

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

MARCELA DE OLIVEIRA TAVARES

**PAPEL DA HDAC6 NA REGULAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E
QUIMIORRESISTÊNCIA DE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS EM CARCINOMA
ORAL.**

Ribeirão Preto

2022

MARCELA DE OLIVEIRA TAVARES

**PAPEL DA HDAC6 NA REGULAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E
QUIMIORRESISTÊNCIA DE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS
EM CARCINOMA ORAL**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Programa de Pós- Graduação em Biologia Oral

Orientador: Profa. Dra. Luciana Oliveira de Almeida

Ribeirão Preto

2022

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO COVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação

Serviço de Documentação Odontológica

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Tavares, Marcela de Oliveira

Papel da HDAC6 na regulação do estresse oxidativo e quimiorresistência de células-tronco tumorais em carcinoma oral. Ribeirão Preto, 2022.

84p. : il. ; 30cm

Dissertação (Mestrado) apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Programa de Pós-Graduação em Biologia Oral.

Orientador: Almeida, Luciana Oliveira

1. Células-tronco tumorais; 2. Carcinoma oral; 3. Quimiorresistência; 4. HDAC6; 5. Estresse Oxidativo ; 6. Epigenética

FOLHA DE APROVAÇÃO

TAVARES, Marcela de Oliveira

Papel da HDAC6 na regulação do estresse oxidativo e quimiorresistência de células-tronco tumorais em carcinoma oral

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa: Biologia Oral

Aprovado em: __/__/____

BANCADA EXAMINADORA

Prof. Dr.

Instituição: Assinatura

Prof. Dr.

Instituição: Assinatura

Prof. Dr.

Instituição: Assinatura

Trabalho desenvolvido nos Laboratórios de Cultura de Célula e de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo com auxílio financeiro da FAPESP (Processo no. 2019/19301-7).

À Jesus Cristo, a Mãe Rainha e a São Miguel Arcanjo!

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo e todos agradeço a Deus, a Virgem Maria e São Miguel Arcanjo pela força, coragem e proteção!

À Universidade de São Paulo e Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto.

À meu pai Ary Tavares (1957-2021), madrinha Aldinha (x-2013) e avó Clotilde (1920-2013), que sempre estarão comigo em meu coração.

À Imaculada Jainaira Miguel e ao Prof. Marcio Mateus Beloti, os primeiros que me acolheram.

À orientadora Profa. Luciana Oliveira de Almeida e sua equipe, pela jornada.

À minha orientadora de graduação Anna Okorokova que me proporciono à base de tudo, profissional e pessoal.

A todos os colegas de trabalho, de bancada, de fluxo e funcionários do laboratório, incluindo a equipe de limpeza.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo n. 2019/19301-7 pelo financiamento do projeto de pesquisa, tornando possível a produção da tese.

E, por fim a todos que indireta ou diretamente contribuíram para realização de mais uma conquista.

Obrigado!!

RESUMO

TAVARES, Marcela de Oliveira. **Papel da HDAC6 na regulação do estresse oxidativo e quimiorresistência de células-tronco tumorais em carcinoma oral. Dissertação (Mestrado).** Ribeirão Preto. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2021. 84p.

A quimiorresistência é um fator de intensificação de desenvolvimento de metástase durante as terapias contra o câncer. Inicia-se com um pequeno grupo de células identificadas como células-tronco tumorais (CTTs). No carcinoma oral, a população de CTTs é acumulada após a quimioterapia e modificações epigenéticas podem estar controlando esse processo. As HDACs são um grupo de enzimas desacetilases que regulam epigeneticamente a expressão gênica através da remoção de grupos acetila dos resíduos de lisina em histonas e proteínas não-histonas. HDAC6 atua em vários processos fisiológicos, incluindo resposta ao estresse oxidativo, autofagia e resposta ao dano no DNA, e seu acúmulo está associado ao desenvolvimento de câncer e acúmulo de CTTs. Este projeto teve como objetivo investigar o papel da HDAC6 na de quimiorresistência mediado pelas CTTs em carcinoma oral; avaliar a influência da HDAC6 na resposta aos danos do DNA e estresse oxidativo e sua aplicação como potencial alvo terapêutico para eliminar CTTs e reverter quimiorresistência. Foram utilizadas linhagens de carcinoma oral selvagem (CAL27 e SCC9), resistentes à cisplatina (CAL27 CisR e SCC9 CisR) e as células-tronco tumorais (CTT+) e não-tronco (CTT-) derivadas das linhagens resistentes. Identificamos aumento na expressão e concentração de HDAC6 por qPCR e Western Blot nas linhagens resistentes e nas CTTs. Determinamos por ensaio de esferas o uso de 15nM de Tubastatina A para reduzir as CTTs. Por imunofluorescência identificamos que HDAC6 desloca-se para o núcleo nas células resistentes, podendo contribuir na proteção contra danos no DNA, como observado pela expressão reduzida de phospho-H2A.X nas linhagens resistentes. Tubastatina A aumentou os níveis de phospho-H2A.X e diminuiu PRDX2 nas CTTs. O uso combinado de Tubastatina A e Cisplatina aumentou phospho-H2A.X. O estresse oxidativo foi avaliado por ensaio de EROs e as enzimas antioxidantes (PRDX2, PRDX6, TXN e SOD2) por qPCR. Ressaltamos a expressão de PRDX2 elevada em todas as amostras. Identificamos por ensaio de apoptose celular que o uso de tubastatina A induz apoptose em CisR e CTTs das nossas

linhagens, e em conjunto com cisplatina, obtivemos sucesso na indução apoptótica. Tubastatina A, ainda é capaz de induzir a redução de CTTs, identificada por citometria de fluxo. Concluimos que existe uma relação entre o acúmulo de HDAC6, diferenciação celular, estresse oxidativo, danos no DNA e apoptose. Essa interação pode estar influenciando a quimiorresistência celular, e sugerimos que a inibição farmacológica de HDAC6 pode ser uma estratégia terapêutica eficaz para reduzir as células-tronco tumorais e reverter a resistência à cisplatina.

Palavra-chave: HDAC6, células-tronco tumorais, quimiorresistência, carcinoma oral.

ABSTRACT

TAVARES, Marcela de Oliveira. **The role of HDAC6 in the regulation of oxidative stress and chemoresistance of tumor stem cells in oral carcinoma.** Thesis (Master Degree). Ribeirão Preto. School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 2020. 84p.

Chemoresistance is a factor in enhancing metastasis development during cancer therapies. It starts with a small group of cells identified as tumor stem cells (CTTs). In oral carcinoma, the population of CTTs is accumulated after chemotherapy and epigenetic changes may be controlling this process. HDACs are a group of deacetylase enzymes that epigenetically regulate gene expression by removing acetyl groups from lysine residues in histones and non-histone proteins. HDAC6 acts on several physiological processes, including oxidative stress response, autophagy and DNA damage response, and its accumulation is associated with the development of cancer and the accumulation of CTTs. This project aimed to investigate the role of HDAC6 in CTT-mediated chemoresistance in oral carcinoma; evaluate the influence of HDAC6 in the response to DNA damage and oxidative stress and its application as a potential therapeutic target to eliminate CTTs and reverse chemoresistance. Strains of wild oral carcinoma (CAL27 and SCC9), resistant to cisplatin (CAL27 CisR and SCC9 CisR) and tumor stem cells (CTT+) and non-stem (CTT-) derived from the resistant strains were used. We identified an increase in HDAC6 expression and concentration by qPCR and Western Blot in resistant strains and in CTTs. We determined by sphere assay the use of 15nM Tubastatin A to reduce CTTs. By immunofluorescence, we identified that HDAC6 moves to the nucleus in resistant cells, which may contribute to protection against DNA damage, as observed by the reduced expression of phospho-H2A.X in resistant strains. Tubastatin A increased phospho-H2A.X levels and decreased PRDX2 in CTTs. The combined use of Tubastatin A and Cisplatin increased phospho-H2A.X. Oxidative stress was evaluated by ROS assay and antioxidant enzymes (PRDX2, PRDX6, TXN and SOD2) by qPCR. We emphasize the high expression of PRDX2 in all samples. We identified by cell apoptosis assay that the use of tubastatin A induces apoptosis in CisR and CTTs of our strains, and together with cisplatin we obtained success in apoptotic induction. Tubastatin A is still able to induce the reduction of CTTs, identified by flow cytometry. We conclude that there is a

relationship between HDAC6 accumulation, cell differentiation, oxidative stress, DNA damage and apoptosis. This interaction may be influencing cellular chemoresistance, and we suggest that pharmacological inhibition of HDAC6 may be an effective therapeutic strategy to reduce tumor stem cells and reverse cisplatin resistance.

Keyword: HDAC6, tumor stem cells, chemoresistance, oral carcinoma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Incidência, Mortalidade e Prevalência de Câncer no Brasil em 2020 (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2020).	19
Figura 2 Distribuição dos casos de câncer de lábio e cavidade oral segundo o intervalo entre o diagnóstico e o primeiro tratamento oncológico no Brasil no ano de 2018 (INCA, 2020a).	20
Figura 3 Distribuição dos casos de câncer de cavidade oral segundo tempo e tipo de modalidade terapêutica do primeiro tratamento. Brasil, 2013 a 2019 (INCA, 2020b).	23
Figura 4 Estratégia de combinação de drogas epigenéticas para tratamento de câncer (MOHAMMAD; BARBASH; CREASY, 2019).	28
Figura 5 Avaliação do perfil de HDAC6 nas linhagens selvagens e resistentes à cisplatina. Linhagens derivadas de tumor na base da língua selvagem (WT) e resistentes à cisplatina (CisR) de CAL27 e SCC9. A perfil de expressão gênica foi determinado pela técnica de qPCR, * $p < 0.05$. B concentração proteica por Western Blot com anti-HDAC6 e GAPDH. C deslocamento de HDAC6 para o núcleo por imunofluorescência, com o anticorpo anti-HDAC6 e calculado a porcentagem de células positivas para HDCA6 nuclear em células sensíveis e resistentes de CAL27 e SCC9 (** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$) (C).	40
Figura 6 Análise de dados de pacientes com câncer de cabeça e pescoço e a expressão de HDAC6. Os dados foram obtidos através da plataforma TCGA (The Cancer Genome Atlas Program). Disponível em: https://portal.gdc.cancer.gov/projects/TCGA-HNSC Acesso em 10/11/2021.	41
Figura 7 Análise da sobrevida de pacientes relacionados à concentração de HDAC6. Os dados foram obtidos através da plataforma TCGA (The Cancer Genome Atlas Program). Comparação entre os níveis de expressão de HDAC6, alto e baixo, em tumores de cabeça e pescoço. Disponível em: https://portal.gdc.cancer.gov/projects/TCGA-HNSC Acesso em 10/11/2021.	42
Figura 8 Avaliação dos danos do DNA em linhagens de carcinoma oral. O ensaio de imunofluorescência com o anticorpo anti-p-H2A.X em células de CAL27 e SCC9. O número de células positivas para phospho-H2A.X foram quantificados pelo software ImageJ (** $p < 0.01$).	43

Figura 9 Avaliação dos níveis de EROs nas populações selvagem e resistente a cisplatina de carcinoma oral. O ensaio de EROs e quantificação da fluorescência com a sonda DCFDA na linhagem CAL27 (***) p<0.001) e na linhagem SCC9 (* p<0.05).....	44
Figura 10 Análise da expressão gênica de enzimas antioxidantes em câncer de cabeça e pescoço. Os dados foram obtidos através da plataforma TCGA (The Cancer Genome Atlas Program). As amostras selecionadas são derivadas de pacientes com tumores primários, metastáticos e de tecido normal. Disponível em: www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga . Acesso em 10/11/2021.....	46
Figura 11 Avaliação do perfil de expressão de genes envolvidos na regulação do estresse oxidativo em linhagens de carcinoma oral resistentes à cisplatina. Foram utilizadas as células selvagens (WT) e resistentes à cisplatina CisR de CAL27 e SCC9. O perfil de expressão gênica dos genes PRDX2 (A), PRDX6 (B), SOD2 (C) e TXN (D) foram determinados através da técnica qPCR e os cálculos obtidos pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$. (* p<0.05; ** p<0.01; ***p<0.001).....	47
Figura 12 Análise de correlação de expressão gênica de amostras de pacientes com tumores de cabeça e pescoço. Genes selecionados: HDAC6, PRDX2, PRDX6, SOD2 e TXN. Os valores de p menores que 0.05 são significativos e o valor de R positivo e negativo é resultado da relação de HDAC6 com as demais expressões gênicas. Disponível em: http://xena.ucsc.edu/). Acesso em 10/11/2021.....	49
Figura 13 Identificação das células-tronco tumorais (CTTs) e análise do perfil de HDAC6. População de CTT+ e CTT- identificada e isolada por “cell sorting” em células de CAL27 ^{CisR} e SCC9 ^{CisR} com atividade enzimática positiva de ALDH e expressão de CD44+ (A). Por qPCR com cálculos obtidos pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ e por Western Blot o perfil de HDAC6 em CTTs (B) (***) p<0.001).....	51
Figura 14 Avaliação do perfil de expressão gênica de genes envolvidos no estresse oxidativo de carcinoma oral. Foram utilizadas as CTTs de CAL27 e SCC9 (A). O perfil de expressão gênica dos genes PRDX2, PRDX6, SOD2 e TXN foram determinados através da técnica qPCR e os cálculos obtidos pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (n.s.: diferenças não-significativas).	52
Figura 15 Avaliação dos danos ao DNA e estresse oxidativo em linhagens de carcinoma oral. O ensaio de imunofluorescência realizado em CTTs de CAL27 e	

SCC9 com a quantificação da expressão do anticorpo anti-PRDX2 (** p<0.01; ***p<0.001) (A) e o anticorpo anti-p-H2A.X (*p<0.05) (B).	53
Figura 16 Análise de viabilidade celular com Tubastatina A (iHDAC6) em células de carcinoma oral. Concentração estoque de Tubastatina A (10uM), 24h. O IC50 das foi determinado usando o protocolo Alamar Blue verificando a redução da relação de absorbância de 570 e 660nm. Linhagens derivadas de tumor na base da língua selvagem (WT) e resistente (CisR) de CAL27 (IC50 WT 42nM e CISR 20nM) (A) e SCC9 (IC50 WT 189nM e CISR 131nM) (B).	55
Figura 17 Análise de viabilidade celular com o uso de Tubastatina A (iHDAC6) em esferas de carcinoma oral. O ensaio de esferas foi feito com incubação a 37°C por 7 dias (0/5/10/15/30nM de Tubastatina A à concentração estoque de 10uM). Linhagens derivadas de tumor na base da língua resistente (CisR) de CAL27 (15nM) (A) e SCC9 (15nM) (B). e a contagem celular foi realizada por microscopia óptica. Os valores são normalizados com o controle (0nM) (***p<0,001).	56
Figura 18 Avaliação de Tubastatina A (iHDAC6) em células de carcinoma oral. Por western Blotting a concentração proteica das amostras de CTTs com (Cisplatina 5µM/Tubastatina 15nM/ 24h) e sem tratamento de CAL27 (A) e SCC9 (B) foram avaliadas. Anti-acetil-α-tubulina e anti-GAPDH.....	56
Figura 19 Análise dos níveis de Apoptose celular em linhagens de carcinoma oral. As linhagens CAL27 (*p<0.05) (A) e SCC9 (***p<0.001) (B) foram cultivadas com Cisplatina (5uM) ou Tubastatina (15nM) por 24h e sem tratamento. Por citometria de fluxo os marcadores de apoptose, sonda Annexina V e Iodeto de Propídio, foram analisados.	58
Figura 20 Avaliação da distribuição de PRDX2 em CTTs de carcinoma oral. Foram usadas células das linhagens CAL27 e SCC9, sem e com tratamento (Cisplatina (5uM)/Tubastatina (15nM)/24h). O ensaio de imunofluorescência com o anticorpo anti-PRDX2 na linhagem CAL27 (*p<0.05) (A) e na linhagem SCC9 (***p<0.001) (B).	59
Figura 21 Avaliação dos níveis de EROs nas populações de CTT- e CTT+ de carcinoma oral. Foram usadas células das linhagens CAL27 e SCC9, sem e com tratamento (Cisplatina (5uM)/Tubastatina (15nM)/24h). O ensaio de EROs com a sonda DCFDA na linhagem CAL27 (A) e na linhagem SCC9 (B). (* p<0.05; ** p<0.01).....	61

Figura 22 Avaliação do acúmulo de danos no DNA em CTT- e CTT+ de carcinoma oral. O ensaio de imunofluorescência com o anticorpo anti-p-H2A.X. O número de células com expressão positiva de phospho-H2A.X foram quantificadas nas linhagens CAL27 (A) e SCC9 (B). (* p<0.05; ***p<0.001).62

Figura 23 Análise dos níveis de Apoptose celular em linhagens de carcinoma oral. As CTTs de CAL27 e SCC9 foram cultivadas com (Cisplatina (5uM)/Tubastatina (15nM)/24h) e sem tratamento. Por citometria de fluxo os marcadores de apoptose, sonda Annexina V e Iodeto, foram analisados. Células CTT – e CTT+ de CAL27 (A) CTT- e CTT+ de SCC9 (B). (* p<0.05; ** p<0.01).64

Figura 24 Identificação e quantificação das células-tronco tumorais (CTTs) em linhagem de carcinoma oral. A população de CTT+ e CTT- isolada por “cell sorting” cultivada com (Cisplatina (5uM)/Tubastatina (15nM)/24h) e sem tratamento. Por citometria de fluxo foi avaliado a atividade enzimática positiva de ALDH e expressão de CD44+ nas linhagens CAL27 CisR (A) e SCC9 CisR (B). (* p<0.05; ** p<0.01). .66

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	18
1.1. Carcinoma Oral	18
1.2. Células-tronco tumorais (CTTs)	21
1.3. Resistência à Quimioterapia e CTTs	22
1.4. Mecanismos Epigenéticos e a Carcinogênese	24
1.5. Histona Desacetilase 6 e o Metabolismo Oxidativo Tumoral	28
1.6. Tubastatina A (iHDAC6)	31
2. OBJETIVOS	33
2.1. OBJETIVO GERAL	33
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1. Cultivo Celular	34
3.2. Ensaio de Formação de Esferas	34
3.3. Extração de Proteínas Totais e Western Blotting	34
3.4. Ensaio de Proliferação Celular	35
3.5. Imunofluorescência	35
3.6. Citometria de fluxo	36
3.7. Ensaio de apoptose.....	36
3.8. PCR em Tempo Real	37
3.9. Análise de Expressão Gênica do TCGA (The Cancer Genome Atlas Program)	37
3.10. Ensaio de determinação de EROs	38
3.11. Análise Estatística	38
4. RESULTADOS.....	39
4.1. Identificação e localização de HDAC6 em células de carcinoma oral.....	39

4.2. Identificação do acúmulo de danos no DNA e de estresse oxidativo nas células selvagens e resistentes de CAL27 e SCC9.....	42
4.3. Caracterização de HDAC6, controle do estresse oxidativo e danos no DNA nas CTTs das linhagens CAL27 CisR e SCC9 CisR.....	49
4.4. Avaliação da inibição farmacológica de HDAC6 pela Tubastatina A nas linhagens resistentes à cisplatina e nas células-tronco tumorais.....	53
4.5. Avaliação da eficiência da administração de Tubastatina A nas linhagens resistentes à cisplatina.....	57
5. DISCUSSÃO.....	67
6. CONCLUSÃO.....	75
7. REFERÊNCIAS.....	76

INTRODUÇÃO

1.1. Carcinoma Oral

De acordo com o GLOBOCAN, dentre os 19.3 milhões de novos casos de câncer registrados em 2020, aproximadamente 10 milhões desses pacientes vieram a óbito. Os tipos mais comuns de câncer diagnosticados registrados em 2020 foram: câncer de mama (2.26 milhões de casos), pulmão (2.21 milhões de casos); colo e reto (1.93 milhões de casos); próstata (1.41 milhões de casos); pele (não melanoma) (1.20 milhões de casos) e estômago (1.09 milhões de casos). E em termos de causas de óbitos foram eles o câncer de pulmão em primeiro lugar (1.80 milhões de mortes); o câncer de colo e reto (935 000 mortes); fígado (830 000 mortes); estômago (769 000 mortes); e câncer de mama (685 000 mortes). O câncer é o responsável pela maior parte das taxas de mortalidade e morbidade ao redor do mundo (BRAY et al., 2018; SUNG et al., 2021; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). Segundo os dados da GLOBOCAN, é estimado um total aproximado de 28,4 milhões de novos casos de câncer em 2040, um aumento de 47%, comparando o registro atual de 19.3 milhões (SUNG et al., 2021).

As neoplasias de cabeça e pescoço apresentam taxas de incidência, prevalência e mortalidade altas e baixos índices de sobrevivência com aproximadamente 890 mil novos casos diagnosticados todos os anos ao redor do mundo e 450 mil óbitos em 2018 (CRAMER et al., 2019; JOHNSON et al., 2020). O câncer oral é a sexta neoplasia maligna mais comum no mundo, e aproximadamente 90% dos casos corresponde ao carcinoma de células escamosas (CCE) (CRAMER et al., 2019; DHANUTHAI et al., 2018; ZAVRAS; SHANMUGHAM, 2021). Dos quase 20 milhões de novos diagnósticos de câncer, aproximadamente 377,713 mil (2,0%) e 177,757 mil (1,8%), respectivamente, são câncer de lábios e de cavidade oral (JOHNSON et al., 2020; SUNG et al., 2021; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). No Brasil, dos 600,000 diagnósticos de câncer em 2020, aproximadamente 10 mil refere-se ao câncer dos lábios e cavidade oral em que cerca de cinco mil vieram a óbito (Figura 1) (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2020). Segundo relatório sobre o cenário assistencial e epidemiológico do

câncer de lábio e cavidade oral no Brasil (2020), o câncer de lábio e da cavidade oral é comumente diagnosticado mais em homens (77%) acima dos 60 anos do que em mulheres (23%), sendo responsável por cerca de 50% dos óbitos por câncer de cabeça e pescoço (INCA, 2020a). Ainda, podemos esperar aproximadamente 15.190 novos casos entre os anos de 2020 e 2022, sendo 11.180 em homens e 4.010 em mulheres (INCA, 2019).

Incidence, Mortality and Prevalence by cancer site										
Cancer	New cases				Deaths				5-year prevalence (all ages)	
	Number	Rank	(%)	Cum.risk	Number	Rank	(%)	Cum.risk	Number	Prop. (per 100 000)
Prostate	97 278	1	16.4	9.69	18 345	3	7.1	1.12	320 178	306.58
Breast	88 492	2	14.9	6.68	20 725	2	8.0	1.48	299 542	277.04
Lung	40 409	3	6.8	1.71	35 160	1	13.5	1.46	43 726	20.57
Lip, oral cavity	9 839	18	1.7	0.40	4 198	19	1.6	0.17	25 800	12.14
All cancer sites	592 212	-	-	21.52	259 949	-	-	9.47	1 563 761	735.7

Figura 1 Incidência, Mortalidade e Prevalência de Câncer no Brasil em 2020 (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2020).

A taxa de sobrevida em cinco anos do carcinoma oral é de aproximadamente 50%, e muitos pacientes vão a óbito por diagnósticos ineficientes e ou tardios (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019; DHANUTHAI et al., 2018; INCA, 2019; SUNG et al., 2021; ZAVRAS; SHANMUGHAM, 2021). Além disso, segundo o INCA (2020), 45% das pessoas diagnosticadas iniciam o tratamento após decorrerem mais de 60 dias e 15% não tem informações quanto ao tratamento (Figura 2) (INCA, 2020a).

O câncer oral pode afetar regiões como: lábios, gengiva, base da língua, palato, nasofaringe, orofaringe, hipofaringe, amígdalas, faringe e outros locais mal definidos do lábio. O carcinoma de células escamosas (CCE) comumente surge no epitélio escamoso de revestimento da cavidade oral tais como os tumores localizados na língua, lábio, gengiva, palato, assoalho da boca e mucosa bucal (DHANUTHAI et al., 2018; NAIK et al., 2017; ZAVRAS; SHANMUGHAM, 2021). São fatores de risco do câncer da cavidade oral: a idade avançada, o tabagismo, o etilismo (riscos aumentam em 30 vezes) e a infecção pelo HPV (relacionada ao câncer de orofaringe) (DHANUTHAI et al., 2018). Outros fatores de risco incluem a exposição ao sol sem proteção (importante risco para o câncer de lábio), o excesso

de gordura corporal, e fatores relacionados à exposição ocupacional (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019; DHANUTHAI et al., 2018; INCA, 2019; ZAVRAS; SHANMUGHAM, 2021).

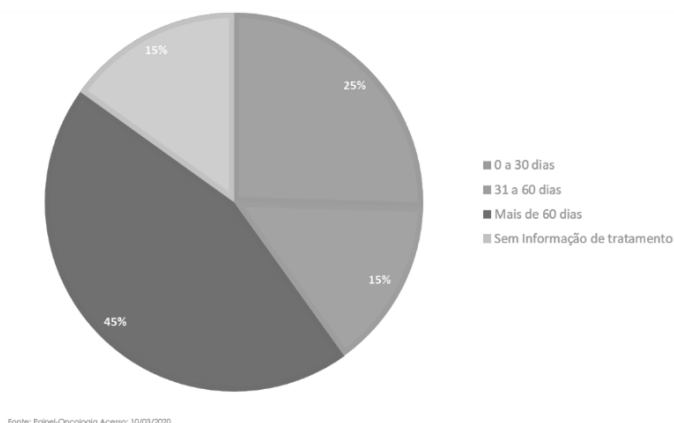


Figura 2 Distribuição dos casos de câncer de lábio e cavidade oral segundo o intervalo entre o diagnóstico e o primeiro tratamento oncológico no Brasil no ano de 2018 (INCA, 2020a).

