobreviveram à 48h de tratamento com as doses de IC₅₀ dos fármacos selecionados (Figura 4.1); **2- tratamento concomitante**: para avaliar a capacidade de formação de esferas e colônias, em condições de desacetilação, obtidas pela presença dos

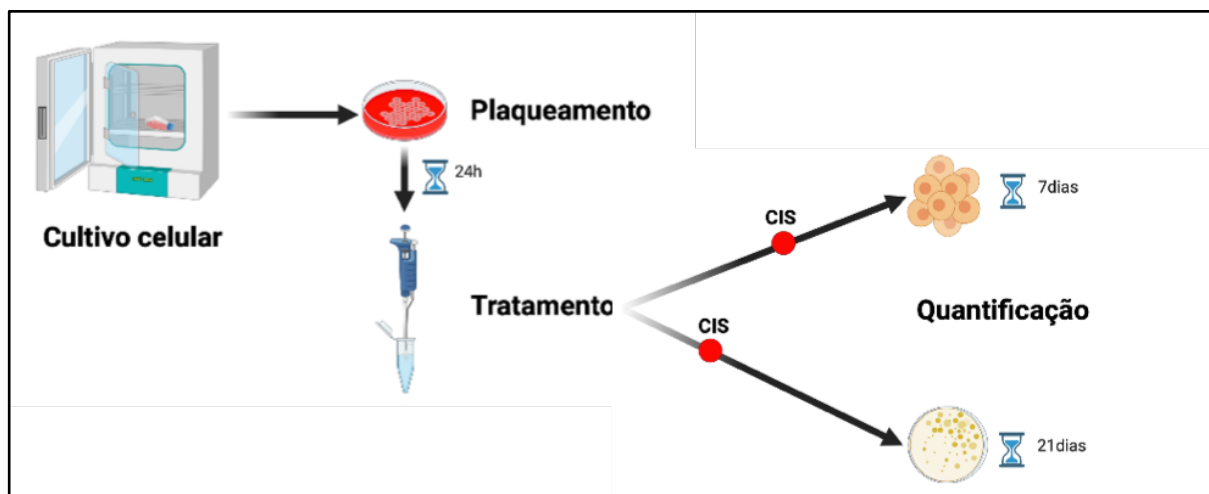
fármacos no meio de cultivo por um período prolongado, 7 dias no ensaio de esferas e 21 dias no ensaio de formação de colônias (Figura 4.2).

Figura 4.1 - Esquema ilustrando a modalidade de **tratamento prévio** realizado nos ensaios de formação de esferas e colônias



Fonte: O autor.

Figura 4.2 - Esquema ilustrando a modalidade de ***tratamento concomitante*** realizado nos ensaios de formação de esferas e colônias



Fonte: O autor.

4.6.1 Ensaios de formação de colônias

Para a realização deste ensaio na abordagem de ***tratamento prévio***, as células das linhagens UM-HMC1 e UM-HMC3A foram cultivadas em frascos de cultivo de 25 cm² (1,5x10⁵ células/frasco). Após 24h do plaqueamento, as células foram tratadas com as doses correspondentes aos IC₅₀ de cada composto, por 48h. Posteriormente, as células que sobreviveram ao tratamento foram plaqueadas em placas de 6 poços (Cat. No. 3516, Corning® Incorporated, Corning, NY, EUA), em uma densidade de 100 células/poço, em 3 mL de meio de cultivo. As células foram mantidas em incubadora (37 °C, 95% de umidade e 5% de CO₂) durante 21 dias, tempo necessário para a formação e crescimento das colônias, sem troca do meio de cultivo.

De modo complementar, na modalidade de ***tratamento concomitante***, 100 células/poço de ambas as linhagens foram plaqueadas em placas de 06 poços e tratadas 24h após o plaqueamento, com as doses de IC₅₀ de Panobinostat e Romidepsin. Após 7 dias, a Cisplatina foi adicionada nos poços destinados aos tratamentos associados (PAN+CIS e ROM+CIS), e as células foram mantidas em

incubadora umidificada (37 °C, 95% de umidade e 5% de CO₂) por mais 13 dias, totalizando 21 dias de experimento.

Passados os 21 dias, os poços contendo as colônias, nas duas abordagens experimentais, foram lavados 2 vezes com PBS 1x e fixados com 1 mL de paraformaldeído 4% (PFA) (Cat. No. P6148, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) por 10 minutos, em TA. Em seguida, os poços foram lavados novamente (2 vezes com 1 mL de PBS 1x) e as colônias foram coradas com 1 mL de Cristal violeta (Cat. No. C0775, Sigma-Aldrich Corporation, San Luis, MO, EUA) diluído em água destilada (1:40), a partir da solução estoque (1,5% em etanol absoluto). Após 5 minutos, os poços foram lavados 4 vezes com água destilada e após a secagem completa, as colônias medindo $\geq 1,5$ mm em seu maior diâmetro, foram contadas visualmente com o auxílio de uma régua milimetrada. Este ensaio foi realizado em triplicata amostral e experimental, nas duas abordagens experimentais realizadas.

4.6.2 Ensaios de formação de esferas

Os ensaios de formação de esferas foram realizados com base na metodologia proposta por Krishnamurthy e Nör (2013) (155), com pequenas modificações. Na modalidade de **tratamento prévio**, as células das linhagens UM-HMC1 e UM-HMC3A foram cultivadas em frascos de cultivo de 25cm² (1,5x10⁵ células/frasco). Após 24 horas do plaqueamento, as células foram tratadas com as doses correspondentes aos IC₅₀ de cada composto, por 48h. Posteriormente, as células que sobreviveram ao tratamento foram replaqueadas (500 células/poço em 1 mL de meio de cultivo) em placas de baixa adesão com 24 poços (Cat. No. 3473, Corning® Incorporated, Corning, NY, EUA) e mantidas em incubadora (37 °C, 95% de umidade e 5% de CO₂), durante 7 dias, sem troca do meio de cultivo.

Já na modalidade de **tratamento concomitante**, realizado para avaliar a capacidade de formação de esferas sob condições de desacetilação, 500 células/poço, em 0,5 mL de meio de cultivo, foram plaqueadas em placas de baixa adesão com (24 poços). Após 24h, essas células foram tratadas com as doses de IC₅₀

de Panobinostat e Romidepsin, e nos grupos associados, a Cisplatina (dose de IC₅₀) foi adicionada após 72h do tratamento com os iHDACs. Durante o experimento, as células foram mantidas em incubadora (37 °C, 95% de umidade e 5% de CO₂), permanecendo em contato com os fármacos até o final do experimento (7 dias após o plaqueamento).

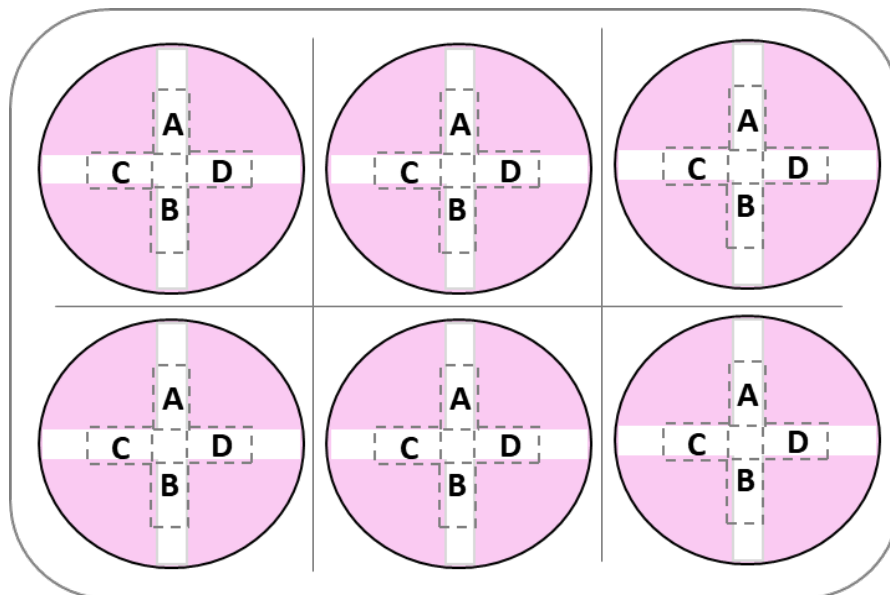
Após o período de 7 dias, em ambas as modalidades de tratamento, as esferas medindo $\geq 50 \mu\text{m}$ foram quantificadas, visualmente, com a ajuda de um microscópio invertido (Axio Vert®, Carl Zeiss, Oberköchen, Alemanha), em um aumento final de 40x. Este ensaio foi realizado em triplicata amostral e experimental, nas duas abordagens experimentais realizadas.

4.7 ENSAIO DE “FERIDA”

O ensaio de ferida foi realizado para avaliar os efeitos dos tratamentos com os fármacos sobre a migração celular coletiva. Para tanto, 5×10^5 células, diluídas em 3 mL de meio, foram plaqueadas em placas de cultivo de 6 poços, até atingirem a confluência (24h para a linhagem UM-HMC1 e 48h para a linhagem um-HMC3A). Posteriormente, as células foram tratadas com 2 $\mu\text{g/mL}$ de Mitomicina C (Mitomycin C ready made solution, Cat. No. M5353, Sigma-Aldrich Corporation, San Luis, MO, EUA) por 4 horas, para inibir a proliferação celular (156). Após esse período, uma “ferida” foi realizada na camada de células, a partir da intersecção de dois traços, um horizontal e outro perpendicular a este, riscados com o auxílio de uma ponteira de 200 μL , de modo a ser obter duas linhas (Figura 4.3). Imediatamente após a formação das feridas, cada poço foi lavado 3 vezes com 2 mL de PBS 1x, para a remoção de células e debris remanescentes, e as áreas foram fotografadas (T0). Em seguida, as células foram tratadas com os fármacos (doses correspondentes aos IC₅₀ em cada linhagem), ou receberam apenas meio de cultivo (controle negativo). As áreas das feridas foram, novamente, visualizadas e fotografadas 48 horas após o tratamento (T1), com um aumento final de 50x, utilizando uma câmera digital acoplada a um microscópio invertido (Axio Vert®, Carl Zeiss, Oberköchen, Alemanha). As áreas das

feridas foram calculadas com o auxílio do software ImageJ (157), e a sua porcentagem de fechamento (migração celular) foi obtida, comparando-se os tempos T0 e T1.

Figura 4.3 - Desenho esquemático das áreas fotografadas no ensaio de ferida (migração celular)



Fonte: O autor.

4.8 ENSAIOS DE MIGRAÇÃO E INVASÃO POR *TRANSWELL*

Previamente à realização dos ensaios, as células das linhagens UM-HMC1 e UM-HMC3A foram tratadas por 48 horas, com as doses de IC_{50} estabelecidas para os compostos. Após o tratamento, as células foram tripsinizadas, contadas e diluídas em meio de cultivo, sem SFB, para uma concentração final de 1×10^6 células viáveis/mL, para cada um dos tratamentos. Para o ensaio de invasão, insertos de membranas de polietileno tereftalato (PET), com poros de 8 μm de diâmetro (Cat. No. 353097, Corning® Incorporated, Corning, NY, EUA) foram, previamente, revestidos com 60 μL de matrigel (Geltrex™ LDEV-Free Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix, Cat. No. A1413202, Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA),

diluído em meio de cultivo sem SFB (1:1). Os insertos foram colocados por 30 minutos na incubadora de células (37 °C), para a polimerização do matrigel. Em seguida, 100 µL de células de cada grupo (1×10^5 células), diluídas em meio de cultivo sem SFB, foram plaqueadas sobre a camada de matrigel polimerizado. Os insertos foram adaptados aos poços da placa de cultivo (24 poços), contendo 500 µL de meio com SFB e permaneceram na incubadora por 48 horas. Já no ensaio de migração, as células (1×10^5 células em 100 µL de meio) diluídas em meio sem SFB, foram plaqueadas diretamente na parte superior de insertos de membrana de Policarbonato, sem a presença de matrigel, com poros de 8 µm de diâmetro (Cat. No. 3422, Corning® Incorporated, Corning, NY, EUA). A seguir, os insertos foram adaptados às placas de cultivo de 24 poços, contendo 500 µL de meio de cultivo com SFB e permaneceram na incubadora por 48 horas.

Após a incubação, os insertos foram lavados 2 vezes com PBS 1x (ciclo de lavagem) e fixados com 700 µL de paraformaldeído 4% por 2 minutos, seguido por 700 µL de metanol (Álcool metílico P.A.-A.C.S. 100%, Cat. No. 01A1085.01.BJ, Labsynth®, Diadema, SP, Brasil) por 20 minutos (sendo 1 ciclo de lavagem realizado após a ação de cada agente fixador). Posteriormente, os insertos foram corados com cristal violeta 1:40 (solução estoque à 1,5% em água destilada) por 15 minutos e, novamente, submetidos a 1 ciclo de lavagem. As células que não migraram para a face inferior do inserto, foram removidas com o auxílio de cotonetes e *microbrushes*. Para a visualização das células que migraram, os insertos foram imersos em poços contendo 1 mL de PBS 1x e 5 imagens aleatórias de cada poço, foram capturadas em um aumento final de 40x, utilizando uma câmera digital acoplada a um microscópio invertido (Axio Vert®, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

4.9 ENSAIO DE CITOMETRIA DE FLUXO

A análise da porcentagem de células ALDH⁺/CD44⁺ por citometria de fluxo, foi realizada para avaliar o efeito dos tratamentos com Panobinostat e Romidepsin, e suas respectivas associações com a Cisplatina, sobre as CTTs derivadas das linhagens UM-HMC1 e UM-HMC3A. Para tanto, as células foram tratadas com as

doses correspondentes aos IC₅₀ de cada fármaco e após 48h de tratamento, as células sobreviventes foram tripsinizadas, contadas e diluídas para uma concentração final de 10⁶ células/mL. Posteriormente, 300 µL da ressuspensão celular (300.000 células) foram transferidos para ubos de poliestireno de 5 mL com tampa filtro (BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA) e lavadas com 1 mL de PBS 1x. A avaliação da atividade de ALDH foi realizada utilizando os reagentes do kit comercial ALDEFLUOR™ (Stem Cell Technologies, Vancouver, Columbia Britânica, Canada). Após a lavagem com PBS 1x, as células foram centrifugadas (1.500 rpm por 5 minutos em TA) em uma centrífuga com rotor de ângulo fixo (Centrifuge 5810 R, Eppendorf®, Hamburgo, Alemanha), ressuspendidas em 200 µL de tampão do kit Aldefluor (ALDEFLUOR™ Assay Buffer) e incubadas com 1 µL de substrato de Aldefluor (ALDEFLUOR™ reagent) durante 1h a 37 °C. Adicionou-se 2 µL de dietilaminobenzalde (ALDEFLUOR™ DEAB Reagent) antes da incubação, para inibir a atividade de ALDH nos tubos de compensação. Em seguida, as células foram lavadas com 300 µL do tampão de Aldefluor e expostas ao anticorpo anti-CD44, diluído 1:400 (50µg/mL, PE anti-mouse/human, Cat. No. 103024, BioLegend®, San Diego, CA, EUA), durante 30 minutos a 4°C. Para finalizar, as células foram lavadas novamente e ressuspendidas em 100 µL do tampão de Aldefluor contendo 200 ng/mL de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) para exclusão das células mortas. Como controle do experimento, foram realizados tubos de compensação e tubos de controle FMO (*fluorescence-minus-one*), conforme especificado no Quadro 4.4.

As amostras foram encaminhadas ao Departamento de Imunologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, onde as análises foram realizadas utilizando o citômetro BD FACSCanto™ II (BD Bioscience, San Jose, CA, USA). Pelo menos 10.000 eventos foram adquiridos e as análises dos dados foram realizadas no software FlowJo™ (FlowJo™ Software para Mac, Versão 10.0. Ashland, OR: Becton, Dickinson and Company; 2021). Para a identificação da porcentagem de células ALDH⁺/CD44⁺, a população total foi, primeiramente, localizada de acordo com o seu tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). A partir disso, foram selecionadas as células viáveis, através da exclusão das células positivas para DAPI e estas, foram então avaliadas quanto a expressão dos marcadores avaliados (ALDH/CD44). Esse experimento foi realizado com triplicata amostral.

Quadro 4.4 - Parâmetros de compensação e controle FMO

Compensação*	Controle FMO**
Controle negativo: ALDH + DEAB	População ALDH ⁺ : ALDH + DEAB + CD44 + DAPI
ALDH: ALDH	População CD44 ⁺ : ALDH + DAPI
CD44: ALDH + DEAB + CD44	População DAPI ⁺ : ALDH + CD44
DAPI: ALDH + DEAB + DAPI	

*Parâmetros de compensação: utilizados no ajuste dos sinais fluorescentes

**Controle FMO: utilizados na identificação e delimitação das populações alvo

Fonte: O autor.

4.10 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL (RT-qPCR)

4.10.1 Extração e purificação do RNA

Para a realização da análise quantitativa da expressão gênica, uma densidade de 115.000 células da linhagem UM-HMC1 e 220.000 células da linhagem UM-HMC3A, diluídas em 5 mL de meio, foram plaqueadas em placas de cultivo de 60 mm de diâmetro (Cat. No. 430166, Corning® Incorporated, Corning, NY, EUA). Após 24 horas, o meio de cultivo das células foi substituído por 5 mL de meio contendo os quimioterápicos, nas suas respectivas doses de IC₅₀. Após 48 horas de tratamento, as placas foram lavadas 3 vezes, com PBS 1x e, em seguida, 1 mL de TRIzol™ Reagent gelado (Cat. No. 15596026, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) foi adicionado às placas e incubado por 5 minutos (TA). Após a incubação, as células foram aspiradas e dispensadas contra a placa por 50 vezes, para finalizar o processo de lise celular e, logo depois, foram coletadas em microtubos de 1,5 mL

(Cat. No. MTC-150-C, Axygen®, Corning® Incorporated, Corning, NY, EUA) e congeladas em *freezer* -80 °C.

O ácido ribonucleico (RNA, do inglês “*Ribonucleic acid*”) total das amostras celulares foi isolado e purificado pelo método de Fenol/Clorofórmio. Para tanto, as amostras coletadas foram descongeladas em gelo e, em seguida, 200 µL de clorofórmio gelado (Cat. No. C1062.01.BJ, Labsynth®, Diadema, SP, Brasil) foi adicionado a cada tubo. As amostras foram homogeneizadas com a ajuda de um vórtex, por 15 segundos e mantidos em TA por 3 minutos. Posteriormente, uma centrifugação longa foi realizada (11.488 x g, 4 °C, 15 minutos) para separar as fases da solução e, em seguida, o sobrenadante foi coletado e transferido para microtubos de 1,5 mL. Logo depois, 500 µL de álcool isopropílico absoluto gelado (Cat. No. A1078.01.BJ, Labsynth®, Diadema, SP, Brasil), foi adicionado aos tubos e uma nova centrifugação foi realizada (11.488 x g, 4 °C, 10 minutos), formando um *pellet* no fundo do microtubo. Adicionou-se então, 1 mL de álcool etílico 70% gelado e as amostras foram delicadamente homogeneizadas, com auxílio de uma pipeta, por 2 vezes. Os tubos foram novamente centrifugados (7.794 x g, 4 °C, 5 minutos) e postos para secar, com a boca virada para baixo, em contato com papel absorvente, por 15 minutos. Os RNAs, extraídos e purificados, foram diluídos em 10-30 µL de água ultrapura e quantificados em espectrofotômetro (NanoDrop® 1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

4.10.2 Controle de qualidade do RNA

Análises por espectrofotometria e eletroforese em gel agarose foram realizadas para o controle de qualidade das amostras, a fim de verificar a pureza e a integridade do material extraído. A pureza do RNA foi verificada em espectrofotômetro (NanoDrop® 1000) através das razões 260/230 (valores maiores que 1,7) e 260/280 (valores entre 1,8-2,1). Já a integridade do material extraído foi visualizada por eletroforese em gel de agarose à 2% (UltraPure™ Agarose, Cat. No. 16500100, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), utilizando um sistema de cuba horizontal (EasyCast OWL D2, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). O gel foi preparado com tampão Tris-Acetato-EDTA 1X (TAE, 10X, pH 8.5, Cat. No.

AM9869, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), e corado com 1 µL de brometo de etídio (UltraPure™ Ethidium Bromide, 10 mg/mL, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). A corrida foi executada com uma voltagem de 90 V, por 40 minutos, e as amostras foram preparadas conforme descrito no Quadro 4.5. As imagens das bandas de RNA ribossomal 18S e 28S, foram visualizadas a partir da interação entre o brometo de etídio e o RNA, após a exposição do gel à luz ultravioleta. A captura foi realizada em um fotodocumentador (MiniBIS Pro, UNISCIENCE, Brasil).

Quadro 4.5 - Reagentes utilizados no preparo das amostras para a corrida do gel de integridade

RNA das amostras	Tampão de carregamento de gel*	Água ultrapura
500 ng = X µL	1 µL	Até completar 10 µL

*BlueJuice™ (10X), Cat. No. 10816015, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA

Fonte: O autor.

4.10.3 Síntese do DNA complementar (cDNA)

Antes da realização da síntese do DNA complementar (cDNA), 1 µg do RNA, extraído e purificado, passou por uma etapa de eliminação da contaminação por DNA genômico, utilizando o kit comercial da enzima *DNase I, Amplification Grade* (Cat. No. 18068015, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Após a etapa de descontaminação, as amostras de RNA foram utilizadas para sintetizar as fitas de cDNA, utilizando-se o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Cat. No. 4368814, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e a enzima *RNase Inhibitor* (Cat. No. N8080119, Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). A reação de transcrição reversa foi realizada em um termociclador (Eppendorf® Mastercycler, Hamburgo, Alemanha) e, a seguir as amostras de cDNA foram armazenadas a -20 °C, até a realização da RT-qPCR. Todas

as reações realizadas para a obtenção do cDNA, seguiram as instruções do fabricante.

4.10.4 Amplificação e detecção da expressão gênica por RT-qPCR

O ensaio de RT-qPCR, foi realizado para verificar a expressão de genes relacionados às CTTs, usando *primers* específicos (Quadro 4.6), em um ABI7500 *Real Time PCR System* (Applied Biosystems 7500 PCR Systems, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). As reações foram realizadas em placas óticas de 96 poços (MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate, Cat. No. N8010560, Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), em duplicata para cada cDNA transcrito reversamente, utilizando-se os seguintes reagentes: *primers sense (F) e anti-sense (R)* para cada gene, 5 µL de *PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix* (Cat. No. A25742, Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), 1 µL de cDNA e água ultrapura, para completar o volume final de 10 µL. O processo de amplificação seguiu as etapas de desnaturação inicial (95 °C por 10 minutos), seguida por 40 ciclos de desnaturação (95 °C por 15 segundos), hibridização (60-62 °C por 30 segundos) e extensão (72 °C por 40 segundos). A curva de dissociação (curva de *melting*) foi realizada após o término do último ciclo, para cada gene analisado. As reações de RT-qPCR foram realizadas utilizando-se 3 amostras diferentes de cDNA/grupo, obtidas em 3 experimentos independentes, realizados com células em passagens diferentes. Para evitar amplificações inespecíficas, reações de RT-qPCR foram realizadas para cada par de *primers*, utilizando-se água ultrapura no lugar das amostras de cDNA (controle negativo). Só foram consideradas elegíveis para a análise, amostras com desvio padrão $\leq 0,05$ entre os valores de Ct das duplicatas.

Para a quantificação relativa dos genes, primeiramente, foi construída uma curva padrão para cada gene (com 5 pontos de diluição), para avaliar a sua eficiência. Em seguida, os valores de eficiência foram utilizados no cálculo da expressão relativa, de acordo com o método proposto por Pfaffl (2001) (158), que leva em consideração a variação entre os limiares de fluorescência das amostras controle e tratadas (ΔCt),

e expressa esses valores em relação ao gene de referência (*housekeeping*). Neste trabalho, optou-se pela utilização do *HPRT* como gene de referência, uma vez que, esse gene foi amplificado de forma mais homogênea do que o *GAPDH*, em todos os grupos experimentais analisados.

Quadro 4.6 - Sequência de primers utilizados na RT-qPCR, com suas respectivas concentrações e temperaturas de hibridização (° C)

Gene	Primers 5' → 3'	Concentração [nM]	(° C)
<i>NANOG</i>	F: CATCCTGAACCTCAGCTCAAACA R: TTGCTATTCTTCGGCCAGTTGT	400	60
<i>BMI-1</i>	F: GCTGCCAATGGCTCTAATGAA R: TGCTGGGCATCGTAAGTATCTT	400	60
<i>OCT-4</i>	F: ACTTCACTGCACTGTACTCCTC R: AGGTTCTCTTCCCTAGCTCCTC	200	60
<i>HPRT*</i>	F: CCTGGCGTCGTGATTAGTGAT R: AGCAAGACGTTTCAGTCCTGT	400	60

*Gene de referência (*housekeeping*), utilizados para a normalização dos dados brutos

Fonte: O autor.

4.11 PCR ARRAY

Além das análises de qPCR descritas anteriormente, reações de PCR array também foram realizadas para analisar a amplificação de 84 genes, encontrados em CTTs humanas (Anexo B), utilizando-se placas *RT² Profiler PCR Array* (Human Cancer Stem Cells, Cat. No. PAHS-176Z, Qiagen, Hilden, NRW, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante.

4.11.1 Coleta, extração e purificação do RNA para PCR array

Para as reações de PCR array, uma densidade de 300.000 células da linhagem UM-HMC1 e 590.000 células da linhagem UM-HMC3A em 10 mL de meio, foram plaqueadas em placas de cultivo de 100 mm de diâmetro (Cat. No. 353003, Falcon®, Corning® Incorporated, Corning, NY, EUA). Após 24 horas, o meio de cultivo das placas foi substituído por 12 mL de meio contendo os fármacos, nas suas respectivas doses de IC₅₀. Após 48 horas de tratamento, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS 1X, e a coleta das células foi realizada com 600 µL de tampão RLT (RNeasy® Mini Kit, Cat. No. 74104, Qiagen, Hilden, NRW, Alemanha). As células coletadas foram lisadas com o auxílio de agulhas acopladas a seringas, com movimentos de compressão e descompressão por 7 vezes, e armazenadas a -80 °C. O RNA total das amostras celulares foi isolado e purificado por colunas de centrifugação, utilizando o kit comercial RNeasy® Mini (Cat. No. 74104, Qiagen, Hilden, NRW, Alemanha), incluindo a etapa de eliminação da contaminação por DNA genômico (RNase-Free DNase Set, Cat. No. 79254, Qiagen, Hilden, NRW, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. Após o processo de extração e purificação, os RNAs extraídos foram diluídos em 30-50 µL de água ultrapura (UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, Cat. No. 10977-015, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e quantificados em espectrofotômetro (NanoDrop® 1000), de forma que, ao final da diluição, todas as amostras ficaram com concentrações ≥ 40 µg/mL. O controle de qualidade do material genético, foi realizado conforme descrito no item 4.11.2.