O carcinoma oral é um desafio para a ciência que luta contra o tempo para diagnosticá-lo e tratá-lo de forma eficiente devido aos índices metastáticos e as falhas no diagnóstico elevadas (DHANUTHAI et al., 2018; INCA, 2019; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2020; SUNG et al., 2021; ZAVRAS; SHANMUGHAM, 2021). A agressividade desse tumor impulsiona a busca de tratamentos específicos visando reduzir a recidiva loco-regional, metástase linfo nodal e a quimo-radio-resistência (HU et al., 2019; KIM; KIM, 2020). O carcinoma oral, assim como outras neoplasias sólidas, apresenta uma massa heterogênea constituída de células de diversos graus de diferenciação e metabolismo. Essas células são dotadas de motilidade, proliferação contínua e plasticidade (DAGOGO-JACK; SHAW, 2018; JOU; HESS, 2017; LIU et al., 2020; NAIK et al., 2016, 2017; RODINI et al., 2017). Assim sendo, compreender as vias de sinalização que controlam o metabolismo, plasticidade e quimo-radio-resistência das células tumorais constitui a base fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias no tratamento contra carcinoma oral (HU et al., 2019; LIU et al., 2020; NAIK et al., 2017; WAGNER et al., 2018).

1.2. Células-tronco tumorais (CTTs)

As células-tronco tumorais (CTTs) são conhecidas por estimular a proliferação celular, auto renovação, diferenciação hierárquica, potencial metastático, tumorigenicidade e quimo-radio-resistência. Existem vários trabalhos mostrando a existência e diferença entre as células tumorais e as células-tronco tumorais em diversos tumores (DAGOGO-JACK; SHAW, 2018; LIU et al., 2020; OKLEJAS; NÖR, 2020; PAPACCIO et al., 2017; PHAN; CROUCHER, 2020), incluindo o carcinoma oral (ALMEIDA et al., 2016; BIGHETTI-TREVISAN et al., 2019; HU et al., 2019; JOU; HESS, 2017; NAIK et al., 2016, 2017; RODINI et al., 2017).

Uma das características mais relevantes das CTTs é seu processo de divisão, que consiste na divisão simétrica, em que ocorre uma divisão resultando em duas CTTs idênticas, e na divisão assimétrica, em que a divisão originará uma CTT e uma célula-filha diferenciada. As CTTs podem ser derivadas de uma célula-tronco normal localizada onde o tumor se iniciou ou uma célula somática sofrendo múltiplas mutações pode originar uma CTT via desdiferenciação, regulando seus fatores de pluripotência (LIU et al., 2020; PAPACCIO et al., 2017; PHAN; CROUCHER, 2020; SHARIF et al., 2019). Em tumores de cabeça e pescoço, estudos mostram que a maioria das CTTs se origina a partir de células-tronco epiteliais adultas ou da desdiferenciação de uma célula madura em que a mesma readquire características de uma célula-tronco. Esse processo acontece em resposta a mecanismos moleculares tais como, o acúmulo de mutações; resposta ao dano no DNA; autofagia; apoptose; transição epitélio-mesenquimal (EMT); regulação epigenética e geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) em resposta ao estresse celular (HU et al., 2019; LIU et al., 2020; NAIK et al., 2017; RODINI et al., 2017).

A identificação da subpopulação de células com fenótipo tronco foi aprimorada ao longo dos anos com o uso de marcadores celulares. As células-tronco tumorais, assim como as células-tronco normais, apresentam marcadores de “stemness” e fatores de transcrição que contribuem para sua identificação tais como: CD34, Nanog, POU domain, class 5, transcription factor 1 (POU5F1) e SRY-Box2 (Sox 2). As CTTs também são identificadas a partir de características adicionais como os mecanismos de resistência ao tratamento, tumorigenicidade e estágio de

quiescência (HU et al., 2019; JOHNSON et al., 2020; PHAN; CROUCHER, 2020; SHIBUE; WEINBERG, 2017). Experimentos como os de Bonnet et al. (1997) confirmaram a presença de uma subpopulação de células-tronco a partir do isolamento e marcação do CD34 positivo e CD38 negativo em leucemia mieloide aguda (DICK; BONNET, 1997); Al.Hajj e colaboradores isolaram e marcaram o CD44 positivo e CD24 negativo para a identificação da subpopulação de CTTs em câncer de mama (AL-HAJJ et al., 2003); e o primeiro a isolar e marcar as CTTs em carcinoma de células escamosa de cabeça e pescoço (HNSCC) foi Prince et. al em 2007 usando o marcador CD44 positivo (NAIK et al., 2017; PRINCE et al., 2007; RODINI et al., 2017).

Estudos mais recentes em tumores de cabeça e pescoço utilizam a associação do marcador CD44+ e a ALDH1 para isolar a subpopulação com fenótipo tronco (JOHNSON et al., 2020). O marcador de membrana CD44 é uma molécula de adesão que se liga ao ácido hialurônico e a sua expressão é necessária para a manutenção das propriedades das CTTs. A enzima citosólica aldeído desidrogenase 1 (ALDH1) tem função de desintoxicação e resistência a drogas via oxidação de aldeídos, e as células positivas para ALDH 1 apresentam comportamento típico do fenótipo tronco e tumorigenicidade (DHANUTHAI et al., 2018; KRISHNAMURTHY et al., 2010). A heterogeneidade e a presença de CTTs no tumor evidencia o desafio da ciência e medicina na busca por novos tratamentos anticâncer visando ultrapassar as barreiras da quimo-radio-resistência em diversos tipos de câncer, incluindo o carcinoma oral (HU et al., 2019; JOHNSON et al., 2020; LIU et al., 2020; RODINI et al., 2017).

1.3. Resistência à Quimioterapia e CTTs

Dentre os tratamentos convencionais mais conhecidos para o câncer estão: a remoção cirúrgica, radioterapia e quimioterapias citotóxicas (National Cancer Institute, 2020). Segundo os dados do PAINEL-Oncologia (2020) as formas de tratamentos utilizadas pelo Sistema Único de Saúde (SUS) no Brasil nos primeiros 30 dias após o diagnóstico incluem a remoção cirúrgica como linha de frente, no entanto, nos últimos 6 anos o uso de quimioterapia vem aumentando (Figura 3) (INCA, 2020b). O objetivo das intervenções terapêuticas é a remoção e ou redução

da massa tumoral. Todavia, a presença das CTTs influencia a quimo-radio-resistência aos tratamentos, principalmente para os tumores de cabeça e pescoço (HU et al., 2019; LIU et al., 2020; YU et al., 2020). A quimioterapia é um tipo de tratamento que utiliza a administração de fármacos para induzir a morte das células tumorais e/ou reduzir o crescimento e proliferação dessas células (National Cancer Institute, 2020). Um dos mecanismos de ação das quimioterapias é a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e danos ao DNA. Entretanto, o aumento da expressão de enzimas antioxidantes, em resposta ao tratamento, controla os níveis endógenos de EROs mantendo a estabilidade genômica e protegendo as CTTs da morte celular (CHANG et al., 2014; HUANG; PAN, 2020; NAIK et al., 2016).

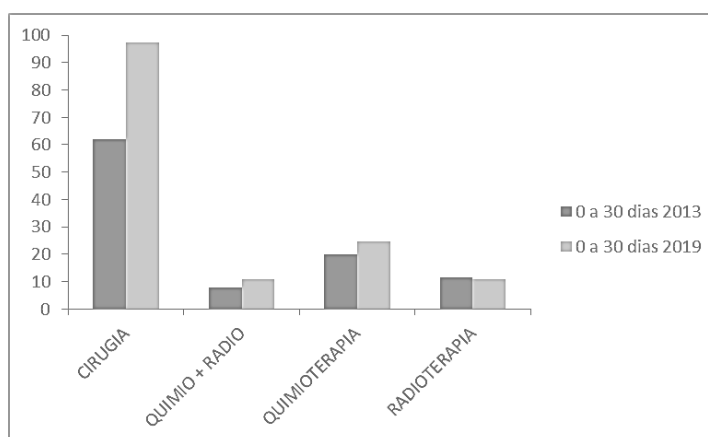


Figura 3 Distribuição dos casos de câncer de cavidade oral segundo tempo e tipo de modalidade terapêutica do primeiro tratamento. Brasil, 2013 a 2019 (INCA, 2020b).

De acordo com as diretrizes da Sociedade Europeia de Oncologia Médica (ESMO) e da National Comprehensive Cancer Network, a quimioterapia baseada em platina é o tratamento mais utilizado para pacientes em casos não cirúrgicos de câncer avançado de células escamosas de cabeça e pescoço (PORCEDDU et al., 2020). Seu mecanismo de ação consiste em atuar como intercalante de DNA gerando níveis altos de quebra da dupla-fita de DNA, induzir o estresse oxidativo e também a senescência celular (DASARI; BERNARD TCHOUNWOU, 2014). As células-tronco tumorais possuem mecanismos que contribuem para a resistência à cisplatina causando alterações na sinalização molecular; no metabolismo da droga; na apoptose; na regulação da sobrevivência celular e no reparo do DNA (ALMEIDA et al., 2017a; SHEN et al., 2012). Além disso, estudos mostram que a cisplatina

induz o acúmulo de CTTs em carcinoma mucoepidermóide de glândulas salivares (GUIMARÃES et al., 2016) e carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HU et al., 2019; NÖR et al., 2014; RODINI et al., 2017; YU et al., 2020).

As CTTs apresentam uma vasta lista de mecanismos de resistência compreendendo fatores como: resposta celular alterada ao uso do fármaco; redução na captação do fármaco; aumento da extrusão do fármaco; inativação ou diminuição da ativação do fármaco e diminuição na formação do complexo fármaco-alvo. Em seu arcabouço celular, as CTTs apresentam transportadores transmembranares, que fazem parte de uma família de moléculas de transportadores ABC (cassete de ligação a ATP) que ativamente bombeiam a droga para fora da célula. Adicionalmente também temos: o ciclo celular interrompido; resposta do DNA ao dano; mudanças nas vias de sinalização Wnt, Notch, Hedgehog; vias metabólicas alteradas; autofagia; antiapoptose; alteração na polaridade celular (EMT-MET) e a regulação epigenética alterada. As CTTs expressam ainda enzimas como ALDH e a glutationina transferase (GST) responsáveis por metabolizar e inativar agentes que contenham platina em sua composição (NAIK et al., 2016, 2017; PAPACCIO et al., 2017; RODINI et al., 2017).

O uso da regulação epigenética como forma de tratamento e prevenção do câncer está em pleno desenvolvimento (GARCÍA-GUEDE; VERA; IBÁÑEZ-DE-CACERES, 2020; NEBBIOSO et al., 2018; TOMASELLI et al., 2020; WAINWRIGHT; SCAFFIDI, 2017). A maquinaria epigenética é crucial para a manutenção e sobrevivência das CTTs e a reprogramação celular via regulação epigenética pode eliminar as CTTs e reverter a resistência (WAINWRIGHT; SCAFFIDI, 2017). Estudos a partir de CTTs de tumores de glândulas salivares mostram que a resistência tumoral pode ser influenciada por modificações epigenéticas (ALMEIDA et al., 2017a; GUIMARÃES et al., 2016).

1.4. Mecanismos Epigenéticos e a Carcinogênese

Epigenética é uma das áreas de pesquisa em biologia molecular e medicina moderna em crescente desenvolvimento e tem despertado interesse em oncologia devido a sua relação com as etapas da carcinogênese (ALLIS; JENUWEIN, 2016;

DAWSON, 2017; TOMASELLI et al., 2020). Tudo começou a partir de 1942 quando o pesquisador Conrad Waddington estabeleceu uma conexão entre o genótipo e as características fenotípicas de um organismo (CHENG et al., 2019). Hoje o conceito que melhor define epigenética é baseado na descrição de mudanças hereditárias que influenciam a expressão gênica sem alterar a sequência do DNA (CHENG et al., 2019; DAWSON, 2017).

As modificações epigenéticas influenciam rotas celulares incluindo o crescimento e proliferação celular; diferenciação; apoptose; controle do ciclo celular; danos ao DNA e a senescência. Mudanças nesses processos podem induzir o desenvolvimento de doenças, como o câncer (CHENG et al., 2019; TOMASELLI et al., 2020). Essas alterações são mais dinâmicas que as genéticas, sendo presumível que a plasticidade transcricional gerada em resposta ao ambiente e terapia resulte em um fracasso dos tratamentos atuais contra o câncer (DAWSON, 2017; SANDOVAL-BASILIO et al., 2018).

Os mecanismos epigenéticos conhecidos são: metilação do DNA, regulação da expressão por RNA não codificante, remodelamento da cromatina e modificações pós-traducionais das histonas (CHENG et al., 2019; MOHAMMAD; BARBASH; CREASY, 2019). As modificações das histonas ocorrem nas caudas de histonas, que apresentam resíduos básicos de lisina e arginina e o grupo hidroxila contendo serina, treonina e tirosina. Essas caudas se estendem para superfície dos nucleossomos e são facilmente influenciadas pelas modificações pós-traducionais covalentes (PTM). As PTMs modificam as histonas adicionando ou removendo grupos químicos via acetilação e metilação principalmente das lisinas (K) e argininas (R); ubiquitinação; fosforilação das serinas (S) e treoninas (T); sumoilação; carbonilação e glicosilação. Essas modificações são fundamentais na regulação de processos biológicos como a ativação ou inativação da expressão gênica relacionada à indução ou bloqueio da tumorigênese (AUDIA; CAMPBELL, 2016; CHENG et al., 2019; MOHAMMAD; BARBASH; CREASY, 2019).

A cromatina é constituída pelo DNA, proteínas histonas e não-histonas e a interação entre essas moléculas pode resultar na ativação ou inativação da transcrição. As interações eletrostáticas entre o DNA (carregado negativamente) e

histonas (carregadas positivamente) coordenam a organização da cromatina. Sua definição enzimática é representada pelos termos eucromatina (genes ativos) e heterocromatina (genes inativos). A descompactação da eucromatina resulta em um DNA mais acessível à maquinaria de transcrição gênica. Em oposição, na heterocromatina, ocorre a compactação de toda a sua estrutura bloqueando o acesso ao genoma. (ALBERTS, 2010; ALLIS; JENUWEIN, 2016; DAWSON, 2017). Segundo Alfraey, desde 1996, a ação enzimática divergente de HAT e HDAC é diretamente proporcional ao estado de regulação gênica ativa ou inativa da cromatina (ALLIS; JENUWEIN, 2016).

A acetilação das histonas é catalisada pela ação de enzimas histona acetiltransferases (HATs), também denominadas lisina acetiltransferases (KATs). As enzimas HATs utilizam acetil-CoA como cofator e catalisam a transferência do grupo acetil para o grupo amino da cadeia lateral da lisina neutralizando a carga positiva das lisinas e enfraquecendo a ligação com o DNA, deixando a cromatina frouxa e acessível aos fatores de transcrição. Em contrapartida, as histonas desacetilases (HDACs) removem esse grupo acetil promovendo a condensação da cromatina. HDACs geralmente atuam como mediadores do silenciamento e repressão de genes (CHENG et al., 2019; LI et al., 2018). O genoma humano codifica 18 tipos de HDACs que são encontradas no núcleo e no citoplasma. Com base na similaridade de sua sequência, as HDACs podem ser divididas em quatro classes: HDACs de classe I (HDAC1-3 e 8); HDACs classe II, que são divididos em duas subclasses, classe IIa (HDAC4, 5, 7 e 9) e classe IIb (HDAC6 e 10); classe III (SIRT1-7); e classe IV (HDAC11) (CHENG et al., 2019; LOSSON et al., 2020; TANG et al., 2018).

As histonas desacetilases (HDACs) conquistaram relevância dentro da comunidade científica em razão de suas funções biológicas, atuando na desacetilação de proteínas histonas e não-histonas (CHENG et al., 2019; LI et al., 2018). HDACs também atuam diretamente em proteínas envolvidas na migração e crescimento de células tumorais e na metástase (AUDIA; CAMPBELL, 2016). A acetilação farmacológica da cromatina por inibidores da histona desacetilase (iHDAC) em HNSCC resulta na acetilação das histonas, interrompendo a resistência à quimioterapia através da redução das CTTs (ALMEIDA et al., 2014).

Decitabine e Vorinostat foram os primeiros inibidores de HDAC a serem disponibilizadas para as terapias contra o câncer em seres humanos (ALLIS; JENUWEIN, 2016). O Vorinostat (ácido hidroxâmico suberoylanilide, SAHA), atua através da acetilação das histonas provocando a redução das CTTs, em tumores sólidos (SINGH; BISHAYEE; PANDEY, 2018; WAGNER et al., 2018). Ele é um inibidor eficiente de histonas desacetilases pan-classe I e classe II, e foi aprovado em 2006 para o tratamento do linfoma (AUDIA; CAMPBELL, 2016; MARKS, 2007). Foi observado que o uso de iHDAC para o tratamento de carcinoma mucoepidermoide promove a diferenciação de CTTs e redução da quimiorresistência, atuando na sensibilização das células à cisplatina (GUIMARÃES et al., 2016). Segundo Almeida (2017) e colaboradores, amostras de xenoinxertos derivados de pacientes mostraram que o uso individual de cisplatina ou vorinostat induziu células resistentes. No entanto, a administração em conjunto resultou na sensibilização das CTTs e redução da viabilidade tumoral via senescência em linhagens celulares de carcinoma adenoide cístico (ALMEIDA et al., 2017a). Esses e outros trabalhos mostram a importância que a epigenética vem alcançando em termos de terapias anticâncer (CASTILHO; SQUARIZE; ALMEIDA, 2017; CHENG et al., 2019; DAWSON, 2017; MOHAMMAD; BARBASH; CREASY, 2019; SANDOVAL-BASILIO et al., 2018; TOMASELLI et al., 2020). O esquema da figura 4 exemplifica a diferença entre as estratégias de tratamentos de câncer. A escolha da terapia alvo específico ou quimioterapia não é suficiente para eliminar as células-tronco tumorais, intensificando a recidiva tumoral. O uso da combinação de terapias alvo específicos ou da quimioterapia com a terapia epigenética vem mostrando sucesso na redução da massa tumoral e eliminação das células-tronco tumorais. A terapia epigenética juntamente a fármacos específicos também vem mostrando bons resultados (MOHAMMAD; BARBASH; CREASY, 2019). No momento os inibidores de HDAC aprovados pelo FDA são a romidepsin, SAHA, PXD101, and LBH589. Em testes clínicos de inibidores de HDAC6, no momento, temos os composto ACY-241 (Citarinostat) e ACY-1215 (Ricolinostat) (LOSSON et al., 2020).

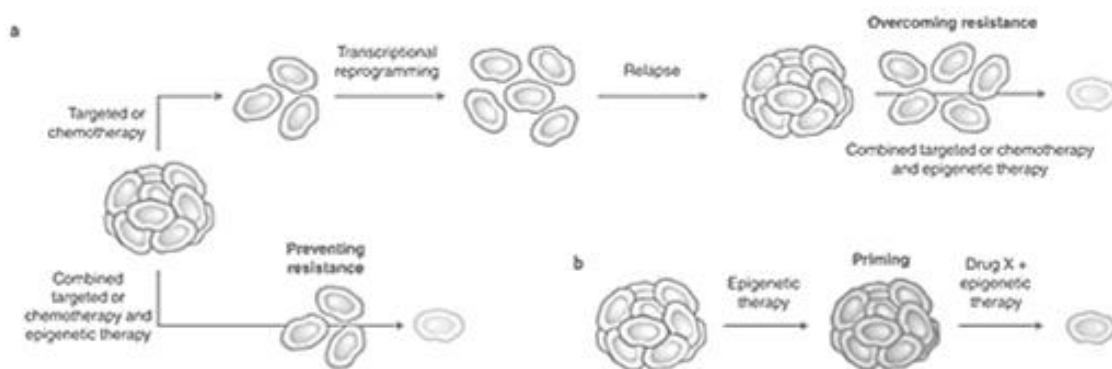


Figura 4 Estratégia de combinação de drogas epigenéticas para tratamento de câncer (MOHAMMAD; BARBASH; CREASY, 2019).

1.5. Histona Desacetilase 6 e o Metabolismo Oxidativo Tumoral

O acúmulo ou expressão aumentada de HDACs em câncer apresenta relevância para a medicina, principalmente como alvo terapêutico (CHANG; WANG, 2016; CHENG et al., 2019; LI et al., 2018; SAKUMA et al., 2006; SKULTETYOVA et al., 2017; USTINOVA et al., 2020). Em condições patológicas, a expressão de HDAC6 elevada é encontrada em doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson, doenças inflamatórias, doenças cardiovasculares e em neoplasias malignas (BATCHU; BRIJMOHAN; ADVANI, 2016; LI et al., 2018). Segundo T. Sakuma e colaboradores (2006), a expressão de HDAC6 está relacionada a fenótipos de câncer mais malignos, como no caso de carcinoma oral, em que a proteína HDAC6 está associada com agressividade e progressão tumoral (SAKUMA et al., 2006). HDAC6 ainda é associada à promoção de câncer cervical, gástrico, pulmonar, hepático e de ovário (CHENG et al., 2019). Outros estudos mostram o acúmulo de HDAC6 em câncer de mama (WANG et al., 2010) e glioblastoma (MARAMPON et al., 2017) atuando como um fator de pluripotência para as CTTs regulando genes como OCT4, NANOG e SOX2 (SHARIF et al., 2019).

HDAC6 é a única histona desacetilase que contém dois domínios catalíticos ativos de desacetilação N-terminal (DD1 e DD2) fazendo parte da classe IIB (CHANG; WANG, 2016; LI et al., 2018; USTINOVA et al., 2020). HDAC6 atua desacetilando diversos substratos, como a cortactina, chaperona HSP90, peroxirredoxinas, outras histonas e proteínas não-histonas (HE et al., 2020; LI et al.,

2018). No entanto, o seu principal substrato são as α -tubulinas (BOYAULT et al., 2007; CHENG et al., 2019; HUBBERT et al., 2002). A acetilação e deacetilação das α -tubulinas interferem no ciclo celular durante a mitose e na motilidade das células, sendo considerado o foco para alguns estudos farmacológicos (LI et al., 2018; LIU et al., 2012; USTINOVA et al., 2020). A desacetilação de α -tubulina pode aumentar a motilidade das células tumorais e contribuir para o desenvolvimento de metástases (GASCHE; GOEL, 2012).

O domínio de ligação a ubiquitina C-terminal dependente de zinco de HDAC6 contribui para o processo de autofagia. A autofagia está associada com a carcinogênese através da renovação ou eliminação de organelas danificadas em resposta ao estresse ou privação de nutrientes, influenciando a resistência ao tratamento (SHARIF et al., 2019). Além disso, HDAC6 contém em sua estrutura moléculas de sinalização que definem sua localização. Pelos sinais de exportação nuclear (NES e SE14) a proteína se localiza no citoplasma, onde regula a acetilação de proteínas não-histonas, e pelo sinal de localização nuclear (NLS), HDAC6 pode translocar-se para o núcleo desacetilando histonas (LI et al., 2018; THE HUMAN PROTEIN ATLAS, 2020; USTINOVA et al., 2020).

HDAC6 está envolvida em processos dependentes ou não da sua atividade catalítica regulando funções biológicas no organismo tais como: a proliferação celular, motilidade, regulação da transcrição gênica e resposta ao estresse (HE et al., 2020; LI et al., 2018; TANG et al., 2018). Na regulação do estresse oxidativo a HDAC6 apresenta um papel importante sobre a atividade mitocondrial do metabolismo do câncer (BAI et al., 2015; PARMIGIANI et al., 2008a; TANG et al., 2018), e a inibição de HDAC6 favorece a desregulação mitocondrial envolvendo o aumento de EROs e falhas na fosforilação oxidativa, induzindo a morte celular (BITLER et al., 2017; PARK et al., 2017). As espécies reativas de oxigênio (EROs) desempenham papel importante na regulação do ciclo celular, controlando a viabilidade, proliferação e diferenciação das células (MORO et al., 2018). Na carcinogênese, as células tumorais aumentam a quantidade de mitocôndrias para suprir a necessidade energética (PAPACCIO et al., 2017). Durante a produção de energia podem ser liberados radicais livres como, por exemplo, o radical hidroxila

(HO), superóxido (O_2) e peróxidos de hidrogênio (H_2O_2) (NAIK et al., 2016; NICOLUSSI et al., 2017). O estresse oxidativo ocorre quando há desequilíbrio entre a produção de EROs e a ação de enzimas antioxidantes responsáveis por sua eliminação, promovendo danos ao DNA, RNA, lipídios e proteínas e interferência no sistema de reparo do DNA (MORO et al., 2018; NICOLUSSI et al., 2017).

A maquinaria celular é equipada com um sistema enzimático antioxidante responsável pela eliminação e/ou neutralização de EROs. Esse sistema é composto pelas enzimas catalase (CAT), ascorbato peroxidase, superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e peroxirredoxina (PRDXs). As PRDXs estão envolvidas na carcinogênese e na aquisição de resistência à terapia, incluindo a cisplatina (NICOLUSSI et al., 2017). TRX1 é ativada por estresse e exibe efeitos anti-apoptóticos, anti-inflamatórios e anti-oxidativos e sua expressão elevada está associada com várias formas de câncer, incluindo o desenvolvimento de metástases, progressão, sobrevivência e quimo-rádio-resistência (ZHU et al., 2019). Segundo Parmigiani e colaboradores (2008) PRDX1 e PRDX2 são substratos da HDAC6, encontradas acetiladas em sua ausência, atuando como antioxidantes protegendo as células do acúmulo de EROS em condições normais. No entanto, em células tumorais, essas proteínas redox conferem resistência aos tratamentos induzindo a fenótipos tumorais agressivos (PARMIGIANI et al., 2008b).

HDAC6 pode influenciar a proteção das células tumorais contra o acúmulo de danos no DNA, atuando no recrutamento de proteínas de reparo e proteínas ativadoras dos pontos de checagem do ciclo celular (BAI et al., 2015; WANG et al., 2012). A fosforilação no resíduo de serina na histona variante H2A.X é fundamental para os primeiros estágios de resposta ao dano no DNA e seu estado fosforilado ativa a sinalização para proteínas de reparo (BISWAS; RAO, 2017). Wang e colaboradores (2012) demonstraram que sob estresse genotóxico, HDAC6 translocar-se para o núcleo a fim de controlar o estado de acetilação de proteínas como ATR e CHK1. Estas proteínas são sensores moleculares de danos ao DNA e estão envolvidas no reparo de quebras na dupla-fita. Quando o estado de fosforilação é alterado na presença de HDAC6, ocorre à inibição da sinalização para ativação da p53 (supressor tumoral) consequentemente afetando a apoptose. A inibição de

HDAC6 em células não pequenas de câncer de pulmão sensibilizam essas células a cisplatina, apresentando mais danos ao DNA, sugerindo maior estímulo da via de sinalização ATR/Ch1 (WANG et al., 2012). Assim sendo, HDAC6 pode ser um importante alvo para o desenvolvimento de novas terapias anticâncer devido: (1) ao seu aumento de expressão após a administração de compostos quimioterápicos como a Cisplatina; (2) proteção das células contra o estresse oxidativo e danos no DNA e (3) seu papel em promover vantagem na sobrevivência das células tumorais (HE et al., 2020; LI et al., 2018; SAKAMOTO; ALDANA-MASANGKAY, 2011).

1.6. Tubastatina A (iHDAC6)

Os inibidores de HDAC, em sua maioria, são não seletivos e possibilitam sua ação em múltiplas vias de sinalização resultando em efeitos tóxicos durante o tratamento. A segunda geração de epi-drogas em desenvolvimento visa aprimorar a seletividade desses compostos (DEPETTER et al., 2019a). HDAC6 atualmente é alvo para o desenvolvimento de terapias anticâncer devido à elevada expressão após a administração de cisplatina, à proteção das células tumorais contra o estresse oxidativo e danos no DNA e ao bloqueio da diferenciação das CTTs (HE et al., 2020; SHARIF et al., 2019; WANG et al., 2012). Tubacina foi o primeiro inibidor específico de HDAC6 mostrando boa seletividade, no entanto com propriedades desfavoráveis ao comércio pela indústria farmacêutica (DEPETTER et al., 2019b; HE et al., 2020).

Tubastatina A, um inibidor seletivo de HDAC6 protegido por tetra-hidro- γ -carbolina (HDAC6i) foi desenvolvido há 10 anos a partir de modificações da estrutura dos anéis aromáticos do inibidor produzido anteriormente, Tubacina (HAGGARTY et al., 2003), incluindo modificações da propriedade lipofílica da molécula (DEPETTER et al., 2019a; KYLE V BUTLER, 2010; SHEN et al., 2020). Segundo Butler e colaboradores (2010), Tubastatina A pode ser utilizada para experimentos *in vitro* e *in vivo* com mais segurança e menos neurotoxicidade possuindo alta especificidade, e sua validação pode ser efetuada analisando a hiperacetilação da α -tubulina (KYLE V BUTLER, 2010; SHEN et al., 2020). A administração de tubastatina A mostrou que HDAC6 é crucial para a regulação da autofagia das CTTs. Sua inibição promoveu a redução do processo autofágico e

aumento de apoptose conduzindo as células tumorais á susceptibilidade aos tratamentos citotóxicos. Assim sendo HDAC6 é um possível alvo terapêutico promissor para reverter a quimiorresistência mediada pelas CTTs no carcinoma oral (SHARIF et al., 2019).

2. OBJETIVOS

2.1.OBJETIVO GERAL

O objetivo desse trabalho foi avaliar o papel da HDAC6 no processo de quimiorresistência mediado por células-tronco tumorais em linhagens celulares de carcinoma oral, identificando a influência da HDAC6 na resposta aos danos do DNA e estresse oxidativo das CTTs e uma possível utilização de HDAC6 como potencial alvo terapêutico para eliminar células-tronco tumorais e reverter a quimiorresistência.

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Investigar o envolvimento de HDAC6 na aquisição da resistência à cisplatina;
- ✓ Avaliar o acúmulo de HDAC6 na população das CTTs resistentes à cisplatina;
- ✓ Investigar o papel de HDAC6 no acúmulo de danos no DNA e na produção de espécies reativas de oxigênio das CTTs;
- ✓ Avaliar a resistência à morte celular nas linhagens quimiorresistentes e nas CTTs;
- ✓ Investigar se a inibição farmacológica de HDAC6, utilizando o composto Tubastatina A, é eficiente para reverter o fenótipo de resistência à cisplatina
- ✓ Determinar se a administração de Tubastatina A apresenta eficácia contra as CTTs;
- ✓ Avaliar a resposta da terapia combinada (cisplatina + tubastatina) na redução da população de CTTs e em seu fenótipo de resistência ao estresse oxidativo e acúmulo de danos no DNA.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultivo Celular

As linhagens celulares originais de carcinoma de cabeça e pescoço CAL27 e SCC9 foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC). As linhagens celulares resistentes à Cisplatina CAL27 CisR e SCC9 CisR foram previamente estabelecidas pelo nosso grupo. As células foram cultivadas em meio DMEM e DMEM: F12 (Dulbecco's modified Eagle's Medium), suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1% coquetel de antibióticos e antimicóticos. As linhagens foram mantidas em incubadora à temperatura controlada de 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

3.2. Ensaio de Formação de Esferas

Aproximadamente 2×10^3 células foram semeadas em ultra-low attachment 6-well plates (placas de baixa adesão) (Corning, New York, USA) e permaneceram em cultura por 7 dias sem e com as seguintes concentrações de Tubastatina A: 0 nM, 5 nM, 15 nM, 30 nM e 60 nM. As células em formato esferoide viáveis foram contadas em microscópio ótico Nikon Eclipse Ti (Melville, New York 11747 800-52-NIKON, USA). As fotografias foram realizadas com o auxílio do software Axio Vision Image (Zeiss). Cada condição foi feita em triplicata.

3.3. Extração de Proteínas Totais e Western Blotting

As células foram cultivadas sem e com tratamento utilizando 5µM de cisplatina e 15nM de Tubastatina A por 24h. Em seguida foram lisadas com tampão RIPA+. O lisado foi submetido à eletrofoerese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). As proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (Millipore, Billerica, MA, USA). A membrana foi bloqueada com TBS-T acrescentado de 5% de leite seguido pela incubação do anticorpo primário anti-HDAC6 (1:1500), anti-α-tubulina (1:1000) e anti-GAPDH (1:8000) (Cell Signaling). Foram utilizados anticorpos secundários conjugados com horseradish peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, CA) e a concentração das proteínas foi obtida por reação quimioluminescente (ECL SuperSignal - Pierce, USA).

3.4. Ensaio de Proliferação Celular

Alamar Blue, ou resazurina, é um indicador de oxirredução capaz de atravessar a membrana de células vivas e é utilizado em testes de viabilidade celular. A resazurina dissolvida em tampões fisiológicos forma uma solução de cor azul escuro. Células viáveis e com metabolismo ativo reduzem a resazurina a resorufina, que apresenta cor rosa e emite fluorescência. A quantidade de resorufina produzida é proporcional ao número de células viáveis, o que pode ser quantificado por meio de fluorescência ou por meio de absorbância. A leitura é realizada em comprimento de onda de 570 nm para excitação e 660 nm na emissão (SITTAMPALAM et al., 2016). As células foram semeadas em placas de 96 poços, com a densidade pré-definida de 3×10^3 células e cada condição foi feita em quintuplicata. As concentrações de Tubastatina A utilizadas foram: 0, 5, 10, 15, 30, 60, 100, 150, 200 e 300 nM. Os resultados foram estabelecidos através da média de três experimentos independentes.

3.5. Imunofluorescência

Aproximadamente 1×10^5 de células foram cultivadas sobre lamínulas de vidro previamente lavadas em etanol absoluto estéril em placas de cultura de 6 poços por 48h. As células foram tratadas com cisplatina $5 \mu\text{M}$ e Tubastatina A 15nM e após 24 horas as lamínulas foram lavadas em PBS (phosphate buffered saline) e fixadas em metanol absoluto gelado por 6 minutos à -20°C . O bloqueio foi realizado em tampão PBS-Triton-X100 (0,1%)-BSA (bovine serum albumin) 3% por 60 minutos, seguido da incubação dos anticorpos primários anti-HDAC6 (1:1500), anti-H2A.X (1:200) e anti-PRDX2 (1:4) (Cell Signaling) overnight, seguido de lavagem com PBS e incubação do anticorpo secundário anti-rabbit ou anti-mouse conjugado à fluoresceína (1:200) por 90 minutos. As lamínulas foram contra-coradas com Hoechst 33342 e montadas sobre lâminas de vidro utilizando-se o meio de montagem Fluoromount (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Foram fotografadas cinco imagens de cada condição em microscópio de fluorescência Trinocular ZEISS, ApoTome.2, utilizando o programa Axiovision Rel 4.8, no aumento

de 20x. As células positivas foram quantificadas utilizando-se o software ImageJ 1.44o (National Institute of Health, USA).

3.6. Citometria de fluxo

A população de células-tronco tumorais foi identificada, quantificada e isolada pela atividade enzimática de ALDH1, utilizando-se o kit Aldefluor (StemCell Technologies, Durham, NC, USA), combinada à expressão do anticorpo CD44-APC (BD Biosciences). Inicialmente, as células foram incubadas com a enzima ALDH1 sozinha ou em combinação com seu inibidor DEAB por 45 minutos à 37°C protegido da luz (conforme instruções do fabricante). Após lavagens com PBS (phosphate buffered saline) para remover o excesso da enzima, as células foram incubadas com o anticorpo anti-CD44-APC à concentração de 1:200 em tampão Aldefluor, por 25 minutos à 4°C sob agitação constante. Após lavagens com PBS para remover o excesso do anticorpo, as células foram ressuspensas em tampão Aldefluor e analisadas no citômetro de fluxo FACS Canto™ II (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA). As amostras foram preparadas em triplicata e foram realizados dois experimentos independentes. Para a realização do cell sorting foram utilizadas aproximadamente 2×10^7 células de cada linhagem e o protocolo da reação foi o mesmo descrito acima. As células foram separadas em CTT+ e CTT- utilizando-se o equipamento BD FACS Melody™ Cell Sorter (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA). As células foram coletadas em tubos de centrifuga contendo meio de cultura estéril e ao final do experimento foram imediatamente colocadas em cultura.

3.7. Ensaio de apoptose

A análise de apoptose das células tumorais foi avaliada usando Annexin V conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e kit de detecção de PI de acordo com o protocolo do fabricante (BD Bioscience). Resumidamente, as CTTs foram ressuspensas em tampão de ligação e coradas com FITC-Annexin V (100 µg/ml) e PI (2µg/ml) por 15 minutos em agitação e temperatura ambiente, protegido da luz, seguido por análise de FACS utilizando-se o equipamento BD FACS Canto™ II (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA). As células positivas

para annexin V e negativas para PI foram consideradas células apoptóticas (PARK et al., 2017).

3.8. PCR em Tempo Real

Para a quantificação da expressão gênica utilizando a técnica qPCR, primeiro foi realizada a extração de RNA utilizando-se o reagente SV Total RNA isolation System (Promega) conforme instruções do fabricante. Posteriormente o RNA foi tratado com DNase e purificado. A síntese de cDNA seguiu o protocolo da GoScript™ Reverse Transcription System (Promega). A expressão dos genes de interesse, Histona Deacetilase 6 (HDAC6), Peroxirredoxina 2 (PRDX2), Peroxirredoxina 6 (PRDX6), Tiorredoxina (TXN) e Superóxido Dismutase 2 (SOD2), foram quantificadas através do sistema SybrGreen com o kit GoTaq qPCR Master Mix (Promega), com o uso da fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ utilizando o gene endógeno β -actina como normalizador em termociclador StepOne (Applied Biosystems). Os primers para a amplificação dos genes de interesse foram construídos utilizando-se o software Gene Runner (versão 6.5.52) e estão descritos à seguir:

Gene	Sequência Forward	Sequência Reverse	Fragmento (pb)
HDAC6	GGAAAAGGTCGCCAGAAACT	GGTTCTGCCTACTTCTTCGCT	166
PRDX2	TGGGCTGTGAAGTGCTGGGCGT	CGCAGGTTCCAGAGGTTGAGCA	156
PRDX6	GTGGTGTTTGTITTTTGGTCCTGA	GACCATCACACTATCCCCATCCT	170
TXN	TCAGACTCCAGCAGCCAAGATG	CAGAGAGGGAATGAAAGAAAGGCT	158
SOD2	CCTCAGCCCTAACGGTGGTGGA	ATTTGTAAGTGTCCCCGTTTCCT	168
β -actina	GCCTCGCTGTCCACCTTCCA	AGAAAGGGTGTAACGCAACTAAG	124

3.9. Análise de Expressão Gênica do TCGA (The Cancer Genome Atlas Program)

Dados de expressão gênica de 612 pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço foram obtidos do TCGA (<https://portal.gdc.cancer.gov/projects/TCGA-HNSC>) e a expressão dos genes HDAC6, PRDX2, PRDX6, SOD2 e TXN, assim como a análise de sobrevida e correlação foram realizadas pelo UCSC Xena Functional Genomics Explorer (<http://xena.ucsc.edu/>).

3.10. Ensaio de determinação de EROs

A geração intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células controle e tratadas com tubastatina A foi determinada através de análises de fluorescência pela quantificação dos níveis de oxidação da sonda 2,7-Dichlorofluorescein diacetate (H2DCFDA; Sigma Aldrich Inc., USA). Na presença de espécies reativas de oxigênio, ocorre a oxidação de H2DCF intracelular em DCF, o qual emite uma fluorescência verde. Aproximadamente 3×10^3 células foram cultivadas placas de cultura de 96 poços com fundo escuro. O H2DCF-DA (25 μ M) preparado em tampão PBS-HEPES foi adicionado às células e as mesmas permaneceram em incubadora de CO₂ por 60 minutos. Após, as células foram lavadas com PBS e levadas para análises e as células positivas para DCF foram quantificadas por análises com fluorímetro (Synergy2, BioTeK).

3.11. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software GraphPad Prism (GraphPad Software, versão 5.0) e um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4. RESULTADOS

4.1. Identificação e localização de HDAC6 em células de carcinoma oral

A expressão da proteína HDAC6 está associada a diversos tipos de tumores como: câncer de bexiga, melanoma, câncer de pulmão e câncer de cabeça e pescoço (LI et al., 2018; LOSSON et al., 2020). A identificação da expressão gênica e análise proteica da HDAC6 nas linhagens CAL27 e SCC9 selvagens (WT) e resistentes à cisplatina (CisR) foi realizada por PCR quantitativo e Western Blotting (Figura 6). O resultado da expressão gênica de HDAC6 demonstrou que houve uma diminuição na quantidade de RNAm na linhagem CAL27 CisR quando comparada à linhagem selvagem (* $p < 0.05$) e não houve diferença para a linhagem SCC9 (Figura 5A). Quando os níveis proteicos de HDAC6 foram analisados por western blot, verificamos que as linhagens resistentes à cisplatina apresentaram elevada concentração de HDAC6 (Figura 5B). HDAC6 primordialmente está presente no citoplasma das células (SHARIF et al., 2019). No entanto, sob a ação de estresse oxidativo, a proteína HDAC6 pode deslocar-se para o núcleo atuando no controle do estado de acetilação das proteínas ATR e CHK1. Este deslocamento pode alterar a fosforilação e atividade das proteínas nucleares (WANG et al., 2012). Por imunofluorescência observamos que houve um acúmulo nuclear significativo de HDAC6 nas linhagens CAL27 (***) $p < 0.001$) e SCC9 (** $p < 0.01$) resistentes à cisplatina (Figura 5C). Esses dados sugerem que durante o processo de aquisição de resistência, promovido pela exposição prolongada à cisplatina, a proteína HDAC6 é acumulada preferencialmente no núcleo das células, onde pode estar controlando a acetilação de histonas em genes que contribuem para a quimiorresistência à cisplatina.

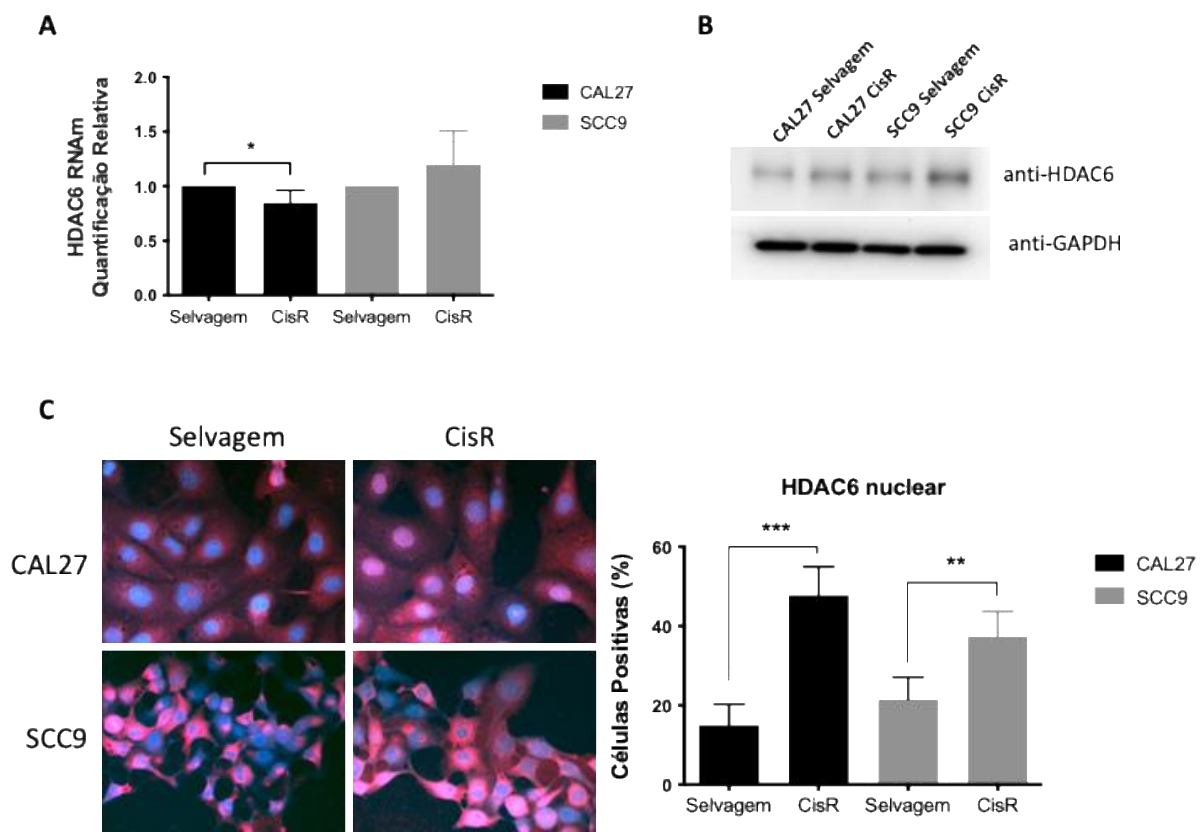


Figura 5 Avaliação do perfil de HDAC6 nas linhagens selvagens e resistentes à cisplatina. Linhagens derivadas de tumor na base da língua selvagem (WT) e resistentes à cisplatina (CisR) de CAL27 e SCC9. A perfil de expressão gênica foi determinado pela técnica de qPCR, * $p < 0.05$. B concentração proteica por Western Blot com anti-HDAC6 e GAPDH. C deslocamento de HDAC6 para o núcleo por imunofluorescência, com o anticorpo anti-HDAC6 e calculado a porcentagem de células positivas para HDCA6 nuclear em células sensíveis e resistentes de CAL27 e SCC9 (** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$) (C).

Para analisarmos os níveis de HDAC6 em tumores de cabeça e pescoço foi feita uma busca de dados na plataforma TCGA (The Cancer Genome Atlas Program). Foram selecionados os dados de amostras de pacientes com câncer de cabeça e pescoço e suas localizações específicas como, por exemplo: câncer nos lábios, faringe, palato, base da língua e demais sítios não específicos. Para a análise selecionamos os tipos de tumores (sítio tumoral) e a expressão gênica de HDAC6 (Figura 6). Verificamos que, em tumores na base da língua, a expressão de HDAC6 é maior que nos demais tipos de câncer e esses dados corroboram a nossa escolha das linhagens derivadas da base da língua de carcinoma oral CAL27 e SCC9 para os estudos com a HDAC6. As análises da taxa de sobrevivência dos pacientes que expressam diferentes níveis de HDAC6 podem ser vistos na Figura 7, e apesar de

observarmos uma maior sobrevida em pacientes com alta expressão de HDAC6, essa diferença não apresenta significância estatística.

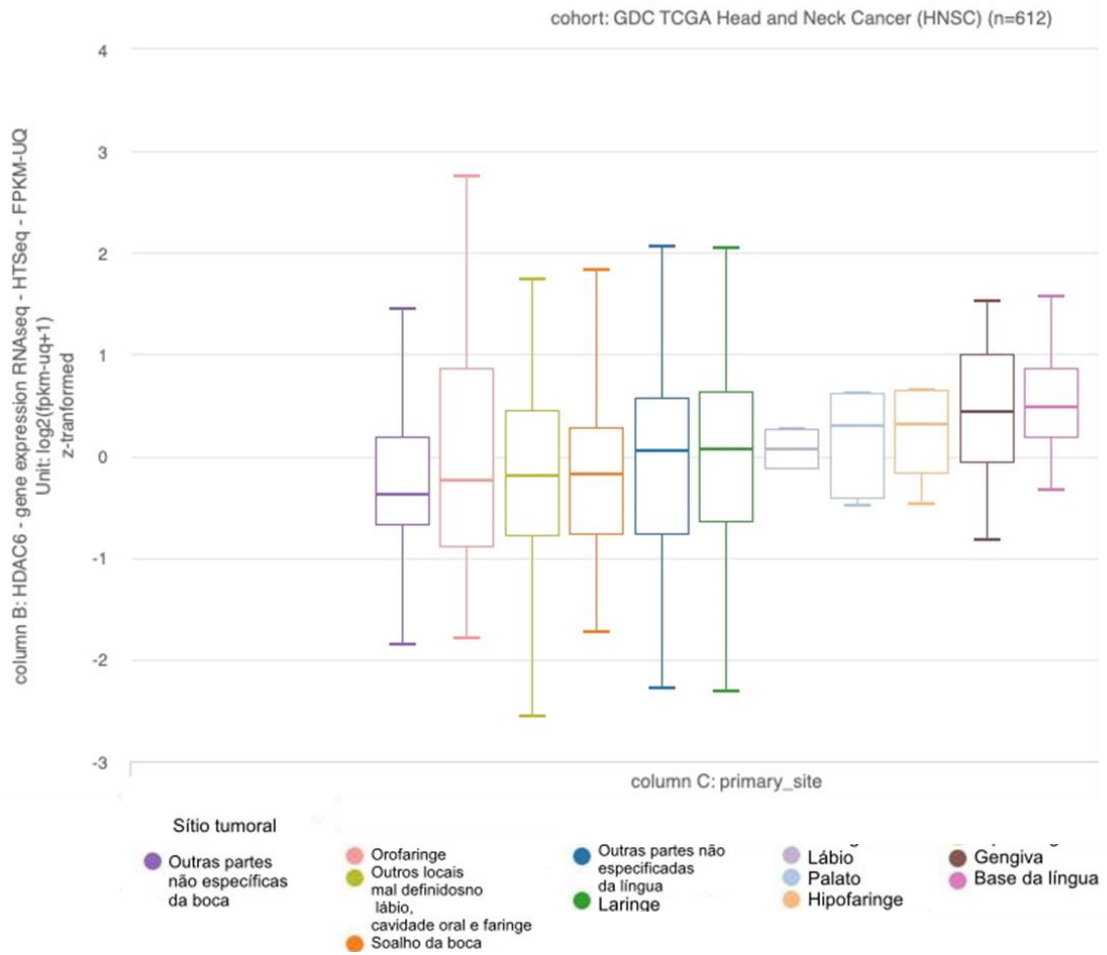


Figura 6 Análise de dados de pacientes com câncer de cabeça e pescoço e a expressão de HDAC6. Os dados foram obtidos através da plataforma TCGA (The Cancer Genome Atlas Program). Disponível em: <https://portal.gdc.cancer.gov/projects/TCGA-HNSC> Acesso em 10/11/2021.

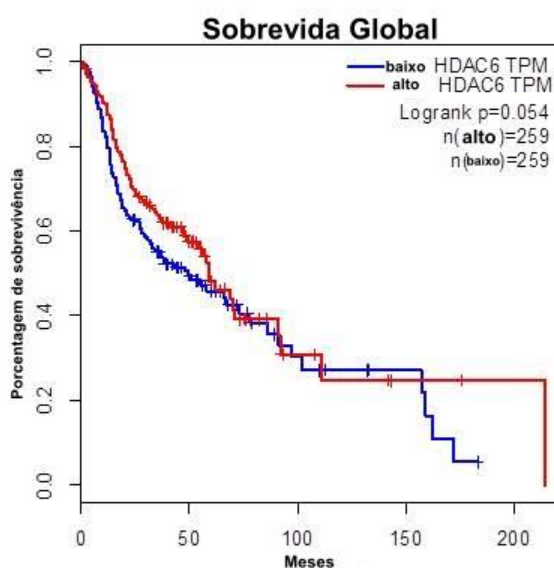


Figura 7 Análise da sobrevida de pacientes relacionados à concentração de HDAC6. Os dados foram obtidos através da plataforma TCGA (The Cancer Genome Atlas Program). Comparação entre os níveis de expressão de HDAC6, alto e baixo, em tumores de cabeça e pescoço. Disponível em: <https://portal.gdc.cancer.gov/projects/TCGA-HNSC> Acesso em 10/11/2021.