4.11.2 Síntese de cDNA e qPCR utilizando RT² Profiler PCR Arrays

A síntese da fita de DNA complementar (cDNA), foi efetuada por transcrição reversa em um aparelho termociclador (Eppendorf® Mastercycler, Hamburgo, Alemanha), utilizando-se o kit comercial *RT² PreAMP cDNA Synthesis* (Cat. No. 330451, Qiagen, Hilden, NRW, Alemanha), a partir de 4 µg do RNA (extraído e purificado). Posteriormente, as reações de PCR em tempo real (qPCR), foram

realizadas com o kit comercial RT² SYBR® Green ROX™ Mastermix (Cat. No. 330523, Qiagen, Hilden, NRW, Alemanha), e os genes presentes na placa foram amplificados em um Real Time PCR System ABI7500 (Applied Biosystems 7500 PCR Systems, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), seguindo as seguintes etapas: ativação da enzima *HotStart DNA Taq Polymerase* (95 °C por 10 minutos), seguido por 40 ciclos de desnaturação (95 °C por 15 segundos), e pela etapa de anelamento e extensão (60 °C por 1 minuto). Após a amplificação, as amostras foram submetidas à análise da curva de dissociação (curva de *melting*), para verificar a especificidade da PCR, caracterizada pela ausência de qualquer curva bimodal ou sinal anormal de amplificação. Todas as reações foram realizadas seguindo as instruções do *datasheet* do fabricante.

4.11.3 Análise dos dados de PCR array

Os resultados foram analisados através do software *GeneGlobe* (Qiagen), disponível em <https://dataanalysis2.qiagen.com/pcr>. Todas as amostras passaram por controle de qualidade, para a avaliação de contaminação por DNA genômico, eficiência da transcrição reversa e reprodutibilidade da reação de qPCR array. A alteração da expressão gênica foi calculada pelo método delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$), no qual o ΔCt foi obtido entre o gene alvo e a média aritmética dos genes endógenos (Quadro 4.7 e 4.8) contidos na placa. Em seguida, foi realizado o cálculo do $\Delta\Delta Ct$, subtraindo-se o valor de ΔCt obtido no grupo controle do ΔCt do grupo tratado (ΔCt do grupo tratado - ΔCt do grupo controle). Os valores de expressão relativa foram então transformados em *fold-change*, utilizando-se a fórmula $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. Foram considerados diferencialmente expressos, apenas os genes com *fold-change* < -2 (subexpressão) ou *fold-change* > 2 (superexpressão).

Além da análise global da expressão gênica por qPCR array, os dados obtidos foram também analisados por Análise de Componentes Principais (PCA), para melhor caracterizar como os tratamentos com os fármacos, explicam as diferenças na expressão dos 84 genes, relacionados a CTTs, presentes na placa de PCR array. Nessas análises, os dados obtidos a partir das matrizes de covariância dos valores de *fold-change*, para cada gene, foram utilizados para demonstrar a variância na

expressão gênica e nos tratamentos em termos de *loading* e *score plots* (biplot). Genes que não foram diferencialmente expressos (sub ou superexpressão) em relação ao grupo não tratado (controle), tiveram $\Delta\Delta Ct = 0$, mas foram incluídos nas matrizes de covariância. Todas as análises de PCA foram realizadas com auxílio do software PAST 4.04 (159).

Os genes que melhor representaram a variância dos dados, após as análises de PCA, foram selecionados e agrupados em relação aos processos biológicos do qual fazem parte, de acordo com o fabricante da placa (<https://geneglobe.qiagen.com/us/product-groups/rt2-profiler-pcr-arrays>).

Quadro 4.7 - Genes utilizados para a normalização dos dados brutos da linhagem UM-HMC1

Grupo	Amostra	Genes Normalizadores					Média aritmética
		<i>ACTB</i>	<i>B2M</i>	<i>GAPDH</i>	<i>HPRT1</i>	<i>RPLP</i>	
Controle	CTRL	16,66	19,16	18,24	22,63	14,18	18,17
Grupo 1	CIS	17,83	18,51	19,09	22,72	14,64	18,56
Grupo 2	PAN	16,88	18,76	18,64	22,98	13,69	18,11
Grupo 3	PAN+CIS	17,29	18,07	20,28	23,62	13,71	18,59
Grupo 4	ROM	16,79	18,54	18,36	22,86	13,46	18,00
Grupo 5	ROM+CIS	17,27	18,54	19,34	23,17	14,25	18,51

Fonte: O autor.

Quadro 4.8 - Genes utilizados para a normalização dos dados brutos da linhagem UM-HMC3A

Grupo	Amostra	Genes Normalizadores		Média aritmética
		<i>B2M</i>	<i>HPRT1</i>	
Controle	CTRL	18,91	22,42	20,67
Grupo 1	CIS	18,12	22,54	20,33
Grupo 2	PAN	17,98	21,88	19,93
Grupo 3	PAN+CIS	18,76	22,82	20,79
Grupo 4	ROM	19,24	22,46	20,85
Grupo 5	ROM+CIS	18,60	22,06	20,33

Fonte: O autor.

4.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

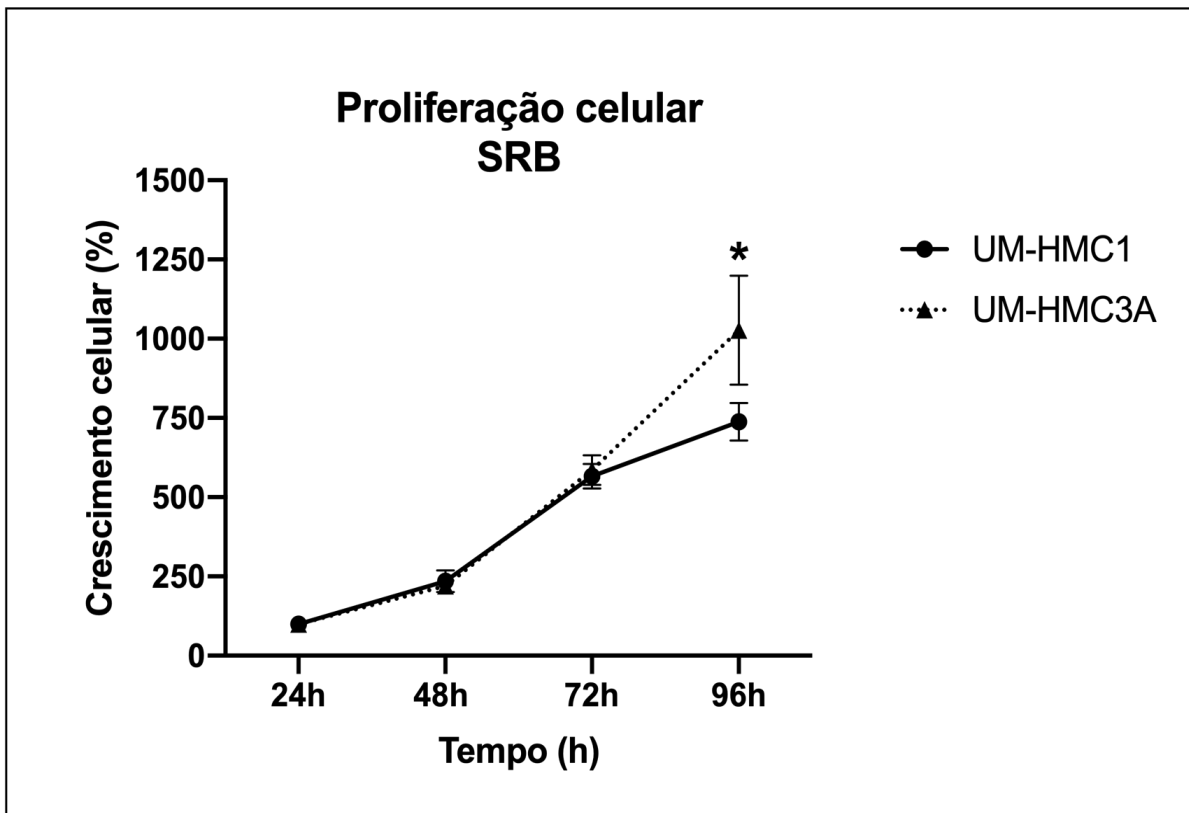
As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa *GraphPad Prism* (versão 8.0 para Mac, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Os dados foram avaliados quanto à distribuição normal (Testes de *Shapiro-Wilk* e *Kolmogorov-Smirnov*, $p > 0,05$) e homocedasticidade (Testes de *Brown-Forsythe* e *Bartlett*, $p > 0,05$). Aqueles que apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variâncias, foram avaliados pela Análise de Variância Fatorial (1 x 1), seguido do teste de *Tukey*. Entretanto, nos casos em que os dados não seguiram uma distribuição normal e apresentaram variâncias heterogêneas, utilizou-se o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo teste de *Dunn's* para comparações múltiplas. Para além disso, também foi utilizado o teste não paramétrico *U de Mann-Whitney*, para comparar a porcentagem de proliferação celular entre as linhagens UM-HMC1 e UM-HMC3A, em 24h, 48h, 72h e 96h. O nível de significância estatística empregado em todas as análises foi de 5% ($\alpha = 0,05$)

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DO PERFIL PROLIFERATIVO DAS LINHAGENS TUMORAIS DERIVADAS DE CME

Inicialmente, foram realizados ensaios de proliferação celular pela técnica de sulforodamina B (SRB), para caracterizar o comportamento proliferativo das células das linhagens UM-HMC1 e UM-HMC3A, em diferentes períodos de tempo (24, 48, 72 e 96 horas). Para tanto, o período de 24h foi definido como sendo o tempo estimado para a adesão celular. Como mostrado na Figura 5.1, ambas as linhagens apresentaram perfis de proliferação semelhantes em 24h, 48h e 72h. Entretanto, houve um aumento significativo na proliferação da linhagem UM-HMC3A (de tumor recidivante), no período de 96h ($p < 0.0001$), comparado à linhagem derivada de tumor primário, UM-HMC1.

Figura 5.1- Percentual de proliferação celular (média \pm desvio padrão) das linhagens tumorais derivadas de CME, determinada pelo método da SRB nos períodos de 48h, 72h e 96h, em relação ao período de 24h.



Teste U de Mann-Whitney realizado para as linhagens estudadas, em cada período analisado. Significância estatística se $p \leq 0,05$.

* diferença significativa entre as linhagens UM-HMC1 e UM-HMC3A no tempo de 96h.

Fonte: O autor.

5.2 ESCANEAMENTO DE 133 FÁRMACOS ONCOLÓGICOS EM LINHAGENS DE CME

Conforme descrito em Material e Métodos, o escaneamento da biblioteca de fármacos foi realizado com 133 drogas antineoplásicas, contidas em placas fornecidas pelo *NCI/NIH* (No. 4858 e 4859). Como critério inicial, foram selecionados fármacos capazes de reduzir, em pelo menos 70%, a viabilidade celular em ambas as linhagens de CME (UM-HMC1 e UM-HMC3A), tratadas com dose única de 5 μ M, por 48 horas. Assim, conforme demonstrado no Apêndice A, apenas seis fármacos atenderam os critérios iniciais, a saber: Panobinostat, Romidepsin, Cabazitaxel, Omacetaxine Mepesuccinate, Ponatinib e Carfilzomib. Porém, apenas Panobinostat (PAN) e Romidepsin (ROM), dois iHDACs, foram selecionados para os ensaios subsequentes, uma vez que, outros estudos já têm mostrado os bons resultados dessa classe de medicamentos frente a linhagens de CME (22), inclusive sobre populações de CTTs (15).

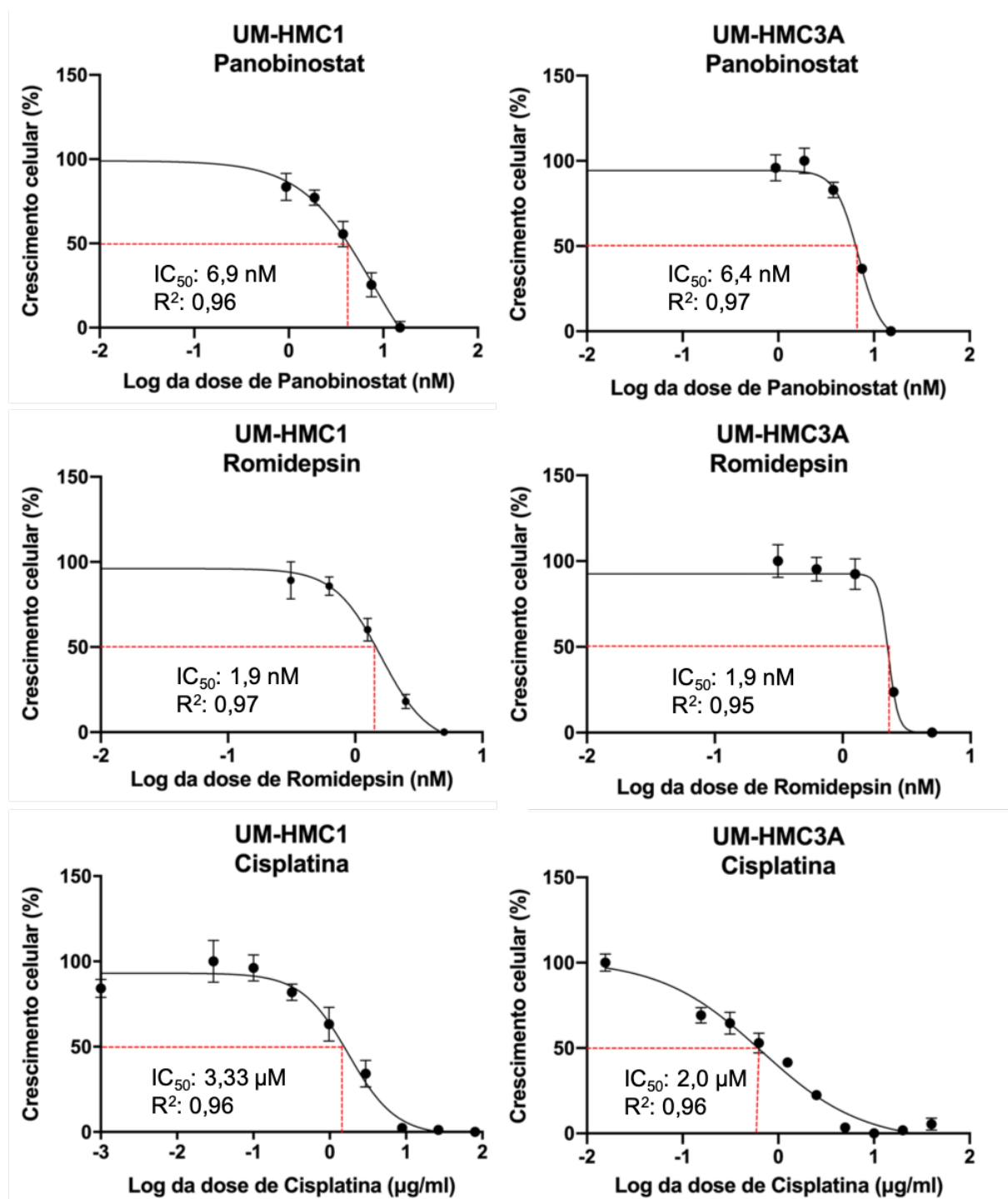
5.3 DETERMINAÇÃO E CONFIRMAÇÃO DAS DOSES DE IC₅₀ DOS FÁRMACOS

Foram utilizados modelos de regressão não linear para o cálculo da Concentração Média Inibitória (IC₅₀) dos fármacos selecionados, nas duas linhagens derivadas de CME (UM-HMC1 e UM-HMC3A). Posteriormente, os valores de IC₅₀ foram utilizados como parâmetro das doses utilizadas em todos os experimentos, para comparar o efeito dos fármacos sobre as células. A relação entre as doses testadas para cada fármaco, e seus respectivos efeitos na diminuição da viabilidade celular, está representada na Figura 5.2. As curvas de dose-resposta apresentaram alto grau de ajustamento ao modelo de regressão ($R^2 > 0,95$), garantindo confiabilidade do modelo. Conforme demonstrado na Figura 5.3, as doses correspondentes aos valores de IC₅₀ determinados para os três fármacos, foram capazes de reduzir o crescimento celular em cerca de 50%. Contudo, entre os iHDACs, o PAN apresentou valores de IC₅₀ relativamente mais altos do que os valores obtidos para ROM, em ambas as

linhagens tumorais avaliadas, sugerindo uma citotoxicidade ligeiramente mais baixa do primeiro, quando comparado ao tratamento com ROM. Além disso, valores de IC_{50} ligeiramente mais baixos para os fármacos PAN e CIS, foram obtidos em UM-HMC3A (CIS = 2,0 μ M e PAN = 6,4 nM) comparado a linhagem UM-HMC1 (CIS = 3,33 μ M e PAN = 6,9 nM).

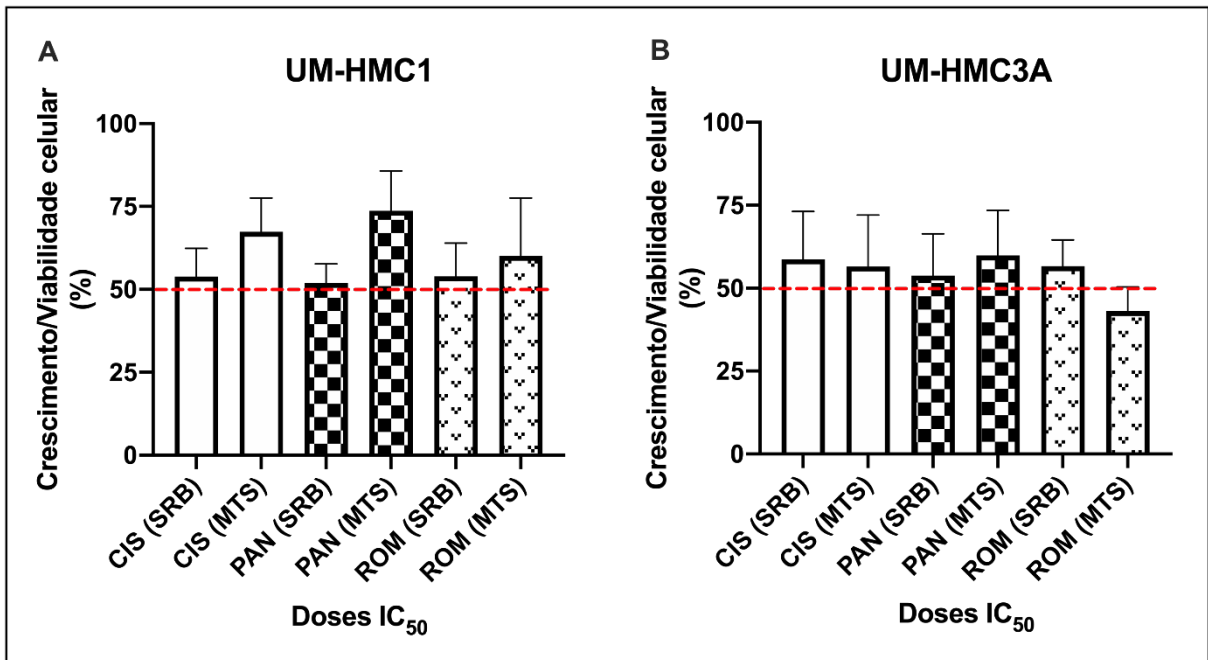
O efeito citotóxico dos fármacos, foram analisados pelos ensaios de SRB e MTS, para avaliar o crescimento e a viabilidade celular, respectivamente, e confirmar as doses de IC_{50} determinadas anteriormente. De um modo geral, as doses de IC_{50} determinadas foram, de fato, capazes de inibir tanto o crescimento, quanto a viabilidade celular, nas duas linhagens celulares de CME (Figura 5.3).

Figura 5.2 - Curvas de dose-resposta dos fármacos nas linhagens UM-HMC1 e UM-HC3A, geradas por modelo de regressão não linear, para definição das doses de IC_{50} .



Fonte: O autor.

Figura 5.3 - Percentual de crescimento (SRB) e viabilidade celular (MTS) (média \pm desvio padrão), normalizados em relação ao grupo CTRL, após 48h o tratamento com as doses de IC₅₀ estabelecidas, nas linhagens tumorais derivadas de CME.



Fonte: O autor

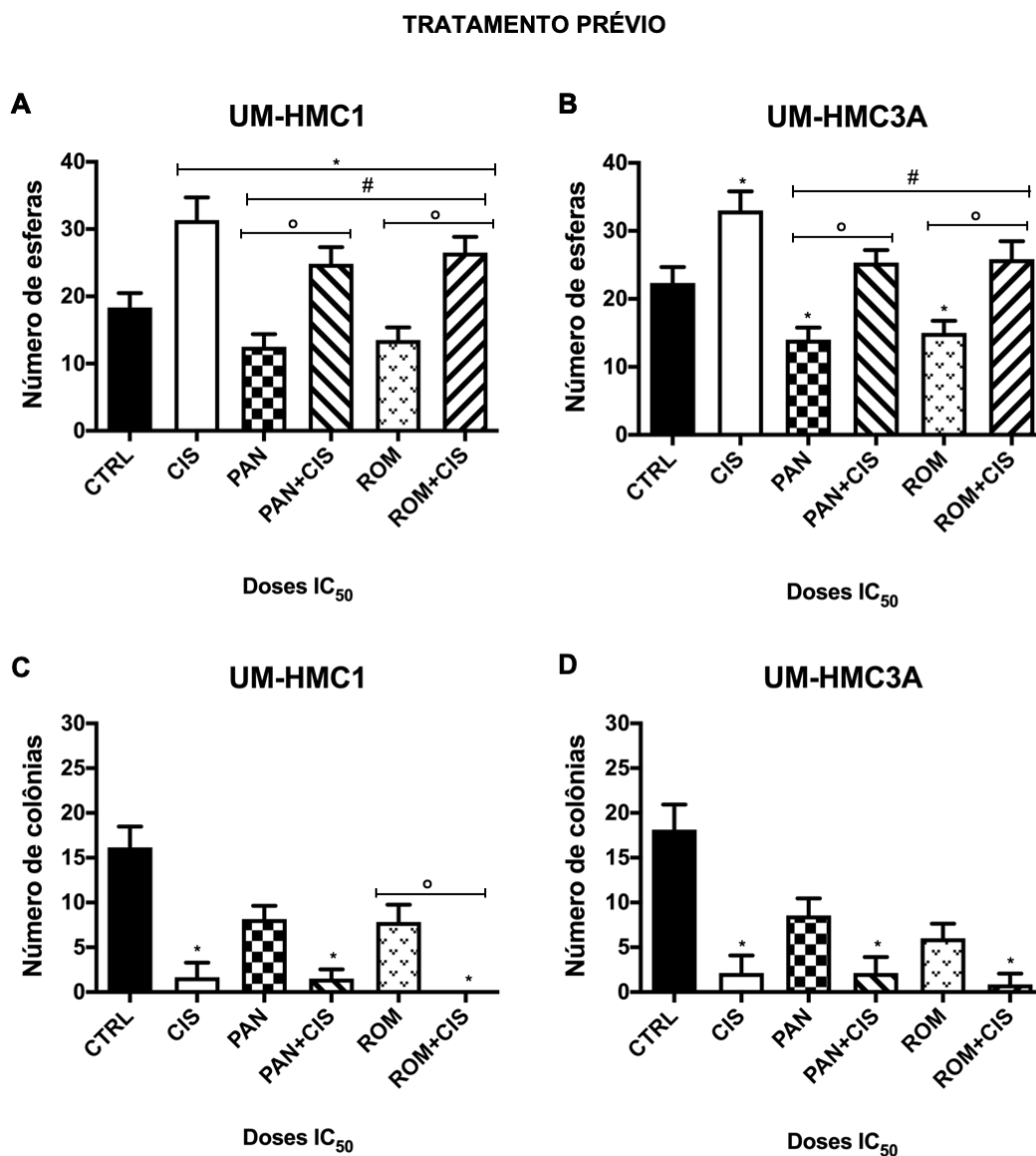
5.4 AÇÃO DOS FÁRMACOS SOBRE PROPRIEDADES RELACIONADAS AO FENÓTIPO TRONCO TUMORAL (CLONOGENICIDADE E AUTORRENOVAÇÃO)

5.4.1 Avaliação do potencial de clonogenicidade e autorrenovação de células remanescentes ao tratamento com os fármacos – Tratamento prévio

Os resultados obtidos com a primeira abordagem experimental estão apresentados na Figura 5.4. Assim, conforme evidenciado nos ensaios de esferas (Figuras 5.4A e 5.4B), apenas os tratamentos com PAN e ROM foram capazes de reduzir significativamente o número de esferas, em relação ao grupo CTRL, tanto na linhagem UM-HMC1, quanto na linhagem UM-HMC3A. Contrariamente, o tratamento com CIS aumentou, de forma significativa, o número de esferas formadas, tanto em relação ao CTRL, quanto em relação à todos os grupos tratados, em ambas as linhagens celulares. Da mesma maneira, a associação entre CIS e os iHDACs (PAN+CIS e ROM+CIS), resultou em um aumento significativo no número de esferas, quando comparada aos tratamentos com PAN e ROM isoladamente. Esse aumento também foi notado em relação ao grupo CTRL, porém, com significância estatística apenas na linhagem UM-HMC1.

Ao contrário do que foi observado no ensaio anterior, os resultados obtidos no ensaio de colônias (Figuras 5.4C e 5.4D) mostraram que, apenas o tratamento prévio com CIS, e suas respectivas associações com os iHDACs (PAN+CIS e ROM+CIS), diminuíram significativamente o número de colônias formadas, em relação ao grupo CTRL, nas duas linhagens celulares analisadas. Além disso, a associação entre ROM+CIS, promoveu uma redução significativa no número de colônias na linhagem UM-HMC1, quando comparada ao tratamento isolado com ROM.

Figura 5.4 - Número de esferas e colônias formadas (média \pm desvio padrão), após 48h de tratamento prévio com as doses de IC₅₀ dos fármacos selecionados.



A e B: Análise de Variância Fatorial (1 x 1), seguida pelo teste de Tukey, para comparações múltiplas entre os grupos analisados.

C e D: Teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's, para comparações múltiplas entre os grupos analisados.

Significância estatística se $p \leq 0,05$.

* diferença significativa em relação ao CTRL.

diferença significativa em relação a CIS.

° diferença significativa entre tratamentos isolados e suas respectivas associações com CIS.

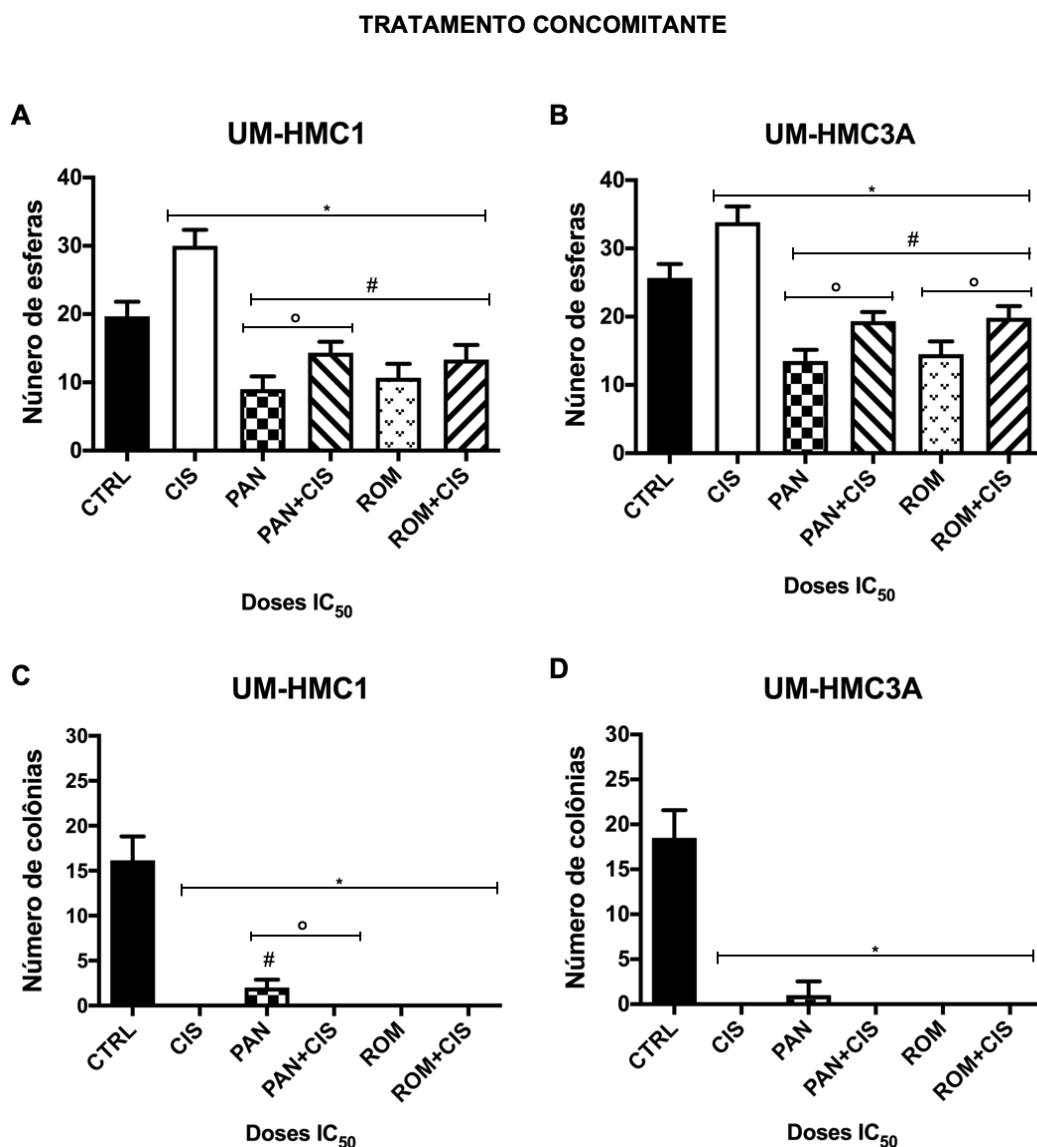
Fonte: O autor.

5.4.2 Avaliação da capacidade de formação de esferas e colônias, na presença dos fármacos adicionados ao meio de cultivo – Tratamento concomitante

No segundo delineamento experimental (Figuras 5.5A e 5.5B), assim como ocorreu na primeira abordagem, o tratamento com CIS nas linhagens UM-HMC1 e UM-HMC3A, elevou significativamente o número de esferas formadas, tanto em relação ao grupo CTRL, quanto em relação à todos os grupos tratados. Por outro lado, com exceção da CIS, todos os outros tratamentos realizados, conseguiram reduzir significativamente o número de esferas formadas, em ambas as linhagens. Esta diminuição se manteve, até mesmo nos grupos que receberam os tratamentos associados (PAN+CIS e ROM+CIS). Porém, apesar dessa diminuição em relação ao grupo CTRL, os grupos tratados em associação com a CIS, apresentaram um número estatisticamente maior de esferas, em relação aos tratamentos com iHDACs isoladamente, com exceção do tratamento com ROM+CIS na linhagem UM-HMC1, que não diferiu estatisticamente do grupo tratado apenas com ROM.

Em relação aos resultados obtidos nos ensaios de colônias (Figuras 5.5C e 5.5D), essa segunda abordagem experimental evidenciou que o contido prolongado dos fármacos com as células, induziu efeitos inibitórios potentes em todos os grupos tratados, de forma que, tanto os fármacos isolados, quanto as associações, reduziram significativamente o número de colônias formadas, em relação ao grupo CTRL, nas duas linhagens. Não obstante, apesar da marcante redução no número de colônias em relação ao grupo CTRL, o tratamento isolado com PAN na linhagem UM-HMC1, permitiu a formação de um maior número de colônias, comparado aos demais tratamentos.

Figura 5.5 - Número de esferas e colônias formadas (média \pm desvio padrão), após o tratamento concomitante com as doses de IC₅₀ dos fármacos selecionados.



A e B: Análise de Variância Fatorial (1 x 1), seguida pelo teste de Tukey, para comparações múltiplas entre os grupos analisados.

C e D: Teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's, para comparações múltiplas entre os grupos analisados.

Significância estatística se $p \leq 0,05$.

* diferença significativa em relação ao CTRL.

diferença significativa em relação a CIS.

° diferença significativa entre tratamentos isolados e suas respectivas associações com CIS.

Fonte: O autor.

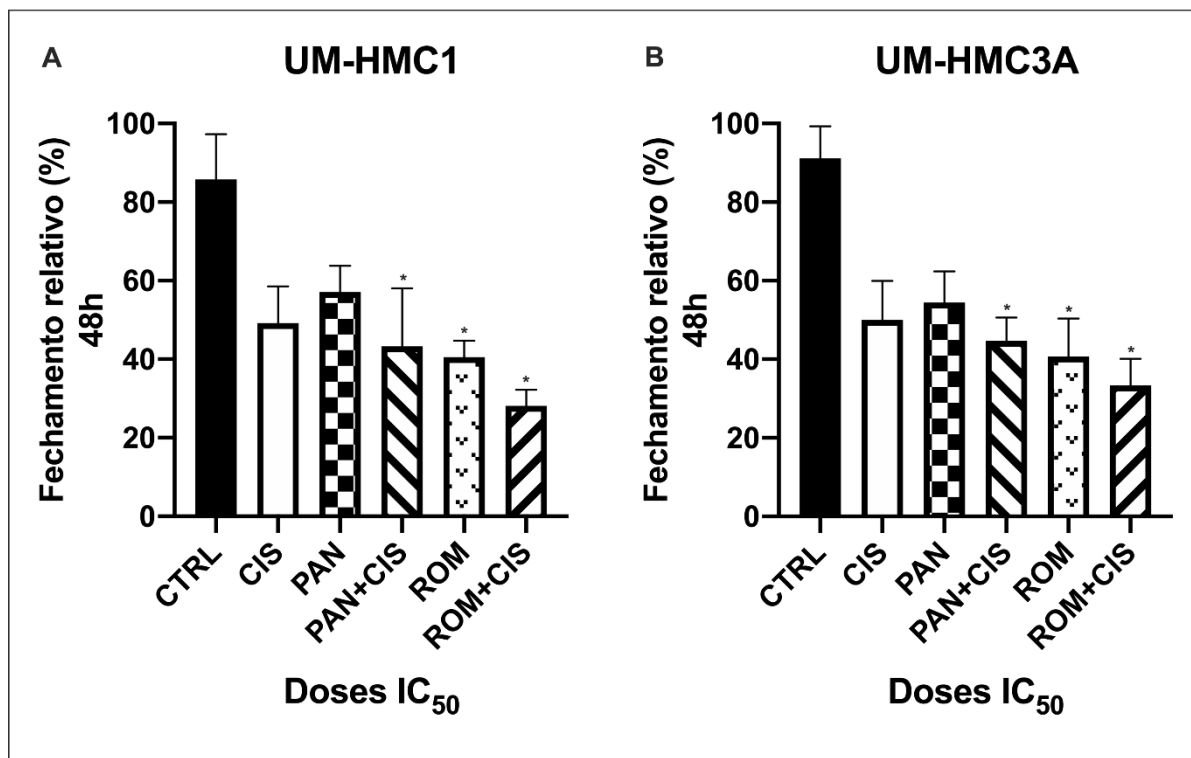
5.5 AÇÃO DOS FÁRMACOS SOBRE A CAPACIDADE DE MIGRAÇÃO E INVASÃO CELULAR

5.5.1 Análise da migração celular pelo ensaio de ferida

Este ensaio foi realizado com o objetivo de avaliar a capacidade dos fármacos iHDACs, e suas associações com a Cisplatina, de inibirem a migração celular coletiva horizontal. Assim, para evitar possíveis interferências do crescimento celular nos resultados de migração, a proliferação celular foi inibida com Mitomicina C, 4 horas antes da formação das “feridas” (T0). A migração celular foi acompanhada por 48h (tempo de tratamento padronizado neste estudo), e após este período, as áreas das feridas foram calculadas e expressas como fechamento relativo da área da “ferida”, em comparação com a área total no T0. A seguir, os dados foram normalizados em relação ao grupo controle.

Conforme mostrado na Figura 5.6, ambas as linhagens analisadas exibiram um padrão semelhante de migração celular na presença dos fármacos. Assim, apenas os tratamentos com ROM (UM-HMC1: $p = 0,013$ e UM-HMC3A: $p = 0,005$), ROM+CIS (UM-HMC1: $p < 0,0001$ e UM-HMC3A: $p = 0,0001$) e PAN+CIS (UM-HMC1: $p = 0,042$ e UM-HMC3A: $p = 0,0353$) foram capazes de inibir significativamente a migração celular, em relação ao grupo CTRL, após as 48h de tratamento. Essa inibição foi demonstrada pela porcentagem de fechamento da área total das “feridas” nesses grupos, visto que a redução do fechamento da área da “ferida”, é diretamente proporcional à capacidade dos fármacos de inibirem a migração celular.

Figura 5.6 - Percentual de fechamento das "feridas" (média \pm desvio padrão), normalizadas pelo grupo CTRL, após 48h de tratamento com as doses de IC₅₀ dos fármacos selecionados.



Teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's, para comparações múltiplas entre os grupos analisados.

Significância estatística se $p \leq 0,05$.

* diferença significativa em relação ao CTRL.

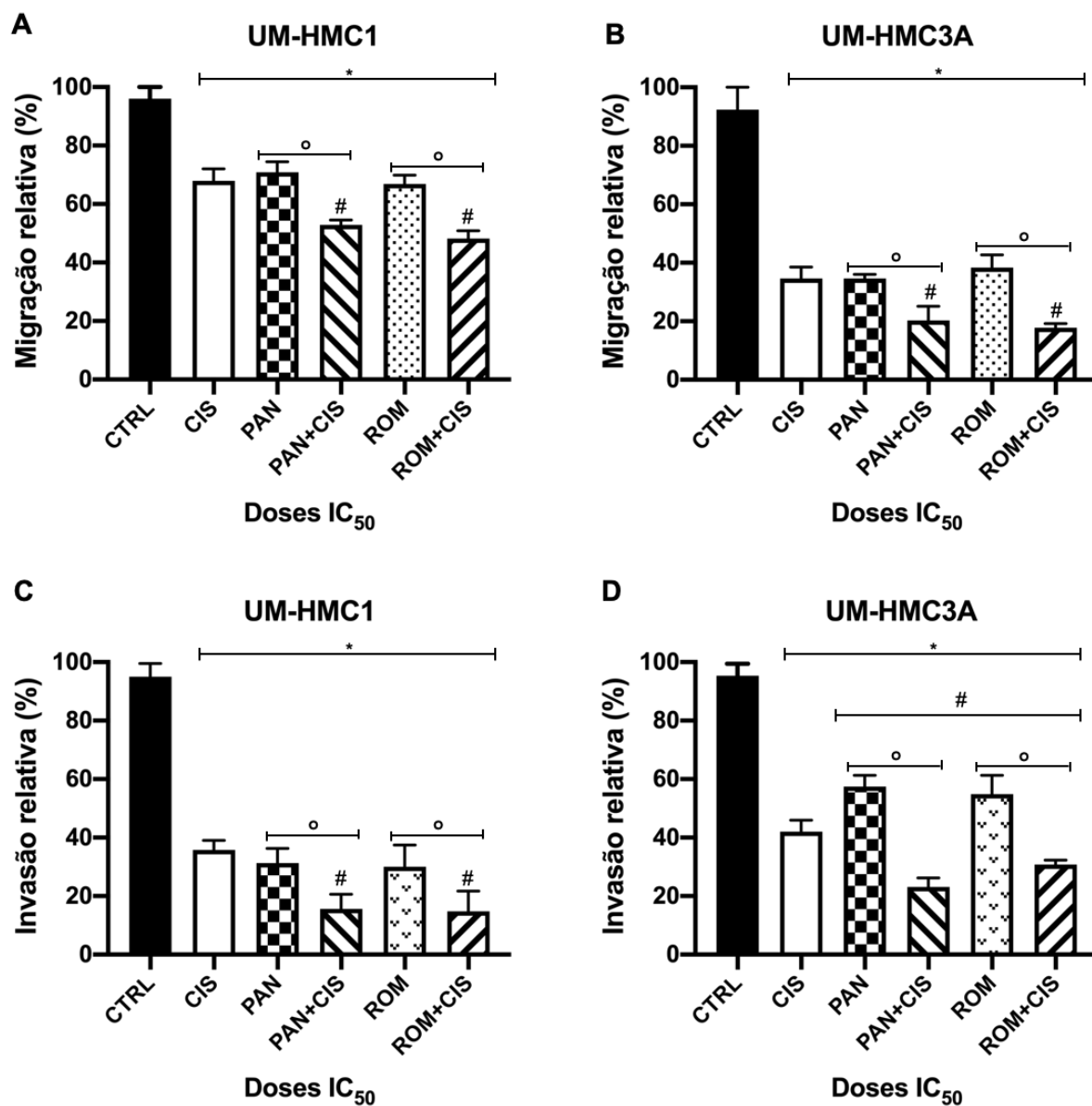
Fonte: O autor.

5.5.2 Análise da migração e invasão celular por *Transwell*

Estes ensaios foram realizados para investigar a capacidade de migração e invasão das células das linhagens UM-HMC1 e UM-HMC3A, que sobreviveram à 48h de tratamento com os fármacos iHDACs selecionados, e suas associações com a Cisplatina. Os resultados mostraram (Figura 5.7), que todos os tratamentos foram capazes de inibir significativamente a migração (A e B) e a invasão (C e D) celular, em ambas as linhagens celulares, quando comparados ao grupo CTRL. Além disso, os tratamentos com os fármacos associados (PAN+CIS e ROM+CIS) apresentaram um efeito inibitório significativamente maior, tanto na migração, quanto na invasão, em comparação com os fármacos ministrados isoladamente (PAN, ROM e CIS), nas duas linhagens avaliadas. Em relação aos tratamentos isolados, no grupo CIS houve

redução significativa do percentual de células invasivas na linhagem UM-HMC3A, comparado aos grupos tratados apenas com PAN e ROM, diferentemente do observado na linhagem UM-HMC1, e também na avaliação da migração celular.

Figura 5.7 – Percentual de células migratórias (A e B) e invasivas (C e D) (média \pm desvio padrão), normalizadas pelo grupo CTRL, após 48h de tratamento com as doses de IC₅₀ dos fármacos selecionados (e suas respectivas associações).



Análise de Variância Fatorial (1 x 1) seguida pelo teste de Tukey, para comparação das médias entre os grupos analisados. Significância estatística se $p \leq 0,05$.

* diferença significativa em relação ao CTRL.

diferença significativa em relação a CIS.

° diferença significativa entre tratamentos isolados e suas respectivas associações com CIS.

Fonte: O autor.

5.6 AÇÃO DOS FÁRMACOS SOBRE A EXPRESSÃO DE MARCADORES RELACIONADOS À CTTs POR CITOMETRIA DE FLUXO

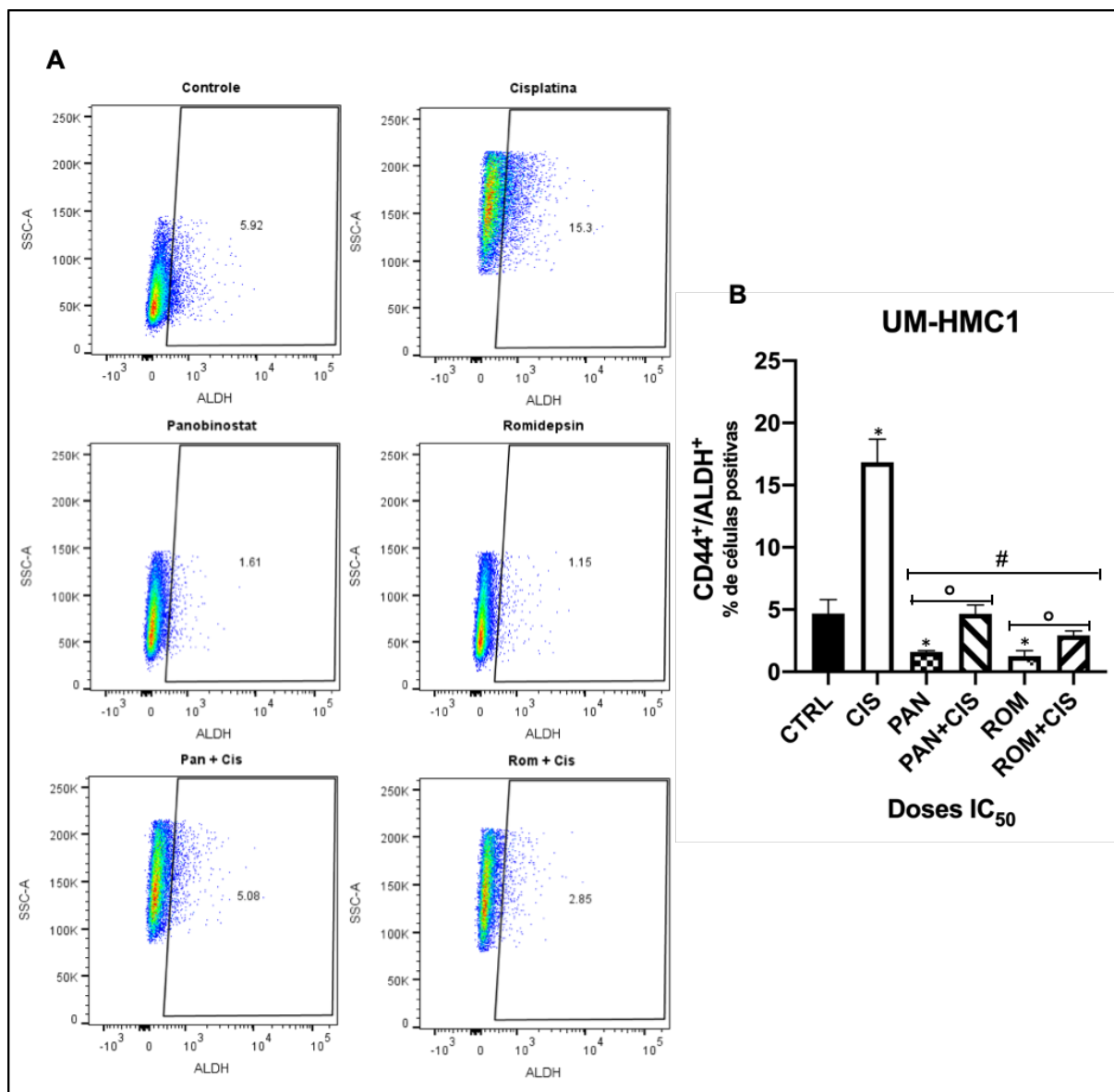
O efeito dos fármacos iHDACs, e suas associações com a Cisplatina, sobre as células tumorais com assinatura fenotípica ALDH⁺/CD44⁺, previamente identificadas como CTTs em linhagens celulares derivadas de CME, foi investigado pelo ensaio de citometria de fluxo. A análise foi realizada a partir da identificação da população celular total, de acordo com o seu tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). Células não viáveis (marcação positiva para DAPI) foram excluídas da análise, e a população com marcação positiva para CD44 foi selecionada. A seguir, as células que apresentaram atividade da enzima ALDH (ALDH⁺) foram identificadas dentro da população CD44⁺ e quantificadas.

Conforme evidenciado na Figura 5.8, nas análises com a linhagem UM-HMC1, o tratamento com CIS promoveu um aumento significativo das células ALDH⁺/CD44⁺, tanto em relação ao CTRL ($p < 0,0001$), quanto em relação aos grupos tratados com PAN e ROM ($p < 0,0001$), enquanto os tratamentos isolados com os iHDACs, reduziram, significativamente, a porcentagem dessas células comparado a o grupo CTRL (PAN, $p = 0,0186$ e ROM, $p = 0,0091$). Por outro lado, os tratamentos com as associações (PAN+CIS e ROM+CIS), não promoveram uma diminuição significativa da população ALDH⁺/CD44⁺, em relação ao grupo CTRL (PAN+CIS, $p > 0,9999$ e ROM+CIS, $p = 0,2870$), ainda que uma redução efetiva tenha ocorrido nas associações, em comparação ao tratamento apenas com CIS ($p < 0,0001$).

Em relação a linhagem UM-HMC3A (Figura 5.9), ao contrário do que foi observado para a linhagem UM-HMC1, os tratamentos isolados com PAN e ROM não foram efetivos, a ponto de promover uma diminuição significativa na população de células ALDH⁺/CD44⁺, quando comparados ao grupo CTRL (PAN, $p = 0,4222$ e ROM, $p = 0,2246$). O tratamento isolado com CIS, elevou significativamente a porcentagem de células positivas para ALDH/CD44, tanto em relação ao grupo CTRL ($p = 0,0009$), como em relação aos grupos tratados com PAN ($p < 0,0001$) e ROM ($p < 0,0001$). Além disso, as associações entre PAN+CIS e ROM+CIS, também elevaram significativamente a população com fenótipo ALDH⁺/CD44⁺, em comparação com os grupos tratados isoladamente com PAN ($p = 0,0004$) e ROM ($p = 0,0334$). Porém,

apenas a associação entre PAN+CIS, promoveu um aumento significativo em relação ao grupo CTRL ($p = 0.0081$).

Figura 5.8 - Frequência (%) de células positivas para marcadores de CTTs na linhagem UM-HMC1



(A) Gráficos representando a porcentagem de células com fenótipo ALDH⁺/CD44⁺ na linhagem UM-HMC1. **(B)** Análise de Variância Fatorial (1 x 1) seguida pelo teste de Tukey, para comparação das médias entre os grupos analisados. Significância estatística se $p \leq 0,05$.

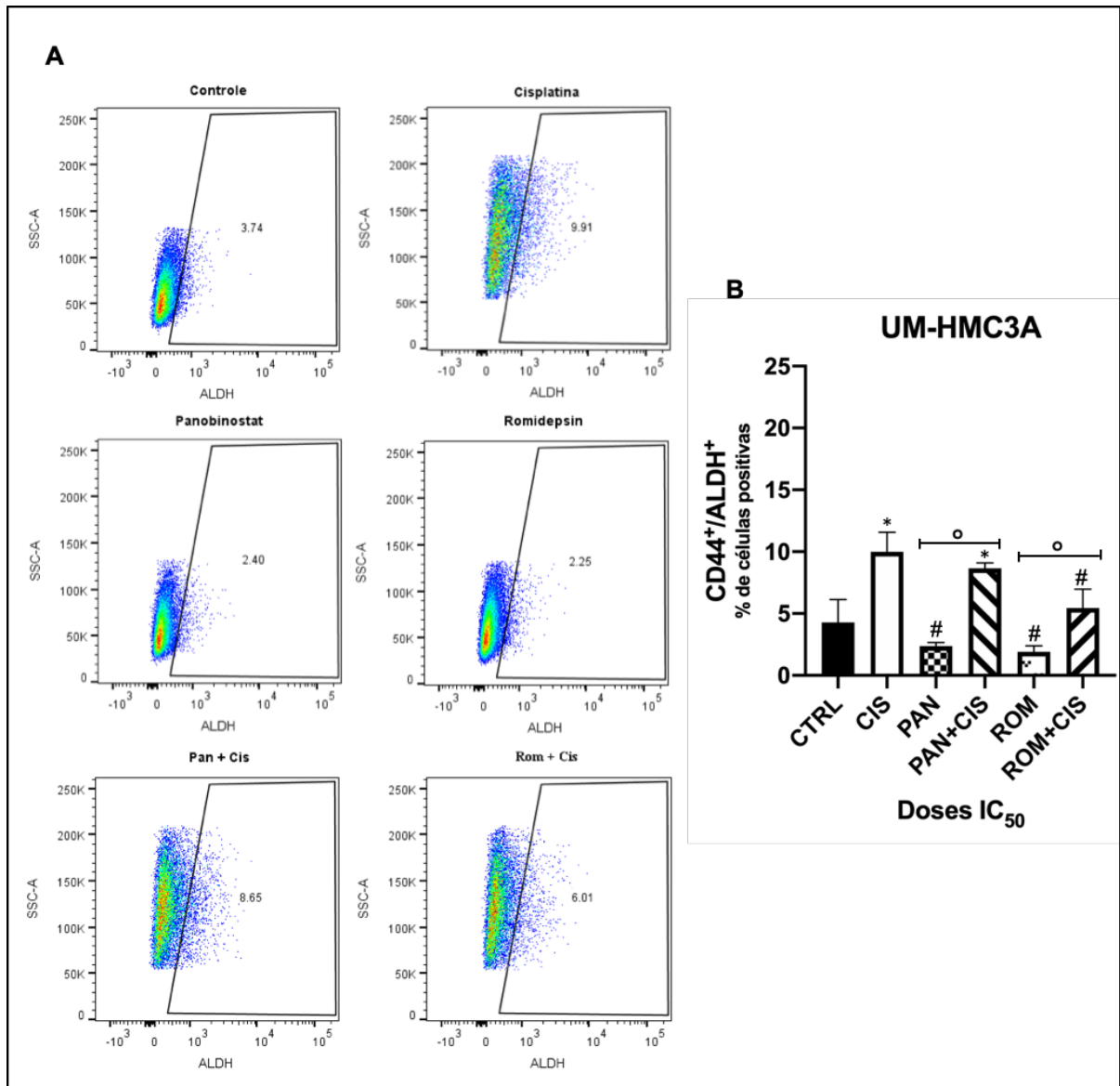
* diferença significativa em relação ao CTRL.

diferença significativa em relação a CIS.