4.2. Identificação do acúmulo de danos no DNA e de estresse oxidativo nas células selvagens e resistentes de CAL27 e SCC9

Por imunofluorescência analisamos o acúmulo de danos ao DNA através do marcador phospho-H2A.X. Sabe-se que a fosforilação de H2A.X é indicação de danos ao DNA dentro da célula (ALMEIDA et al., 2014). Os resultados mostram que a expressão de phospho-H2A.X está reduzida nas células de CAL27 CisR e SCC9 CisR (Figura 8), com significância estatística (** $p < 0.01$). Esses resultados sugerem que as linhagens resistentes à cisplatina apresentam proteção aos danos no DNA frequentemente induzidos pela administração da cisplatina.

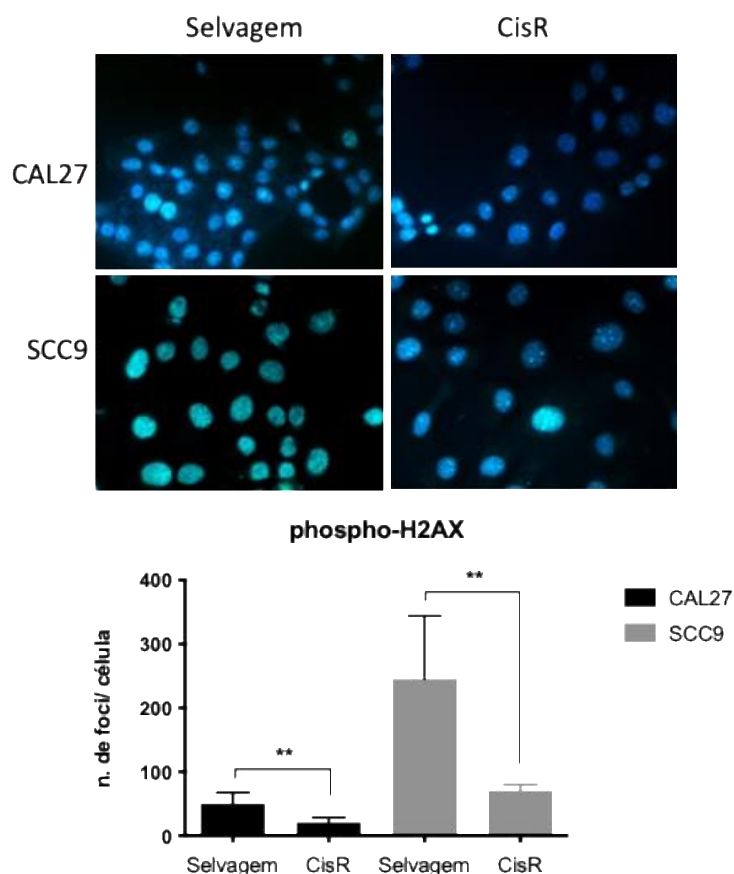


Figura 8 Avaliação dos danos do DNA em linhagens de carcinoma oral. O ensaio de imunofluorescência com o anticorpo anti-p-H2A.X em células de CAL27 e SCC9. O número de células positivas para phospho-H2A.X foram quantificados pelo software ImageJ (** p<0.01).

Estudos mostram que células tumorais apresentam resistência ao estresse oxidativo, seja ele de fonte intracelular ou extracelular (JUNG et al., 2019; NICOLUSSI et al., 2017). A participação de HDAC6 no mecanismo de proteção celular influencia a regulação do estresse oxidativo (RYU et al., 2017), pois entre seus substratos encontram-se as enzimas antioxidantes PRDX1 e PRDX2. (LOSSON et al., 2020; PARMIGIANI et al., 2008a). Com a inibição de HDAC6 ocorre aumento da atividade das proteínas antioxidantes ocasionando à redução da resistência celular a quimioterapia (LOSSON et al., 2020; SEIDEL et al., 2015). Para investigarmos os níveis de estresse oxidativo nas linhagens resistentes à cisplatina, os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) foram quantificados com a sonda fluorescente H2-DCFDA. O composto não fluorescente DCF-DA é convertido em fluorescência na presença de espécies reativas de oxigênio (BHAGAT et al., 2018). Os resultados mostram que os níveis de estresse oxidativo são maiores nas células

selvagens e reduzidos nas células resistentes das duas linhagens (Figura 9). Esses dados sugerem que as linhagens quimiorresistentes, cujos níveis de HDAC6 estão aumentados, apresentam proteção contra o estresse oxidativo.

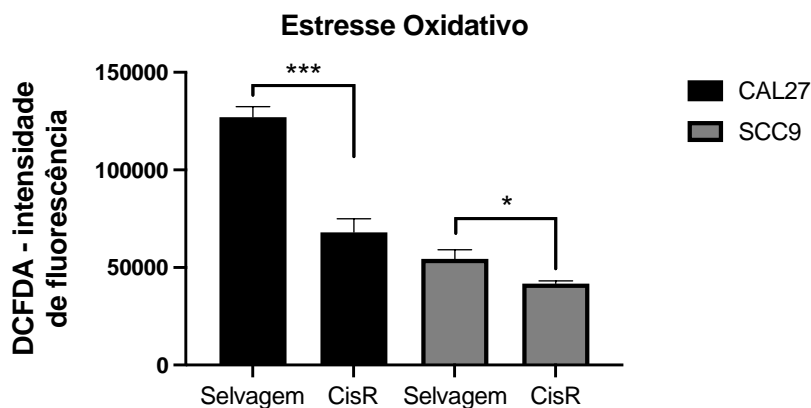
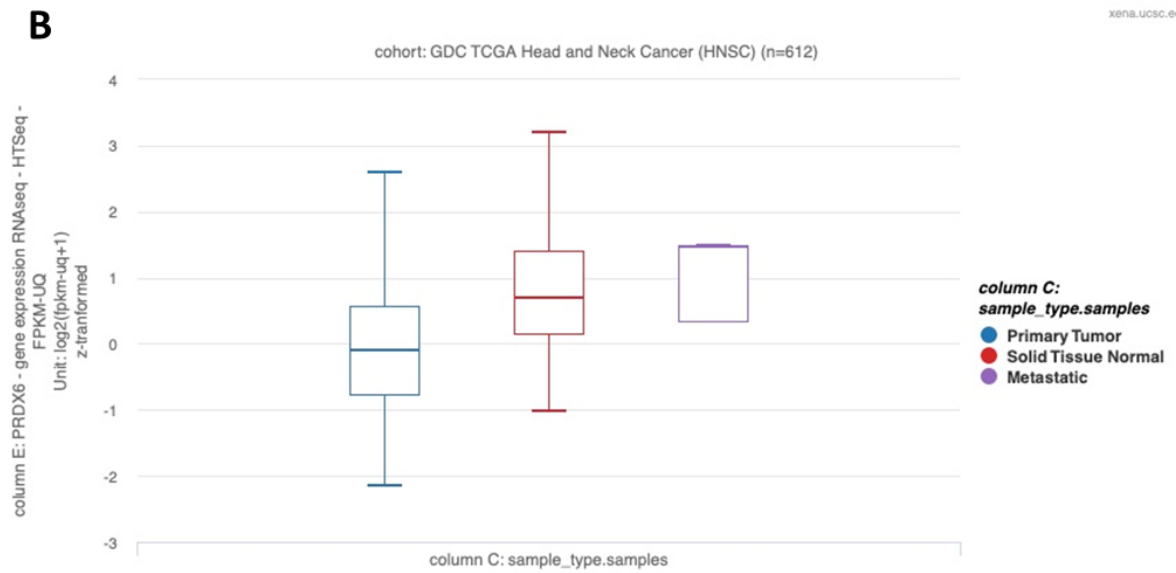
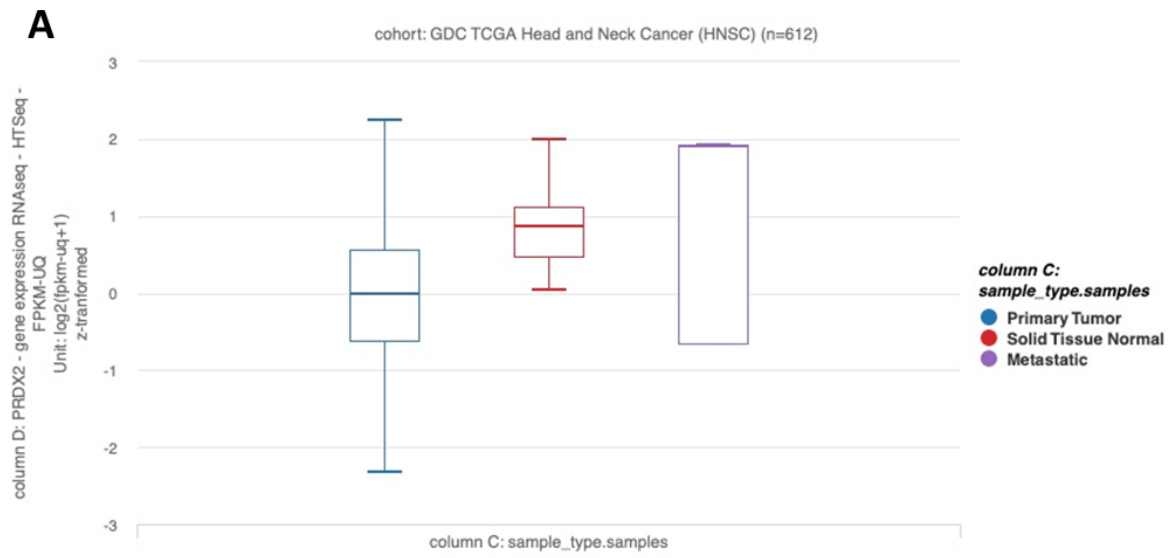


Figura 9 Avaliação dos níveis de EROs nas populações selvagem e resistente a cisplatina de carcinoma oral. O ensaio de EROs e quantificação da fluorescência com a sonda DCFDA na linhagem CAL27 (***) $p < 0.001$) e na linhagem SCC9 (* $p < 0.05$).

Através dos dados obtidos na plataforma TCGA foi feita a análise da expressão gênica de proteínas antioxidantes que estão envolvidas na regulação do estresse oxidativo em câncer de cabeça e pescoço. Selecionamos amostras de pacientes com tumores primários, metastáticos e amostras de tecido normais para avaliar a expressão gênica de PRDX2, PRDX6, SOD2 e TXN (Figura 10). As proteínas PRDX2 e PRDX6 possuem perfil de expressão gênica similar, baixos níveis em tumores primários e elevada expressão em tumores metastáticos indicando uma relação com a agressividade tumoral. A enzima SOD2 se encontra normalmente expressa em tecidos normais e em neoplasias sua expressão está reduzida. A TXN possui perfil similar a SOD2, no entanto, como essa enzima contribui para a atividade antioxidante da PRDX2, ela possui elevada expressão também em metástases. Esses dados sugerem uma regulação diferencial do estresse oxidativo em amostras de pacientes com câncer de cabeça e pescoço.



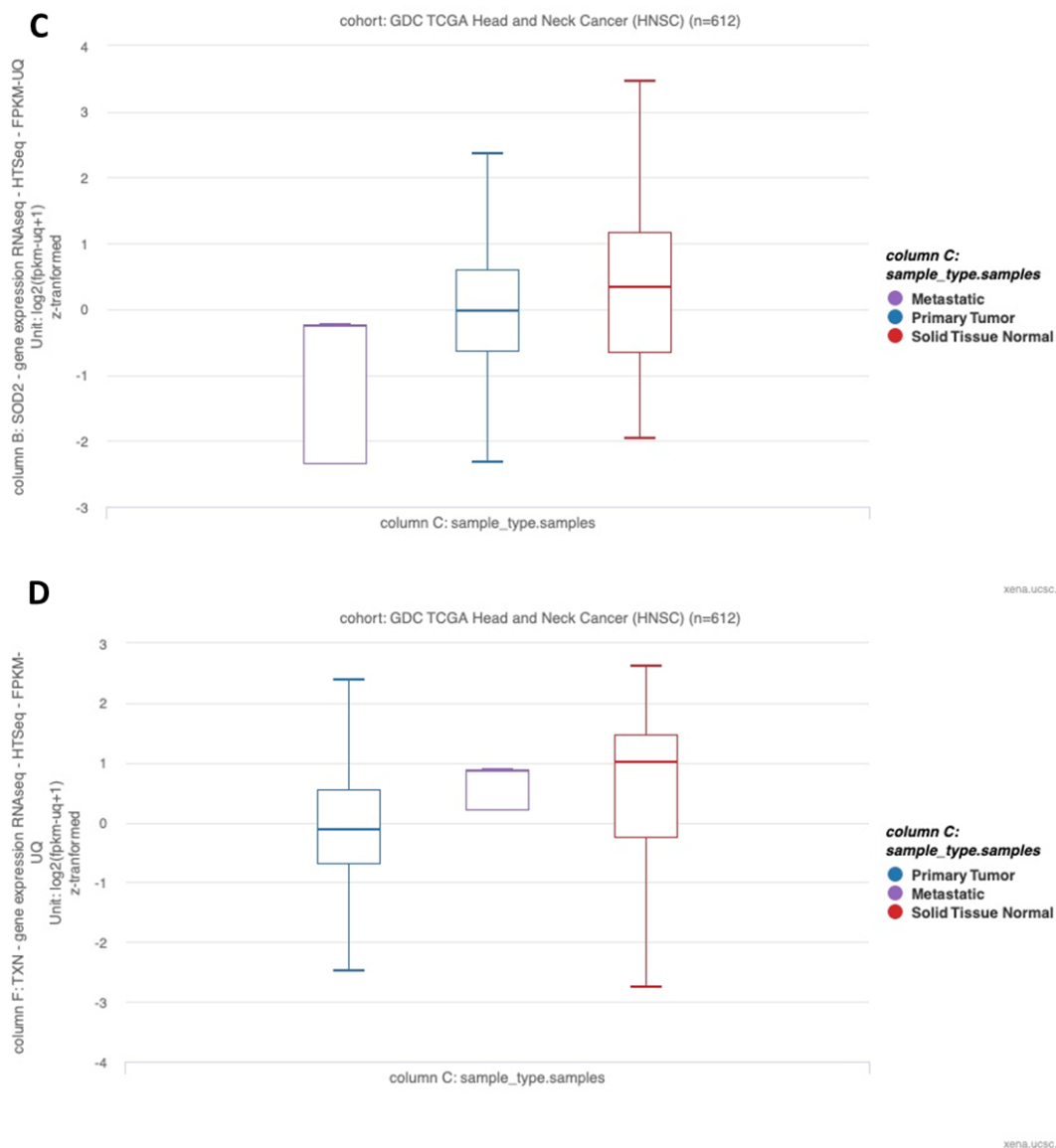


Figura 10 Análise da expressão gênica de enzimas antioxidantes em câncer de cabeça e pescoço. Os dados foram obtidos através da plataforma TCGA (The Cancer Genome Atlas Program). As amostras selecionadas são derivadas de pacientes com tumores primários, metastáticos e de tecido normal. Disponível em: www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga). Acesso em 10/11/2021.

Em seguida, nós avaliamos a expressão relativa dos genes antioxidantes PRDX2, PRDX6, TXN e SOD2 nas linhagens CAL27 e SCC9 resistentes comparadas com suas respectivas linhagens selvagens (Figura 11). As enzimas antioxidantes são determinantes na tumorigênese e sua atividade depende da sua origem e relação com outras proteínas durante a resposta ao estresse oxidativo (NICOLUSSI et al., 2017; ZHU et al., 2019). Os resultados mostram que houve um aumento da expressão de PRDX2 nas linhagens CAL27 CisR (*p<0.05) e SCC9

CisR (**p<0.01) em comparação com as linhagens selvagens (Figura 11A). A expressão de PRDX6 e SOD2 está elevada em SCC9 CisR (**p<0.01) e reduzida em CAL27 CisR (**p<0.001) em comparação a suas respectivas amostras selvagens (Figura 11 B e C). A TXN também está elevada em SCC9 CisR (*p<0.05) e reduzida em CAL27 CisR (**p<0.001) (Figura 11D). Os resultados mostram que a linhagem SCC9 CisR apresenta maiores níveis de expressão das enzimas antioxidantes que a linhagem CAL27, o que pode refletir nos baixos níveis de EROs observados na figura 9.

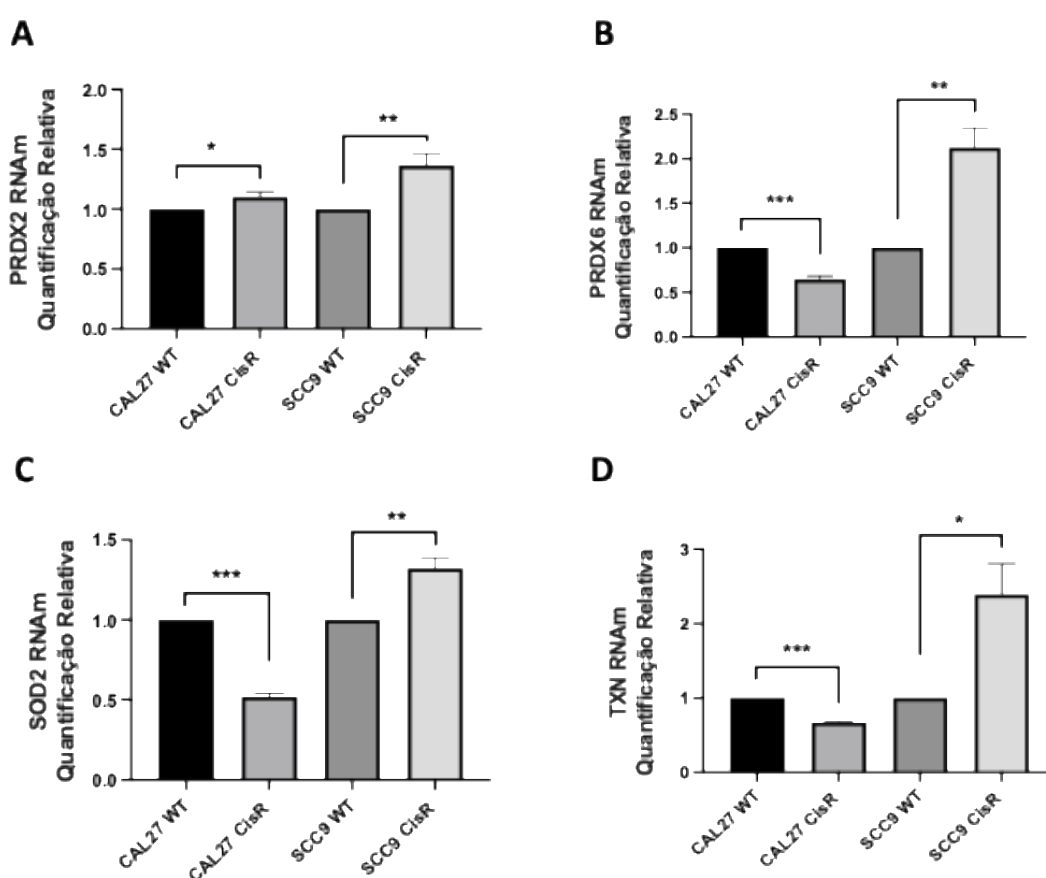


Figura 11 Avaliação do perfil de expressão de genes envolvidos na regulação do estresse oxidativo em linhagens de carcinoma oral resistentes à cisplatina. Foram utilizadas as células selvagens (WT) e resistentes à cisplatina CisR de CAL27 e SCC9. O perfil de expressão gênica dos genes PRDX2 (A), PRDX6 (B), SOD2 (C) e TXN (D) foram determinados através da técnica qPCR e os cálculos obtidos pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$. (* p<0.05; ** p<0.01; ***p<0.001).

Em seguida, nós realizamos análises de dados da plataforma XENA com o objetivo de investigar a correlação da HDAC6 com a expressão dessas enzimas antioxidantes em pacientes com tumores de cabeça e pescoço. Selecionados os

dados da expressão gênica de HDAC6 em combinação com a expressão gênica de cada uma das enzimas antioxidantes: PRDX2 com HDAC6; PRDX6 com HDAC6; SOD2 com HDAC6 e TXN com HDAC6 (Figura 12). Ao analisarmos os valores de R obtidos pela análise de correlação, nós verificamos que para valores positivos e expressão de HDAC6 elevada, há também um aumento da expressão da outra proteína (correlação positiva) e para valores de R negativo, quando a expressão de HDAC6 está elevada, há uma redução da expressão da outra proteína (correlação negativa). Na Figura 12A e B observamos uma correlação positiva, porém com significância estatística apenas para a correlação entre HDAC6 e PRDX2, isso sugere que HDAC6 pode estar elevando a expressão de PRDX2. Nas Figuras 12C e D, identificamos o oposto, uma correlação negativa entre a expressão de HDAC6 e dos genes SOD2 e TXN, com significância para a correlação entre HDAC6 e TXN, onde a HDAC6 elevada pode estar reduzindo a expressão de TXN.

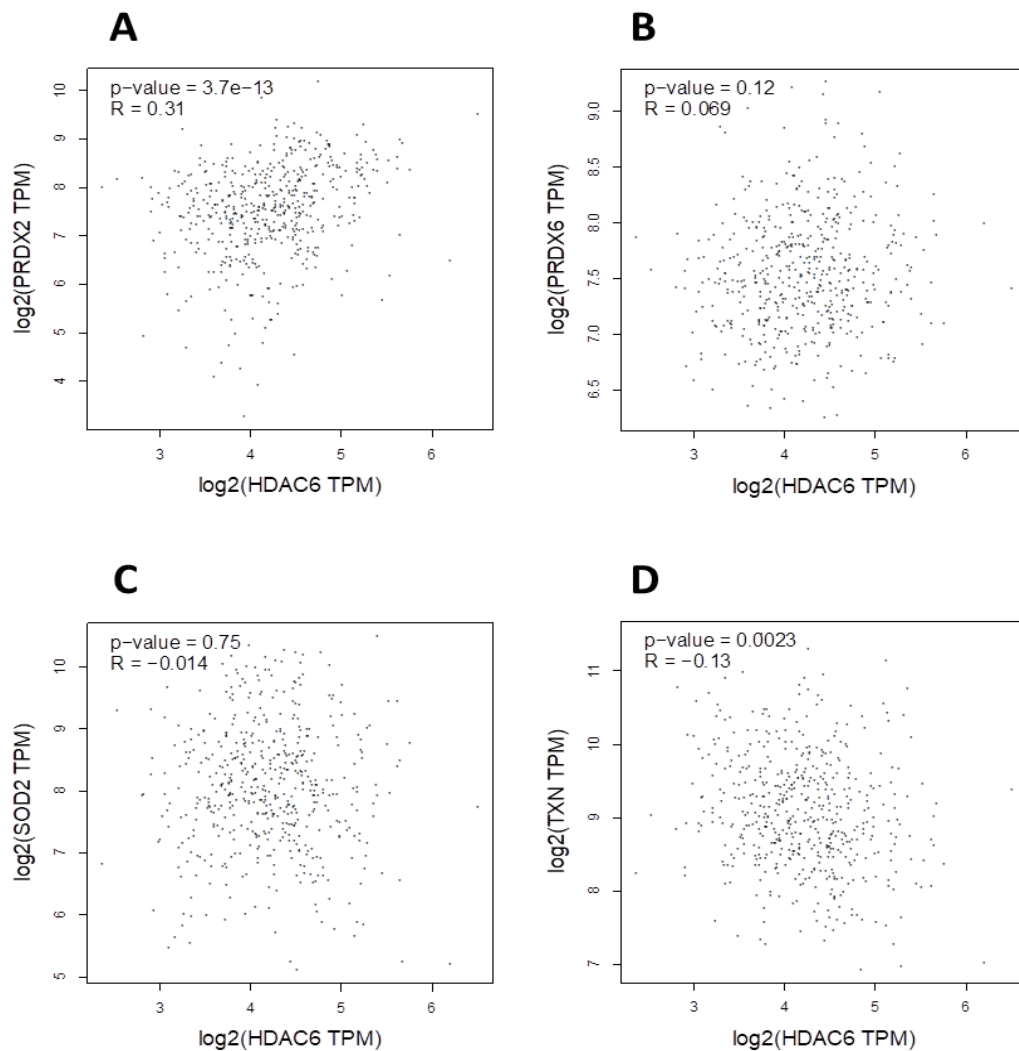


Figura 12 Análise de correlação de expressão gênica de amostras de pacientes com tumores de cabeça e pescoço. Genes selecionados: HDAC6, PRDX2, PRDX6, SOD2 e TXN. Os valores de p menores que 0.05 são significativos e o valor de R positivo e negativo é resultado da relação de HDAC6 com as demais expressões gênicas. Disponível em: <http://xena.ucsc.edu/>). Acesso em 10/11/2021.

4.3. Caracterização de HDAC6, controle do estresse oxidativo e danos no DNA nas CTTs das linhagens CAL27 CisR e SCC9 CisR

Nossos resultados anteriores demonstraram que HDAC6 está acumulada nas linhagens resistentes à cisplatina e as mesmas também apresentam menores níveis de estresse oxidativo e danos no DNA, sugerindo uma proteção dessas células contra os efeitos promovidos pela cisplatina. Nós também observamos em outros trabalhos que as CTTs estão acumuladas em nossas linhagens resistentes à

cisplatina (OLIVEIRA et al.,- submetido para publicação-). Assim, nós avaliamos se HDAC6 pode estar contribuindo para a quimiorresistência mediada pelas células-tronco tumorais. As CTTs derivadas das linhagens CisR foram identificadas e isoladas com o uso dos marcadores enzima ALDH (aldeído desidrogenase) e o anticorpo CD44+ e posteriormente cultivadas novamente (FABER et al., 2011; YU; CIRILLO, 2020). A partir dessa separação obtivemos duas populações distintas de células tumorais, as células não-tronco tumorais (CTT-), que apresentaram baixa marcação de CD44 e ALDH; e as células-tronco tumorais (CTT+) que expressaram altos níveis de CD44 e ALDH (Figura 13A). Em seguida, nós avaliamos os níveis de RNAm de HDAC6 nas duas populações de células e identificamos elevada expressão gênica nas CTT+ com alta significância estatística para a linhagem CAL-27 (**p<0.001) (Figura 13B). Os níveis da proteína HDAC6 também foram observados aumentados nas populações CTT+ (Figura 13C), enfatizando a relação de HDAC6 com o fenótipo tronco e quimiorresistência celular. É interessante notar que a proteína HDAC6 sofre uma clivagem na população de células-tronco tumorais. Esta clivagem foi identificada anteriormente em células epiteliais infectadas com o vírus da influenza A e parece ser mediada pela ação da caspase-3, estabilizando a localização citoplasmática de HDAC6 (HUSAIN; HARROD, 2009).

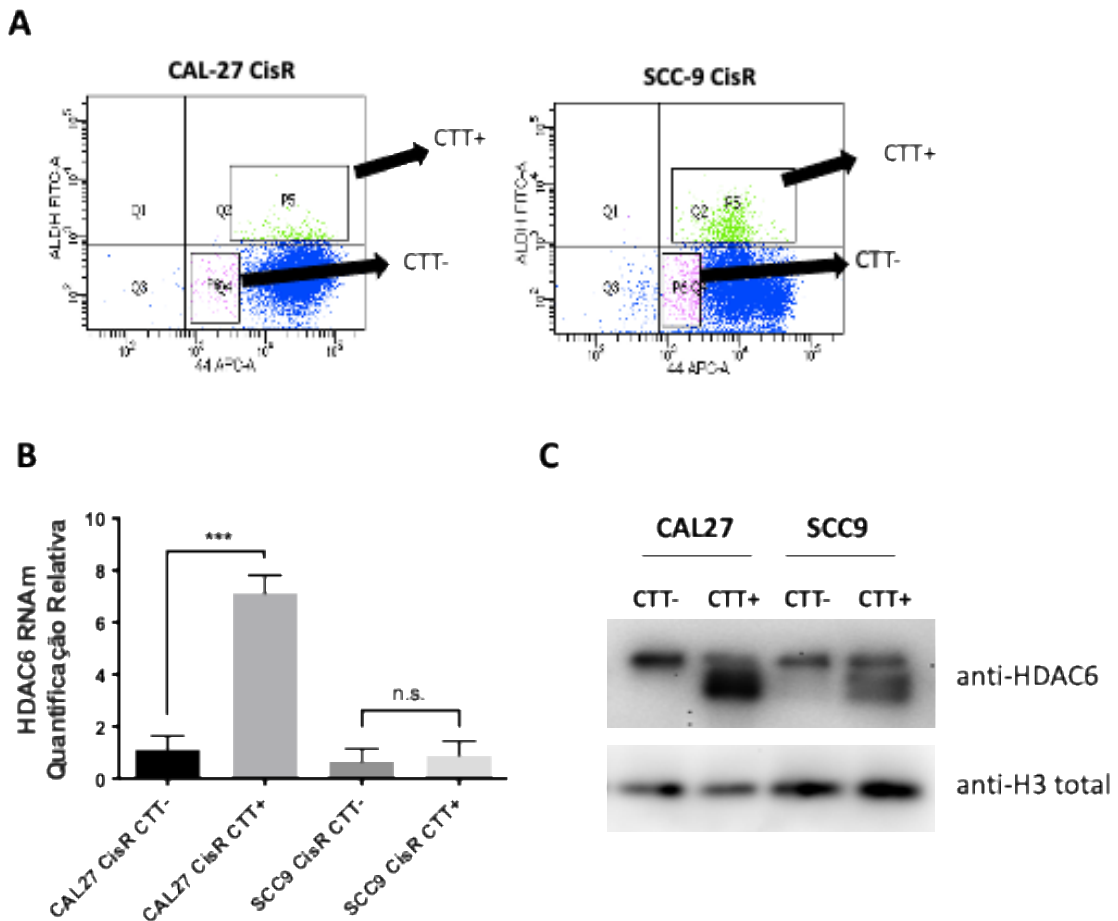


Figura 13 Identificação das células-tronco tumorais (CTTs) e análise do perfil de HDAC6. População de CTT+ e CTT- identificada e isolada por “cell sorting” em células de CAL27^{CisR} e SCC9^{CisR} com atividade enzimática positiva de ALDH e expressão de CD44+ (A). Por qPCR com cálculos obtidos pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ e por Western Blot o perfil de HDAC6 em CTTs (B) (***) $p < 0.001$.

Em seguida, através do qPCR, nós quantificamos a expressão relativa dos genes antioxidantes PRDX2, PRDX6, TXN e SOD2 nas populações de CTT- e CTT+ de CAL27 e SCC9 resistentes à cisplatina (Figura 14). Os resultados mostram que não houve diferença na expressão de nenhum dos genes analisados entre as populações de CTT+ e CTT-, porém existem diferenças entre as duas linhagens e os padrões de expressão gênica das enzimas antioxidantes PRDX2, PRDX6, SOD2 e TXN. Ressaltamos que as CTT+ de CAL27 apresentou baixa expressão dos genes SOD2 (Figura 14C) e TXN (Figura 14D) se comparada à SCC9. A expressão de PRDX6 não diferiu entre as linhagens (Figura 14B). A linhagem SCC9 CisR CTT+ apresentou expressão menor somente de PRDX2 (Figura 14A). Esses dados sugerem regulação diferencial na resposta ao estresse oxidativo.

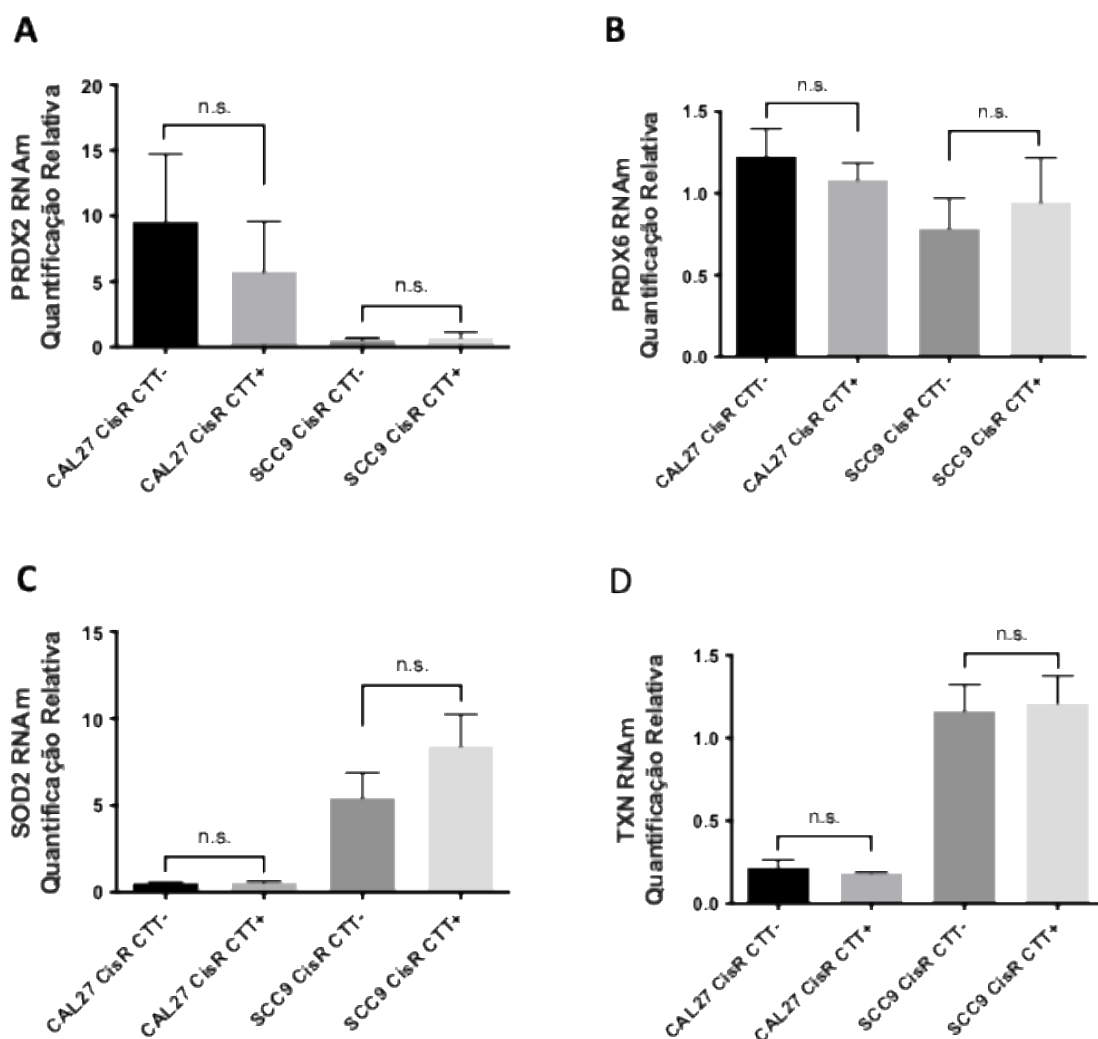


Figura 14 Avaliação do perfil de expressão gênica de genes envolvidos no estresse oxidativo de carcinoma oral. Foram utilizadas as CTTs de CAL27 e SCC9 (A). O perfil de expressão gênica dos genes PRDX2, PRDX6, SOD2 e TXN foram determinados através da técnica qPCR e os cálculos obtidos pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (n.s.: diferenças não-significativas).

Quando os níveis da proteína PRDX2 foram analisados por imunofluorescência, os resultados obtidos foram semelhantes ao observado para o RNAm, demonstrando que a linhagem CAL27 apresenta níveis mais altos de PRDX2 do que a linhagem SCC9. Porém, quando comparamos as populações CTT- e CTT+, observamos que os maiores níveis de PRDX2 estão presentes nas CTT+ das linhagens CAL27 CisR ($***p < 0.001$) e SCC9 CisR ($**p < 0.01$) (Figura 15A). Os níveis de danos no DNA foram avaliados através da quantificação da distribuição de fosfo-H2A.X nas populações de CTT- e CTT+. Foi observado uma redução na quantidade de danos na população de células-tronco tumorais (CTT+) das linhagens CAL27 CisR ($*p < 0.05$) e SCC9 CisR ($*p < 0.05$) (Figura 15B). Esses resultados

indicam que existe uma maior proteção ao estresse oxidativo e ao acúmulo de danos no DNA nas células-tronco tumorais das linhagens resistentes à cisplatina.

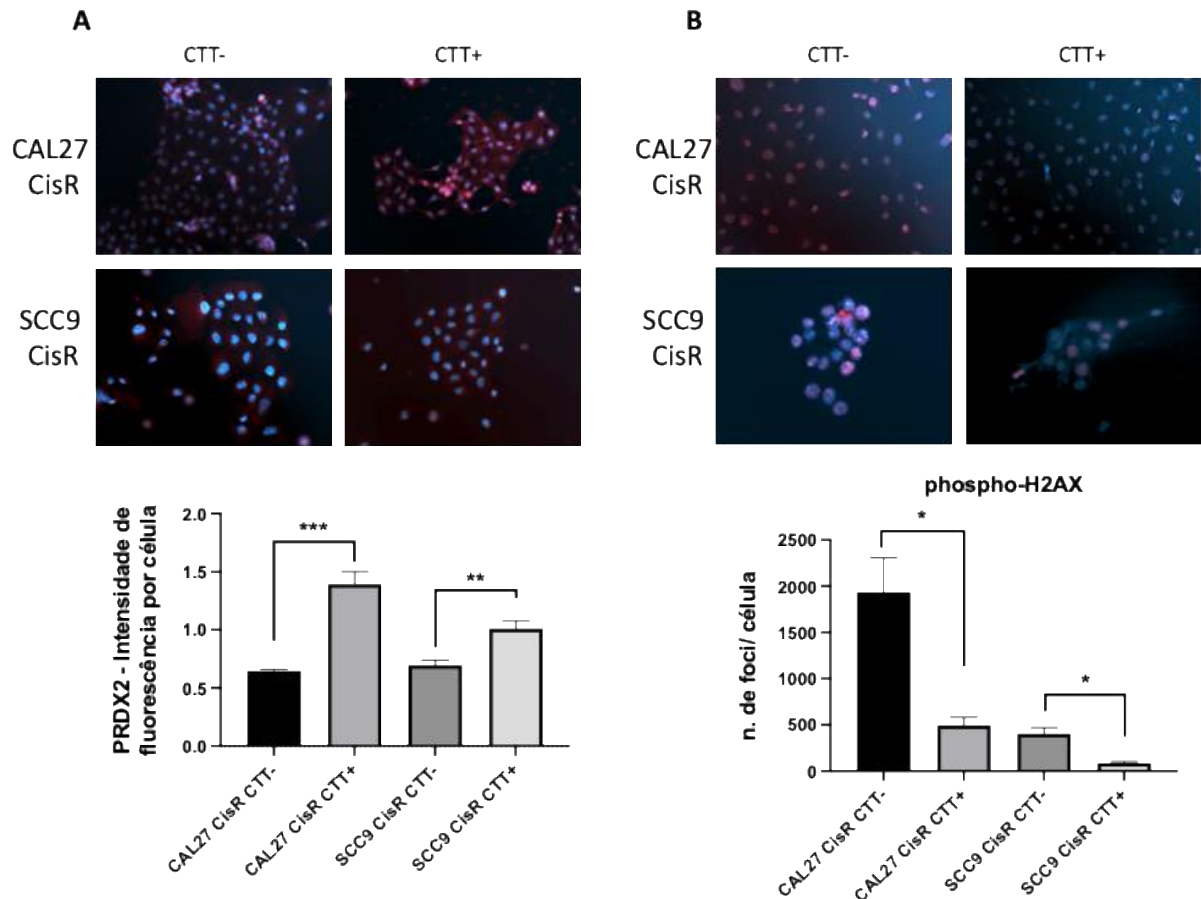


Figura 15 Avaliação dos danos ao DNA e estresse oxidativo em linhagens de carcinoma oral. O ensaio de imunofluorescência realizado em CTTs de CAL27 e SCC9 com a quantificação da expressão do anticorpo anti-PRDX2 (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) (A) e o anticorpo anti-p-H2A.X (* $p < 0.05$) (B).

4.4. Avaliação da inibição farmacológica de HDAC6 pela Tubastatina A nas linhagens resistentes à cisplatina e nas células-tronco tumorais

Como nossos resultados demonstraram que a HDAC6 parece exercer uma função importante tanto nas linhagens resistentes à cisplatina quanto na população de células-tronco tumorais derivadas destas linhagens, nós buscamos investigar se

a inibição farmacológica de HDAC6 poderia ser uma estratégia promissora como terapia para reverter a quimiorresistência. A administração de Tubastatina A para inibir HDAC6 foi escolhida de acordo com os últimos achados na literatura que nos mostra sucesso em sua especificidade em inibir a proteína HDAC6 (AUZMENDI-IRIARTE et al., 2020; BATCHU; BRIJMOHAN; ADVANI, 2016; DEPETTER et al., 2019b; KYLE V BUTLER, 2010; LEYK et al., 2017; LOSSON et al., 2020). Primeiramente, o ensaio de viabilidade celular com Alamar Blue foi realizado para identificarmos o IC50 de Tubastatina A para as linhagens selvagens e resistentes à cisplatina. O IC50 é a concentração do composto necessária para eliminar cerca de 50% do total de células viáveis. Foi obtido um IC50 de 42 nM para a linhagem CAL27 selvagem (WT) (Figura 16A) e de 20 nM para a linhagem CAL27 CisR (Figura 16B). A SCC9 apresentou concentrações de IC50 muito superiores às observadas para a CAL27, sendo a dose IC50 de 189 nM para a SCC9 WT (Figura 16C) e de 131 nM para SCC9 CisR (Figura 16D). Uma observação importante é que as linhagens resistentes à cisplatina se mostraram mais sensíveis à administração de Tubastatina A, talvez, devido aos níveis aumentados de HDAC6 observados nas linhagens resistentes à cisplatina.

Em seguida, a dose IC50 de Tubastatina A necessária para eliminar especificamente as células-tronco tumorais foi determinada através do ensaio de formação de esferas (Figura 17A e B). Foi observado que as células-tronco tumorais de ambas as linhagens responderam ao tratamento com Tubastatina A de forma muito semelhante, apresentando um IC50 de 15 nM (**p<0.001), e mesmo as concentrações mais baixas de Tubastatina A (5 nM) já foram eficientes para reduzir de forma significativa as CTTs (**p<0.001). É importante observar também que, a população de células-tronco tumorais apresenta maior sensibilidade à Tubastatina A do que a população total de células quimiorresistentes (15 nM vs 20 nM para a CAL27; 15 nM vs 131 nM para a SCC9).

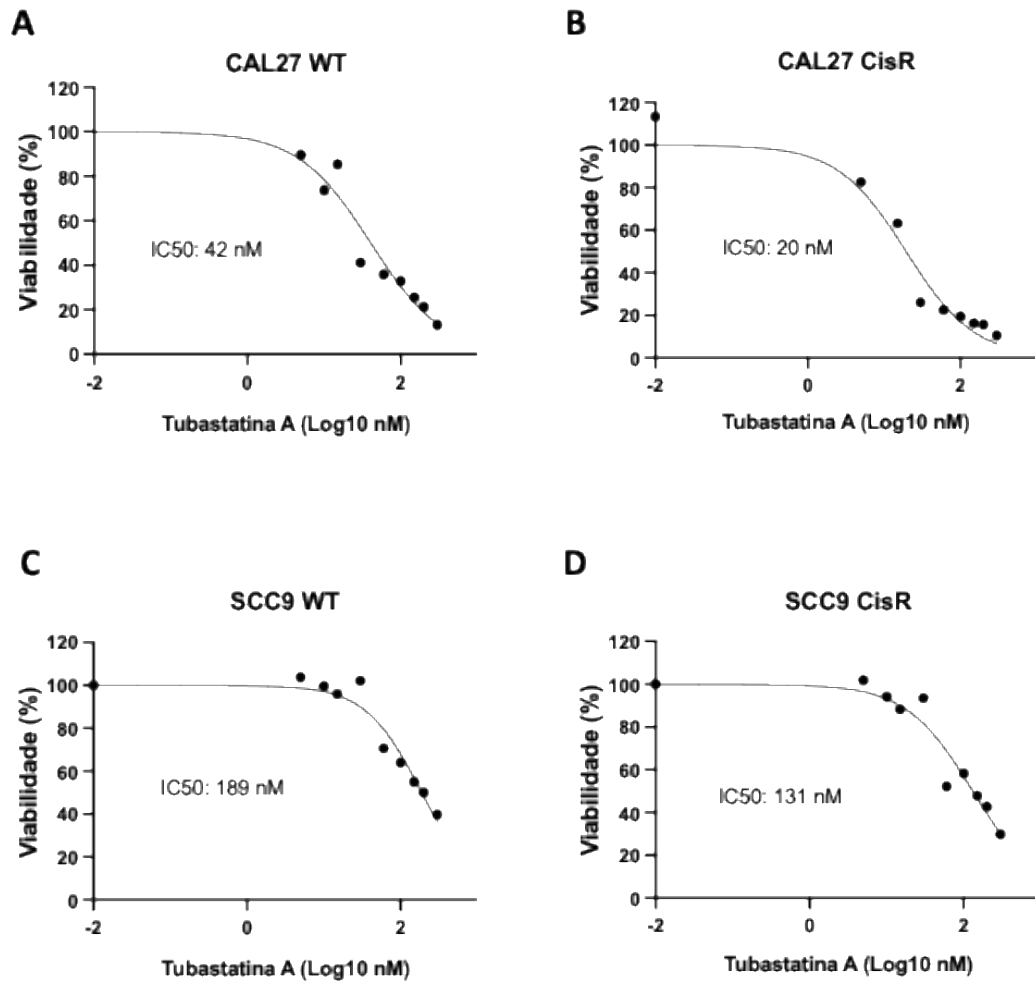
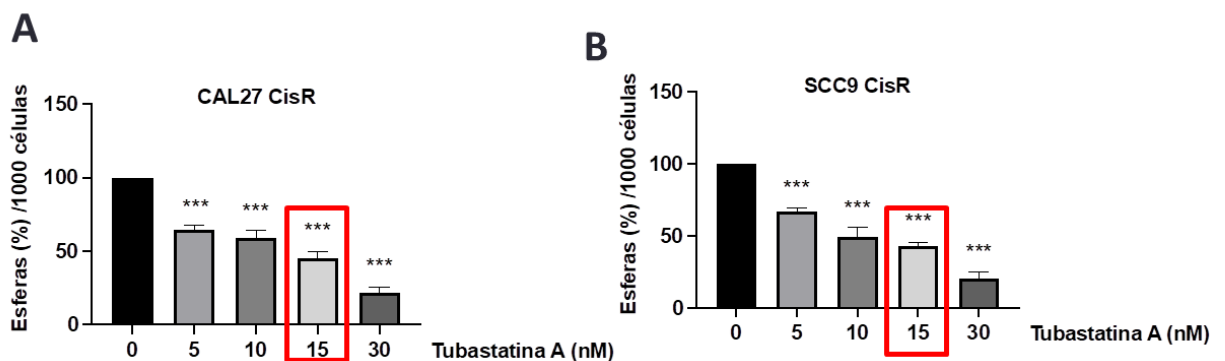


Figura 16 Análise de viabilidade celular com Tubastatina A (iHDAC6) em células de carcinoma oral. Concentração estoque de Tubastatina A (10uM), 24h. O IC50 das foi determinado usando o protocolo Alamar Blue verificando a redução da relação de absorbância de 570 e 660nm. Linhagens derivadas de tumor na base da língua selvagem (WT) e resistente (CisR) de CAL27 (IC50 WT 42nM e CISR 20nM) (A) e SCC9 (IC50 WT 189nM e CISR 131nM) (B).



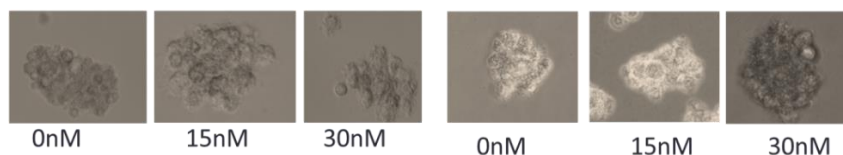


Figura 17 Análise de viabilidade celular com o uso de Tubastatina A (iHDAC6) em esferas de carcinoma oral. O ensaio de esferas foi feito com incubação a 37°C por 7 dias (0/5/10/15/30nM de Tubastatina A à concentração estoque de 10uM). Linhagens derivadas de tumor na base da língua resistente (CisR) de CAL27 (15nM) (A) e SCC9 (15nM) (B). e a contagem celular foi realizada por microscopia óptica. Os valores são normalizados com o controle (0nM) (***) $p < 0,001$.

Por western Blotting, nós avaliamos se a dose de Tubastatina A selecionada (15 nM) foi eficiente para modular HDAC6 e seu principal substrato, α -tubulina, em CTTs de carcinoma oral. Utilizamos para tal o anticorpo anti- α -tubulina acetilada, que de acordo com dados na literatura nos mostra que a ausência de HDAC6, seja por inibição ou knockdown, induz a proteína α -tubulina a seu estado acetilado (HE et al., 2020; KYLE V BUTLER, 2010). As análises mostram que as CTTs de ambas as linhagens na presença de Tubastatina A (15nM) resultou na maior concentração de α -tubulina acetilada, validando o uso desse composto e sua eficácia em inibir HDAC6. O uso de cisplatina não mostrou interferência na acetilação da proteína α -tubulina (Figura 18).

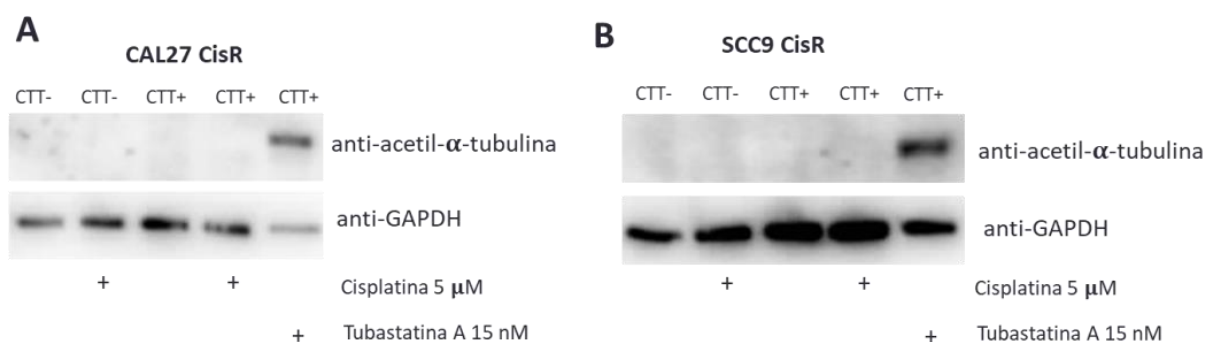


Figura 18 Avaliação de Tubastatina A (iHDAC6) em células de carcinoma oral. Por western Blotting a concentração proteica das amostras de CTTs com (Cisplatina 5 μ M/Tubastatina 15nM/ 24h) e sem tratamento de CAL27 (A) e SCC9 (B) foram avaliadas. Anti-acetil- α -tubulina e anti-GAPDH.