° diferença significativa entre tratamento isolado e sua respectiva associação com CIS.

Fonte: O autor.

Figura 5.9 - Frequência (%) de células positivas para marcadores de CTTs na linhagem UM-HMC3A



(A) Gráficos representando a porcentagem de células com fenótipo ALDH⁺/CD44⁺ na linhagem UM-HMC3A. **(B)** Análise de Variância Fatorial (1 x 1) seguida pelo teste de Tukey, para comparação das médias entre os grupos analisados. Significância estatística se $p \leq 0,05$.

* diferença significativa em relação ao CTRL.

diferença significativa em relação a CIS.

° diferença significativa entre tratamento isolado e sua respectiva associação com CIS.

Fonte: O autor.

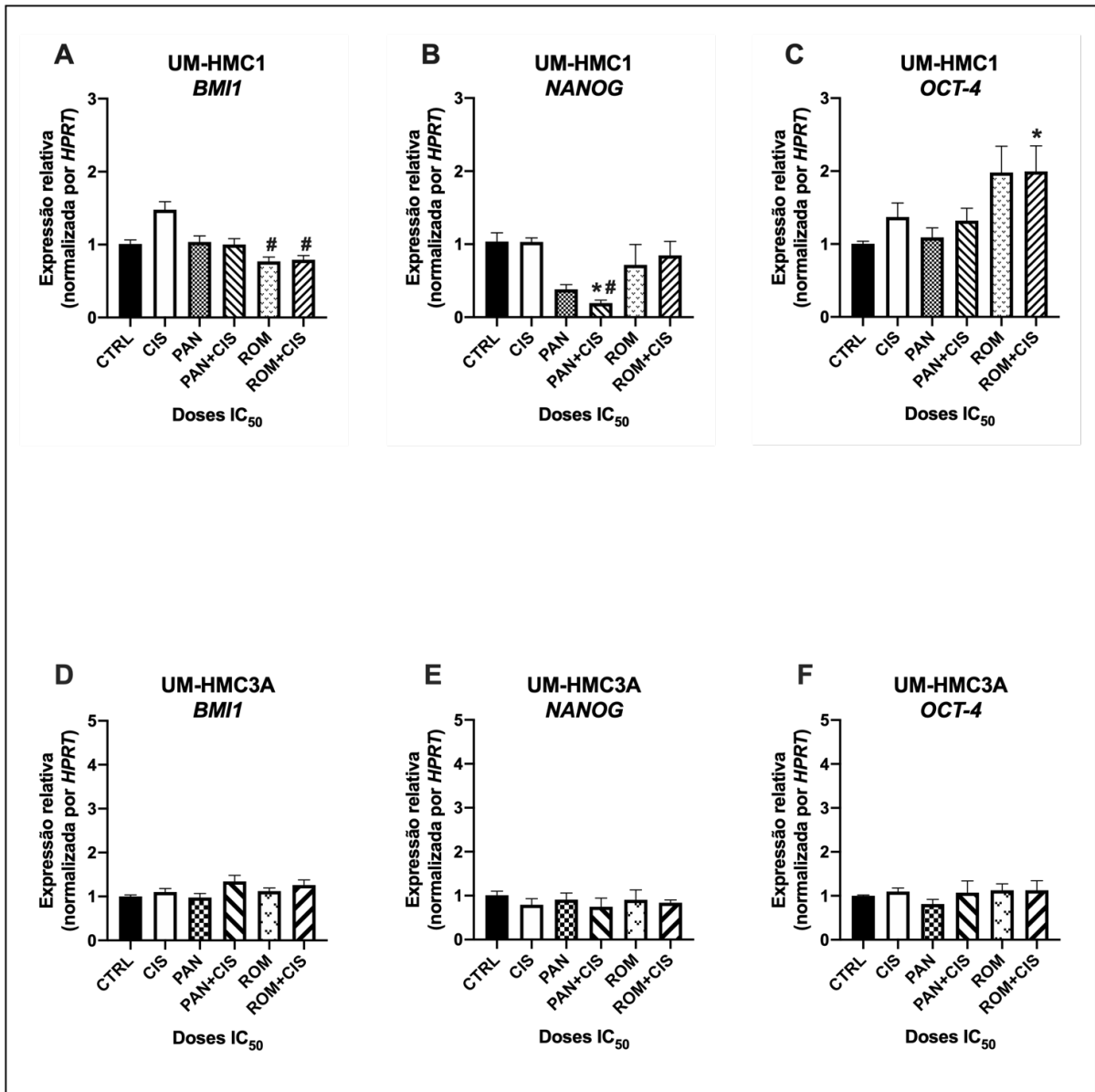
5.7 AÇÃO DOS FÁRMACOS SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À CTTs POR RT-qPCR

Análises de RT-qPCR foram utilizadas para avaliar a ação dos fármacos selecionados, sobre a expressão gênica de alguns marcadores de CTTs, já utilizados no CME. Esses genes estão associados aos processos de pluripotência e autorrenovação celular (*BMI1*, *OCT-4* e *NANOG*). A análise dos dados foi realizada pelo método de Pfaffl (2001) (158), no qual as expressões relativas dos genes alvos foram calculadas em relação ao grupo CTRL e normalizadas pelo gene constitutivo *HPRT*.

Os resultados mostraram, que a expressão da *OCT-4* na linhagem UM-HMC1 só foi afetada, significativamente, pelo tratamento com ROM+CIS, que promoveu o aumento nos níveis de expressão deste gene, quando comparado ao grupo CTRL (Figura 5.10 C). Já em relação ao *NANOG*, o tratamento com PAN+CIS reduziu, significativamente, a expressão deste gene, tanto em relação ao CTRL, quanto em relação ao grupo tratado com CIS (Figura 5.10 B). Contudo, a análise do *BMI-1* revelou que os tratamentos com ROM e ROM+CIS, até promoveram uma redução nos níveis deste gene, porém, essa diminuição só foi estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com CIS, e não em relação ao grupo CTRL, como era esperado (Figura 5.10 A).

Diferentemente do que foi observado na linhagem UM-HMC1, nenhum dos tratamentos com os iHDACs, tão pouco, suas associações com a Cisplatina, foram capazes de alterar, de forma significativa, os níveis de expressão dos genes *BMI-1*, *NANOG* e *OCT-4* na linhagem UM-HMC3A (Figura 5.10 D, E e F).

Figura 5.10 - Expressão relativa de genes relacionados à CTTs (média \pm desvio padrão), após 48h de tratamento com as doses de IC₅₀ dos fármacos selecionados.



Teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's, para comparações múltiplas entre os grupos analisados. Significância estatística se $p \leq 0,05$. *diferença significativa em relação ao CTRL. #diferença significativa em relação a CIS.

Fonte: O autor

5.8 AÇÃO DOS FÁRMACOS SOBRE O PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À CTTs POR qPCR ARRAY

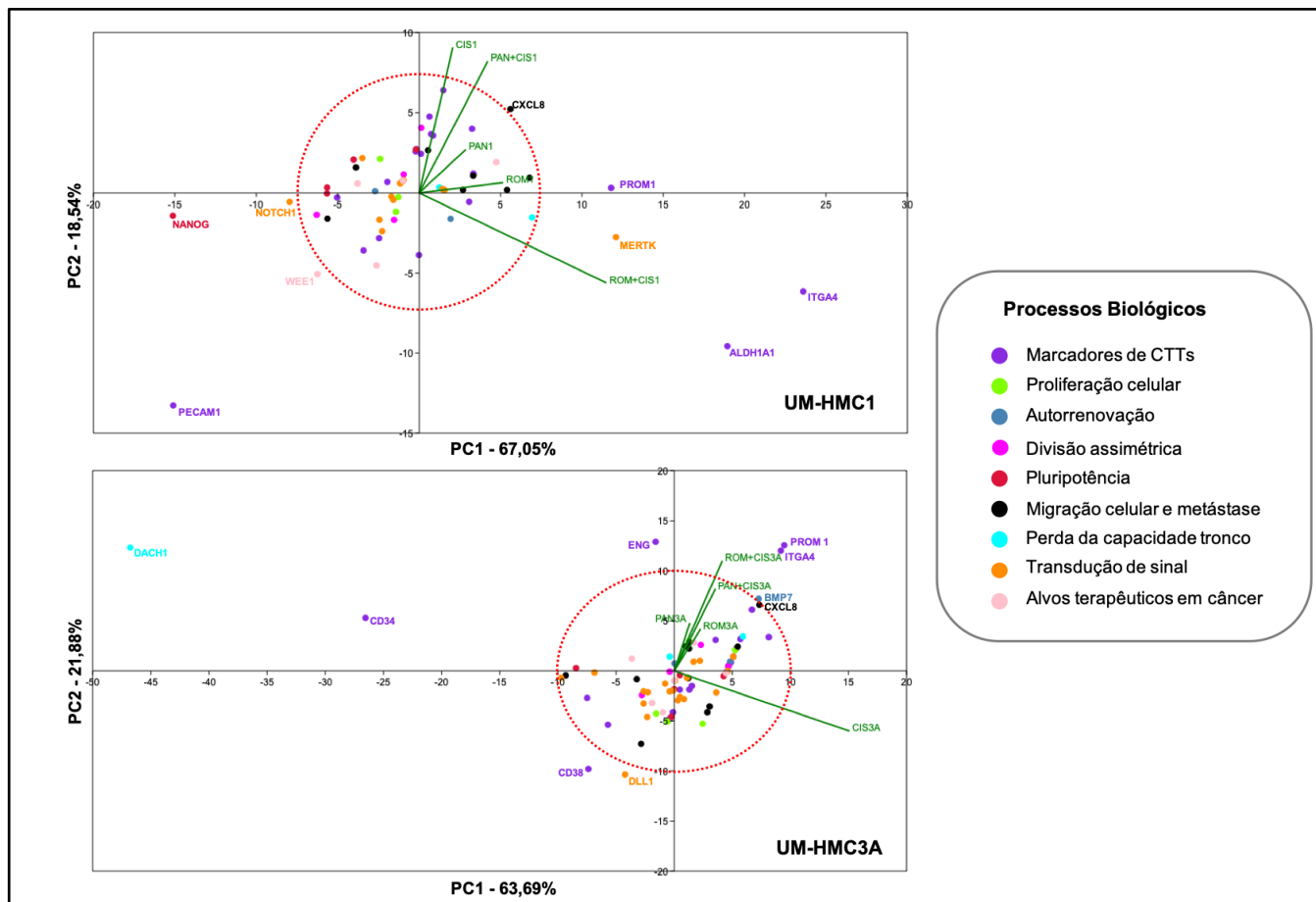
5.8.1 Identificação dos genes diferencialmente expressos pela Análise de Componentes Principais (PCA)

A Análise de Componentes Principais (PCA) foi realizada em um conjunto de dados de expressão gênica, a partir dos 84 genes relacionados a CTTs, avaliados por PCR array, com o objetivo de reduzir as informações obtidas, e identificar os genes que melhor representaram a variância dos dados nas linhagens de CME, após os tratamentos com os fármacos. Para isso, a expressão relativa dos genes foi previamente analisada pelo método $\Delta\Delta CT$ e, em seguida, o *Fold change* foi calculado. Apenas os genes que se mostraram diferencialmente expressos em pelo menos um tratamento, em relação ao grupo CTRL (*fold change* < -2 (subexpressão) ou *fold change* > 2 (superexpressão)), foram incluídos na análise de PCA.

De acordo com os resultados do PCA, juntos, os Componentes Principais 1 e 2 (PC1 e PC2) foram capazes de explicar 85,57% da variância dos dados na linhagem UM-HMC1 (Figura 5.11 A) e 85,58% na linhagem UM-HMC3A (Figura 5.11 B). De um modo geral, todos os tratamentos realizados foram capazes de alterar a expressão de genes relacionados com as CTTs, em níveis variados, com destaque para os tratamentos com ROM+CIS e CIS, que exerceram maior influência sobre a variância dos dados nas linhagens UM-HMC1 e UM-HMC3A, respectivamente.

Os genes que melhor representaram a variância dos dados na linhagem UM-HMC1 e UM-HMC3A, foram definidos a partir de limites (*cut off*), estabelecidos com base na distribuição espacial dos dados no gráfico *biplot*, bem como, pela expressão diferencial desses genes em relação ao grupo CTRL. Para tanto, os genes posicionados fora do limite estabelecido (circunferência tracejada no *biplot*), foram considerados para a análise do perfil de expressão gênica qualitativa. Adicionalmente, as Tabelas 5.1 e 5.2 sintetizam a expressão diferencial dos 9 genes que melhor representam a variância dos dados em cada linhagem, e os agrupam de acordo com os principais processos biológicos no qual estão envolvidos.

Figura 5.11 - Análise por Componentes Principais (PCA) da expressão diferencial dos genes relacionados à CTTs avaliados por PCR array, após o tratamento com as doses de IC₅₀ dos fármacos iHDACs e suas associações com a Cisplatina.



Os pontos coloridos representam diferentes genes, que foram agrupados por cores, de acordo com o processo biológico do qual fazem parte.

Fonte: O autor

5.8.2 Perfil qualitativo da expressão diferencial dos genes identificados pela análise de PCA

5.8.2.1 Perfil de expressão gênica da linhagem UM-HMC1

Conforme demonstrado na Tabela 5.1, dentre os nove genes que se destacaram na linhagem UM-HMC1, quatro deles são utilizados como marcadores de CTTs (*PROM1*, *ITGA4*, *ALDH1A1*, *PECAM1*). A expressão relativa dos genes *PROM1* e *ITGA4* não foram alteradas diferencialmente pelo tratamento com CIS, em relação ao grupo CTRL. Entretanto, o tratamento com ROM, bem como, a associação dos iHDACs com CIS (PAN+CIS e ROM+CIS) promoveram uma superexpressão desses genes, evidenciada de forma mais marcante no grupo tratado com ROM+CIS. Interessantemente, apenas o gene *PROM1* foi diferencialmente expresso após o tratamento com PAN. Em relação a expressão de *ALDH1A1*, os resultados mostraram uma regulação negativa deste gene pelo tratamento com CIS, enquanto os iHDACs isolados, promoveram a sua superexpressão. Curiosamente, a associação entre ROM+CIS promoveu um aumento marcante, enquanto o tratamento com PAN+CIS não afetou diferencialmente a expressão desse gene. Por outro lado, o gene *PECAM1*, apresentou um perfil de expressão homogêneo e foi regulado negativamente em todos os grupos tratados, com destaque para o tratamento com CIS.

NANOG (relacionado a pluripotência celular) e *NOTCH1* (transdutor de sinal) foram outros genes que se destacaram, exibindo um perfil de expressão semelhante, foram regulados negativamente pelos iHDACs e suas associações com a CIS. Além desses, o gene *MERTK*, outro transdutor de sinal avaliado, mostrou expressão diferencial apenas nos grupos tratados com CIS e ROM+CIS, com destaque para o aumento importante observado no grupo associado (ROM+CIS). Enquanto *CXCL8*, um gene relacionado a processos de migração celular e metástase, foi superexpresso em todos os tratamentos, com exceção do grupo PAN; e *WEE1*, um importante alvo terapêutico em câncer, foi regulado negativamente em todos os grupos tratados, com exceção do tratamento com ROM, que não alterou a expressão deste gene.

Tabela 5.1 - Expressão gênica (*fold change*) dos genes identificados pela análise de PCA na linhagem UM-HMC1, após o tratamento com as doses de IC₅₀ dos fármacos iHDACs e suas associações com a Cisplatina, em relação ao grupo controle.

Processos biológicos	Genes	Expressão gênica em relação ao grupo CTRL (<i>Fold-change</i> *)				
		CIS	PAN	PAN+CIS	ROM	ROM+CIS
Marcadores de CTTs	<i>PROM1</i>	+1,31	+2,90	+3,48	+7,25	+9,49
	<i>ITGA4</i>	+1,31	+1,01	+4,17	+5,70	+24,77
	<i>ALDH1A1</i>	-4,10	+2,28	+1,82	+4,61	+21,39
	<i>PECAM1</i>	-10,54	-6,57	-14,54	-4,48	-6,55
Pluripotência	<i>NANOG</i>	-1,87	-6,78	-6,0	-14,15	-7,22
Migração celular e metástase	<i>CXCL8</i>	+2,40	+1,45	+6,36	+2,25	+3,57
Transdução de sinal	<i>NOTCH1</i>	+1,98	-3,83	-4,41	-4,14	-4,45
	<i>MERTK</i>	+2,99	+1,01	+1,34	+1,53	+14,55
Alvos terapêuticos em câncer	<i>WEE1</i>	-8,90	-2,61	-2,35	-1,75	-3,72

*Os níveis de expressão gênica foram considerados como diferenciais, em relação ao grupo controle, se: *fold change* < -2 (subexpressão) ou *fold change* > 2 (superexpressão).

Fonte: O autor.

5.8.2.2 Perfil de expressão gênica da linhagem UM-HMC3A

Na linhagem UM-HMC3A, foram selecionados nove genes que se destacaram nas análises de PCA (Tabela 5.2). Desses, cinco genes são conhecidos como marcadores de CTTs (*PROM1*, *ITGA4*, *CD38*, *CD34* e *ENG*) e os outros 4 estão envolvidos em processos biológicos como autorrenovação (*BMP7*), migração celular e metástase (*CXCL8*), perda da capacidade tronco (*DACH1*) e transdução de sinal (*DLL1*).

De modo semelhante ao observado na linhagem UM-HMC1, os genes *PROM1* e *ITGA4* foram superexpressos após os tratamentos com os iHDACs e suas associações com a CIS. Já o marcador *CD38*, foi regulado negativamente, tanto pelos tratamentos isolados (CIS, PAN e ROM) quanto pela associação entre PAN+CIS. O gene *CD34*, acompanhou o perfil de expressão exibido pelo *CD38*, sem, contudo, ter sua expressão alterada pelo tratamento com PAN. Outro marcador de CTTs que se destacou foi o *ENG*, que exibiu uma grande regulação negativa no grupo tratado com CIS. Curiosamente, a associação entre ROM+CIS induziu um grande aumento na expressão de *ENG*, apesar do tratamento isolado com ROM não ter alterado a sua expressão.

Em relação ao *BMP7*, gene envolvido com o processo de autorrenovação celular, apenas a associação entre ROM+CIS promoveu o aumento da expressão gênica. Para o *CXCL8*, diferentemente do que ocorreu na linhagem UM-HMC1, apenas os tratamentos associando os iHDACs com a CIS (PAN+CIS e ROM+CIS) induziram superexpressão deste gene. Por sua vez, o gene *DACH1*, relacionado à perda da capacidade tronco, só não teve a sua expressão alterada no grupo tratado com PAN. Nos demais grupos, houve uma regulação negativa desse gene, de forma mais pronunciada após o tratamento com CIS. Enquanto o *DLL1*, gene que está relacionado ao processo de transdução de sinal, foi subexpresso após todos os tratamentos, com exceção do grupo tratado com ROM+CIS, no qual a expressão de *DLL1* não foi alterada efetivamente.

Tabela 5.2 - Expressão gênica (*fold change*) dos genes selecionados pela análise de PCA na linhagem UM-HMC3A, após o tratamento com as doses de IC₅₀ dos fármacos iHDACs e suas associações com a Cisplatina, em relação ao grupo controle.

Processos biológicos	Genes	Expressão Gênica Diferencial em relação ao grupo CTRL (<i>Fold-change</i> *)				
		CIS	PAN	PAN+CIS	ROM	ROM+CIS
Marcadores de CTTs	<i>PROM1</i>	+1,18	+2,42	+4,39	+3,08	+15,69
	<i>ITGA4</i>	-1,54	+4,77	+4,30	+2,63	+14,09
	<i>CD34</i>	-30,69	+1,26	-6,53	-3,80	+1,65
	<i>ENG</i>	-10,32	-1,70	-1,70	-1,13	+16,06
	<i>CD38</i>	-7,50	-12,20	-11,64	-5,24	+1,00
Autorrenovação	<i>BMP7</i>	-1,72	+1,33	-1,29	-1,88	+13,29
Migração celular e metástase	<i>CXCL8</i>	+1,85	+1,81	+10,12	-1,22	+4,85
Perda da capacidade tronco	<i>DACH1</i>	-52,22	-1,28	-3,28	-3,58	-3,90
Transdução de sinal	<i>DLL1</i>	-3,97	-3,21	-14,36	-7,26	-1,06

*Os níveis de expressão gênica foram considerados como diferenciais, em relação ao grupo controle, se: *fold change* < -2 (subexpressão) ou *fold change* > 2 (superexpressão).

Fonte: O autor.

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho, demonstrou-se, pela primeira vez, o efeito dos tratamentos com Panobinostat (PAN) e Romidepsin (ROM), dois inibidores de histonas deacetilases (iHDACs), como terapia única e em associação com a Cisplatina (CIS), sobre o fenótipo tronco-tumoral e a expressão de genes relacionados às células-tronco de câncer (CTTs), em linhagens de carcinoma mucoepidermoide de glândula salivar menor (CME). Inicialmente, hipotetizou-se que os fármacos iHDACs apresentariam efeitos antitumorais sobre linhagens de CME e que tanto isoladamente, quanto em associação com a CIS, eles poderiam atuar sobre as CTTs, podendo, inclusive, reduzir, *in vitro*, a resistência tumoral do CME à CIS.

Sabe-se que a resistência à quimioterapia, que ocorre após a seleção e a repopulação tumoral pelas células resistentes ao tratamento (160), ainda representa um dos principais desafios no tratamento de carcinomas de cabeça e pescoço. Apesar de pouco elucidada, essa resistência tem sido associada à presença das CTTs na população intratumoral, uma vez que, essa pequena população apresenta mecanismos de evasão/resistência (137), que lhes permite escapar da radioterapia (17) e da quimioterapia convencional (15), além de possuírem a capacidade de iniciar e manter o crescimento de uma nova população (137), favorecendo as recidivas e contribuindo para as metástases tumorais.

As CTTs já foram identificadas em linhagens celulares derivadas de CME de glândulas salivares menores e representam menos de 5% do total de células tumorais (23,106), o que pode justificar a resistência deste tumor ao tratamento. Consequentemente, o CME conta, ainda hoje, com limitadas opções de tratamento, já que a quimioterapia é utilizada apenas como terapia adjuvante, em casos de tumores irresssecáveis, recorrentes ou metastáticos, sem que haja melhora significativa na sobrevida dos pacientes (161).

A Cisplatina, por exemplo, pertence ao pequeno grupo de quimioterápicos, disponíveis para serem utilizados em tumores de glândulas salivares (64). Esse fármaco foi aprovado pela FDA em 1978 e desde então, tem sido amplamente utilizado no tratamento de tumores sólidos, incluindo os cânceres de cabeça e pescoço, de

modo que, aproximadamente 50% de todos os pacientes com câncer, em todo o mundo, são tratados com Cisplatina (162). A CIS atua danificando o DNA genômico e mitocondrial, e exerce a sua atividade antitumoral, através de múltiplas vias que levam à apoptose, sendo que o estresse oxidativo é o mecanismo de ação mais comum, embora alterações nos mecanismos de reparo de DNA e a parada do ciclo celular, também contribuam para o efeito citotóxico desse quimioterápico (162).

Contudo, apesar de pouco elucidada, a resistência tumoral à CIS tem sido associada à mecanismos moleculares envolvidos na permanência intracelular dos fármacos, na sua inativação citosólica, bem como no aumento da capacidade de reparo do DNA, por parte das CTTs (163,164). Além disso, já foi verificado que a sinalização mitogênica do NF- κ B está envolvida na aquisição de resistência à CIS (109). No CME, já foi verificado a existência de uma superativação intrínseca na sinalização do NF- κ B (17), e essa ativação, já foi relacionada com a redução da apoptose, e com o aumento na desacetilação das histonas (compactação da cromatina) (109).

As enzimas histonas acetiltransferases (HATs) e histonas deacetilases (HDACs), participam, em conjunto, regulando a expressão de genes envolvidos na proliferação, diferenciação e migração celular (20). Contudo, a expressão inapropriada de HDACs nas células cancerígenas, promove o silenciamento de genes supressores de tumor, reguladores do ciclo celular, além de indutores de apoptose. Além disso, as HDACs também estão envolvidas na manutenção das CTTs, através da regulação de vias associadas à autorrenovação, e redução da transcrição de genes relacionados à diferenciação celular (137,165).

Nesse contexto, fármacos iHDACs tem se destacado na oncologia, por induzirem a hiperacetilação das histonas (modificação pós-traducional que controla o acesso ao DNA, através da configuração da cromatina) (20), podendo, teoricamente, reverter a resistência à Cisplatina. Estudos recentes têm apresentado os iHDACs como uma estratégia promissora no combate às CTTs (137). Entretanto, existem apenas quatro iHDACs aprovados pela FDA para serem utilizados como terapia antitumoral (Vorinostat, Belinostat, Panobinostat e Romidepsin) (25) e desses, até o momento, apenas o Vorinostat (SAHA) já foi testado em linhagens de CME (5,15,23). Assim, embora todos iHDACs compartilhem uma atividade inibitória sobre as enzimas

HDACs, esses fármacos apresentam estruturas químicas distintas, o que lhes confere diferenças importantes em termos de farmacocinética, eficiência, potência e efeitos adversos (166). Além disso, as diferenças exibidas pelos iHDACs em relação à especificidade para as diferentes classes de HDACs, também são bastante relevantes, já que estas enzimas são diferencialmente expressas em diversos tipos de câncer. Logo, um mesmo iHDAC pode apresentar eficácia diferencial em diferentes tipos de câncer (123,126). Somado a isso, o desconhecimento, quase que completo, acerca do padrão de expressão das HDACs no CME, ressalta, ainda mais, a necessidade de novos estudos com iHDACs em linhagens de CME.