4.5. Avaliação da eficiência da administração de Tubastatina A nas linhagens resistentes à cisplatina

Estudos mostram que o EROs intracelular pode modificar a sinalização de morte celular induzindo a autofagia ou apoptose. Apoptose celular é indispensável na quimioterapia de vários tumores (XUE et al., 2020). HDAC6 é identificada no processo de apoptose através da deacetilação da proteína pró-apoptótica Ku70, acarretando na inibição do mecanismo apoptótico. A inibição de HDAC6 causa desfosforilação das proteínas AKT e ERK, promovendo redução de proliferação celular e aumento de morte das células tumorais (LOSSON et al., 2020; SEIDEL et al., 2015). Como HDAC6 está envolvida na regulação do estresse oxidativo e acúmulo de danos DNA, nós analisamos se a inibição farmacológica de HDAC6 por Tubastatina A poderia induzir a morte celular. Por ensaio de apoptose celular através de citometria de fluxo com os marcadores Annexina V (marcação de Apoptose celular) e Iodeto de propídio (marcação de DNA fragmentado, células mortas) foi avaliada a taxa de morte celular nas células das linhagens CAL27 e SCC9 selvagens e resistentes à cisplatina, sem e com tratamento. Os resultados mostram um aumento significativo no número de células apoptóticas com a administração de Tubastatina A em ambas as linhagens resistentes à cisplatina (* $p < 0.05$ para a CAL27; *** $p < 0.001$ para a SCC9) (Figura 19A e B). CAL27 selvagem se mostrou mais sensível à morte celular do que SCC9 enquanto as linhagens CisR apresentaram níveis muito semelhantes de células apoptóticas. A administração de cisplatina não foi eficiente para induzir apoptose nas linhagens selvagens. Não foi observada diferença na porcentagem de apoptose entre as linhagens selvagem e CisR da CAL27 (Figura 19A), mas para a linhagem SCC9, as células resistentes apresentaram maiores níveis de apoptose (*** $p < 0.001$) do que as selvagens (Figura 19B). Nossos resultados sugerem que a administração de Tubastatina A nas linhagens resistentes à cisplatina é capaz de induzir as células a entrarem em apoptose.

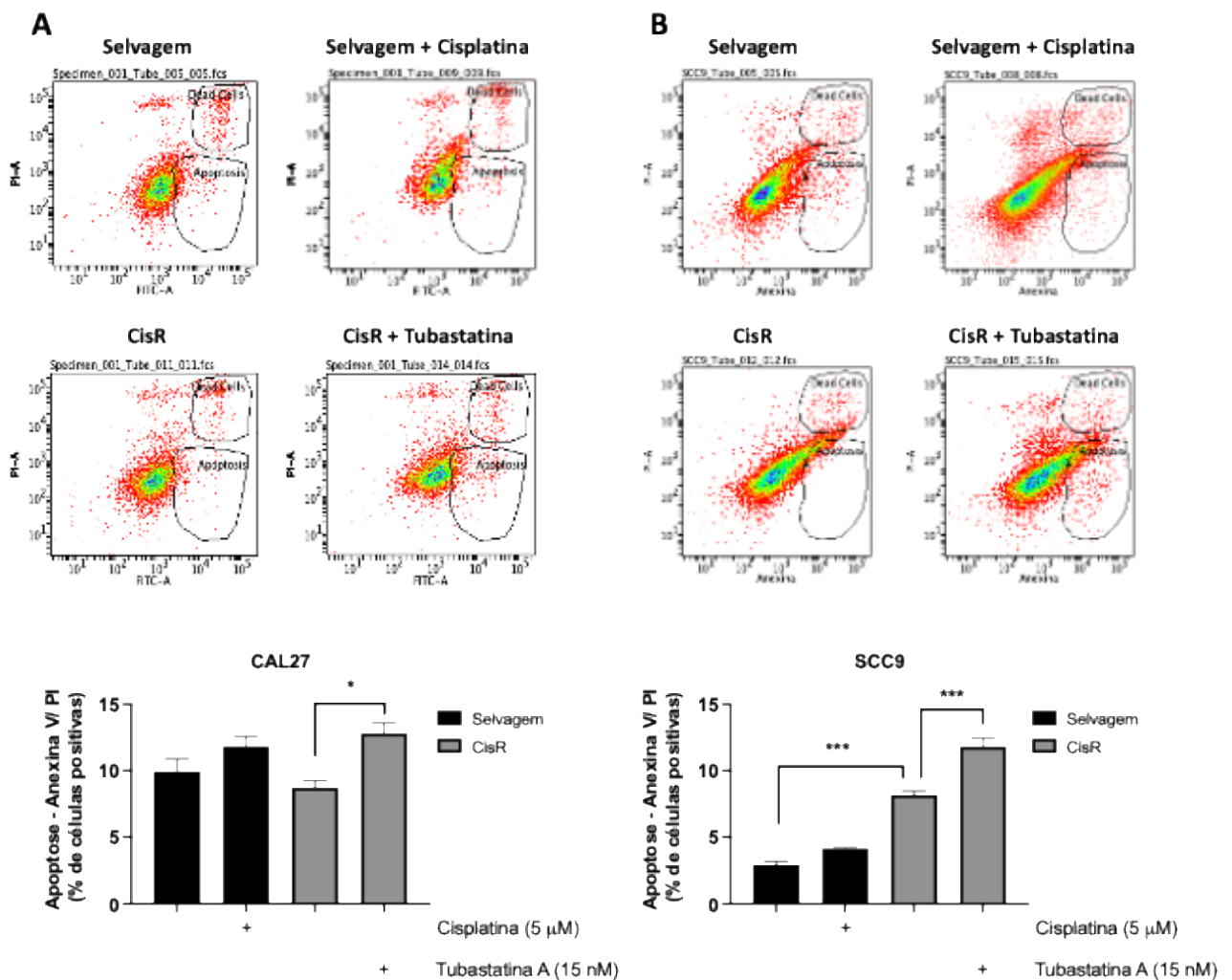


Figura 19 Análise dos níveis de Apoptose celular em linhagens de carcinoma oral. As linhagens CAL27 (* $p < 0.05$) (A) e SCC9 (** $p < 0.001$) (B) foram cultivadas com Cisplatina (5 μ M) ou Tubastatina (15nM) por 24h e sem tratamento. Por citometria de fluxo os marcadores de apoptose, sonda Annexina V e Iodeto de Propídio, foram analisados.

4.6. Efeito da administração de Tubastatina A no fenótipo e acúmulo das células-tronco tumorais

Uma das consequências da quimioterapia é a produção de altas concentrações de EROs e/ou RNS (espécies reativas de nitrogênio) que aumentam o estresse oxidativo em células tumorais, podendo induzir alterações da maquinaria epigenética (GARCÍA-GUEDE; VERA; IBÁÑEZ-DE-CACERES, 2020). Como nós observamos anteriormente que as linhagens resistentes à cisplatina apresentam proteção ao estresse oxidativo e as células-tronco tumorais apresentam acúmulo da

proteína antioxidante PRDX2, nós avaliamos se a inibição de HDAC6 através da administração de Tubastatina A poderia reverter essas condições e estimular a formação de espécies reativas de oxigênio e consequentemente induzir a morte celular. Através da imunofluorescência, nós identificamos que os níveis de PRDX2 encontram-se elevados nas CTT+ (como observado anteriormente), sendo que a CAL27 apresenta o maior acúmulo (** $p < 0.001$) (Figura 20A). A administração de cisplatina não altera significativamente os níveis de PRDX2, mas a administração de Tubastatina A reduz de forma significativa os níveis de PRDX2 tanto nas CTT+ da linhagem CAL27 (** $p < 0.001$) (Figura 20A) quanto nas CTT+ da linhagem SCC9 (* $p < 0.05$) (Figura 20B).

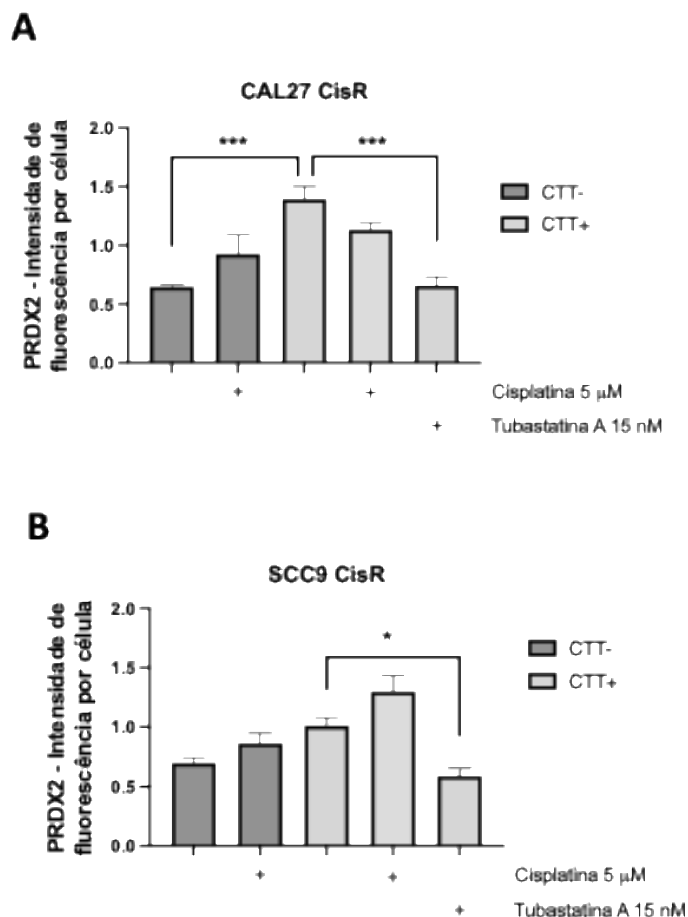


Figura 20 Avaliação da distribuição de PRDX2 em CTTs de carcinoma oral. Foram usadas células das linhagens CAL27 e SCC9, sem e com tratamento (Cisplatina (5 μ M)/Tubastatina (15nM)/24h). O ensaio de imunofluorescência com o anticorpo anti-PRDX2 na linhagem CAL27 (* $p < 0.05$) (A) e na linhagem SCC9 (** $p < 0.001$) (B).

Em seguida, nós avaliamos a capacidade da Tubastatina A em induzir estresse oxidativo através do ensaio de EROs (Figura 21). Na linhagem CAL27 CisR, foi observado que as células-tronco tumorais (CTT+) apresentam maiores níveis de espécies reativas de oxigênio comparadas às células não-tronco (CTT-) (** $p < 0.01$). A administração de cisplatina foi capaz de estimular a produção de EROs nas CTT- ($p < 0.05$) mas não exerceu nenhum efeito sobre as CTT+. Já a inibição farmacológica de HDAC6 pela administração de Tubastatina A foi eficiente para a geração de EROs nas CTT+ ($p < 0.05$), porém, quando combinada à cisplatina, a Tubastatina não foi eficiente (Figura 21A). Para a linhagem SCC9 CisR, foi observado um menor acúmulo de EROs na população de CTT+ quando comparada às CTT- ($p < 0.05$). A cisplatina não promoveu a formação de EROs em nenhuma das populações e a administração de Tubastatina A induziu a produção de EROs nas CTT+ ($p < 0.05$), assim como observado para a CAL27. Novamente, no tratamento combinado, a Tubastatina A não apresentou eficiência (Figura 21B).

O efeito da inibição de HDAC6 sobre a indução do acúmulo de danos no DNA também foi investigado após a administração de Tubastatina A através da análise da distribuição da proteína H2A.X fosforilada (Figura 22). Os resultados observados foram muito semelhantes entre as linhagens analisadas. O tratamento com cisplatina induziu a formação de danos no DNA tanto nas CTT- quanto nas CTT+, sendo mais evidente na linhagem SCC9 (** $p < 0.001$ nas CTT-; $p < 0.05$ nas CTT+) (Figura 22B). A Tubastatina A como monoterapia induziu o acúmulo de danos no DNA nas duas linhagens, porém, de forma significativa apenas para a linhagem SCC9 ($p < 0.05$) e a administração de Tubastatina A em combinação com a cisplatina foi muito eficiente em promover o acúmulo de danos no DNA em ambas as linhagens (** $p < 0.001$).

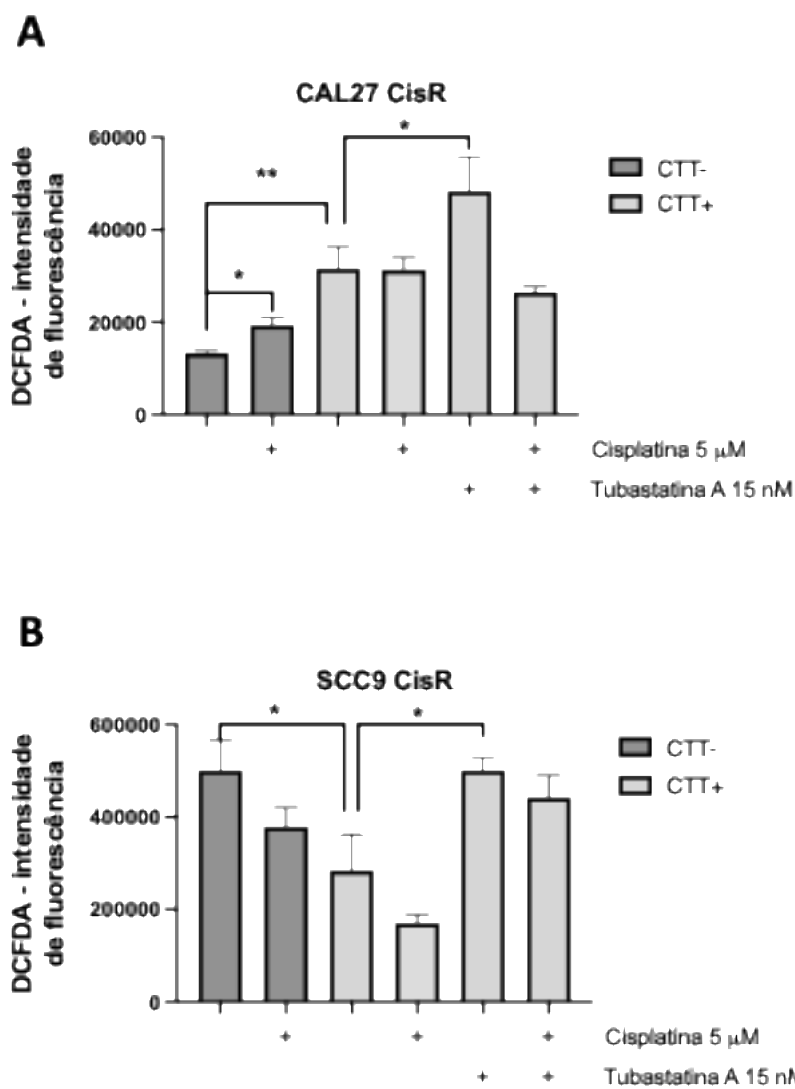


Figura 21 Avaliação dos níveis de EROs nas populações de CTT- e CTT+ de carcinoma oral. Foram usadas células das linhagens CAL27 e SCC9, sem e com tratamento (Cisplatina (5μM)/Tubastatina (15nM)/24h). O ensaio de EROs com a sonda DCFDA na linhagem CAL27 (A) e na linhagem SCC9 (B). (* p<0.05; ** p<0.01).

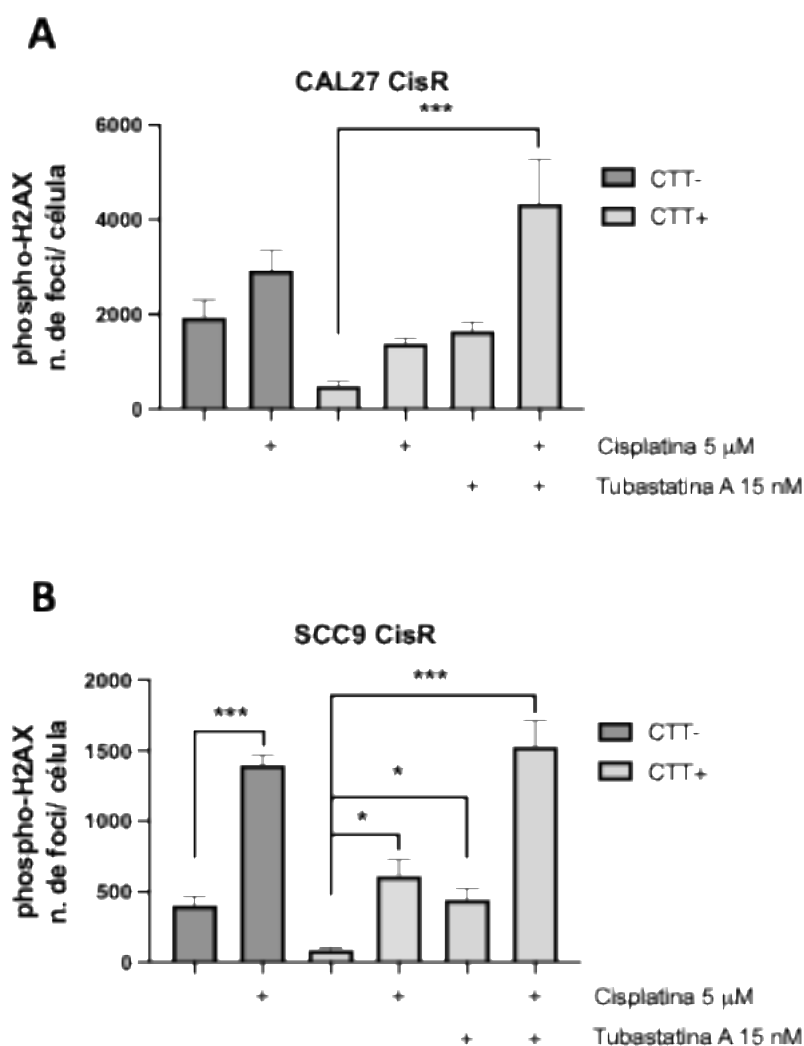
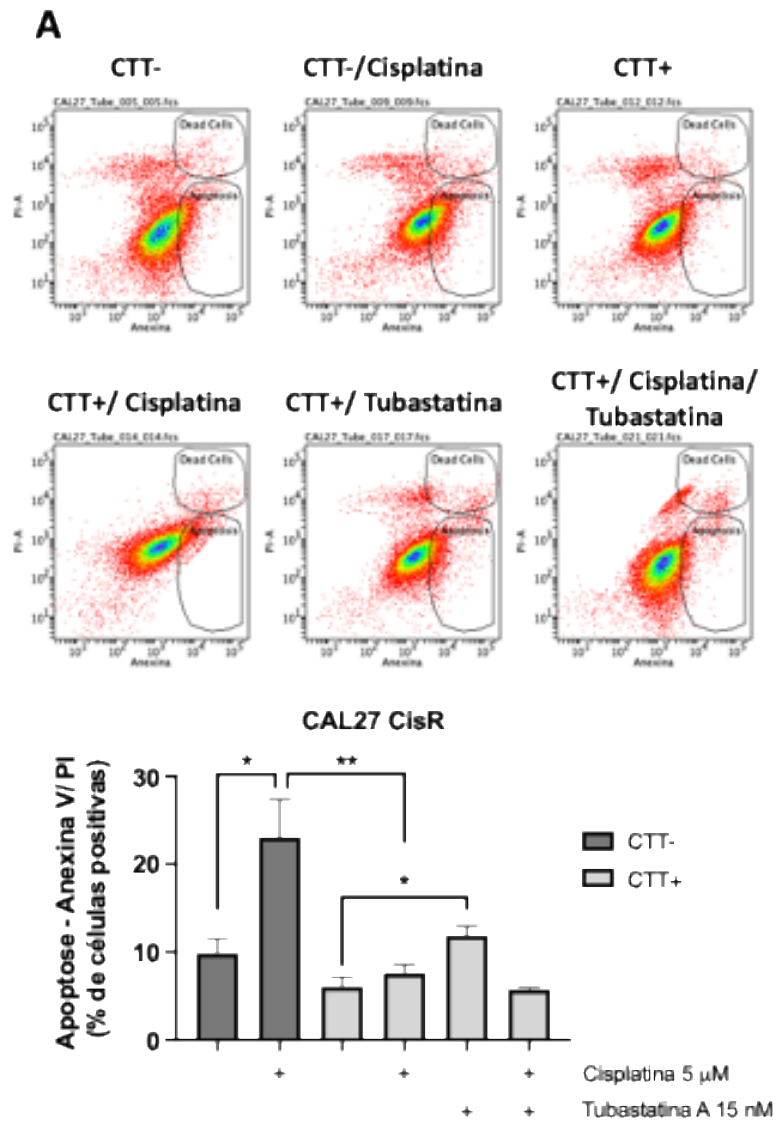


Figura 22 Avaliação do acúmulo de danos no DNA em CTT- e CTT+ de carcinoma oral. O ensaio de imunofluorescência com o anticorpo anti-p-H2A.X. O número de células com expressão positiva de phospho-H2A.X foram quantificadas nas linhagens CAL27 (A) e SCC9 (B). (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$).

Como nossos resultados demonstraram um efeito significativo da inibição farmacológica de HDAC6 sobre o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e o acúmulo de danos no DNA das células-tronco tumorais, nós buscamos investigar se a administração de Tubastatina A poderia induzir a morte celular das células-tronco tumorais por apoptose. Para a linhagem CAL27 CisR, foi observado que a exposição das CTT- à cisplatina induz a morte por apoptose (* $p < 0.05$), mas nas CTT+, a cisplatina não exerce efeito na ativação de apoptose. Já a administração de Tubastatina A como monoterapia aumentou de forma significativa a quantidades de células-tronco tumorais em apoptose (* $p < 0.05$), mas quando em combinação com a cisplatina, não apresentou eficiência (Figura 23A). Na linhagem

SCC9 CisR, a cisplatina como monoterapia induziu apoptose nas CTT- e também nas CTT+, de forma significativa (* $p < 0.05$). A Tubastatina A também foi eficiente para induzir a apoptose das células-tronco tumorais como monoterapia (** $p < 0.01$) e em associação com a cisplatina (** $p < 0.01$) (Figura 23B). Nossos resultados sugerem que a inibição farmacológica de HDAC6 pode ser um bom alvo terapêutico para reduzir a população de células-tronco tumorais.



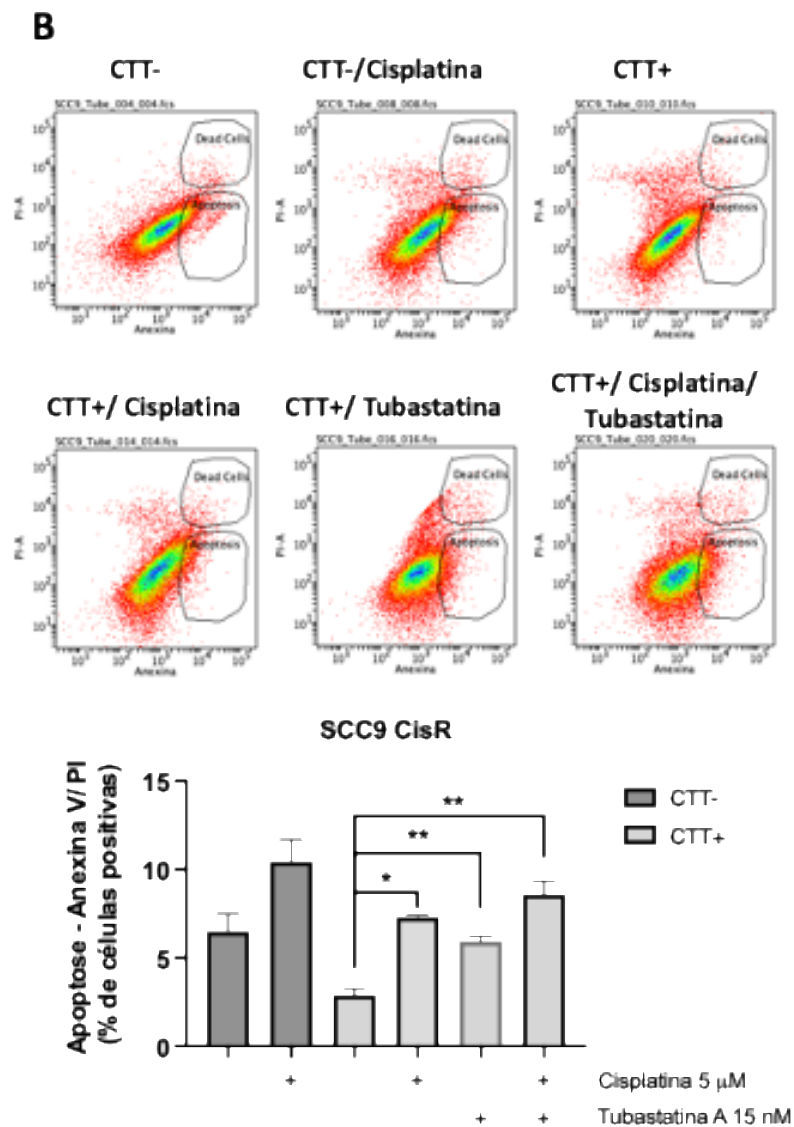
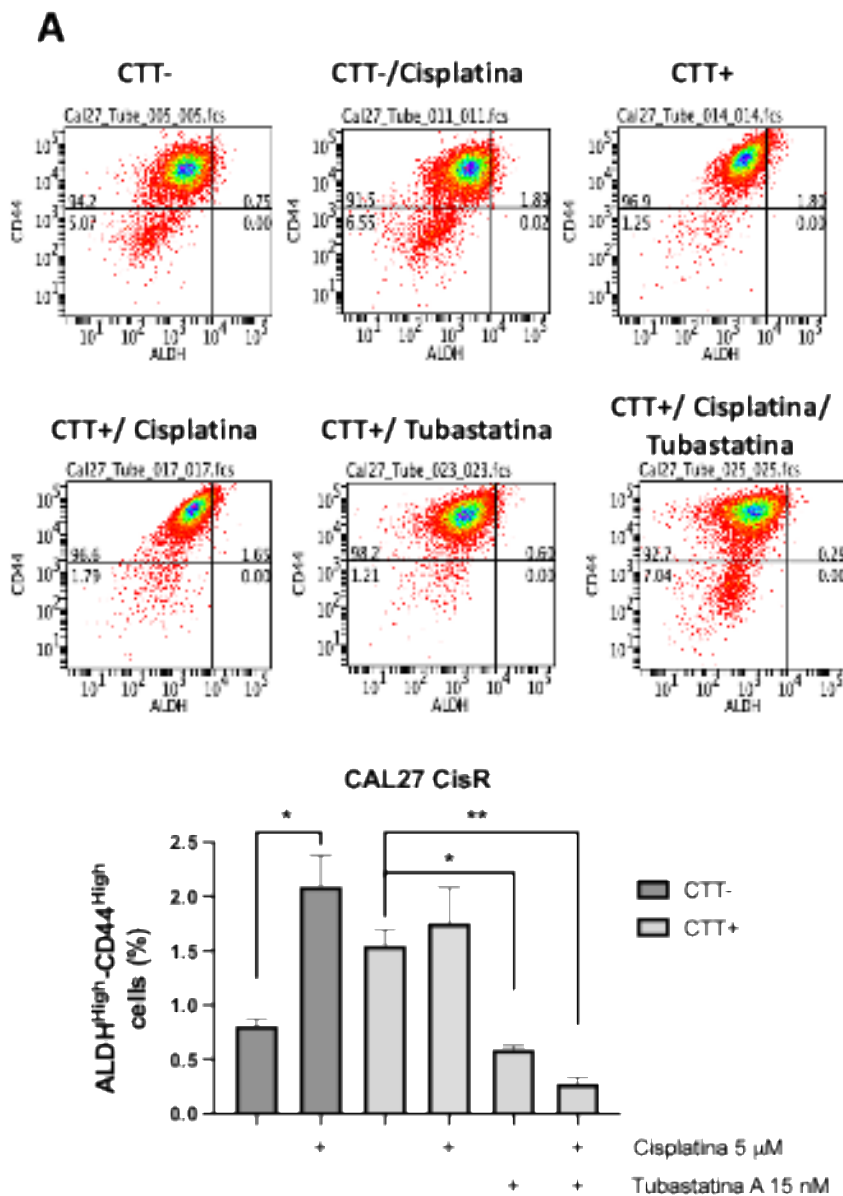


Figura 23 Análise dos níveis de Apoptose celular em linhagens de carcinoma oral. As CTTs de CAL27 e SCC9 foram cultivadas com (Cisplatina (5 μ M)/Tubastatina (15nM)/24h) e sem tratamento. Por citometria de fluxo os marcadores de apoptose, sonda Annexina V e Iodeto, foram analisados. Células CTT – e CTT+ de CAL27 (A) CTT- e CTT+ de SCC9 (B). (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Em seguida, nós analisamos o efeito da Tubastatina A, como monoterapia e em combinação com a cisplatina, especificamente sobre o acúmulo de células-tronco tumorais. Como observado anteriormente pelo nosso grupo (MILAN et al., - em preparação), a administração de cisplatina às células não-tronco induziu a desdiferenciação desta população promovendo o aumento das células-tronco tumorais em ambas as linhagens (* $p < 0.05$). De forma oposta, foi observado que a administração de Tubastatina A reduziu de forma significativa a população de células-tronco tanto na linhagem CAL27 CisR (* $p < 0.05$) (Figura 24A) quanto na

linhagem SCC9 CisR (**p<0.01) (Figura 24B) e, quando combinada com a cisplatina, a administração de Tubastatina A foi capaz de reverter o efeito da cisplatina sobre o acúmulo de células-tronco, reduzindo significativamente seus níveis em ambas as linhagens celulares (**p<0.01). Esses resultados corroboram com a premissa principal do uso combinado de compostos para uma maior eficiência no tratamento de carcinoma oral, sensibilização e indução a diferenciação celular, enfatizando a tubastatina A, como exemplo de epi-droga de segunda geração.