Portanto, este estudo se propôs a avaliar, *in vitro*, o efeito dos tratamentos com fármacos iHDACs, como terapia única e em associação com a Cisplatina, sobre o fenótipo tronco-tumoral e a expressão de genes relacionados às CTTs, em linhagens de CME de glândula salivar menor. Para tanto, os principais resultados obtidos neste estudo foram sintetizados e estão apresentados no Quadro 6.1.

Quadro 6.1 - Resumo dos principais resultados encontrados no desenvolvimento das metodologias do presente trabalho

Efeito dos tratamento sobre:	Ensaio	Linhagens celulares analisadas	
		UM-HMC1	UM-HMC3A
Migração coletiva	Ensaio de “Ferida”	Redução significativa apenas nos grupos tratados com ROM isoladamente e nas associações entre ROM+CIS e PAN+CIS	
Migração individual	Migração por <i>transwell</i>	Redução significativa em todos os grupos analisados	
Invasão	Invasão por <i>transwell</i>	Redução significativa em todos os grupos analisados	
Clonogenicidade	Formação de Colônias – <i>Tratamento prévio (48 horas)</i>	Redução significativa apenas nos grupos tratados com CIS isoladamente e as associações entre ROM+CIS e PAN+CIS	
	Formação de Colônias – <i>Tratamento concomitante (prolongado)</i>	Redução significativa em todos os grupos analisados	
Autorrenovação	Formação de Esferas – <i>Tratamento prévio (48 horas)</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Redução significativa nos grupos tratados com PAN e ROM • Aumento significativo no grupo tratado com CIS 	
	Formação de Esferas – <i>Tratamento concomitante (prolongado)</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Redução significativa nos grupos tratados com PAN, ROM e nos grupos em associação com a Cisplatina (ROM+CIS e PAN+CIS) • Aumento significativo no grupo tratado com CIS 	
CTTs	Citometria de fluxo (ALDH ⁺ /CD44 ⁺)	<ul style="list-style-type: none"> • Redução significativa nos grupos tratados com PAN e ROM • Aumento significativo no grupo tratado com CIS 	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento significativo nos grupos tratados com CIS e PAN+CIS
Expressão de genes relacionados às CTTs	RT-qPCR Genes: <i>BMI-1</i> , <i>NANOG</i> , <i>OCT4</i>	<ul style="list-style-type: none"> • BMI-1: sem alteração • NANOG: redução significativa no grupo tratado com PAN+CIS • OCT-4: aumento significativo no grupo tratado com ROM+CIS 	Nenhum dos tratamentos alteraram significativamente a expressão dos genes analisados

Assim, além da avaliação dos efeitos dos iHDACs administrados individualmente, tratamentos em associação com a CIS (PAN+CIS e ROM+CIS) também foram realizados, para verificar a existência de um possível efeito sinérgico proveniente dessa interação. Além disso, a possibilidade dessa associação reduzir a resistência à CIS, também foi analisada, já que, tanto a população com fenótipo tronco-tumoral (ALDH⁺/CD44⁺), quanto as células capazes de formar esferas, apresentaram resistência ao tratamento com CIS e, inclusive, foram estimuladas, principalmente na modalidade de tratamento prévio.

Em vista disso, na primeira etapa deste estudo foi realizado o escaneamento de diversos compostos frente as linhagens de CME, a partir do qual, foram selecionados os dois iHDACs avaliados neste estudo, Panobinostat e Romidepsin. Ambos os iHDACs (PAN e ROM), exibiram efeitos antitumorais, em baixas doses, reduzindo tanto o crescimento, quanto a viabilidade celular. Dentre eles, observou-se que ROM, um inibidor seletivo para HDACs de classe I, foi mais potente que o PAN, considerado um pan-inibidor de HDACs, sobre as linhagens de CME, já que as doses de IC₅₀ encontradas para este último fármaco, foram consideravelmente maiores, nas duas linhagens celulares analisadas.

As doses de IC₅₀ utilizadas, foram estabelecidas levando-se em consideração o período de 48h de tratamento, com base em modelos de regressão não linear. Para tanto, utilizou-se o ensaio SRB para mensurar os valores de crescimento celular, em cada dose testada, já que esse método apresenta bom rendimento e alta sensibilidade com baixo número de células, além de apresentar desempenho similar ao Brometo tiazolil azul de tetrazólio (MTT) (167,168). Entretanto, na medida em que a SRB consegue avaliar apenas o crescimento celular, não diferenciando, portanto, células vivas de células mortas (154), optou-se por verificar se as doses de IC₅₀ estabelecidas, também apresentavam efeitos sobre a viabilidade celular. Com isso, o ensaio de MTS, que avalia a atividade metabólica das enzimas mitocondriais (169), foi realizado e confirmou que os fármacos exibem, além do efeito citostático, um efeito citotóxico sobre as linhagens celulares derivadas de CME, utilizadas neste estudo.

Em seguida, foram realizados ensaios para avaliar as ações dos fármacos, frente a processos envolvidos com a metástase tumoral (migração e invasão celular), uma vez que a metástase a distância é a principal causa de mortes em pacientes com

CME (170); e que a progressão do câncer oral, em geral, vem acompanhada por um aumento na desacetilação das histonas e dos marcadores de TEM (171). A TEM é um dos principais mecanismos envolvidos no processo de metástase (172), na medida em que as células epiteliais vão adquirindo características mesenquimais, que lhes permite penetrar na membrana basal e migrar, através da matriz extracelular, até cair na corrente sanguínea e se disseminar pelo corpo (173,174). Essas células podem se mover individualmente ou coletivamente e podem circular como células isoladas (células tumorais circulantes), ou como agregados celulares (microêmbolos tumorais circulantes), respectivamente (175). Apesar de ambos os modelos de células circulantes terem sido identificados nos cânceres epiteliais (176), trabalhos recentes sugerem que as células que migram coletivamente, são a forma mais dominante e agressiva em circulação, tendo sido, inclusive, associadas a um pior prognóstico em alguns tipos de câncer (177,178).

Assim, os ensaios de migração e invasão celular por *transwell*, foram realizados para verificar se os iHDACs (PAN e ROM), e suas associações com a CIS, seriam capazes de inibir o processo de migração e invasão das células tumorais, quando tratadas com doses correspondentes aos valores de IC₅₀. Os resultados obtidos mostraram que 48h de tratamento com PAN e ROM, isoladamente, foram capazes de inibir a migração individual e a invasão celular, nas duas linhagens de CME. Além disso, aparentemente, a associação dos iHDACs com a CIS, promoveu um efeito sinérgico entre os fármacos, potencializando os efeitos dos tratamentos isolados com CIS, PAN e ROM. Embora, apenas o tratamento com ROM e os tratamentos em associação com a CIS, tenham conseguido inibir significativamente o processo de migração coletiva das células tumorais, como demonstrado pelo ensaio de “ferida”. É importante salientar, que no ensaio de “ferida” foi utilizado um fármaco inibidor da síntese de DNA (Mitomicina C), em baixas doses, para interromper a proliferação celular, já que este tipo de ensaio, quando realizado por mais de 24h, não permite diferenciar proliferação de motilidade celular (179).

Na sequência, avaliou-se o efeito dos tratamentos com os iHDACs (PAN e ROM), e suas associações com a CIS, em doses correspondentes aos valores de IC₅₀, sobre duas importantes propriedades (clonogenicidade e autorrenovação), relacionadas a população de CTTs, já que, evidências recentes, têm sugerido que os iHDACs atuam melhor sobre células com fenótipo tronco-tumoral (15). Além disso,

acredita-se que as alterações no “*status*” da cromatina nas CTTs, sejam mantidas pela desacetilação das histonas, que está envolvida, entre outras coisas, com a ativação de genes relacionados à CTTs (20,180).

Para tanto, os ensaios de formação de colônias e esferas, foram realizados utilizando-se duas abordagens metodológicas distintas: 1- tratamento prévio e 2- tratamento concomitante. Na primeira abordagem (*tratamento prévio*), as células foram tratadas, por 48h, com os fármacos, e, posteriormente, as propriedades de clonogenicidade e autorrenovação, foram avaliadas nas células sobreviventes ao tratamento. Contudo, na segunda abordagem, essas propriedades foram avaliadas em condições de desacetilação, obtida pela presença prolongada dos fármacos no meio de cultivo, concomitantemente ao crescimento das colônias (21 dias) e esferas tumorais (7 dias).

O ensaio de formação de colônias, foi realizado para avaliar a capacidade de uma única célula se autorrenovar em colônias de 50 ou mais células, quando plaqueadas em baixa densidade (capacidade clonogênica) (181). Neste trabalho, os resultados mostraram que nenhum dos iHDACs avaliados (PAN e ROM), atuaram eficientemente sobre a capacidade clonogênica das CTTs, após 48h de tratamento (*tratamento prévio*), uma vez que, não houve redução significativa no número de colônias formadas, quando comparado ao grupo sem tratamento (CTRL). Além disso, ao contrário do que foi observado no ensaio de esferas, as colônias tumorais se mostraram bastante sensíveis ao tratamento com CIS e foram mais resistentes aos tratamentos isolados com os iHDACs, tanto na linhagem UM-HMC1, quanto na UM-HMC3A. Porém, quando associados, esses tratamentos (PAN+CIS e ROM+CIS) conseguiram reverter a “resistência” exibida aos iHDACs.

Interessantemente, as colônias tumorais foram drasticamente afetadas por todos os fármacos, quando submetidas à abordagem de tratamento concomitante. Esses resultados sugerem, que os iHDACs só são efetivos na redução das colônias tumorais, quando estão em contato direto com as células (*tratamento concomitante*), já que a retirada dos fármacos, após o tratamento prévio, não conseguiu reduzir, significativamente, o número de colônias formadas. Parag-Sharma et al., (2021) observaram resultados semelhantes, ao constatar que o SAHA (iHDAC que atua sobre HDACs de classe I e II) só apresentou efeito inibitório sobre as colônias,

enquanto foi mantido em contato com as células (5). Para além disso, notou-se que a retirada desse fármaco provocou um crescimento exacerbado das colônias tumorais na linhagem UM-HMC3A, o que, segundo os autores, poderia inviabilizar a utilização do SAHA em regime de monoterapia (5).

Posteriormente, realizou-se ensaios de formação de esferas, para verificar se os iHDACs avaliados conseguiriam alterar a capacidade das CTTs, de crescer em condições de baixa adesão e se autorrenovarem formando esferas (182); já que, diferentemente do que ocorre com as CTTs, as células tumorais não-tronco, sofrem morte celular programada quando perdem a ancoragem aos substratos da matriz extracelular circundante (183). Os resultados encontrados, mostraram que ambos os fármacos (PAN e ROM) foram capazes de reduzir, de forma significativa, a formação de esferas, após 48h de tratamento com iHDACs (*tratamento prévio*), nas duas linhagens celulares (UM-HMC1 e UM-HMC3A). Para além disso, no que tange a hipótese deste trabalho, os tratamentos associados, nas duas linhagens celulares analisadas, até conseguiram diminuir a resistência à Cisplatina (*tratamento prévio*) e reduzir o número de esferas formadas, porém, essa redução não foi observada em relação ao grupo CTRL, como era esperado. Entretanto, quando administrados de maneira prolongada (*tratamento concomitante*), ambas as associações foram capazes de reverter a resistências à CIS.

Para confirmar o efeito dos fármacos sobre as células com fenótipo tronco-tumoral, as células das linhagens UM-HMC1 e UM-HMC3A foram tratadas com os iHDACs, e suas associações com a CIS. Em seguida, análises por citometria de fluxo foram realizadas, através da combinação entre a alta atividade enzimática de ALDH e a expressão de CD44. Assim como no ensaio de esferas (*tratamento prévio*), observou-se que as CTTs são, de fato, resistentes ao tratamento com CIS, que por sua vez, promoveu o enriquecimento da população tronco-tumoral (ALDH⁺/CD44⁺). Além disso, os iHDACs aqui avaliados, não conseguiram sensibilizar as CTTs ao tratamento com CIS, uma vez que, as associações entre os iHDACs e a Cisplatina (PAN+CIS e ROM+CIS) não conseguiram reverter a “resistência” e este quimioterápico.

Por outro lado, no trabalho desenvolvido por Guimarães et al., (2016), observou-se que o iHDAC SAHA foi capaz de sensibilizar as CTTs ao tratamento com

a CIS (inclusive nas células da linhagem UM-HMC3A, que também foi utilizada neste estudo) (15). Além disso, Guimarães et al., (2016) (15) também observaram que esse iHDAC (SAHA) atuou de forma mais eficiente sobre as esferas tumorais, do que sobre as células cultivadas em monocamada, apresentando valores de IC_{50} significativamente inferiores para as esferas, em todas as linhagens celulares analisadas (UM-HMC3A, UM-HMC3B e UM-HMC5) (15). Entretanto, os autores notaram que a dose necessária para reduzir o número de esferas tumorais em 50% (IC_{50} encontrado para as esferas) na linhagem UM-HMC3A, não foi capaz de reduzir a população de células ALDH⁺, sugerindo a existência de uma subpopulação tronco-tumoral distinta, não isolada apenas pela atividade enzimática de ALDH⁺ (15).

Curiosamente, os iHDACs avaliados neste estudo, que foram efetivos na redução das esferas tumorais, não foram capazes de reduzir a população ALDH⁺/CD44⁺ na linhagem UM-HMC3A. Apesar da população ALDH⁺/CD44⁺ apresentar um alto potencial para formar esferas, esse potencial não foi restrito ao fenótipo ALDH⁺/CD44⁺ (106), o que sugere uma possível diferença entre as populações de CTTs, isoladas pelo ensaio de esferas e pela citometria de fluxo, nas linhagens de CME. Essa diferença poderia, inclusive, explicar a “resistência” aos iHDACs na população ALDH⁺/CD44⁺, caracterizada por citometria de fluxo, visto que essa população já se mostrou altamente tumorigênica quando inoculada *in vivo*, em estudos anteriores (106).

Em contrapartida, outro trabalho, conduzido pelo mesmo grupo de pesquisa (23), mostrou que as doses de IC_{50} do iHDAC Vorinostat (SAHA), estabelecidas para as células em monocamada (doses maiores), foram capazes de reduzir a porcentagem de células ALDH⁺ (com atividade de ALDH), nas linhagens UM-HMC1 e UM-HMC3A, as mesmas utilizadas neste estudo. Interessantemente, a redução no número de esferas só foi significativa na linhagem UM-HMC3A (23), derivada de tumor recidivante. Desse modo, apesar da enzima ALDH ter sido apontada como um marcador universal de CTTs (90), já foi demonstrado que uma combinação entre marcadores específicos se faz necessária, para isolar populações de CTTs no CME (106), assim como foi realizado neste estudo.

Para além disso, ainda que as CTTs da linhagem UM-HMC3A tenham se mostrado mais resistentes no presente trabalho, Parag-Sharma et al., (2021)

observaram uma redução na população ALDH⁺/CD44⁺ na linhagem UM-HMC3A, mesmo utilizando doses inferiores ao IC₅₀ do iHDAC SAHA (5). Contudo, deve-se levar em consideração, o tempo de tratamento prolongado utilizado por Parag-Sharma et al (2021)(5), que foi de 7 dias, enquanto no presente estudo, as células foram tratadas por apenas 48h, antes da realização do ensaio de citometria. Tais diferenças poderiam estar relacionadas, tanto a diferenças metodológicas, quanto às especificidades de cada iHDAC, em relação a HDACs diferencialmente expressas nas linhagens de CME.

Após as análises funcionais, realizou-se a avaliação da expressão gênica de alguns marcadores relacionados à CTTs, por RT-qPCR, para verificar como os fármacos estudados modulam a expressão de *BMI-1*, *NANOG* e *OCT-4*. Os marcadores em questão, já foram previamente identificados em casos de CME, e se mostraram superexpressos em relação ao tecido glandular normal (14). Além disso, já foram relacionados a um pior prognóstico em carcinomas de cabeça e pescoço (102), inclusive no CME (14). Assim, na medida em que esses marcadores se encontram superexpressos em CTTs, e que estas já foram identificadas no CME (106), é importante analisar, como os fármacos analisados neste estudo, atuam sobre a expressão desses genes. Para tanto, células de ambas as linhagens (UM-HMC1 e UM-HMC3A) foram tratadas, por 48h, com os iHDACs e suas associações com a CIS, e a análise de RT-qPCR foi realizada em seguida.

Os resultados de expressão gênica mostraram que, apesar de alguns iHDACs já terem mostrado a capacidade de regular negativamente a expressão de *BMI-1*, *NANOG* e *OCT-4* em linhagens de carcinomas de cabeça e pescoço (184), a monoterapia com PAN e ROM, não foi capaz de alterar a expressão desses genes nas linhagens de CME avaliadas neste estudo. As expressões dos referidos genes, também não foram alteradas pelo tratamento com CIS, ainda que tenha sido observado um acúmulo de CTTs após essa modalidade de tratamento, nos ensaios de formação de esferas. Não obstante, houve um aumento na expressão de *OCT-4*, após o tratamento com ROM+CIS, na linhagem UM-HMC1, enquanto a associação entre PAN+CIS, promoveu uma pequena redução na expressão de *NANOG* nesta mesma linhagem. Esses dois genes codificam fatores de transcrição que atuam, em conjunto, para garantir a manutenção das propriedades de pluripotência e autorrenovação, tanto das células-tronco embrionárias, quanto das CTTs (101).

Neste trabalho, a análise de expressão gênica da linhagem UM-HMC1 revelou alterações sutis nos níveis de *OCT-4*, que foram, até certo ponto, refletidas nos ensaios funcionais, já que houve um aumento significativo das esferas tumorais, após 48h de tratamento (*tratamento prévio*) com ROM+CIS. Contudo, apesar de também ter havido uma elevação nos níveis de *OCT-4*, após o tratamento com PAN+CIS, essa alteração não foi significativa, a ponto de justificar o aumento verificado no número de esferas tumorais na linhagem UM-HMC1. Contudo, vale ressaltar que as análises de RT-qPCR foram realizadas a partir de células cultivadas em monocamadas, com condições normais de adesão, diferentemente do que ocorre no ensaio de esferas.

Nesse mesmo contexto, verificou-se uma regulação negativa do gene *NANOG*, após o tratamento com PAN+CIS, comparado a associação entre ROM+CIS. Assim, levando-se em consideração a redução das esferas tumorais, observada após a modalidade de tratamento prolongado (*tratamento concomitante*), sugere-se a realização de outros estudos, para avaliar se um maior tempo de tratamento é necessário, para que as alterações gênicas sejam acompanhadas por alterações nos processos celulares relacionados à tumorigênese e progressão do câncer.

Além das análises de RT-qPCR descritas anteriormente, este trabalho também analisou a expressão de 84 gene – comumente expressos em CTTs humanas - presentes em uma placa de qPCR array. Na sequência, os dados obtidos por qPCR array, foram analisados pela análise de PCA, para investigar como as modalidades de tratamento utilizadas neste estudo, poderiam explicar a variação nos dados de expressão gênica. Desse modo, os genes que melhor representaram a variância dos dados de expressão gênica, foram identificados em cada linhagem celular (Tabela e Tabela), e alguns deles serão discutidos a seguir.

De um modo geral, as linhagens celulares analisadas, exibiram um perfil de expressão diferente entre elas, apesar dos genes *PROM1*, *ITGA4* e *CXCL8* terem se destacado em ambas as linhagens. O gene *CXCL8* (*Interleucina 8*, *IL-8*) codifica uma quimiocina importante na resposta inflamatória e sua expressão é fortemente influenciada por fatores como óxido nítrico, hipóxia e desenvolvimento tumoral (185). Essa quimiocina desempenha um papel importante na regulação da migração, invasão e angiogênese; além da proliferação celular, já que a expressão de *CXCL8* é regulada por fatores de transcrição da família do NF- κ B (186,187), que já se

mostraram superexpressos no CME (17). Assim, sabendo que a superexpressão de NF- κ B já foi relacionada ao aumento da desacetilação das histonas, além da resistência à CIS (109), esperava-se que os tratamentos com os iHDACs, e suas associações com a CIS, pudessem reduzir a expressão de *CXCL8*; mesmo levando-se em consideração a falta de evidências acerca do padrão de expressão deste gene em tumores CME, comparado ao tecido glândula normal. Contudo, o que nós observamos foi um aumento efetivo na expressão deste gene, após os tratamentos com os fármacos, com exceção do iHDAC PAN na linhagem UM-HMC1, e das associações PAN+CIS e ROM+CIS na linhagem UM-HMC3A, que não foram capazes de alterar a expressão diferencial deste gene em relação ao grupo CTRL (não tratado). Interessantemente, esse padrão de expressão não se refletiu nos achados dos ensaios funcionais, uma vez que, houve uma redução na migração individual e na invasão, em todos os grupos tratados, sugerindo que o controle desses processos biológicos, vai muito além da sinalização desencadeada pela expressão de *CXCL8*.

Já o *PROM-1* (*Prominina 1*, *CD133*), é um gene responsável pela codificação de uma proteína transmembrana, expressa por células-tronco somáticas e células progenitoras em diversos órgãos, além de CTTs (188). Essa proteína já foi encontrada na membrana das células secretoras e das células ductais das glândulas salivares maiores (188), conforme sugere a teoria de origem do CME, segundo a qual, as células iniciadoras do tumor se encontram nos ductos excretórios (70). Além disso, já foi verificado que células com fenótipo *CD133*⁺, isoladas em linhagens de carcinomas epidermoides orais, apresentaram aumento da capacidade de invadir e formar colônias, além do aumento na tumorigenicidade e na resistência à quimioterapia com Paclitaxel (189). A expressão de *CD133* também foi encontrada em neoplasias malignas e benignas de glândula salivar, incluindo o CME (188,190), apesar de não ter sido verificada nenhuma correlação com o grau histológico e o estágio do tumor (190). Neste trabalho, verificou-se, com exceção da CIS, todos os tratamentos aumentaram a expressão de *CD133*, nas duas linhagens celulares analisadas. Contudo, sabendo que o *CD133* também é expresso por CTTs e que o CME exhibe resistência à Cisplatina, esperava-se que os níveis de *CD133* estivessem elevados nesse grupo, visto que a CIS induziu um aumento substancial das CTTs, caracterizado por maior número de esferas tumorais. Ademais, sabe-se que o *CD133* está associado ao aumento na clonogenicidade, contudo, os ensaios de colônias revelaram que, tanto

a CIS, quanto os tratamentos associados (PAN+CIS e ROM+CIS), foram capazes de reduzir o número de colônias. Não obstante, esses achados um tanto quanto inesperados, podem estar relacionados tanto a presença de diferentes populações de CTTs presentes nas linhagens de CME, já sugerida na literatura (106,110), quanto a diferenças nos tempos de tratamentos nos diferentes experimentos, ou até mesmo, a padrões diferenciais de expressão gênica, nas células usadas no qPCR array (população total) e nos ensaios de colônias e esferas, (populações mais ricas CTTs).

O *ITGA4* (*integrina $\alpha 4$*), por sua vez, é responsável pela codificação de uma proteína transmembrana, que medeia as interações entre células e entre as células e a matriz extracelular (191). A superexpressão desta proteína já foi encontrada em alguns tipos de câncer e tem sido associada à invasão de células tumorais e metástase, uma vez que, o *ITGA4* participa da sinalização celular para controle da sobrevivência, proliferação, migração e crescimento tumoral (192). A superexpressão de *ITGA4* também foi observada em carcinomas epidermóides orais, em detrimento das margens livre de tumor, de modo que esse gene foi indicado como potencial biomarcador, em algumas localizações da cavidade oral (193). No presente trabalho, verificou-se que os tratamentos com ROM, ROM+CIS e PAN+CIS promoveram uma regulação positiva de *ITGA4* e, apesar da CIS não ter alterado a expressão deste gene em nenhuma linhagem, sua associação com ROM aumentou marcadamente a expressão de *ITGA4*, em ambas as linhagens. O tratamento com PAN, por sua vez, só induziu a superexpressão de *ITGA4* na linhagem UM-HMC3A. Assim, sabendo que *ITGA4* ativa a via de sinalização Hedgehog (192), que por sua vez, está relacionada com a manutenção das CTTs (194), os resultados encontrados aqui, sugerem que 48h de tratamento com os iHDACs, aumentam o potencial tumorigênico das células derivadas de CME, o que não foi verificado nos ensaios funcionais (formação de esferas), nos quais apenas o tratamento com CIS induziu o enriquecimento da população de CTTs.

Para além dos genes discutidos acima, também foram identificados no PCA alguns marcadores de CTTs (*PECAM 1*, *CD34* e *ENG*), que são utilizados em estudos clínicos para o monitoramento da densidade vascular em tumores malignos, visto que a angiogênese representa um fator biológico essencial na progressão e metástase tumoral (195). Nesse sentido, o aumento na densidade vascular já foi correlacionado ao pior prognóstico, progressão da doença, e diminuição da sobrevida global e livre

de doença, em vários tipos de câncer (196,197). Além disso, evidências recentes têm apontado para a relação existente entre o aumento das CTTs, sob o estímulo da hipóxia, e o aumento do fator de crescimento endotelial vascular, cujo papel é induzir a angiogênese (198). Interessantemente, apesar desses marcadores serem comumente encontrados em células endoteliais presentes no microambiente tumoral (199), neste trabalho, observou-se que as células derivadas de CME também expressaram esses genes, que por sua vez, tiveram a sua expressão modulada pelos tratamentos com os iHDACs e suas associações com a CIS.

O gene *PECAM 1* (Molécula de Adesão Celular Endotelial Plaquetária, CD31) se destacou apenas na linhagem UM-HMC1, uma vez que, todos os tratamentos promoveram redução efetiva na expressão deste gene, com destaque para os grupos tratados com CIS e PAN+CIS, que se mostraram mais eficientes. Esse gene codifica uma glicoproteína, pertencente à superfamília das imunoglobulinas, cuja expressão é encontrada em plaquetas, leucócitos e células T, além de ser altamente expressa em células endoteliais, participando, portanto, do desenvolvimento vascular (195). A expressão de CD31 também já foi observada em células tumorais derivadas de melanoma, carcinomas de cólon, próstata e pulmão (200). Além disso, já foi observado que a marcação de CD31 em células tumorais, foi associada com o aumento da invasividade no câncer de mama (201) e à metástase, via indução da TEM, em células de carcinoma hepatocelular (195). Assim, em vista do papel biológico associado à expressão de *PECAM 1*, os resultados de expressão gênica obtidos neste trabalho, confirmam os achados encontrados nas análises funcionais de migração e invasão, em que todos os fármacos analisados, isoladamente e em associação, foram efetivos na redução da migração individual e invasão celular.

Em relação às propriedades de pluripotência e autorrenovação, apenas os genes *NANOG* (pluripotência) e *BMP7* (autorrenovação) se destacaram nas análises de PCA, nas linhagens UM-HMC1 e UM-HMC3A, respectivamente. Contrastando com os achados do ensaio de RT-qPCR, no qual apenas o tratamento com PAN+CIS foi capaz de reduzir a expressão de *NANOG*, a análise realizada com as placas de qPCR array, mostrou que todos os tratamentos, com exceção da CIS, promoveram uma redução efetiva na expressão deste gene. Assim, na medida em que o *NANOG* é um dos fatores de transcrição responsável pela manutenção do estado indiferenciado e de pluripotência nas células-tronco embrionárias e nas CTTs (202), era de se esperar

que houvesse uma redução no fenótipo-tronco das células tumorais derivadas de CME, nos ensaios funcionais, o que não ocorreu após 48h de tratamento (*tratamento prévio*). Contudo, sabendo que o tratamento prolongado (*tratamento concomitante*) com os iHDACs e suas associações com a CIS, promoveram uma redução significativa no número de esferas, podemos deduzir, que um maior tempo de tratamento é necessário para que as alterações gênicas sejam “traduzidas” em alterações celulares efetivas. No entanto, é preciso ter em mente a participação de outros dois genes principais (*OCT-4* e *SOX2*) nessa rede que regula a manutenção do estado “tronco”, já que eles podem se manter constantes nos estágios iniciais da diferenciação celular, ainda que tenha havido uma redução na expressão de *NANOG* (203).

O gene *BMP7* (*Proteína Óssea Morfogênica 7*) codifica uma proteína pertencente à superfamília do TGF- β , que por sua vez, desempenha um papel importante no controle da proliferação, invasão e migração das células cancerígenas (204). Evidências recentes demonstraram a expressão aberrante desta proteína em diversos tipos de câncer, incluindo o câncer de ovário, tumores do trato digestivo, melanoma, câncer de mama e de próstata (204). Contudo, expressão já foi associada, tanto à mecanismos pró-oncogênicos, (aumento da proliferação, migração e invasão), quanto aos mecanismos supressores de tumor, dependendo do tipo de câncer (205). Neste trabalho, apesar do padrão de expressão de *BMP7* não ter sido avaliado em tecido glandular normal, observou-se que o tratamento com ROM+CIS aumentou consideravelmente a expressão deste gene. Assim, levando em consideração que o tratamento com ROM+CIS promoveu uma redução considerável na capacidade de invasão, migração individual e coletiva, pode-se deduzir que essa superexpressão de *BMP7*, verificada na linhagem UM-HMC3A, pode ter atuado como um “atenuante de malignidade” nas células derivadas de CME. Resultados parecidos foram encontrados em células derivadas do câncer de mama, já que a expressão de *BMP7* foi capaz de inibir, tanto a expressão de genes relacionados à transição epitélio-mesenquimal, quanto a invasão celular (206,207).

O *DACH1* (Do inglês *Dachshund homolog 1*), por sua vez, é um gene supressor de tumor, que foi selecionado por ter se destacado na linhagem UM-HMC3A. Esse gene codifica um fator de transcrição, responsável pela regulação da expressão de genes alvos relacionados ao destino celular (208). Evidências recentes demonstraram

uma redução na expressão de *DACH1* em cânceres humanos, em comparação aos tecidos adjacentes normais (209). Esse padrão de expressão já foi identificado em algumas neoplasias malignas, incluindo o câncer colorretal (210), oral (211,212) e de mama (213); e já foi intimamente relacionado aos processos de proliferação, invasão e metástase (214). Em carcinomas epidermoides de língua, por exemplo, a redução de *DACH1* foi associada à tumores mais avançados, pouco diferenciados e à metástase linfonodal (212). Estudos *in vitro*, também demonstraram que a superexpressão deste gene favorece a apoptose, além de inibir processos biológicos relacionados à progressão do câncer (212). Outro estudo demonstrou que o aumento de *DACH1* favoreceu a redução, tanto do número, quanto do tamanho de mamoesferas, além de diminuir a porcentagem de células com fenótipo-tronco ($CD44^{high}/CD24^{low}$) no câncer de mama (215). *DACH1* também promoveu a repressão da transcrição de genes relacionados à manutenção das propriedades das células-tronco (*SOX2*, *NANOG* e *KLF4*) (215). Neste trabalho, observou-se uma grande redução na expressão de *DACH1* no grupo tratado com a CIS, indo de encontro aos achados dos ensaios funcionais, em que a CIS promoveu um aumento substancial das esferas tumorais e das células com fenótipo tronco-tumoral. Dentre os fármacos iHDACs e suas associações com a CIS, apenas o tratamento com PAN não promoveu a redução de *DACH1*, ainda que não tenha aumentado a expressão deste gene.

Em suma, primeiramente foi verificado que os iHDACs analisados, exibiram efeitos antitumorais com uma alta citotoxicidade e em baixas concentrações. Em seguida, sabendo que as esferas tumorais são enriquecidas com CTTs (106), e que a combinação entre a atividade enzimática de ALDH e a expressão de CD44 consegue identificar células altamente tumorigênicas (106), essa população foi utilizada para analisar a ação dos fármacos iHDACs e suas associações com a CIS, sobre processos biológicos (migração, invasão, pluripotência e autorrenovação) relacionados às CTTs; visto que estas células estão fortemente envolvidas no processo de resistência à terapia (137) e já foram identificadas em CME (106). Nós verificamos que, tanto PAN, quanto ROM, administrados em regime de monoterapia, foram efetivos na redução das propriedades de migração, invasão e autorrenovação, apesar de não terem inibido significativamente a formação das colônias tumorais, e tão pouco, de reduzido a população de células com fenótipo tronco-tumoral (células $ALDH^+/CD44^+$) na linhagem UM-HMC3A. Esses achados sugerem uma maior

resistência dessa linhagem aos tratamentos testados, ainda que valores menores de IC_{50} tenham sido obtidos nessa linhagem. Porém, é importante destacar que o IC_{50} dos fármacos foi determinado apenas para células totais (não enriquecidas com CTTs), cultivadas em monocamada; logo, doses ligeiramente diferentes poderiam ser encontradas em colônias e esferas, como relatado em outro estudo recente (15). Além disso, outra ressalva que merece ser feita, diz respeito ao tempo de tratamento, já que este trabalho padronizou um período de 48h, previamente à realização dos ensaios; com exceção dos ensaios de esfera e colônia, nos quais as células foram mantidas em contato com os fármacos por tempo período prolongado (*tratamento concomitante*).

Para além disso, também foi mostrado que, de fato, as CTTs das linhagens de CME são resistentes à 48h de tratamento com CIS, que, por sua vez, promoveu o acúmulo desta população, em ambas as linhagens estudadas, verificado através do aumento no número das esferas tumorais e das células $ALDH^+/CD44^+$. Frente a isso, foi observado que as associações entre os iHDACs e a CIS, não foram capazes de sensibilizar as CTTs ao tratamento com CIS. Curiosamente, essas associações só foram efetivas na redução das esferas tumorais, após a modalidade de *tratamento concomitante*, no qual os fármacos permaneceram em contato com as células por um período prolongado.

Após os ensaios funcionais, utilizou-se a ferramenta de RT-qPCR, para avaliar o perfil de expressão de genes, sabidamente associados à manutenção das características tronco-tumorais em CME. Nós observamos pequenas alterações, apenas nos níveis de *NANOG* e *OCT-4*, após os tratamentos com PAN+CIS e ROM+CIS, respectivamente, na linhagem UM-HMC1, ainda que essas alterações não tenham refletido os achados dos ensaios funcionais. Isso pode estar relacionado a eventos de regulação pós-transcricional e a uma série de fatores extrínsecos, já mencionados anteriormente. Além das análises por RT-qPCR convencional, placas de qPCR array também foram utilizadas para investigar 84 genes relacionados à CTTs humanas.

Os resultados obtidos por qPCR array foram submetidos, então, a análises de PCA, para identificar quais tratamentos responderiam pela maior parte da variância presente no conjunto de dados de expressão gênica. Outro ponto que merece

destaque, gira em torno dos mecanismos de ação e das vias de sinalização envolvidos na atividade antitumoral dos iHDACs avaliados, sozinhos e em associação com a CIS. Assim, a fim de complementar os achados acima expostos, também foi avaliada a expressão de 84 genes envolvidos com modificações epigenéticas da cromatina (resultados não mostrados), utilizando uma outra placa de qPCR array. Contudo, é importante ressaltar que todos esses dados de expressão gênica, ainda serão complementados por análises proteômicas, já realizadas com ambas as linhagens, após tratamento com os iHDACs e suas associações com a CIS, cujos resultados ainda estão sendo analisados e, por esta razão, não puderam ser incluídos na tese.

7 CONCLUSÕES

De maneira geral, podemos concluir que as hipóteses iniciais deste trabalho foram, apenas, parcialmente aceitas, uma vez que:

- 1) Os fármacos iHDACs exibiram efeitos antitumorais nas duas linhagens celulares analisadas, reduzindo tanto o crescimento, quanto a viabilidade celular;
- 2) A monoterapia com os iHDACs (PAN ou ROM) atuou eficientemente na redução dos processos de autorrenovação, invasão e migração, ainda que não tenham afetado a clonogenicidade das células cultivadas em monocamadas, na modalidade de tratamento prévio;
- 3) Os iHDACs, quando utilizados em regime de monoterapia, só foram efetivos na redução das células com fenótipo tronco-tumoral (ALDH⁺/CD44⁺) na linhagem UM-HMC1, derivada de tumor primário;
- 4) As CTTs derivadas de CME, aqui estudadas, se mostraram resistentes ao tratamento com CIS, mesmo após um contato prolongado com o fármaco (tratamento concomitante);
- 5) Os tratamentos associados não foram eficientes na sensibilização das CTTs à ação da CIS após 48h de tratamento (tratamento prévio); porém, os tratamentos em associação, quando administrados de maneira concomitante, foram capazes de diminuir a resistência, o que foi comprovado pela redução das propriedades de autorrenovação e clonogenicidade;
- 6) As associações entre os iHDACs e Cisplatina, potencializaram a redução do número de colônias, além da capacidade de migrar e invadir, em ambas as linhagens;
- 7) A expressão dos genes relacionados aos processos de pluripotência e autorrenovação, foi minimamente afetada pós 48h de tratamento com os iHDACs, sozinhos ou em associação com a CIS.

Este trabalho demonstrou, pela primeira vez, os efeitos antitumorais de dois fármacos iHDACs (Panobinostat e Romidepsin), sobre linhagens celulares derivadas de CME de glândula salivar menor. Tomados em conjunto, os dados aqui apresentados, não apenas apoiam relatos anteriores da literatura, mostrando os efeitos anticâncer de outros iHDACs, como também acrescentam achados valiosos a respeito dessa classe de fármacos, frente ao CME. Portanto, embora parte dos dados obtidos neste estudo, não tenha contemplado as hipóteses iniciais apresentadas, no que tange a efetividade dos iHDACs frente a algumas propriedades relacionadas ao fenótipo tronco-tumoral. Estes fármacos mostraram, claramente, um potencial passível de ser explorado em outros estudos, principalmente se associados a drogas com mecanismos de ação diferentes, daqueles apresentados pela Cisplatina. Não obstante, a busca por novas opções terapêuticas para o CME de glândula salivar ainda permanece em aberto.

REFERÊNCIAS ¹

1. Ferlay J, Laversanne M, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, et al. Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow [Internet]. International Agency for Research on Cancer. 2020 [cited 2022 Sep 21]. Available from: <https://gco.iarc.fr/tomorrow>
2. Brandwein-Gensler M, Bell D, Inagaki H, Katabi N, Leivo I, Seethala R, et al. Mucoepidermoid carcinoma. In: El-Naggar AK, Chan JK, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ, editors. WHO Classification of Head and Neck Tumors. 4th ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2017. p. 163–4.
3. Goode R, El-Naggar A. Mucoepidermoid carcinoma. In: Barnes L, Eveson J, Reichart P, Sidransky D, editors. World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon, France: IARC Press; 2005. p. 219–20.
4. McHugh CH, Roberts DB, El-Naggar AK, Hanna EY, Garden AS, Kies MS, et al. Prognostic factors in mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands. *Cancer*. 2012 Aug 15;118(16):3928–36.
5. Parag-Sharma K, Tasoulas J, Musicant AM, do Nascimento-Filho CHV, Zhu Z, Twomey C, et al. Synergistic efficacy of combined EGFR and HDAC inhibitors overcomes tolerance to EGFR monotherapy in salivary mucoepidermoid carcinoma. *Oral Oncol*. 2021 Apr;115:105166.
6. vander Poorten V, Hunt J, Bradley PJ, Haigentz M, Rinaldo A, Mendenhall WM, et al. Recent trends in the management of minor salivary gland carcinoma. *Head Neck*. 2014 Mar;36(3):444–55.
7. Alfieri S, Granata R, Bergamini C, Resteghini C, Bossi P, Licitra LF, et al. Systemic therapy in metastatic salivary gland carcinomas: A pathology-driven paradigm? *Oral Oncol*. 2017 Mar;66:58–63.
8. 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. *Head Neck Oncol*. 2012 May 4;4:19.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

9. Chen AM, Garcia J, Granchi PJ, Johnson J, Eisele DW. Late recurrence from salivary gland cancer: when does “cure” mean cure? *Cancer*. 2008 Jan 15;112(2):340–4.
10. Gasch C, Ffrench B, O’Leary JJ, Gallagher MF. Catching moving targets: Cancer stem cell hierarchies, therapy-resistance & considerations for clinical intervention. *Mol Cancer*. 2017;16(1):1–15.
11. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CHM, Jones DL, et al. Cancer stem cells - Perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*. 2006;66(19):9339–44.
12. Warner KA, Adams A, Bernardi L, Nor C, Finkel KA, Zhang Z, et al. Characterization of tumorigenic cell lines from the recurrence and lymph node metastasis of a human salivary mucoepidermoid carcinoma. *Oral Oncol*. 2013;49(11):1059–66.
13. Adams A, Warner K, Pearson AT, Zhang Z, Kim HS, Mochizuki D, et al. ALDH/CD44 identifies uniquely tumorigenic cancer stem cells in salivary gland mucoepidermoid carcinomas. *Oncotarget*. 2015 Sep 29;6(29):26633–50.
14. Destro Rodrigues MFS, Sedassari BT, Esteves CM, de Andrade NP, Altemani A, de Sousa SCOM, et al. Embryonic stem cells markers Oct4 and Nanog correlate with perineural invasion in human salivary gland mucoepidermoid carcinoma. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 2017 Feb 1;46(2):112–20.
15. Guimarães DM, Almeida LO, Martins MD, Warner KA, Silva ARS, Vargas PA, et al. Sensitizing mucoepidermoid carcinomas to chemotherapy by targeted disruption of cancer stem cells. *Oncotarget*. 2016 Jul 5;7(27):42447–60.
16. Zhang L, Xia Y, Li L, Wang Y, Liu Y, Li C, et al. Cancer stem cell-like cells exist in mucoepidermoid carcinoma cell line MC3. *Oncol Res*. 2013;20(12):589–600.
17. Wagner VP, Martins MAT, Martins MD, Warner KA, Webber LP, Squarize CH, et al. Overcoming adaptive resistance in mucoepidermoid carcinoma through inhibition of the IKK- β /I κ B α /NF κ B axis. *Oncotarget*. 2016;7(45):73032–44.
18. Suraweera A, O’Byrne KJ, Richard DJ. Combination Therapy With Histone Deacetylase Inhibitors (HDACi) for the Treatment of Cancer: Achieving the Full Therapeutic Potential of HDACi. *Front Oncol*. 2018;8:92.

19. Singh AK, Bishayee A, Pandey AK. Targeting Histone Deacetylases with Natural and Synthetic Agents: An Emerging Anticancer Strategy. *Nutrients*. 2018 Jun 6;10(6).
20. Liu N, Li S, Wu N, Cho KS. Acetylation and deacetylation in cancer stem-like cells. *Oncotarget*. 2017 Oct 24;8(51):89315–25.
21. Ahn MY, Yoon JH. Histone deacetylase 7 silencing induces apoptosis and autophagy in salivary mucoepidermoid carcinoma cells. *J Oral Pathol Med*. 2017 Apr;46(4):276–83.
22. Ahn MY, Ahn JW, Kim HS, Lee J, Yoon JH. Apicidin inhibits cell growth by downregulating IGF-1R in salivary mucoepidermoid carcinoma cells. *Oncol Rep*. 2015 Apr 1;33(4):1899–907.
23. Wagner VP, Martins MD, Martins MAT, Almeida LO, Warner KA, Nör JE, et al. Targeting histone deacetylase and NFκB signaling as a novel therapy for Mucoepidermoid Carcinomas. *Sci Rep*. 2018 Feb 1;8(1):2065.
24. Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, et al. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov*. 2019 Jan 12;18(1):41–58.
25. Wu D, Qiu Y, Jiao Y, Qiu Z, Liu D. Small Molecules Targeting HATs, HDACs, and BRDs in Cancer Therapy. *Front Oncol*. 2020;10:560487.
26. World Health Organization (WHO). Global Health Estimates 2020: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2019 [Internet]. WHO. 2020 [cited 2023 Jan 9]. Available from: [who.int/ data/gho/data/ themes/mortality-andglobal-health-estimates/global-leadi ngcauses-of-death](https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/global-leading-causes-of-death)
27. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2021 May 4;71(3):209–49. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21660>
28. Wang X dong, Meng L jiao, Hou T ting, Huang S hui. Tumours of the salivary glands in northeastern China: a retrospective study of 2508 patients. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2015 Feb;53(2):132–7.

29. Carlson ER, Schlieve T. Salivary Gland Malignancies. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2019 Feb;31(1):125–44.
30. Peraza A, Gómez R, Beltran J, Amarista FJ. Mucoepidermoid carcinoma. An update and review of the literature. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg.* 2020 Dec;121(6):713–20.
31. Triantafyllidou K, Dimitrakopoulos J, Iordanidis F, Koufogiannis D. Mucoepidermoid carcinoma of minor salivary glands: a clinical study of 16 cases and review of the literature. *Oral Dis.* 2006 Jul;12(4):364–70.
32. Lopes MA, Kowalski LP, da Cunha Santos G, Paes de Almeida O. A clinicopathologic study of 196 intraoral minor salivary gland tumours. *J Oral Pathol Med.* 1999 Jul;28(6):264–7.
33. Kokemueller H, Brueggemann N, Swennen G, Eckardt A. Mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands--clinical review of 42 cases. *Oral Oncol.* 2005 Jan;41(1):3–10.
34. Jones A v, Craig GT, Speight PM, Franklin CD. The range and demographics of salivary gland tumours diagnosed in a UK population. *Oral Oncol.* 2008 Apr;44(4):407–17.
35. Alsanie I, Rajab S, Cottom H, Adegun O, Agarwal R, Jay A, et al. Distribution and Frequency of Salivary Gland Tumours: An International Multicenter Study. *Head Neck Pathol.* 2022 May 27;16(4):1043–54.
36. Kızıl Y, Aydil U, Ekinci O, Dilci A, Köybaşıoğlu A, Düzlü M, et al. Salivary gland tumors in Turkey: demographic features and histopathological distribution of 510 patients. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2013 Jul;65(Suppl 1):112–20.
37. Ito FA, Ito K, Vargas PA, de Almeida OP, Lopes MA. Salivary gland tumors in a Brazilian population: a retrospective study of 496 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005 Jul;34(5):533–6.
38. Coca-Pelaz A, Rodrigo JP, Triantafyllou A, Hunt JL, Rinaldo A, Strojjan P, et al. Salivary mucoepidermoid carcinoma revisited. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2015 Apr;272(4):799–819.

39. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Chi AC. Oral and Maxillofacial Pathology. 4th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2016. 912 p.
40. Goode RK, Auclair PL, Ellis GL. Mucoepidermoid carcinoma of the major salivary glands: clinical and histopathologic analysis of 234 cases with evaluation of grading criteria. *Cancer*. 1998 Apr 1;82(7):1217–24.
41. Batsakis JG, Luna MA. Histopathologic grading of salivary gland neoplasms: I. Mucoepidermoid carcinomas. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1990 Oct;99(10 Pt 1):835–8.
42. Brandwein MS, Ferlito A, Bradley PJ, Hille JJ, Rinaldo A. Diagnosis and classification of salivary neoplasms: pathologic challenges and relevance to clinical outcomes. *Acta Otolaryngol*. 2002 Oct;122(7):758–64.
43. Licitra L, Grandi C, Prott FJ, Schornagel JH, Bruzzi P, Molinari R. Major and minor salivary glands tumours. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2003 Feb;45(2):215–25.
44. Israel Y, Rachmiel A, Gourevich K, Nagler R. Survival Probabilities Related to Histology, Grade and Stage in Patients With Salivary Gland Tumors. *Anticancer Res*. 2019 Feb;39(2):641–7.
45. Waldron CA, el-Mofty SK, Gnepp DR. Tumors of the intraoral minor salivary glands: a demographic and histologic study of 426 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1988 Sep;66(3):323–33.
46. Rajasekaran K, Stubbs V, Chen J, Yalamanchi P, Cannady S, Brant J, et al. Mucoepidermoid carcinoma of the parotid gland: A National Cancer Database study. *Am J Otolaryngol* [Internet]. 39(3):321–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29559174>
47. Dalgic A, Karakoc O, Aydin U, Hidir Y, Gamsizkan M, Karahatay S, et al. Minor salivary gland neoplasms. *J Craniofac Surg*. 2014 May;25(3):e289-91.
48. O'Neill ID. t(11;19) translocation and CRTC1-MAML2 fusion oncogene in mucoepidermoid carcinoma. *Oral Oncol*. 2009 Jan;45(1):2–9.

49. Okumura Y, Miyabe S, Nakayama T, Fujiyoshi Y, Hattori H, Shimozato K, et al. Impact of CRTC1/3-MAML2 fusions on histological classification and prognosis of mucoepidermoid carcinoma. *Histopathology*. 2011 Jul;59(1):90–7.
50. Simpson RHW, Skálová A, di Palma S, Leivo I. Recent advances in the diagnostic pathology of salivary carcinomas. *Virchows Arch*. 2014 Oct;465(4):371–84.
51. Nakayama T, Miyabe S, Okabe M, Sakuma H, Ijichi K, Hasegawa Y, et al. Clinicopathological significance of the CRTC3-MAML2 fusion transcript in mucoepidermoid carcinoma. *Mod Pathol*. 2009 Dec;22(12):1575–81.
52. García JJ, Hunt JL, Weinreb I, McHugh JB, Barnes EL, Ciepły K, et al. Fluorescence in situ hybridization for detection of MAML2 rearrangements in oncocytic mucoepidermoid carcinomas: utility as a diagnostic test. *Hum Pathol*. 2011 Dec;42(12):2001–9.
53. Bishop JA, Cowan ML, Shum CH, Westra WH. MAML2 Rearrangements in Variant Forms of Mucoepidermoid Carcinoma: Ancillary Diagnostic Testing for the Ciliated and Warthin-like Variants. *Am J Surg Pathol*. 2018 Jan;42(1):130–6.
54. Tajima S, Namiki I, Koda K. A clear cell variant of mucoepidermoid carcinoma harboring CRTC1-MAML2 fusion gene found in buccal mucosa: report of a case showing a large clear cell component and lacking typical epidermoid cells and intermediate cells. *Med Mol Morphol*. 2017 Jun;50(2):117–21.
55. Jee KJ, Persson M, Heikinheimo K, Passador-Santos F, Aro K, Knuutila S, et al. Genomic profiles and CRTC1-MAML2 fusion distinguish different subtypes of mucoepidermoid carcinoma. *Mod Pathol*. 2013 Feb;26(2):213–22.
56. Behboudi A, Enlund F, Winnes M, Andrén Y, Nordkvist A, Leivo I, et al. Molecular classification of mucoepidermoid carcinomas-prognostic significance of the MECT1-MAML2 fusion oncogene. *Genes Chromosomes Cancer*. 2006 May;45(5):470–81.
57. Okabe M, Miyabe S, Nagatsuka H, Terada A, Hanai N, Yokoi M, et al. MECT1-MAML2 fusion transcript defines a favorable subset of mucoepidermoid carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2006 Jul 1;12(13):3902–7.

58. Birkeland AC, Foltin SK, Michmerhuizen NL, Hoesli RC, Rosko AJ, Byrd S, et al. Correlation of Crtc1/3-Maml2 fusion status, grade and survival in mucoepidermoid carcinoma. *Oral Oncol.* 2017 May;68:5–8.
59. van Weert S, Lissenberg-Witte BI, Bloemena E, Leemans CR. Mucoepidermoid carcinoma of the head and neck: CRTC1/3 MAML 2 translocation and its prognosticators. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2022 May;279(5):2573–81.
60. Sama S, Komiya T, Guddati AK. Advances in the Treatment of Mucoepidermoid Carcinoma. *World J Oncol.* 2022 Feb;13(1):1–7.
61. Pederson AW, Salama JK, Haraf DJ, Witt ME, Stenson KM, Portugal L, et al. Adjuvant chemoradiotherapy for locoregionally advanced and high-risk salivary gland malignancies. *Head Neck Oncol.* 2011 Jul 26;3:31.
62. Mueller SK, Haderlein M, Lettmaier S, Agaimy A, Haller F, Hecht M, et al. Targeted Therapy, Chemotherapy, Immunotherapy and Novel Treatment Options for Different Subtypes of Salivary Gland Cancer. *J Clin Med.* 2022 Jan 29;11(3).
63. Bell D, Hanna EY. Salivary gland cancers: biology and molecular targets for therapy. *Curr Oncol Rep.* 2012 Apr;14(2):166–74.
64. American Cancer Society. Chemotherapy for Salivary Gland Cancer [Internet]. *Treating Salivary Gland Cancer.* 2022 [cited 2022 Jun 26]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/salivary-gland-cancer/treating/chemotherapy.html>
65. Laurie SA, Siu LL, Winquist E, Maksymiuk A, Harnett EL, Walsh W, et al. A phase 2 study of platinum and gemcitabine in patients with advanced salivary gland cancer: a trial of the NCIC Clinical Trials Group. *Cancer.* 2010 Jan 15;116(2):362–8.
66. Hong MH, Kim CG, Koh YW, Choi EC, Kim J, Yoon SO, et al. Efficacy and safety of vinorelbine plus cisplatin chemotherapy for patients with recurrent and/or metastatic salivary gland cancer of the head and neck. *Head Neck.* 2018 Jan;40(1):55–62.
67. Licitra L, Cavina R, Grandi C, Palma SD, Guzzo M, Demicheli R, et al. Cisplatin, doxorubicin and cyclophosphamide in advanced salivary gland carcinoma. A phase II trial of 22 patients. *Ann Oncol.* 1996 Aug;7(6):640–2.