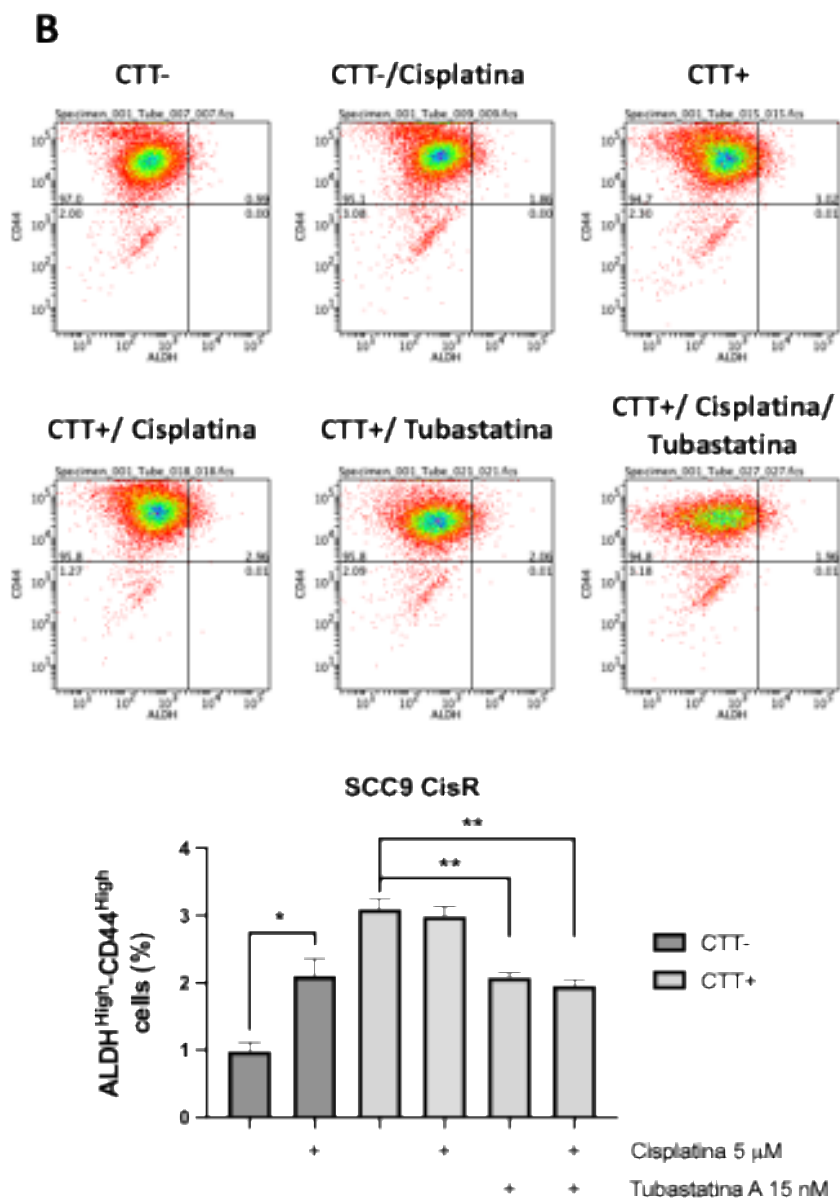


Figura 24 Identificação e quantificação das células-tronco tumorais (CTTs) em linhagem de carcinoma oral. A população de CTT+ e CTT- isolada por “cell sorting” cultivada com (Cisplatina (5 μ M)/Tubastatina (15nM)/24h) e sem tratamento. Por citometria de fluxo foi avaliado a atividade enzimática positiva de ALDH e expressão de CD44+ nas linhagens CAL27 CisR (A) e SCC9 CisR (B). (* p<0.05; ** p<0.01).

6. DISCUSSÃO

A carcinogênese, resumidamente, é um processo composto pelos estágios de iniciação, promoção e progressão e sabe-se que em cada etapa ocorrem alterações epigenéticas (CHENG et al., 2019; TOMASELLI et al., 2020; WEBBER et al., 2017). Segundo Dhanuthai, K. e colaboradores (2018), pela distribuição anatômica de câncer oral, a língua, tecido não queratinizado, possui predisposição ao desenvolvimento da neoplasia, e a saliva e mucosa são fatores que favorecem a absorção de carcinógenos (DHANUTHAI et al., 2018). De acordo com os dados no INCA (2019), a base da língua e outras localizações foram a 4^o e 5^o maiores causa de morte de câncer de cabeça e pescoço no Brasil entre o período de 2009 e 2018 (INCA, 2019). As linhagens celulares utilizadas para essa dissertação de mestrado foram extraídas de carcinoma oral de língua: CAL27 selvagens (WT); SCC9 selvagens (WT); a versão resistente à cisplatina CAL27^{CisR} e SCC9^{CisR}; incluindo a versão tronco e não-tronco tumoral de CAL27 e SCC9 (CTT- e CTT+).

Cisplatina, cis-diamminedichloroplatinum (II) (CDDP), ainda é a primeira linha de tratamento utilizada na quimioterapia. É um agente com propriedades capazes de intercalar entre as fitas da molécula de DNA induzindo sua quebra. Os tratamentos convencionais apresentam pouca eficácia, todavia o desenvolvimento de quimioterapias alvo específico apresenta um futuro promissor para a medicina (CAO et al., 2018). As linhagens celulares utilizadas neste trabalho foram submetidas ao tratamento com cisplatina para induzir a resistência e avaliamos o perfil de HDAC6 nas células sensíveis e resistentes à cisplatina. Os resultados mostraram que as linhagens celulares CAL27 e SCC9 resistentes à cisplatina apresentaram aumento de HDAC6. A concentração de HDAC6 influencia os mecanismos epigenéticos envolvidos em etapas da carcinogênese influenciando a sobrevivência das células tumorais (SHARIF et al., 2019). Por imunofluorescência, nós identificamos em nossas amostras concentrações significativas de HDAC6 no núcleo das células. HDAC6 vem sendo investigada por controlar o estresse oxidativo a partir do seu deslocamento do citoplasma para o núcleo em células tumorais, atuando sobre os danos ao DNA (CHEN et al., 2013; USTINOVA et al., 2020). Esses dados sugerem que há um deslocamento de HDAC6 para o núcleo durante a carcinogênese e esse

movimento pode estar contribuindo para a quimiorresistência, neste caso à cisplatina.

Uma das funções da proteína HDAC6 é influenciar epigeneticamente a progressão tumoral pela regulação da transcrição, motilidade, controle do ciclo celular e modulação dos fatores de pluripotência, contribuindo para a resistência à terapia (SHARIF et al., 2019). Coletamos os dados da expressão gênica de HDAC6 em amostras de pacientes com câncer de cabeça e pescoço e as taxas de sobrevivência desses pacientes utilizando uma ferramenta da plataforma The Cancer Genome Atlas Program. Identificamos que os tumores da base da língua e da gengiva apresentaram alta expressão gênica da HDAC6. Esses dados reforçam a importância de nosso trabalho de explorar o envolvimento de HDAC6 e sua modulação em células tumorais. Na literatura existem poucos estudos abordando o papel de HDAC6 na resistência tumoral em carcinoma oral (CAO et al., 2018; CHANG; WANG, 2016; CHENG et al., 2019; SAKUMA et al., 2006; SHARIF et al., 2019; SINGH; BISHAYEE; PANDEY, 2018; YANG et al., 2018; YANO et al., 2019).

O estresse oxidativo promovido pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROS) é um dos mecanismos de resposta ao câncer, que por sua vez ocasiona danos na molécula de DNA das células (LEE et al., 2020). Para avaliar os danos no DNA em células selvagens e resistentes a cisplatina de CAL27 e SCC9, quantificamos a expressão de phospho-H2Ax e observamos redução de danos no DNA nas células resistentes à cisplatina. Usando unicamente a cisplatina como quimioterápico, que por sua vez tem função de induzir lesões no DNA, ocorre que no decorrer do tratamento a quimiorresistência tem sido um agravante do seu uso (DIYABALANAGE; GRANDA; HOOKER, 2013; SURAWEERA; O'BYRNE; RICHARD, 2018; YOON et al., 2011). Resultados de análises da expressão de H2Ax em linhagens tumorais diversificadas mostraram alta indução de H2Ax e apoptose celular após tratamento com cisplatina por 6 horas, e longa exposição ao tratamento (24 horas) resultou em células resistentes (OLIVE; BANÀTH, 2009).

O mecanismo de resposta ao estresse oxidativo pode ser influenciado pela atividade enzimática da HDAC6 como citado na literatura (GARCÍA-GUEDE; VERA; IBÁÑEZ-DE-CACERES, 2020; KAMEMURA et al., 2012; PARMIGIANI et al., 2008b;

RYU et al., 2017; TANG et al., 2018). Os dados obtidos do The Cancer Genome Atlas Program e da plataforma XENA nos mostram a relação das enzimas antioxidantes e HDAC6 em tumores de cabeça e pescoço. Observamos que a expressão gênica de PRDX2 e PRDX6 foi maior nos tumores em estágio metastático e o aumento da expressão gênica das mesmas está correlacionado com o aumento da expressão gênica de HDAC6. Segundo Ryu (2017), a ausência de HDAC6 induz sensibilidade celular ao estresse oxidativo (RYU et al., 2017), sugerindo que HDAC6 pode estar regulando direta ou indiretamente proteínas envolvidas no controle do estresse oxidativo. Como observamos que HDAC6 está acumulada no núcleo das células, onde pode atuar controlando a expressão gênica, nós avaliamos em nossas células a expressão gênica das enzimas antioxidantes PRDX2, PRDX6, SOD2 e TXN. Destacamos que as quatro enzimas apresentaram expressão gênica elevada em SCC9 CisR comparada a sua versão selvagem e também comparada a linhagem CAL27 CisR. É interessante destacar que, comparada a linhagem CAL27, SCC9 apresenta níveis de EROs muito inferiores, condição que pode ser devida aos níveis elevados das enzimas antioxidantes. PRDX2 foi o único gene que apresentou aumento da expressão em ambas as linhagens resistentes. Pesquisas analisando células de câncer cervical resistente à cisplatina com níveis elevados de TXN 1, PRDX 1 e PRDX 2 indicaram o envolvimento destas enzimas com a resistência a terapia pois elas atuam eliminando as moléculas de EROs (ZHU et al., 2019). Os nossos resultados também mostram que os níveis de estresse oxidativo são maiores nas células selvagens e menores nas células resistentes a cisplatina das duas linhagens. Segundo XUE, D. F. et al. 2020, existe uma relação entre a concentração de EROs intracelular e a resistência a cisplatina em células de CAL27 e CAL27/CDDP, mostrando níveis elevados nas análises (XUE et al., 2020). Esses resultados sugerem relação com o fator resistência tumoral ao mecanismo de resposta ao estresse na presença de HDAC6 em carcinoma oral, através da regulação de PRDX2, por exemplo.

HDAC6 tem como função a regulação de vias de sinalização de proliferação e desenvolvimento celular, que quando desreguladas, causam o agravamento da progressão tumoral. Estudos mostram que altas concentrações de HDAC6 estão associadas ao fenótipo tronco em gliomas (AUZMENDI-IRIARTE et al., 2020). Sabe-

se também que a administração de cisplatina está associada ao acúmulo de CTTs em tumores de glândulas salivares e a quimiorresistência é modulada por modificações epigenéticas (GARCÍA-GUEDE; VERA; IBÁÑEZ-DE-CACERES, 2020; GUIMARÃES et al., 2016). Resultados anteriores do nosso grupo mostram um acúmulo de CTTs nas linhagens CAL27 e SCC9 resistentes à cisplatina (MILAN et al., em preparação). Verificamos também alta expressão gênica e concentração da proteína HDAC6 em CTTs, sugerindo que possa haver uma interferência de HDAC6 na quimiorresistência em carcinoma oral. Alterações na disponibilidade e concentração da proteína HDAC6 fazem parte da carcinogênese influenciando a sobrevivência das células tumorais (SHARIF et al., 2019). Esses dados sugerem uma conexão entre a HDAC6 e o fenótipo tronco nas linhagens analisadas neste trabalho.

Em carcinoma oral de células escamosas foi identificada que a população de CTTs constitui-se de uma subpopulação resistente após a administração de cisplatina, com redução de DNA mitocondrial, responsável pela produção das enzimas envolvidas na regulação do estresse oxidativo (AMINUDDIN et al., 2020). As CTTs sem tratamento apresentaram uma resposta diferencial ao estresse oxidativo. Em nosso trabalho observamos que as enzimas antioxidantes PRDX2 e SOD2 apresentam os maiores níveis de expressão, porém, nós não observamos diferenças na expressão gênica entre as populações de células-tronco e não-tronco tumorais. As PRDXs apresentam função protetora ou tumorigênica sendo encontradas em vários tipos de tumores em concentrações e atividade enzimática variadas. Na carcinogênese, a enzima SOD2 é o primeiro antioxidante ativado agindo na redução da formação dos radicais livres, possuindo função de proteção e pró-oxidante dependendo do nível de acúmulo (RHOMDHONI; KURNIAWAN; HIDAYATI, 2019; ZENG et al., 2018). Uma vez que PRDX2 estava aumentada em nossas linhagens resistentes à cisplatina; apresentou correlação positiva com HDAC6 em amostras de pacientes com tumores de cabeça e pescoço; e apresentou altos níveis de expressão nas populações de células analisadas, nós investigamos os níveis da proteína PRDX2 e observamos acúmulo da proteína na população de células-tronco tumorais. Pesquisas mostram a relação de PRDX2 em CTTs em câncer de pâncreas sugerindo o uso de Ursodeoxycholic acid (UDCA), como forma

de tratamento, pois este reduz o estresse oxidativo e conseqüentemente reduzindo a ativação da PRDX2. Foi identificado também uma redução na capacidade de formar esferas juntamente com a redução da expressão de SOX2 (KIM et al., 2017). Ainda, outros autores mostram que o knockdown de PRDX2 inibe a desdiferenciação de células tumorais em CTTs em câncer colorretal, evidenciando a função da PRDX2 na resistência celular (PENG et al., 2021; WANG et al., 2016).

A habilidade das CTTs em reparar o dano ocorrido no DNA é alta comparada as células não-tronco tumorais. Esse mecanismo ocorre em diversos tipos de câncer, tais como: glioma, carcinoma de nasofaringe, câncer de pulmão, câncer de próstata e câncer de mama (ARNOLD et al., 2020; SKVORTSOV et al., 2015). Como a cisplatina atua intercalando-se ao DNA e promovendo quebras na dupla-fita, e nós observamos que nossas linhagens resistentes apresentam redução de danos no DNA, evidenciada pela quantificação de H2A.X fosforilada, nós buscamos analisar os níveis de danos no DNA na população de células-tronco tumorais e observamos níveis muito reduzidos de danos quando comparamos com a população não-tronco, confirmando que as CTTs apresentam uma forte resistência aos efeitos da cisplatina. Em CTTs de câncer de mama, após 48h do tratamento com radioterapia foi visto redução da expressão de H2A.X, mostrando a capacidade das CTTs de reparar os danos causados no DNA pela radiação (LIU et al., 2020).

A segunda geração de epi-drogas possui um futuro promissor para a indústria farmacêutica (LIU et al., 2020; MOHAMMAD; BARBASH; CREASY, 2019; TOMASELLI et al., 2020). Pesquisas mostram que o uso de 10 μ M tanto de Tubastatina A, Tubathian ou Tubacin aumentam os níveis da acetilação do resíduo K9 de histona 3 (DEPETTER et al., 2019a). Utilizamos o inibidor de HDAC6, Tubastatina A, pois na literatura já existem ótimos resultados de sua atuação na inibição de HDAC6 e redução da viabilidade celular tumoral (AUZMENDI-IRIARTE et al., 2020; DEPETTER et al., 2019b; HE et al., 2020; KYLE V BUTLER, 2010; LEYK et al., 2017; LOSSON et al., 2020; SHARIF et al., 2019). Inicialmente nós avaliamos a resposta das linhagens selvagens e resistentes ao tratamento com Tubastatina A, e surpreendentemente, nós observamos que as linhagens resistentes à cisplatina responderam melhor ao tratamento com Tubastatina A, sugerindo que a inibição

farmacológica de HDCA6 pode ser uma estratégia promissora para combater a resistência à cisplatina. Linhagens celulares de carcinoma oral que apresentam resistência intrínseca à cisplatina também apresentam níveis reduzidos de acetilação de histonas e a administração de inibidores de HDACs sensibilizam as células à cisplatina (ALMEIDA et al., 2014). Pesquisas mostram que concentrações de 4 nM e 500 nM de Tubastatina A reduziram a migração de células de glioblastoma (KALISZCZAK et al., 2016), e o crescimento e migração de células escamosas de carcinoma de esôfago (TAO et al., 2018).

As células cultivadas em placas de baixa adesão apresentam fenótipo tronco e permanecem viáveis formando aglomerados de células resistentes chamados de esferas (LIU et al., 2020). Nós utilizamos esta estratégia para determinar a resposta das células-tronco tumorais ao tratamento com cisplatina. Nossos resultados indicaram que a concentração de 15nM de tubastatina A foi eficiente para reduzir em 50% a população de células-tronco tumorais. É importante salientar que as células-tronco tumorais apresentaram maior sensibilidade à Tubastatina A do que a população global de células tumorais, tanto nas linhagens selvagens quanto resistentes à cisplatina, sugerindo que a Tubastatina A pode ser utilizada para reduzir especificamente a população de células-tronco tumorais. Estudos mostram que o uso de HDAC6i (Tubastatina A) juntamente com 5-Fluorouracil (5-FU), em câncer colorretal, foi eficiente na redução dos marcadores celulares do fenótipo tronco, como NANOG, reduzindo assim a população tronco celular (WANG et al., 2019). Em CTTs de glioblastoma, inibidores de HDAC como vorinostat e tubastatina A possuem potencial de reduzir a população tronco durante o tratamento, via indução da diferenciação celular (AUZMENDI-IRIARTE et al., 2020).

Visando validar o tratamento com Tubastatina A (iHDAC6) verificamos que a concentração proteica de α -tubulina acetilada, substrato principal de HDAC6, encontra-se elevada nas amostras de CTT+ tratadas, indicando eficácia na inibição de HDAC6. De acordo com dados na literatura, a ausência de HDAC6, seja por inibição ou knockdown, induz a proteína α -tubulina a seu estado acetilado (BATCHU; BRIJMOHAN; ADVANI, 2016; HE et al., 2020; KYLE V BUTLER, 2010; SHEN et al., 2020; USTINOVA et al., 2020). Segundo CHANG, I.; WANG, C. Y. (2016), o

knockdown de HDAC6 na linhagem SCC1 resistente à cisplatina promove o aumento das concentrações de acetyl tubulin (Lys-40), sugerindo o uso de HDAC6 como potencial alvo terapêutico para transpassar a quimiorresistência (CHANG; WANG, 2016). Esses resultados indicam que concentrações nanomolares de Tubastatina A são eficazes na inibição de HDAC6.

In vivo, a administração de cisplatina ocasiona ligações cruzadas da cadeia de DNA, acumulando danos e induzindo produção de EROs, que por sua vez desencadeiam a apoptose (RHOMDHONI; KURNIAWAN; HIDAYATI, 2019). No entanto, alterações na expressão de HDAC6 podem contribuir para a resistência a cisplatina como em NSCLC, em que a alta expressão de HDAC6 reduz a sensibilidade das células aos tratamentos com cisplatina, reduzindo assim a apoptose celular, além de prevenir contra os danos no DNA (GARCÍA-GUEDE; VERA; IBÁÑEZ-DE-CACERES, 2020; WANG et al., 2012). Nossos resultados demonstraram que a cisplatina é capaz de promover um efeito insignificante na indução de apoptose, mesmo nas linhagens selvagens, mas a administração de Tubastatina A promove uma ativação significativa da apoptose nas linhagens quimiorresistentes, reforçando nossa hipótese de que a inibição farmacológica de HDAC6 é uma estratégia promissora para reverter a resistência tumoral à cisplatina. Na população de células-tronco tumorais, destacamos alta indução apoptótica com o uso de tubastatina A. Resultados com CTTs de glioma após o tratamento com iHDAC6 mostraram elevada porcentagem de células apoptóticas (YANG et al., 2018). Outros estudos mostram ainda, que a expressão alterada de HDAC6 é detectada em carcinoma oral de células escamosas e sua inibição contribui para a ativação de apoptose e redução de autofagia (CHANG; WANG, 2016; SAKUMA et al., 2006).

Os mecanismos celulares e moleculares, como a manutenção do fenótipo tronco, transição epitélio- mesenquimal (EMT) e o acúmulo de espécies reativas de oxigênio, estão envolvidos no processo de diferenciação celular, recidiva e metástase tumoral (LIU et al., 2020). As enzimas antioxidantes reduzem os níveis de radicais livres com atividades enzimáticas opostas, agente indutor de câncer ou como agentes terapêuticos (JUNG et al., 2019; MEI et al., 2019; RHOMDHONI;

KURNIAWAN; HIDAYATI, 2019; ZHU et al., 2019). Além disso, a população de CTTs produz mais enzimas antioxidantes e acumula menos EROs, conseqüentemente apresenta maior resistência (BHATTACHARYA et al., 2020; LIU et al., 2020). Nós observamos que a administração de Tubastatina A foi eficiente para reduzir os níveis da proteína antioxidante PRDX2, aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio e conseqüentemente promover o acúmulo de danos no DNA das células-tronco tumorais. Análises de células tumorais de mama revelaram que PRDX1/2/4/5/6 podem ser alvos terapêuticos eficientes. Sabe-se que o acúmulo de EROs resulta em danos no DNA na maioria das células tumorais em resposta a terapia (MEI et al., 2019). A administração de iHDAC6 (Tubacina) em CTTs de glioma para avaliação de dano no DNA mostrou aumento da concentração de H2A.X após 4h de irradiação comparada ao controle, sugerindo que a capacidade de reparo dessas células pode ser reduzida pela inibição de HDAC6 (YANG et al., 2018). Análises em NSCLC mostrou que os tratamentos com cisplatina ou outros, podem induzir o estresse celular, a modificação de HDAC6 e da H2A.X, mostrando a importância dessas histonas no balanço redox e na carcinogênese (GARCÍA-GUEDE; VERA; IBÁÑEZ-DE-CACERES, 2020; WANG et al., 2012).