68. Gilbert J, Li Y, Pinto HA, Jennings T, Kies MS, Silverman P, et al. Phase II trial of taxol in salivary gland malignancies (E1394): a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Head Neck*. 2006 Mar;28(3):197–204.
69. Chen AM, Granchi PJ, Garcia J, Bucci MK, Fu KK, Eisele DW. Local-regional recurrence after surgery without postoperative irradiation for carcinomas of the major salivary glands: implications for adjuvant therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007 Mar 15;67(4):982–7.
70. Porcheri C, Meisel CT, Mitsiadis TA. Molecular and Cellular Modelling of Salivary Gland Tumors Open New Landscapes in Diagnosis and Treatment. *Cancers (Basel)*. 2020 Oct 24;12(11).
71. Tomasetti C, Vogelstein B. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science (1979)*. 2015 Jan 2;347(6217):78–81.
72. Nimmakayala RK, Batra SK, Ponnusamy MP. Unraveling the journey of cancer stem cells from origin to metastasis. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2019 Jan;1871(1):50–63.
73. Rich JN. Cancer stem cells: understanding tumor hierarchy and heterogeneity. *Medicine [Internet]*. 2016 Sep;95(1 Suppl 1):S2–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27611934>
74. Reid PA, Wilson P, Li Y, Marcu LG, Bezak E. Current understanding of cancer stem cells: Review of their radiobiology and role in head and neck cancers. *Head Neck*. 2017 Sep;39(9):1920–32.
75. Yoo YD, Kwon YT. Molecular mechanisms controlling asymmetric and symmetric self-renewal of cancer stem cells. *J Anal Sci Technol*. 2015;6(1):28.
76. Meacham CE, Morrison SJ. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature*. 2013 Sep 19;501(7467):328–37.
77. Bu P, Chen KY, Lipkin SM, Shen X. Asymmetric division: a marker for cancer stem cells in early stage tumors? *Oncotarget*. 2013 Jul;4(7):950–1.
78. MacArthur BD, Lemischka IR. Statistical mechanics of pluripotency. *Cell*. 2013 Aug 1;154(3):484–9.

79. Afify SM, Seno M. Conversion of Stem Cells to Cancer Stem Cells: Undercurrent of Cancer Initiation. *Cancers (Basel)*. 2019 Mar 11;11(3).
80. Cooper M. Regenerative Pathologies: Stem Cells, Teratomas and Theories of Cancer. *Med Stud*. 2009 Feb 21;1(1):55–66.
81. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994;367(6464):645–8.
82. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med [Internet]*. 1997 Jul;3(7):730–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9212098>
83. Wolmarans E, Boy SC, Nel S, Mercier AE, Pepper MS. Cancer Stem Cells in Head and Neck Carcinomas: Identification and Possible Therapeutic Implications. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1083:89–102.
84. Toole BP. Hyaluronan-CD44 Interactions in Cancer: Paradoxes and Possibilities. *Clin Cancer Res*. 2009 Dec 15;15(24):7462–8.
85. de Andrade NP, Rodrigues MFSD, Rodini CO, Nunes FD. Cancer stem cell, cytokeratins and epithelial to mesenchymal transition markers expression in oral squamous cell carcinoma derived from orthotopic xenotransplantation of CD44high cells. *Pathol Res Pract*. 2017 Mar;213(3):235–44.
86. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 1;100(7):3983–8.
87. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jan 16;104(3):973–8.
88. Clay MR, Tabor M, Owen JH, Carey TE, Bradford CR, Wolf GT, et al. Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase. *Head Neck*. 2010 Sep;32(9):1195–201.

89. Krishnamurthy S, Dong Z, Vodopyanov D, Imai A, Helman JI, Prince ME, et al. Endothelial cell-initiated signaling promotes the survival and self-renewal of cancer stem cells. *Cancer Res.* 2010 Dec 1;70(23):9969–78.
90. Marcato P, Dean CA, Giacomantonio CA, Lee PWK. Aldehyde dehydrogenase: its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. *Cell Cycle.* 2011 May 1;10(9):1378–84.
91. Baillie R, Tan ST, Itinteang T. Cancer Stem Cells in Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma: A Review. *Front Oncol* [Internet]. 2017;7:112. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28626726>
92. Fan Z, Li M, Chen X, Wang J, Liang X, Wang H, et al. Prognostic Value of Cancer Stem Cell Markers in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: a Meta-analysis. *Sci Rep.* 2017 Feb 21;7:43008.
93. Huang T, Song X, Xu D, Tiek D, Goenka A, Wu B, et al. Stem cell programs in cancer initiation, progression, and therapy resistance. *Theranostics.* 2020;10(19):8721–43.
94. Chiou SH, Yu CC, Huang CY, Lin SC, Liu CJ, Tsai TH, et al. Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2008 Jul 1;14(13):4085–95.
95. Tahmasebi E, Alikhani M, Yazdanian A, Yazdanian M, Tebyanian H, Seifalian A. The current markers of cancer stem cell in oral cancers. *Life Sci.* 2020 May 15;249:117483.
96. Tsai LL, Yu CC, Chang YC, Yu CH, Chou MY. Markedly increased Oct4 and Nanog expression correlates with cisplatin resistance in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2011 Sep;40(8):621–8.
97. Gliagias V, Wotman M, Herman SW, Costantino P, Kraus D, Tham T. Investigating the role of octamer binding transcription Factor-4 (Oct-4) in oral cavity squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Am J Otolaryngol.* 2019;40(2):282–8.
98. Allegra E, Trapasso S, Pisani D, Puzzo L. The role of BMI1 as a biomarker of cancer stem cells in head and neck cancer: a review. *Oncology.* 2014;86(4):199–205.

99. Sauvageau M, Sauvageau G. Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer. *Cell Stem Cell*. 2010 Sep 3;7(3):299–313.
100. Li Z, Wang Y, Yuan C, Zhu Y, Qiu J, Zhang W, et al. Oncogenic roles of Bmi1 and its therapeutic inhibition by histone deacetylase inhibitor in tongue cancer. *Lab Invest*. 2014 Dec;94(12):1431–45.
101. Rodrigues MFSD, Xavier FC de A, Andrade NP, Lopes C, Miguita Luiz L, Sedassari BT, et al. Prognostic implications of CD44, NANOG, OCT4, and BMI1 expression in tongue squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2018 Aug;40(8):1759–73.
102. He Q, Liu Z, Zhao T, Zhao L, Zhou X, Wang A. Bmi1 drives stem-like properties and is associated with migration, invasion, and poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma. *Int J Biol Sci*. 2015;11(1):1–10.
103. Kang MK, Kim RH, Kim SJ, Yip FK, Shin KH, Dimri GP, et al. Elevated Bmi-1 expression is associated with dysplastic cell transformation during oral carcinogenesis and is required for cancer cell replication and survival. *Br J Cancer*. 2007 Jan 15;96(1):126–33.
104. Yi C, Li BB, Zhou CX. Bmi-1 expression predicts prognosis in salivary adenoid cystic carcinoma and correlates with epithelial-mesenchymal transition-related factors. *Ann Diagn Pathol*. 2016 Jun;22:38–44.
105. Tamatani T, Takamaru N, Ohe G, Akita K, Nakagawa T, Miyamoto Y. Expression of CD44, CD44v9, ABCG2, CD24, Bmi-1 and ALDH1 in stage I and II oral squamous cell carcinoma and their association with clinicopathological factors. *Oncol Lett*. 2018 Jul;16(1):1133–40.
106. Adams A, Warner K, Pearson AT, Zhang Z, Kim HS, Mochizuki D, et al. ALDH/CD44 identifies uniquely tumorigenic cancer stem cells in salivary gland mucoepidermoid carcinomas. *Oncotarget*. 2015 Sep;6(29):26633–50.
107. Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu MF, et al. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*. 2008 May 7;100(9):672–9.

108. Brooks MD, Burness ML, Wicha MS. Therapeutic Implications of Cellular Heterogeneity and Plasticity in Breast Cancer. *Cell Stem Cell*. 2015 Sep 3;17(3):260–71.
109. Almeida LO, Abrahao AC, Rosselli-Murai LK, Giudice FS, Zagni C, Leopoldino AM, et al. NFκB mediates cisplatin resistance through histone modifications in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *FEBS Open Bio*. 2014;4:96–104.
110. Zhang L, Li L, Wang Y, Liu Y, Li C. MC3 mucoepidermoid carcinoma cell line enriched cancer stem-like cells following chemotherapy. *Oncol Lett*. 2014;7(5):1569–75.
111. Kim Y, Joo KM, Jin J, Nam DH. Cancer stem cells and their mechanism of chemo-radiation resistance. *Int J Stem Cells*. 2009 May;2(2):109–14.
112. Wallace SS. Base excision repair: a critical player in many games. *DNA Repair (Amst)*. 2014 Jul;19:14–26.
113. D'Souza A, Blee AM, Chazin WJ. Mechanism of action of nucleotide excision repair machinery. *Biochem Soc Trans*. 2022 Feb 28;50(1):375–86.
114. Manandhar M, Boulware KS, Wood RD. The ERCC1 and ERCC4 (XPF) genes and gene products. *Gene*. 2015 Sep 15;569(2):153–61.
115. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer*. 2005 Apr;5(4):275–84.
116. Steinbichler TB, Dudás J, Skvortsov S, Ganswindt U, Riechelmann H, Skvortsova II. Therapy resistance mediated by cancer stem cells. *Semin Cancer Biol*. 2018 Dec;53:156–67.
117. Shen DW, Pouliot LM, Hall MD, Gottesman MM. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. *Pharmacol Rev*. 2012 Jul;64(3):706–21.
118. Cutter AR, Hayes JJ. A brief review of nucleosome structure. *FEBS Lett*. 2015 Oct 7;589(20 Pt A):2914–22.

119. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet.* 2007 Apr;8(4):286–98.
120. Singh AK, Bishayee A, Pandey AK. Targeting Histone Deacetylases with Natural and Synthetic Agents: An Emerging Anticancer Strategy. *Nutrients.* 2018 Jun 6;10(6).
121. Jacobson S, Pillus L. Modifying chromatin and concepts of cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 1999;9(2):175–84.
122. Legartová S, Stixová L, Strnad H, Kozubek S, Martinet N, Dekker FJ, et al. Basic nuclear processes affected by histone acetyltransferases and histone deacetylase inhibitors. *Epigenomics.* 2013 Aug;5(4):379–96.
123. Milazzo G, Mercatelli D, di Muzio G, Triboli L, de Rosa P, Perini G, et al. Histone Deacetylases (HDACs): Evolution, Specificity, Role in Transcriptional Complexes, and Pharmacological Actionability. *Genes (Basel).* 2020 May 15;11(5).
124. McClure JJ, Li X, Chou CJ. Advances and Challenges of HDAC Inhibitors in Cancer Therapeutics. *Adv Cancer Res.* 2018;138:183–211.
125. Long PM, Tighe SW, Driscoll HE, Moffett JR, Namboodiri AMA, Viapiano MS, et al. Acetate supplementation induces growth arrest of NG2/PDGFR α -positive oligodendroglioma-derived tumor-initiating cells. *PLoS One.* 2013;8(11):e80714.
126. Marks PA, Xu WS. Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. *J Cell Biochem.* 2009 Jul 1;107(4):600–8.
127. Huang BH, Laban M, Leung CHW, Lee L, Lee CK, Salto-Tellez M, et al. Inhibition of histone deacetylase 2 increases apoptosis and p21Cip1/WAF1 expression, independent of histone deacetylase 1. *Cell Death Differ.* 2005 Apr;12(4):395–404.
128. Cang S, Feng J, Konno S, Han L, Liu K, Sharma SC, et al. Deficient histone acetylation and excessive deacetylase activity as epigenomic marks of prostate cancer cells. *Int J Oncol.* 2009 Dec;35(6):1417–22.

129. Weichert W, Röske A, Gekeler V, Beckers T, Ebert MPA, Pross M, et al. Association of patterns of class I histone deacetylase expression with patient prognosis in gastric cancer: a retrospective analysis. *Lancet Oncol*. 2008 Feb;9(2):139–48.
130. Weichert W, Denkert C, Noske A, Darb-Esfahani S, Dietel M, Kalloger SE, et al. Expression of Class I Histone Deacetylases Indicates Poor Prognosis in Endometrioid Subtypes of Ovarian and Endometrial Carcinomas. *Neoplasia*. 2008 Sep;10(9):1021–7.
131. Oehme I, Deubzer HE, Wegener D, Pickert D, Linke JP, Hero B, et al. Histone deacetylase 8 in neuroblastoma tumorigenesis. *Clin Cancer Res*. 2009 Jan 1;15(1):91–9.
132. Wagner VP, Martins MD, Guimaraes DM, Vasconcelos AC, Meurer L, Vargas PA, et al. Reduced chromatin acetylation of malignant salivary gland tumors correlates with enhanced proliferation. *J Oral Pathol Med*. 2017 Oct;46(9):792–7.
133. Rikiishi H. Autophagic and Apoptotic Effects of HDAC Inhibitors on Cancer Cells. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:1–9.
134. Liu M, Zhou J, Chen Z, Cheng ASL. Understanding the epigenetic regulation of tumours and their microenvironments: opportunities and problems for epigenetic therapy. *J Pathol*. 2017 Jan;241(1):10–24.
135. Eckschlager T, Plch J, Stiborova M, Hrabeta J. Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs. *Int J Mol Sci*. 2017 Jul 1;18(7):1414.
136. Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. Vol. 6, *Nature Reviews Cancer*. 2006. p. 38–51.
137. Lin PC, Hsieh HY, Chu PC, Chen C. Therapeutic Opportunities of Targeting Histone Deacetylase Isoforms to Eradicate Cancer Stem Cells. *Int J Mol Sci*. 2018 Jul 2;19(7):1939.
138. Cerda T, Sun XS, Vignot S, Marcy PY, Baujat B, Baglin AC, et al. A rationale for chemoradiation (vs radiotherapy) in salivary gland cancers? On behalf of the REFCOR (French rare head and neck cancer network). *Crit Rev Oncol Hematol*. 2014 Aug;91(2):142–58.

139. Burkitt K, Saloura V. Epigenetic Modifiers as Novel Therapeutic Targets and a Systematic Review of Clinical Studies Investigating Epigenetic Inhibitors in Head and Neck Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021 Oct 19;13(20):5241.
140. Zhang Z, Zhou L, Xie N, Nice EC, Zhang T, Cui Y, et al. Overcoming cancer therapeutic bottleneck by drug repurposing. *Signal Transduct Target Ther*. 2020 Jul 2;5(1):113.
141. Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, et al. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov*. 2019 Jan;18(1):41–58.
142. Losson H, Schnekenburger M, Dicato M, Diederich M. Natural Compound Histone Deacetylase Inhibitors (HDACi): Synergy with Inflammatory Signaling Pathway Modulators and Clinical Applications in Cancer. *Molecules*. 2016 Nov 23;21(11):1608.
143. Garnock-Jones KP. Panobinostat: First Global Approval. *Drugs*. 2015 Apr 3;75(6):695–704.
144. Oki Y, Buglio D, Fanale M, Fayad L, Copeland A, Romaguera J, et al. Phase I Study of Panobinostat plus Everolimus in Patients with Relapsed or Refractory Lymphoma. *Clinical Cancer Research*. 2013 Dec 15;19(24):6882–90.
145. Moore DC, Arnall JR, Harvey RD. Incidence and management of adverse events associated with panobinostat in the treatment of relapsed/refractory multiple myeloma. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*. 2019 Apr 31;25(3):613–22.
146. Gray JE, Haura E, Chiappori A, Tanvetyanon T, Williams CC, Pinder-Schenck M, et al. A Phase I, Pharmacokinetic, and Pharmacodynamic Study of Panobinostat, an HDAC Inhibitor, Combined with Erlotinib in Patients with Advanced Aerodigestive Tract Tumors. *Clinical Cancer Research*. 2014 Mar 15;20(6):1644–55.
147. Jeon YJ, Ko SM, Cho JH, Chae J II, Shim JH. The HDAC inhibitor, panobinostat, induces apoptosis by suppressing the expression of specificity protein 1 in oral squamous cell carcinoma. *Int J Mol Med*. 2013 Oct;32(4):860–6.

148. Whittaker SJ, Demierre MF, Kim EJ, Rook AH, Lerner A, Duvic M, et al. Final Results From a Multicenter, International, Pivotal Study of Romidepsin in Refractory Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2010 Oct 10;28(29):4485–91.
149. Coiffier B, Pro B, Prince HM, Foss F, Sokol L, Greenwood M, et al. Results From a Pivotal, Open-Label, Phase II Study of Romidepsin in Relapsed or Refractory Peripheral T-Cell Lymphoma After Prior Systemic Therapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2012 Feb 20;30(6):631–6.
150. Piekarcz RL, Frye R, Turner M, Wright JJ, Allen SL, Kirschbaum MH, et al. Phase II Multi-Institutional Trial of the Histone Deacetylase Inhibitor Romidepsin As Monotherapy for Patients With Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2009 Nov 10;27(32):5410–7.
151. Haigentz M, Kim M, Sarta C, Lin J, Keresztes RS, Culliney B, et al. Phase II trial of the histone deacetylase inhibitor romidepsin in patients with recurrent/metastatic head and neck cancer. *Oral Oncol*. 2012 Dec;48(12):1281–8.
152. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, et al. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 1990 Jul 4;82(13):1107–12.
153. Wang X, Luo Y, Li M, Yan H, Sun M, Fan T. Management of salivary gland carcinomas - a review. *Oncotarget*. 2017 Jan 17;8(3):3946–56.
154. Kamiloglu S, Sari G, Ozdal T, Capanoglu E. Guidelines for cell viability assays. *Food Front*. 2020 Sep 16;1(3):332–49.
155. Krishnamurthy S, Nör JE. Orosphere assay: A method for propagation of head and neck cancer stem cells. *Head Neck*. 2013 Jul;35(7):1015–21.
156. Wagner VP, Martins MD, Amoura E, Zanella VG, Roesler R, de Farias CB, et al. TrkB-Targeted Therapy for Mucoepidermoid Carcinoma. *Biomedicines*. 2020 Nov 24;8(12):531.
157. Rasband WS. ImageJ [Internet]. Bethesda, Maryland, USA: National Institutes of Health; 1997 [cited 2023 Jan 10]. Available from: <https://imagej.nih.gov/ij/>

158. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001 May 1;29(9):45e–45.
159. Hammer Ø, Harper DA, Ryan PD. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* [Internet]. 2001 Jun 22 [cited 2023 Jan 9];4(1). Available from: http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm
160. Milan TM, Eskenazi APE, Bighetti-Trevisan RL, de Almeida LO. Epigenetic modifications control loss of adhesion and aggressiveness of cancer stem cells derived from head and neck squamous cell carcinoma with intrinsic resistance to cisplatin. *Arch Oral Biol.* 2022 Sep;141:105468.
161. Bell D, Hanna EY. Salivary gland cancers: biology and molecular targets for therapy. *Curr Oncol Rep* [Internet]. 2012 Apr;14(2):166–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22246609>
162. Ghosh S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorg Chem.* 2019 Jul;88:102925.
163. Amable L. Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine. *Pharmacol Res.* 2016 Apr;106:27–36.
164. Xiao Y, Lin FT, Lin WC. ACTL6A promotes repair of cisplatin-induced DNA damage, a new mechanism of platinum resistance in cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2021 Jan 19;118(3).
165. Miller CP, Singh MM, Rivera-Del Valle N, Manton CA, Chandra J. Therapeutic Strategies to Enhance the Anticancer Efficacy of Histone Deacetylase Inhibitors. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:1–17.
166. Zhang L, Zhang J, Jiang Q, Zhang L, Song W. Zinc binding groups for histone deacetylase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2018 Jan 1;33(1):714–21.
167. Keepers YP, Pizao PE, Peters GJ, van Ark-Otte J, Winograd B, Pinedo HM. Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1991 Jul;27(7):897–900.

168. Perez RP, Godwin AK, Handel LM, Hamilton TC. A comparison of clonogenic, microtetrazolium and sulforhodamine B assays for determination of cisplatin cytotoxicity in human ovarian carcinoma cell lines. *Eur J Cancer*. 1993 Jan;29(3):395–9.
169. Wang Y, Nguyen DT, Yang G, Anesi J, Kelly J, Chai Z, et al. A Modified MTS Proliferation Assay for Suspended Cells to Avoid the Interference by Hydralazine and β -Mercaptoethanol. *Assay Drug Dev Technol*. 2021 Apr 1;19(3):184–90.
170. Ali S, Sarhan M, Palmer FL, Witcher M, Shah JP, Patel SG, et al. Cause-Specific Mortality in Patients with Mucoepidermoid Carcinoma of the Major Salivary Glands. *Ann Surg Oncol*. 2013 Jul 9;20(7):2396–404.
171. Webber LP, Wagner VP, Curra M, Vargas PA, Meurer L, Carrard VC, et al. Hypoacetylation of acetyl-histone H3 (H3K9ac) as marker of poor prognosis in oral cancer. *Histopathology*. 2017 Aug;71(2):278–86.
172. Babaei G, Aziz SGG, Jaghi NZZ. EMT, cancer stem cells and autophagy; The three main axes of metastasis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021 Jan;133:110909.
173. Novikov NM, Zolotaryova SY, Gautreau AM, Denisov E v. Mutational drivers of cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer*. 2021 Jan 5;124(1):102–14.
174. Eccles SA, Box C, Court W. Cell migration/invasion assays and their application in cancer drug discovery. In 2005. p. 391–421.
175. Lintz M, Muñoz A, Reinhart-King CA. The Mechanics of Single Cell and Collective Migration of Tumor Cells. *J Biomech Eng*. 2017 Feb 1;139(2).
176. Bocci F, Kumar Jolly M, Onuchic JN. A Biophysical Model Uncovers the Size Distribution of Migrating Cell Clusters across Cancer Types. *Cancer Res*. 2019 Nov 1;79(21):5527–35.
177. Gaggioli C, Hooper S, Hidalgo-Carcedo C, Grosse R, Marshall JF, Harrington K, et al. Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat Cell Biol*. 2007 Dec 25;9(12):1392–400.

178. Hou JM, Krebs MG, Lancashire L, Sloane R, Backen A, Swain RK, et al. Clinical Significance and Molecular Characteristics of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor Microemboli in Patients With Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2012 Feb 10;30(5):525–32.
179. Grada A, Otero-Vinas M, Prieto-Castrillo F, Obagi Z, Falanga V. Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. *Journal of Investigative Dermatology*. 2017 Feb;137(2):e11–6.
180. John M Le, Cristiane H Squarize, Rogerio M Castilho. Histone modifications: Targeting head and neck cancer stem cells. *World J Stem Cells*. 2014;6(5):511.
181. Munshi A, Hobbs M, Meyn RE. Clonogenic cell survival assay. *Methods Mol Med*. 2005;110:21–8.
182. Dontu G, Wicha MS. Survival of mammary stem cells in suspension culture: Implications for stem cell biology and neoplasia. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2005 Jan;10(1):75–86.
183. Kruyt FAE, Schuringa JJ. Apoptosis and cancer stem cells: Implications for apoptosis targeted therapy. Vol. 80, *Biochemical Pharmacology*. 2010. p. 423–30.
184. Chikamatsu K, Ishii H, Murata T, Sakakura K, Shino M, Toyoda M, et al. Alteration of cancer stem cell-like phenotype by histone deacetylase inhibitors in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Sci*. 2013 Nov;104(11):1468–75.
185. Ha H, Debnath B, Neamati N. Role of the CXCL8-CXCR1/2 Axis in Cancer and Inflammatory Diseases. *Theranostics*. 2017;7(6):1543–88.
186. Christofakis EP, Miyazaki H, Rubink DS, Yeudall WA. Roles of CXCL8 in squamous cell carcinoma proliferation and migration. *Oral Oncol*. 2008 Oct;44(10):920–6.
187. Ji X, Sun T, Xie S, Qian H, Song lixiang, Wang lihua, et al. Upregulation of CPNE7 in mesenchymal stromal cells promotes oral squamous cell carcinoma metastasis through the NF- κ B pathway. *Cell Death Discov*. 2021 Oct 14;7(1):294.

188. Karbanová J, Laco J, Marzesco AM, Janich P, Voborníková M, Mokry J, et al. Human Prominin-1 (CD133) Is Detected in Both Neoplastic and Non-Neoplastic Salivary Gland Diseases and Released into Saliva in a Ubiquitinated Form. *PLoS One*. 2014 Jun 9;9(6):e98927.
189. Zhang Q, Shi S, Yen Y, Brown J, Ta JQ, Le AD. A subpopulation of CD133+ cancer stem-like cells characterized in human oral squamous cell carcinoma confer resistance to chemotherapy. *Cancer Lett*. 2010 Mar;289(2):151–60.
190. Xu W, Wang Y, Qi X, Xie J, Wei Z, Yin X, et al. Prognostic factors of palatal mucoepidermoid carcinoma: a retrospective analysis based on a double-center study. *Sci Rep*. 2017 Mar 6;7(1):43907.
191. Mezu-Ndubuisi OJ, Maheshwari A. The role of integrins in inflammation and angiogenesis. *Pediatr Res*. 2021 May 7;89(7):1619–26.
192. Xie J, Yang P, Lin HP, Li Y, Clementino M, Fenske W, et al. Integrin $\alpha 4$ up-regulation activates the hedgehog pathway to promote arsenic and benzo[α]pyrene co-exposure-induced cancer stem cell-like property and tumorigenesis. *Cancer Lett*. 2020 Nov;493:143–55.
193. Yen CY, Huang CY, Hou MF, Yang YH, Chang CH, Huang HW, et al. Evaluating the performance of fibronectin 1 (FN1), integrin $\alpha 4\beta 1$ (ITGA4), syndecan-2 (SDC2), and glycoprotein CD44 as the potential biomarkers of oral squamous cell carcinoma (OSCC). *Biomarkers*. 2013 Feb 2;18(1):63–72.
194. Cochrane C, Szczepny A, Watkins D, Cain J. Hedgehog Signaling in the Maintenance of Cancer Stem Cells. *Cancers (Basel)*. 2015 Aug 11;7(3):1554–85.
195. Zhang YY, Kong LQ, Zhu XD, Cai H, Wang CH, Shi WK, et al. CD31 regulates metastasis by inducing epithelial–mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma via the ITGB1-FAK-Akt signaling pathway. *Cancer Lett*. 2018 Aug;429:29–40.
196. Marioni G, D'Alessandro E, Giacomelli L, Staffieri A. CD105 is a marker of tumour vasculature and a potential target for the treatment of head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2010 May;39(5):361–7.