O estudo da modulação epigenética em células tumorais e troncos tumorais tem o objetivo de transpassar a quimo-rádio-resistência aos tratamentos, dificultando a recidiva e metástase tumoral (BIGHETTI-TREVISAN et al., 2019; MOHAMMAD; BARBASH; CREASY, 2019; SURAWEERA; O'BYRNE; RICHARD, 2018). Nossos resultados mostraram que a Tubastatina A apresenta um efeito importante na redução da população de células-tronco tumorais. Além disso, a associação entre Tubastatina A e cisplatina, como tratamento combinado, demonstrou-se também eficiente para reduzir o acúmulo de células-tronco promovido pela administração de cisplatina como monoterapia. Trabalhos anteriores demonstraram que o uso de vorinostat (iHDACs) sensibiliza as CTTs de carcinoma adenoide cístico e carcinoma mucoepidermóide à cisplatina, resultando no decréscimo da subpopulação de CTTs, sugerindo o uso combinado dessas drogas (ALMEIDA et al., 2017b; GUIMARÃES et al., 2016). Segundo Sharif e colaboradores (2019), a HDAC6 possui papel importante na pluripotência em modelos de CTTs de carcinoma humano e murino, onde foi demonstrado que sua inibição com 5µM de Tubastatina A (HDAC6i) e o

knockdown de HDAC6 resultaram na regulação negativa dos fatores de transcrição (pluripotência) POU5F1/Oct4, NANOG e SOX2 reduzindo a proliferação das CTTs e induzindo a diferenciação em células tumorais (SHARIF et al., 2019). Esses dados indicam a eficiência de iHDAC6 e o papel da HDAC6 no mecanismo de resistência à terapia. Ainda, HDAC6 se mostrou um potencial alvo farmacológico para reduzir a população de células-tronco tumorais e combater a resistência à cisplatina.

7. CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou que a proteína HDAC6 está acumulada em linhagens celulares de carcinoma oral resistentes à cisplatina e mais especificamente na população de células-tronco tumorais derivadas destas linhagens. HDAC6 exerce papel importante nas células resistentes e CTTs de carcinoma oral, influenciando os mecanismos de reparo no DNA, estresse oxidativo, diferenciação celular e quimiorresistência a tratamentos. A inibição farmacológica de HDAC6 através da administração de baixas doses de Tubastatina A se mostrou eficiente na redução da viabilidade celular e indução ao estresse oxidativo, modulando os níveis das proteínas PRDX2 e H2A.X e induzindo apoptose. Ressaltamos também que o uso combinado de tubastatina A e cisplatina reduziu de forma significativa a população de células-tronco tumorais. Diante de nossos resultados, sugerimos que HDAC6 pode ser um alvo terapêutico importante para o desenvolvimento de novas estratégias e a utilização de inibidores farmacológicos de HDAC6, como a Tubastatina A, em conjunto aos tratamentos convencionais, como com cisplatina, pode reverter a resistência e eliminar as CTTs de carcinoma oral.

8. REFERÊNCIAS

- AL-HAJJ, M. et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 7, p. 3983–3988, 2003.
- ALBERTS, B. **Biologia Molecular da CÉLULA**. [s.l: s.n.].
- ALLIS, C. D.; JENUWEIN, T. The molecular hallmarks of epigenetic control. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 8, p. 487–500, 2016.
- ALMEIDA, L. O. et al. NFκB mediates cisplatin resistance through histone modifications in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). **FEBS Open Bio**, v. 4, p. 96–104, 2014.
- ALMEIDA, L. O. et al. Profiling the behavior of distinct populations of head and neck cancer stem cells. **Cancers**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2016.
- ALMEIDA, L. O. et al. Unlocking the chromatin of adenoid cystic carcinomas using HDAC inhibitors sensitize cancer stem cells to cisplatin and induces tumor senescence. **Stem Cell Research**, v. 21, p. 94–105, 2017a.
- ALMEIDA, L. O. et al. Unlocking the chromatin of adenoid cystic carcinomas using HDAC inhibitors sensitize cancer stem cells to cisplatin and induces tumor senescence. **Stem Cell Research**, v. 21, p. 94–105, 2017b.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2019. **Cancer Practice**, v. 8, n. 3, p. 105–108, 2019.
- AMINUDDIN, A. et al. Mitochondrial DNA alterations may influence the cisplatin responsiveness of oral squamous cell carcinoma. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–17, 2020.
- ARNOLD, C. R. et al. The Role of Cancer Stem Cells in Radiation Resistance. **Frontiers in Oncology**, v. 10, n. February, p. 1–12, 2020.
- AUDIA, J. E.; CAMPBELL, R. M. Histone modifications and cancer markers. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 8, n. 4, p. 1–32, 2016.
- AUZMENDI-IRIARTE, J. et al. Characterization of a new small-molecule inhibitor of HDAC6 in glioblastoma. **Cell Death and Disease**, v. 11, n. 6, 2020.
- BAI, J. et al. Down-regulation of deacetylase HDAC6 inhibits the melanoma cell line A375.S2 growth through ROS-dependent mitochondrial pathway. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–11, 2015.
- BATCHU, S. N.; BRIJMOHAN, A. S.; ADVANI, A. The therapeutic hope for HDAC6 inhibitors in malignancy and chronic disease. **Clinical Science**, v. 130, n. 12, p. 987–1003, 1 jun. 2016.
- BHAGAT, S. D. et al. An Endogenous Reactive Oxygen Species (ROS)-Activated

Histone Deacetylase Inhibitor Prodrug for Cancer Chemotherapy. **ChemMedChem**, v. 13, n. 19, p. 2073–2079, 2018.

BHATTACHARYA, A. et al. SMAR1 repression by pluripotency factors and consequent chemoresistance in breast cancer stem-like cells is reversed by aspirin. p. 1–18, 2020.

BIGHETTI-TREVISAN, R. L. et al. Cancer Stem Cells: Powerful Targets to Improve Current Anticancer Therapeutics. **Stem Cells International**, v. 2019, 2019.

BISWAS, S.; RAO, C. M. Epigenetics in cancer: Fundamentals and Beyond. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 173, p. 118–134, 2017.

BITLER, B. G. et al. ARID1A-mutated ovarian cancers depend on HDAC6 activity. **Nature Cell Biology**, v. 19, n. 8, p. 962–973, 2017.

BOYAULT, C. et al. HDAC6, at the crossroads between cytoskeleton and cell signaling by acetylation and ubiquitination. **Oncogene**, v. 26, n. 37, p. 5468–5476, 2007.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

CAO, J. et al. Ricolinostat (ACY-1215) suppresses proliferation and promotes apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma via miR-30d/PI3K/AKT/mTOR and ERK pathways. **Cell Death and Disease**, v. 9, n. 8, 2018.

CASTILHO, R.; SQUARIZE, C.; ALMEIDA, L. Epigenetic Modifications and Head and Neck Cancer: Implications for Tumor Progression and Resistance to Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, p. 1506, 12 jul. 2017.

CHANG, C. W. et al. Distinct subpopulations of head and neck cancer cells with different levels of intracellular reactive oxygen species exhibit diverse stemness, proliferation, and chemosensitivity. **Cancer Research**, v. 74, n. 21, p. 6291–6305, 2014.

CHANG, I.; WANG, C. Y. Inhibition of HDAC6 protein enhances bortezomib-induced apoptosis in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) by reducing autophagy. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 35, p. 18199–18209, 2016.

CHEN, P. B. et al. C. **eLife**, v. 2013, n. 2, p. 1–25, 2013.

CHENG, Y. et al. Targeting epigenetic regulators for cancer therapy: Mechanisms and advances in clinical trials. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 4, n. 1, 2019.

CRAMER, J. D. et al. The changing therapeutic landscape of head and neck cancer. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 16, n. 11, p. 669–683, 2019.

DAGOGO-JACK, I.; SHAW, A. T. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 15, n. 2, p. 81–94, 8 fev. 2018.

DASARI, S.; BERNARD TCHOUNWOU, P. **Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action***European Journal of Pharmacology*, 2014.

DAWSON, M. A. The cancer epigenome: Concepts, challenges, and therapeutic opportunities. **Science**, v. 355, n. 6330, p. 1147–1152, 17 mar. 2017.

DEPETTER, Y. et al. Selective pharmacological inhibitors of HDAC6 reveal biochemical activity but functional tolerance in cancer models. **International Journal of Cancer**, v. 145, n. 3, p. 735–747, 2019a.

DEPETTER, Y. et al. **Selective pharmacological inhibitors of HDAC6 reveal biochemical activity but functional tolerance in cancer models***International Journal of Cancer*, 2019b.

DHANUTHAI, K. et al. Oral cancer: A multicenter study. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 23, n. 1, p. e23–e29, 2018.

DICK, J. E.; BONNET, D. Human Acute Myeloid Leukaemia is organised as a heirarchy that originates from a primitive haematopoetic cell. **Nature Medicine**, v. 3, n. 7, p. 730–737, 1997.

DIYABALANAGE, H. V. K.; GRANDA, M. L.; HOOKER, J. M. Combination therapy: Histone deacetylase inhibitors and platinum-based chemotherapeutics for cancer. **Cancer Letters**, v. 329, n. 1, p. 1–8, 2013.

FABER, A. et al. CD44 as a stem cell marker in head and neck squamous cell carcinoma. **Oncology Reports**, v. 26, n. 2, p. 321–326, 2011.

GARCÍA-GUEDE, Á.; VERA, O.; IBÁÑEZ-DE-CACERES, I. When oxidative stress meets epigenetics: Implications in cancer development. **Antioxidants**, v. 9, n. 6, p. 1–26, 2020.

GASCHE, J. A.; GOEL, A. Epigenetic mechanisms in oral carcinogenesis. **Future Oncology**, v. 8, n. 11, p. 1407–1425, 2012.

GUIMARÃES, D. M. et al. Sensitizing mucoepidermoid carcinomas to chemotherapy by targeted disruption of cancer stem cells. **Oncotarget**, v. 7, n. 27, 2016.

HAGGARTY, S. J. et al. Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2003.

HE, X. et al. Novel Selective Histone Deacetylase 6 (HDAC6) Inhibitors: A Patent Review (2016-2019). **Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery**, v. 15, n. 1, p. 32–48, 2020.

HU, J. et al. Cancer stem cell self-renewal as a therapeutic target in human oral cancer. **Oncogene**, v. 38, n. 27, p. 5440–5456, 2019.

HUANG, G.; PAN, S. T. **ROS-Mediated Therapeutic Strategy in Chemo-/Radiotherapy of Head and Neck Cancer***Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020.

HUBBERT, C. et al. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. **Nature**, v. 417, n. 6887, p. 455–458, 2002.

HUSAIN, M.; HARROD, K. S. Influenza A virus-induced caspase-3 cleaves the histone deacetylase 6 in infected epithelial cells. **FEBS Letters**, v. 583, n. 15, p. 2517–2520, 2009.

INCA, 2020. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva** – Rio de Janeiro. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-boca>. Acesso em 16/06/2020

INCA. Relatório sobre o cenário assistencial e epidemiológico do câncer de lábio e cavidade oral no Brasil. v. 2, p. 27, 2020a.

INCA. R ELATÓRIO DO DO TRATAMENTO DO CÂNCER NO Relatório do intervalo entre diagnóstico e início do tratamento do câncer no SUS. 2020b.

INCA, 2019. ESTIMATIVA 2020 - **Incidência de Câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**. [s.l: s.n.].

INCA, 2019. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva** – Rio de Janeiro. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acesso em 16/06/2020.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Brazil facts sheet. **Globocan 2020**, v. 278, p. 1–2, 2020.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2020. Incidência, Mortalidade e Prevalência de Câncer no Brasil em 2020. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/76-brazil-fact-sheets.pdf>
<https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-populations>. Acesso em 10/10/2021

JOHNSON, D. E. et al. Head and neck squamous cell carcinoma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 6, n. 1, p. 92, 26 dez. 2020.

JOU, A.; HESS, J. Epidemiology and Molecular Biology of Head and Neck Cancer. **Oncology Research and Treatment**, v. 40, n. 6, p. 328–332, 2017.

JUNG, C. H. et al. Mitochondrial superoxide dismutase 2 mediates γ -irradiation-induced cancer cell invasion. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 51, n. 2, 2019.

KALISZCZAK, M. et al. AKT activation controls cell survival in response to HDAC6 inhibition. **Cell Death & Disease**, v. 7, n. 6, p. e2286–e2286, 30 jun. 2016.

KAMEMURA, K. et al. Depression of mitochondrial metabolism by downregulation of cytoplasmic deacetylase, HDAC6. **FEBS Letters**, 2012.

KIM, Y.-J.; KIM, J. H. Increasing incidence and improving survival of oral tongue squamous cell carcinoma. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 7877, 12 dez. 2020.

KIM, Y. J. et al. Ursodeoxycholic acid suppresses epithelial-mesenchymal transition

and cancer stem cell formation by reducing the levels of peroxiredoxin II and reactive oxygen species in pancreatic cancer cells. **Oncology Reports**, v. 38, n. 6, p. 3632–3638, 2017.

KRISHNAMURTHY, S. et al. Endothelial Cell-Initiated Signaling Promotes the Survival and Self-Renewal of Cancer Stem Cells. **Cancer Research**, v. 70, n. 23, p. 9969–9978, 1 dez. 2010.

KYLE V BUTLER, AT ALL. Rational Design and Simple Chemistry Yield a Superior, Neuroprotective HDAC6 Inhibitor, Tubastatin A. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 2, p. 612–615, fev. 2010.

LEE, H.-A. et al. Sensitization to oxidative stress and G2/M cell cycle arrest by histone deacetylase inhibition in hepatocellular carcinoma cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 147, n. December 2019, p. 129–138, fev. 2020.

LEYK, J. et al. HDAC6 inhibition by tubastatin A is protective against oxidative stress in a photoreceptor cell line and restores visual function in a zebrafish model of inherited blindness. **Cell death & disease**, v. 8, n. 8, p. e3028, 2017.

LI, T. et al. Histone deacetylase 6 in cancer. **Journal of Hematology and Oncology**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2018.

LIU, Y. et al. Modulation of histone deacetylase 6 (HDAC6) nuclear import and tubulin deacetylase activity through acetylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 34, p. 29168–29174, 2012.

LIU, Y. et al. Radiotherapy targeting cancer stem cells “awakens” them to induce tumour relapse and metastasis in oral cancer. **International Journal of Oral Science**, v. 12, n. 1, p. 19, 24 dez. 2020.

LOSSON, H. et al. HDAC6—An Emerging Target Against Chronic Myeloid Leukemia? **Cancers**, v. 12, n. 2, p. 318, 29 jan. 2020.

MARAMPON, F. et al. HDAC4 and HDAC6 sustain DNA double strand break repair and stem-like phenotype by promoting radioresistance in glioblastoma cells. **Cancer Letters**, v. 397, n. March, p. 1–11, 2017.

MARKS, P. A. Discovery and development of SAHA as an anticancer agent. **Oncogene**, v. 26, n. 9, p. 1351–1356, 2007.

MEI, J. et al. Comprehensive analysis of peroxiredoxins expression profiles and prognostic values in breast cancer. **Biomarker Research**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2019.

MOHAMMAD, H. P.; BARBASH, O.; CREASY, C. L. Targeting epigenetic modifications in cancer therapy: erasing the roadmap to cancer. **Nature Medicine**, v. 25, n. 3, p. 403–418, 2019.

MORO, J. DA S. et al. Oral and oropharyngeal cancer: epidemiology and survival analysis. **Einstein (São Paulo)**, v. 16, n. 2, p. 1–5, 2018.

NAIK, P. P. et al. Implications of cancer stem cells in developing therapeutic

resistance in oral cancer. **Oral Oncology**, v. 62, p. 122–135, 2016.

NAIK, P. P. et al. **Stem Cell Microenvironments and Beyond**. Cham: Springer International Publishing, 2017. v. 1041

NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2020. Tipo de tratamento contra o câncer. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>. Acesso em 16/06/2020

NEBBIOSO, A. et al. Cancer epigenetics: Moving forward. **PLoS Genetics**, v. 14, n. 6, p. 1–25, 2018.

NICOLUSSI, A. et al. The role of peroxiredoxins in cancer. **Molecular and Clinical Oncology**, v. 6, n. 2, p. 139–153, 2017.

NÖR, C. et al. Cisplatin Induces Bmi-1 and Enhances the Stem Cell Fraction in Head and Neck Cancer. **Neoplasia**, v. 16, n. 2, p. 137-W8, 2014.

OKLEJAS, A. E.; NÖR, J. E. Overcoming head and neck cancer stem cells. **Improving the Therapeutic Ratio in Head and Neck Cancer**, p. 135–158, 2020.

OLIVE, P. L.; BANÀTH, J. P. Kinetics of H2AX phosphorylation after exposure to cisplatin. **Cytometry Part B - Clinical Cytometry**, v. 76, n. 2, p. 79–90, 2009.

PAPACCIO, F. et al. Concise Review: Cancer Cells, Cancer Stem Cells, and Mesenchymal Stem Cells: Influence in Cancer Development. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 6, n. 12, p. 2115–2125, 2017.

PARK, S. et al. HDAC6 deficiency induces apoptosis in mesenchymal stem cells through p53 K120 acetylation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 494, n. 1–2, p. 51–56, dez. 2017.

PARMIGIANI, R. B. et al. HDAC6 is a specific deacetylase of peroxiredoxins and is involved in redox regulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 28, p. 9633–9638, 2008a.

PARMIGIANI, R. B. et al. HDAC6 is a specific deacetylase of peroxiredoxins and is involved in redox regulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 28, p. 9633–9638, 15 jul. 2008b.

PENG, L. et al. The critical role of peroxiredoxin-2 in colon cancer stem cells. **Aging**, v. 13, n. 8, p. 11170–11187, 2021.

PHAN, T. G.; CROUCHER, P. I. The dormant cancer cell life cycle. **Nature Reviews Cancer**, 2020.

PORCEDDU, S. V. et al. Treating Patients With Locally Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck Unsuitable to Receive Cisplatin-Based Therapy. **Frontiers in Oncology**, v. 9, n. January, p. 1–12, 2020.

PRINCE, M. E. et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. **Proceedings of the National**

Academy of Sciences of the United States of America, v. 104, n. 3, p. 973–978, 2007.

RHOMDHONI, A. C.; KURNIAWAN, P.; HIDAYATI, T. Correlation Between Superoxide Dismutase Serum Level Alteration with Neck Metastatic Tumor Post Cisplatin–Paclitaxel Chemotherapy Response in Nasopharyngeal Carcinoma Patients. **Indian Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery**, v. 71, n. S1, p. 643–646, 18 out. 2019.

RODINI, C. O. et al. Oral cancer stem cells - properties and consequences. **Journal of Applied Oral Science**, v. 25, n. 6, p. 708–715, 2017.

RYU, H. W. et al. HDAC6 regulates sensitivity to cell death in response to stress and post-stress recovery. **Cell Stress and Chaperones**, v. 22, n. 2, p. 253–261, 2017.

SAKAMOTO, K. M.; ALDANA-MASANGKAY, G. I. The role of HDAC6 in cancer. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, 2011.

SAKUMA, T. et al. Aberrant expression of histone deacetylase 6 in oral squamous cell carcinoma. **International Journal of Oncology**, v. 29, n. 1, p. 117–124, 2006.

SANDOVAL-BASILIO, J. et al. Epigenetic mechanisms in odontogenic tumors: A literature review. **Archives of Oral Biology**, v. 87, n. October 2017, p. 211–217, 2018.

SEIDEL, C. et al. Histone deacetylase 6 in health and disease. **Epigenomics**, v. 7, n. 1, p. 103–118, 2015.

SHARIF, T. et al. HDAC6 differentially regulates autophagy in stem-like versus differentiated cancer cells. **Autophagy**, v. 15, n. 4, p. 686–706, 2019.

SHEN, D.-W. et al. Cisplatin Resistance: A Cellular Self-Defense Mechanism Resulting from Multiple Epigenetic and Genetic Changes. **Pharmacological Reviews**, v. 64, n. 3, p. 706–721, 2012.

SHEN, S. et al. Structural and in Vivo Characterization of Tubastatin A, a Widely Used Histone Deacetylase 6 Inhibitor. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, n. 5, p. 706–712, 2020.

SHIBUE, T.; WEINBERG, R. A. EMT, CSCs, and drug resistance: The mechanistic link and clinical implications. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 14, n. 10, p. 611–629, 2017.

SINGH, A. K.; BISHAYEE, A.; PANDEY, A. K. **Targeting histone deacetylases with natural and synthetic agents: An emerging anticancer strategy**. [s.l: s.n.]. v. 10

SITTAMPALAM, G. et al. Assay Guidance Manual. **Assay Guidance Manual**, n. Md, p. 305–336, 2016.

SKULTETYOVA, L. et al. Human histone deacetylase 6 shows strong preference for tubulin dimers over assembled microtubules. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

SKVORTSOV, S. et al. Crosstalk between DNA repair and cancer stem cell (CSC) associated intracellular pathways. **Seminars in Cancer Biology**, v. 31, p. 36–42, 2015.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

SURAWEERA, A.; O'BYRNE, K. J.; RICHARD, D. J. Combination Therapy With Histone Deacetylase Inhibitors (HDACi) for the Treatment of Cancer: Achieving the Full Therapeutic Potential of HDACi. **Frontiers in Oncology**, v. 8, n. March, p. 1–15, 2018.

TANG, J. et al. Blockade of histone deacetylase 6 protects against cisplatin-induced acute kidney injury. **Clinical Science**, v. 132, n. 3, p. 339–359, 14 fev. 2018.

TAO, H. et al. Silence of HDAC6 suppressed esophageal squamous cell carcinoma proliferation and migration by disrupting chaperone function of HSP90. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 8, p. 6623–6632, 2018.

THE CANCER GENOME ATLAS PROGRAM - **TCGA**, 2020. Dados de expressão gênica de 612 pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço. Disponível em: <https://portal.gdc.cancer.gov/projects/TCGA-HNSC>. Acesso em 10/11/2021

THE HUMAN PROTEIN ATLAS, 2020. Expression of HDAC6 in Cancer. Disponível em: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000094631-HDAC6/pathology>. Acesso em 10/01/2020.

TOMASELLI, D. et al. Epigenetic polypharmacology: A new frontier for epi-drug discovery. **Medicinal Research Reviews**, v. 40, n. 1, p. 190–244, 2020.

USTINOVA, K. et al. The disordered N-terminus of HDAC6 is a microtubulebinding domain critical for efficient tubulin deacetylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 9, p. 2614–2628, 2020.

WAGNER, V. P. et al. Targeting histone deacetylase and NFκB signaling as a novel therapy for Mucoepidermoid Carcinomas. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

WAINWRIGHT, E. N.; SCAFFIDI, P. Epigenetics and Cancer Stem Cells: Unleashing, Hijacking, and Restricting Cellular Plasticity. **Trends in Cancer**, v. 3, n. 5, p. 372–386, 2017.

WANG, K. H. et al. Increasing CD44 + /CD24 - tumor stem cells, and upregulation of COX-2 and HDAC6, as major functions of HER2 in breast tumorigenesis. **Molecular Cancer**, v. 9, n. 1, p. 288, 2010.

WANG, L. et al. Depletion of HDAC6 Enhances Cisplatin-Induced DNA Damage and Apoptosis in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, 2012.

WANG, R. et al. Peroxiredoxin 2 is essential for maintaining cancer stem cell-like

phenotype through activation of Hedgehog signaling pathway in colon cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 52, p. 86816–86828, 2016.

WANG, T. et al. The inflammatory cytokine IL-6 induces FRA1 deacetylation promoting colorectal cancer stem-like properties. **Oncogene**, v. 38, n. 25, p. 4932–4947, 2019.

WEBBER, L. P. et al. Hypoacetylation of acetyl-histone H3 (H3K9ac) as marker of poor prognosis in oral cancer. **Histopathology**, v. 71, n. 2, p. 278–286, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Who Report on Cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all. **Geneva: World Health Organization; 2020**, p. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO., 2020.

XENA FUNCTIONAL GENOMICS EXPLORER – **UCSC**, 2020. Expressão gênica e análise de sobrevida. Disponível em: <http://xena.ucsc.edu/>. Acesso em 10/11/2021

XUE, D. F. et al. ROS enhances the cytotoxicity of cisplatin by inducing apoptosis and autophagy in tongue squamous cell carcinoma cells. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 122, n. February, p. 105732, 2020.

YANG, W. et al. HDAC6 inhibition induces glioma stem cells differentiation and enhances cellular radiation sensitivity through the SHH/Gli1 signaling pathway. **Cancer Letters**, v. 415, p. 164–176, 2018.

YANO, M. et al. Clinicopathological correlation of ARID1A status with HDAC6 and its related factors in ovarian clear cell carcinoma. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2019.

YOON, C. Y. et al. The histone deacetylase inhibitor trichostatin synergistically resensitizes a cisplatin resistant human bladder cancer cell line. **Journal of Urology**, v. 185, n. 3, p. 1102–1111, 2011.

YU, S. S.; CIRILLO, N. The molecular markers of cancer stem cells in head and neck tumors. **Journal of Cellular Physiology**, v. 235, n. 1, p. 65–73, 2020.

YU, W. et al. Acquisition of cisplatin resistance shifts head and neck squamous cell carcinoma metabolism toward neutralization of oxidative stress. **Cancers**, v. 12, n. 6, p. 1–16, 2020.

ZAVRAS, A. I.; SHANMUGHAM, J. R. Measurement and Distribution of Oral Cancer. In: **Burt and Eklund's Dentistry, Dental Practice, and the Community**. [s.l.] Elsevier, 2021. p. 189–201.

ZENG, H. et al. DNA checkpoint and repair factors are nuclear sensors for intracellular organelle stresses-inflammations and cancers can have high genomic risks. **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. MAY, p. 1–25, 2018.

ZHU, H. et al. Expression of thioredoxin 1 and peroxiredoxins in squamous cervical carcinoma and its predictive role in NACT. **BMC Cancer**, v. 19, n. 1, p. 1–9, 2019.