197. Mahapatra N, Uma Rao K, Ranganathan K, Joshua E, Thavarajah R. Study of expression of endoglin (CD105) in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. 2021;25(3):552.
198. Derakhshan S, Mahdavi N, Kardouni Khoozestani N, Nasr Esfahani B, Heidarian F, Rahrotaban S, et al. Assessment of the association of OCT3/4 with GLUT1 and CD105 in oral squamous cell carcinoma using dual immunohistochemistry. *BMC Oral Health*. 2022 Dec 19;22(1):300.
199. Koochek Dezfuli M, Seyedmajidi M, Nafarzadeh S, Yazdani F, Bijani A. Angiogenesis and Lymphangiogenesis in Salivary Gland Adenoid Cystic Carcinoma and Mucoepidermoid Carcinoma. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2019 Dec 1;20(12):3547–53.
200. Tang DG, Chen YQ, Newman PJ, Shi L, Gao X, Diglio CA, et al. Identification of PECAM-1 in solid tumor cells and its potential involvement in tumor cell adhesion to endothelium. *Journal of Biological Chemistry*. 1993 Oct 25;268(30):22883–94.
201. Sapino A, Bongiovanni M, Cassoni P, Righi L, Arisio R, Deaglio S, et al. Expression of CD31 by cells of extensive ductal in situ and invasive carcinomas of the breast. *J Pathol*. 2001 Jun;194(2):254–61.
202. Samiec M, Romanek J, Lipiński D, Opiela J. Expression of pluripotency-related genes is highly dependent on trichostatin A-assisted epigenomic modulation of porcine mesenchymal stem cells analysed for apoptosis and subsequently used for generating cloned embryos. *Animal Science Journal*. 2019 Sep 12;90(9):1127–41.
203. Veneri P, Vazquez Echeagaray C, Oses C, Stortz M, Guberman A, Levi V. Dynamical reorganization of the pluripotency transcription factors Oct4 and Sox2 during early differentiation of embryonic stem cells. *Sci Rep*. 2020 Mar 23;10(1):5195.
204. Sun R, Guan H, Liu W, Liang J, Wang F, Li C. Expression of BMP7 in cervical cancer and inhibition of epithelial-mesenchymal transition by BMP7 knockdown in HeLa cells. *Int J Mol Med*. 2020 Feb 27;
205. Ehata S, Miyazono K. Bone Morphogenetic Protein Signaling in Cancer; Some Topics in the Recent 10 Years. *Front Cell Dev Biol*. 2022 May 25;10.

206. Ying X, Sun Y, He P. Bone Morphogenetic Protein-7 Inhibits EMT-Associated Genes in Breast Cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2015;37(4):1271–8.
207. Kobayashi A, Okuda H, Xing F, Pandey PR, Watabe M, Hirota S, et al. Bone morphogenetic protein 7 in dormancy and metastasis of prostate cancer stem-like cells in bone. *Journal of Experimental Medicine*. 2011 Dec 19;208(13):2641–55.
208. Jiao X, Li Z, Wang M, Katiyar S, di Sante G, Farshchian M, et al. Dachshund Depletion Disrupts Mammary Gland Development and Diverts the Composition of the Mammary Gland Progenitor Pool. *Stem Cell Reports*. 2019 Jan;12(1):135–51.
209. Liu Y, Han N, Zhou S, Zhou R, Yuan X, Xu H, et al. The DACH/EYA/SIX gene network and its role in tumor initiation and progression. *Int J Cancer*. 2016 Mar 1;138(5):1067–75.
210. Wang P. Suppression of DACH1 promotes migration and invasion of colorectal cancer via activating TGF- β -mediated epithelial-mesenchymal transition. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 May;460(2):314–9.
211. Paluszczak J, Sarbak J, Kostrzevska-Poczekaj M, Kiwerska K, Jarmuż-Szymczak M, Grenman R, et al. The negative regulators of Wnt pathway—DACH1, DKK1, and WIF1 are methylated in oral and oropharyngeal cancer and WIF1 methylation predicts shorter survival. *Tumor Biology*. 2015 Apr 7;36(4):2855–61.
212. Zhang L, Wang CQ, Liu F, Dong ZQ, Zhao P, Dong X ning, et al. Effects of human Dachshund homolog 1 on the proliferation, migration, and adhesion of squamous cell carcinoma of the tongue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2016 Jan;121(1):58–66.
213. Zhao F, Wang M, Li S, Bai X, Bi H, Liu Y, et al. DACH1 inhibits SNAIL1-mediated epithelial–mesenchymal transition and represses breast carcinoma metastasis. *Oncogenesis*. 2015 Mar 16;4(3):e143–e143.
214. Xu H, Yu S, Yuan X, Xiong J, Kuang D, Pestell RG, et al. DACH1 suppresses breast cancer as a negative regulator of CD44. *Sci Rep*. 2017 Jun 28;7(1):4361.

215. Wu K, Jiao X, Li Z, Katiyar S, Casimiro MC, Yang W, et al. Cell Fate Determination Factor Dachshund Reprograms Breast Cancer Stem Cell Function. *Journal of Biological Chemistry*. 2011 Jan;286(3):2132–42.

APÊNDICE A – Viabilidade celular (média ± desvio-padrão) dos fármacos avaliados no escaneamento inicial (placas 4858 e 4859) após 48h de tratamento

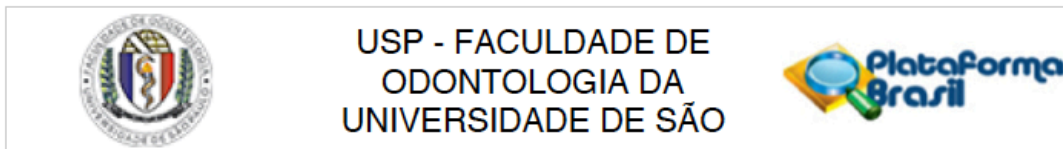
Placa No. 4858					Placa No. 4859				
Nome da droga	UM-HMC1		UM-HMC3A		Nome da droga	UM-HMC1		UM-HMC3A	
	VC (%)	DP (±)	VC (%)	DP (±)		VC (%)	DP (±)	VC (%)	DP (±)
1. Allopurinol	312.8	20.5	113.8	1.1	81. Enzalutamide	61.8	54.7	1.7	8.3
2. Dacarbazina	233.2	17.0	80.6	23.6	82. Romidepsin**	1.9	0.7	14.8	3.3
3. Azacitidine	142.6	28.6	77.3	21.6	83. Doxorubicin hydrochloride	11.4	14.2	2.2	2.3
4. Procarbazine hydrochloride	337.3	21.0	120.2	20.6	84. Plicamycin	3.8	4.9	13.5	4.0
5. Gemcitabine hydrochloride	128.2	38.2	65.7	14.8	85. Vinorelbine tartrate	39.1	37.3	0.7	2.6
6. Chlorambucil	211.9	6.4	89.5	8.2	86. Cabazitaxel*	4.8	6.9	7.0	5.9
7. Megestrol acetate	315.3	58.7	78.4	31.0	87. Abiraterone	7.4	11.8	15.7	7.7
8. Niraparib hydrochloride	231.5	18.9	73.6	11.1	88. Vandetanib	83.0	2.1	130.5	18.8
9. Lenvatinib	262.8	105.8	70.9	15.6	89. Omacetaxine mepesuccinate*	5.0	0.7	11.9	3.3
10. Topotecan hydrochloride	45.9	14.0	5.0	14.7	90. Etoposide	162.4	5.7	129.9	11.0
11. Flurouracil	138.4	61.4	32.3	5.6	91. Vinblastine sulfate	90.6	15.2	70.2	3.2
12. Arsenic trioxide	300.1	26.2	123.5	8.6	92. Irinotecan hydrochloride	246.2	8.9	143.2	33.6
13. Decitabine	235.8	41.3	103.3	11.1	93. Dabrafenib mesylate	263.9	29.5	148.6	27.0
14. Streptozocin	247.2	8.7	123.4	28.4	94. Amfostine	228.9	19.7	149.6	7.8
15. Vorinostat	106.0	1.6	21.8	2.2	95. Erismodegib	206.4	21.4	138.9	8.4
16. Melphalan hydrochloride	221.3	51.2	62.1	4.8	96. Ixazomib citrate	57.6	15.9	19.6	8.4
17. Bendamustine hydrochloride	255.1	32.8	101.1	34.0	97. Tamoxifen citrate	221.9	16.7	139.0	11.4
18. Bortezomib	41.5	7.5	0.0	0.1	98. Vincristine sulfate	99.7	27.7	74.4	5.7
19. Vismodegib	207.3	19.7	83.1	20.7	99. Docetaxel	142.3	22.1	112.9	6.1
20. Dasatinib	153.7	30.5	44.8	19.0	100. Venetoclax	251.9	42.8	152.9	11.0
21. Hydroxyurea	243.6	18.9	78.2	17.1	101. Pazopanib hydrochloride	148.7	11.9	118.9	22.7
22. Temozolomide	240.4	34.7	88.5	3.1	102. Vemurafenib	186.3	62.6	123.4	14.6
23. Carmustine	275.2	38.2	104.8	20.1	103. Ponatinib*	15.0	7.6	3.7	0.4
24. Capecitabine	121.8	26.1	44.2	13.7	104. Epirubicin hydrochloride	42.0	23.0	40.3	11.6
25. Exemestane	244.9	32.3	106.4	25.5	105. Teniposide	100.0	64.3	95.3	8.5
26. Mitomycin	109.1	18.8	-0.9	10.5	106. Temsirolimus	97.4	39.4	113.8	6.7
27. Carboplatin	247.2	25.3	81.6	17.0	107. Imiquimod	150.1	22.5	135.7	28.0
28. Axitinib	138.6	16.8	24.2	31.6	108. Nilotinib	155.9	35.2	126.1	3.1
29. Rucaparib phosphate	212.5	16.3	5.8	35.4	109. Regorafenib	145.7	27.5	138.7	31.7
30. Imatinib	136.5	56.7	159.4	70.1	110. Cabozantinib	122.1	29.1	136.2	40.1
31. Thioguanine	97.6	50.5	104.7	15.4	111. Estramustine phosphate sodium	89.0	80.7	148.2	48.4
32. Busulfan	96.8	26.3	250.2	10.2	112. Bleomycin sulfate	88.5	35.3	117.4	24.6
33. Cyclophosphamide	142.6	32.6	222.2	76.2	113. Fulvestrant	123.2	22.2	143.8	25.6
34. Ifosfamide	89.3	31.1	213.4	28.6	114. Palbociclib	140.0	5.0	145.7	50.9
35. Anastrozole	104.9	3.0	231.3	23.4	115. Alecetinib	77.1	62.0	113.8	3.8
36. Mitotane	137.1	14.6	270.3	17.0	116. Osimertinib	227.7	30.5	137.7	16.9
37. Oxaliplatin	140.8	14.1	221.0	64.7	117. Bosutinib	227.4	11.5	106.8	6.9
38. Uridine triacetate	152.0	35.2	275.8	8.8	118. Lapatinib	147.0	28.2	74.6	24.6
39. Crizotinib	128.6	9.2	41.9	37.5	119. Paclitaxel	123.9	0.2	81.4	27.1
40. Sorafenib	150.6	33.9	197.2	21.1	120. Everolimus	174.2	9.9	106.3	11.0
41. Mercaptopurine	155.1	36.1	130.1	29.0	121. Plerixafor	190.2	13.8	122.0	11.5
42. Altretamine	116.5	19.2	183.6	21.5	122. Idarubicin hydrochloride	59.2	10.7	28.3	13.7
43. Uracil mustard	119.3	39.2	194.0	19.5	123. Cobimetinib	128.7	5.8	91.1	6.4
44. Cisplatin	142.6	15.1	252.1	56.7	124. Certinib	95.2	27.7	10.6	16.3
45. Letrozole	140.5	44.1	225.0	6.9	125. Sirolimus	167.4	5.7	107.1	19.6
46. Clofarabine	23.7	5.7	75.2	27.2	126. Trametinib	160.4	45.8	95.6	1.7
47. Fludarabine phosphate	143.0	57.0	236.3	18.4	127. Triethylenemelamine	166.9	20.8	117.6	17.1
48. Mitoxantrone	9.6	4.8	15.3	3.0	128. Ixabepilone	94.2	23.6	83.8	16.2
49. Idelalisib	148.1	52.8	240.8	9.3	129. Daunorubicin hydrochloride	33.0	9.9	22.2	6.5
50. Raloxifene	126.8	18.9	215.0	51.7	130. Daclotromycin	34.4	7.2	34.5	2.8
51. Mechlorethamine hydrochloride	65.8	33.2	134.6	51.5	131. Valrubicin	47.8	4.7	2.1	2.0
52. Floxuridine	99.5	21.8	80.1	41.1	132. Carfilzomib*	17.9	5.1	10.3	1.6
53. Cytarabine hydrochloride	89.5	40.2	118.7	47.4	133. Zoledronic acid	177.3	14.3	127.8	25.9
54. Tretinoin	91.7	53.9	112.2	19.5					
55. Lenalidomide	141.9	39.2	192.1	93.0					
56. Belinostat	32.3	1.7	16.0	25.9					
57. Capecitabine	141.0	17.4	183.8	61.8					
58. Gafitinib	62.4	37.4	188.2	33.6					
59. Ibrutinib	95.6	21.7	60.4	11.7					
60. Afatinib	117.4	9.4	80.9	21.9					
61. Thiotepa	143.3	9.5	83.7	32.3					
62. Methoxsalen	125.6	3.5	76.6	15.6					
63. Thalidomide	102.6	11.9	65.9	9.8					
64. Dexrazoxane	79.7	8.3	59.3	20.0					
65. Nelarabine	117.4	13.3	60.4	13.9					
66. Panobinostat**	11.1	1.8	-6.7	0.8					
67. Celecoxib	152.6	30.9	62.5	14.8					
68. Erlotinib hydrochloride	74.6	12.8	58.5	18.1					
69. Ribociclib	98.0	11.1	57.9	5.1					
70. Pralatrexate	52.3	8.1	34.1	20.5					
71. Aminolevulinic acid hydrochloride	77.1	1.8	45.6	32.6					
72. Lomustine	0.6	0.6	-8.8	1.5					
73. Trifluridine	92.7	16.3	48.7	3.6					
74. Pentostatin	100.2	10.9	59.6	8.4					
75. Pomalidomide	97.2	21.6	61.5	9.9					
76. Pipobroman	60.7	52.8	73.6	13.7					
77. Sunitinib	42.6	36.5	25.5	6.6					
78. Olaparib	38.9	33.1	12.1	5.8					
79. Methotrexate	1.0	0.1	8.5	6.9					
80. Pemetrexed, Disodium salt, Heptahydrate	0.5	0.3	-0.2	2.4					

VC – Porcentagem média de células viáveis após o tratamento com os fármacos (5 µM); DP – Desvio padrão. *Linhas em destaque mostram os fármacos com os melhores efeitos citotóxicos sobre as linhagens de CME (VC ≥ 70%).

**Fármacos selecionados e testados nos experimentos subsequentes.

Fonte: O autor.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito de quimioterápicos sobre células tronco tumorais derivadas de carcinoma mucoepidermóide de glândula salivar: uma análise in vitro e in vivo.

Pesquisador: Fabio Daumas Nunes

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 93854318.1.0000.0075

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Conselho Nacional de Desenvolvimento e Tecnologia

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.798.905

Apresentação do Projeto:

Entre os tumores malignos da glândula salivar, o carcinoma mucoepidermóide (CME) é o mais prevalente. Com uma alta resistência ao tratamento antitumoral convencional, a cirurgia associada à radioterapia é o tratamento eletivo atual para o CME, deixando sequelas graves e comprometendo a qualidade de vida dos indivíduos afetados.

Objetivo da Pesquisa:

Este projeto tem como objetivo principal verificar o efeito citotóxico de inibidores de histona deacetilase, inibidor de tirosina quinase, e suas associações, sobre células que apresentem assinatura fenotípica genotípica de células tronco tumorais de carcinoma mucoepidermóide in vitro e in vivo.

 Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos apresentados pelo projeto proposto se deve ao manejo dos produtos químicos e biológicos presentes nos reagentes dos experimentos e medicamentos a serem manipulados. Para minimizar os riscos para os pesquisadores, toda a equipe envolvida na execução do projeto fará uso de

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)3091-7960 Fax: (11)3091-7814 E-mail: cepfo@usp.br



USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 2.798.905

equipamentos de proteção individual. Além disso, a equipe se propõe a seguir as normas apresentadas pelo protocolo de segurança dos laboratórios onde serão executados os experimentos.

Benefícios:

Este estudo traz o reposicionamento de fármacos como abordagem inovadora para identificar uma quimioterapia mais eficaz para o carcinoma mucoepidermóide de glândula salivar, uma vez que, não existem agentes quimioterápicos eficazes contra esse tipo de câncer. Dessa forma, esse estudo contribuirá para melhorar o resultado do tratamento e sobrevivência de pacientes com carcinoma mucoepidermóide de glândula salivar.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Esse estudo poderá contribuir para melhorar o resultado do tratamento e sobrevivência de pacientes com carcinoma mucoepidermóide de glândula salivar.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos exigidos pela Resolução CNS 466/12 foram anexados corretamente (Projeto Detalhado, Folha de Rosto, Autorização do Biobanco. Não há necessidade de TCLE. Cronograma adequado.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

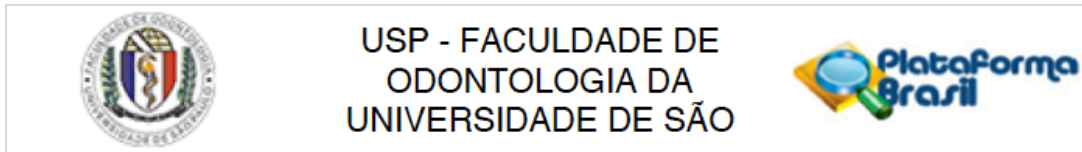
Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P	16/07/2018		Aceito

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 Fax: (11)3091-7814 E-mail: cepfo@usp.br



Continuação do Parecer: 2.798.905

Básicas do Projeto	ETO_1141943.pdf	17:14:18		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Plataforma_Brasil_Emilia_Versao_Final.pdf	16/07/2018 17:13:08	EMILIA MARIA GOMES AGUIAR	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Carta_Biobanco_Emilia.pdf	11/07/2018 14:27:09	EMILIA MARIA GOMES AGUIAR	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRostoEmilia.pdf	23/05/2018 17:16:26	Lucyene Miguita Luiz	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Emilia_Justificativa_de_ausencia_de_TCLE.pdf	23/05/2018 04:57:27	Lucyene Miguita Luiz	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 03 de Agosto de 2018

Assinado por:
Marla Gabriela Haye Blazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)3091-7960 Fax: (11)3091-7814 E-mail: cepfo@usp.br

ANEXO B– Lista dos 84 genes encontrados em CTTs humanas, presentes na placa de RT² Profiler PCR Array (Human Cancer Stem Cells, Cat. No. PAHS-176Z, Qiagen, Hilden, NRW, Alemanha)

Position	UniGene	GenBank	Symbol	Description
A01	Hs.404102	NM_178559	ABCB5	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 5
A02	Hs.480218	NM_004827	ABCG2	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2
A03	Hs.740441	NM_001627	ALCAM	Activated leukocyte cell adhesion molecule
A04	Hs.76392	NM_000689	ALDH1A1	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1
A05	Hs.367437	NM_000051	ATM	Ataxia telangiectasia mutated
A06	Hs.434961	NM_000332	ATXN1	Ataxin 1
A07	Hs.590970	NM_001699	AXL	AXL receptor tyrosine kinase
A08	Hs.731287	NM_005180	BMI1	BMI1 polycomb ring finger oncogene
A09	Hs.473163	NM_001719	BMP7	Bone morphogenetic protein 7
A10	Hs.644105	NM_013230	CD24	CD24 molecule
A11	Hs.374990	NM_001773	CD34	CD34 molecule
A12	Hs.479214	NM_001775	CD38	CD38 molecule
B01	Hs.502328	NM_000610	CD44	CD44 molecule (Indian blood group)
B02	Hs.595920	NM_001274	CHEK1	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)
B03	Hs.129452	NM_004392	DACH1	Dachshund homolog 1 (Drosophila)
B04	Hs.631988	NM_001954	DDR1	Discoidin domain receptor tyrosine kinase 1
B05	Hs.40499	NM_012242	DKK1	Dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)
B06	Hs.379912	NM_005618	DLL1	Delta-like 1 (Drosophila)
B07	Hs.511076	NM_019074	DLL4	Delta-like 4 (Drosophila)
B08	Hs.202672	NM_001379	DNMT1	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1
B09	Hs.419815	NM_001963	EGF	Epidermal growth factor
B10	Hs.76753	NM_000118	ENG	Endoglin
B11	Hs.542050	NM_002354	EPCAM	Epithelial cell adhesion molecule
B12	Hs.446352	NM_004448	ERBB2	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)
C01	Hs.39925	NM_000126	ETFA	Electron-transfer-flavoprotein, alpha polypeptide
C02	Hs.533683	NM_000141	FGFR2	Fibroblast growth factor receptor 2
C03	Hs.514038	NM_004475	FLOT2	Flotillin 2
C04	Hs.155651	NM_021784	FOXA2	Forkhead box A2
C05	Hs.59368	NM_032682	FOXP1	Forkhead box P1
C06	Hs.173859	NM_003507	FZD7	Frizzled family receptor 7
C07	Hs.524134	NM_002051	GATA3	GATA binding protein 3
C08	Hs.445733	NM_002093	GSK3B	Glycogen synthase kinase 3 beta
C09	Hs.88556	NM_004964	HDAC1	Histone deacetylase 1
C10	Hs.504609	NM_002165	ID1	Inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein
C11	Hs.597664	NM_001556	IKKBK	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta
C12	Hs.624	NM_000584	IL8	Interleukin 8
D01	Hs.482077	NM_002203	ITGA2	Integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)
D02	Hs.440955	NM_000885	ITGA4	Integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)
D03	Hs.133397	NM_000210	ITGA6	Integrin, alpha 6
D04	Hs.643813	NM_002211	ITGB1	Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)
D05	Hs.626544	NM_000214	JAG1	Jagged 1
D06	Hs.656213	NM_004972	JAK2	Janus kinase 2
D07	Hs.479754	NM_000222	KIT	V-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog

Position	UniGene	GenBank	Symbol	Description
D08	Hs.1048	NM_003994	KITLG	KIT ligand
D09	Hs.567674	NM_173484	KLF17	Kruppel-like factor 17
D10	Hs.376206	NM_004235	KLF4	Kruppel-like factor 4 (gut)
D11	Hs.549084	NM_004690	LATS1	LATS, large tumor suppressor, homolog 1 (Drosophila)
D12	Hs.86154	NM_024674	LIN28A	Lin-28 homolog A (C. elegans)
E01	Hs.23616	NM_001004317	LIN28B	Lin-28 homolog B (C. elegans)
E02	Hs.631951	NM_014757	MAML1	Mastermind-like 1 (Drosophila)
E03	Hs.306178	NM_006343	MERTK	C-mer proto-oncogene tyrosine kinase
E04	Hs.712553	NM_021950	MS4A1	Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1
E05	Hs.89603	NM_001018016	MUC1	Mucin 1, cell surface associated
E06	Hs.202453	NM_002467	MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
E07	Hs.25960	NM_005378	MYCN	V-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)
E08	Hs.635882	NM_024865	NANOG	Nanog homeobox
E09	Hs.618430	NM_003998	NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
E10	Hs.709191	NM_000625	NOS2	Nitric oxide synthase 2, inducible
E11	Hs.495473	NM_017617	NOTCH1	Notch 1
E12	Hs.487360	NM_024408	NOTCH2	Notch 2
F01	Hs.376675	NM_000442	PECAM1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule
F02	Hs.491582	NM_000930	PLAT	Plasminogen activator, tissue
F03	Hs.466871	NM_002659	PLAUR	Plasminogen activator, urokinase receptor
F04	Hs.249184	NM_002701	POU5F1	POU class 5 homeobox 1
F05	Hs.614734	NM_006017	PROM1	Prominin 1
F06	Hs.494538	NM_000264	PTCH1	Patched 1
F07	Hs.654514	NM_002838	PTPRC	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
F08	Hs.706933	NM_021818	SAV1	Salvador homolog 1 (Drosophila)
F09	Hs.369779	NM_012238	SIRT1	Sirtuin 1
F10	Hs.437846	NM_005631	SMO	Smoothed, frizzled family receptor
F11	Hs.48029	NM_005985	SNAI1	Snail homolog 1 (Drosophila)
F12	Hs.732963	NM_003106	SOX2	SRY (sex determining region Y)-box 2
G01	Hs.463059	NM_003150	STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)
G02	Hs.409911	NM_000116	TAZ	Tafazzin
G03	Hs.494622	NM_004612	TGFBR1	Transforming growth factor, beta receptor 1
G04	Hs.644697	NM_006288	THY1	Thy-1 cell surface antigen
G05	Hs.644998	NM_000474	TWIST1	Twist homolog 1 (Drosophila)
G06	Hs.422585	NM_057179	TWIST2	Twist homolog 2 (Drosophila)
G07	Hs.249441	NM_003390	WEE1	WEE1 homolog (S. pombe)
G08	Hs.248164	NM_005430	WNT1	Wingless-type MMTV integration site family, member 1
G09	Hs.484047	NM_015238	WWC1	WW and C2 domain containing 1
G10	Hs.503692	NM_006106	YAP1	Yes-associated protein 1
G11	Hs.124503	NM_030751	ZEB1	Zinc finger E-box binding homeobox 1
G12	Hs.34871	NM_014795	ZEB2	Zinc finger E-box binding homeobox 2
H01	Hs.520640	NM_001101	ACTB	Actin, beta
H02	Hs.534255	NM_004048	B2M	Beta-2-microglobulin
H03	Hs.544577	NM_002046	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H04	Hs.412707	NM_000194	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
H05	Hs.546285	NM_001002	RPLP0	Ribosomal protein, large, P0
H06	N/A	SA_00105	HGDC	Human Genomic DNA Contamination
H07	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H08	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H09	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H10	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
H11	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
H12	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control