



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO**



ANA PATRICIA ESPALADORI ESKENAZI

**TRIAGEM DE EPI-DROGAS PARA A APLICAÇÃO COMO TERAPIA COMBINADA
NA ELIMINAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS E REVERSÃO DA
QUIMIORRESISTÊNCIA EM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO**

RIBEIRÃO PRETO

2023

ANA PATRICIA ESPALADORI ESKENAZI

**TRIAGEM DE EPI-DROGAS PARA A APLICAÇÃO COMO TERAPIA COMBINADA
NA ELIMINAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS E REVERSÃO DA
QUIMIORRESISTÊNCIA EM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO**

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: Prof^a. Dr^a. Luciana Oliveira de Almeida

VERSÃO ORIGINAL

RIBEIRÃO PRETO

2023

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

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Eskenazi, Ana Patricia Espaladori

Triagem de epi-drogas para a aplicação como terapia combinada na eliminação de células-tronco tumorais e reversão da quimiorresistência em câncer de cabeça e pescoço. Ribeirão Preto, 2023.

101p. : il. ; 30cm

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

Orientador: Almeida, Luciana Oliveira

Versão Original

1. Epi-drogas; 2. Células-tronco tumorais; 3. Câncer oral; 4. Quimiorresistência; 5. HNSCC (Carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço); 6. Epigenética; 7. Modificações de Histonas.

FOLHA DE APROVAÇÃO

ESKENAZI, A. P. E. Triagem de epi-drogas para a aplicação como terapia combinada na eliminação de células-tronco tumorais e reversão da quimiorresistência em câncer de cabeça e pescoço.

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

Presidente:

Profa. Dra. Luciana Oliveira de Almeida

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Instituição: _____

Julgamento: _____ 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 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - (Processo no. 88887.684567/2022-00 do Programa DS).

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao meu esposo, **Marcelo Eskenazi**, meu amor, meu norte e companheiro incansável, que sempre compreendeu meus anseios e nunca poupa esforços para tornar realidade meus sonhos e projetos de vida.

Dedico esse trabalho aos meus amados filhos, **Lucas** e **André**, que com sua energia motivante e amor sem fim, me apoiaram e ajudaram para concretização desse projeto. Vocês são minha vida.

Dedico esse trabalho, ao meu pai, **Octaviano** e à minha mãe **Terezinha** (que já descansa suavemente nos braços do Pai), porque foram exemplos de fé e perseverança; nunca deixaram de valorizar a educação e por essa razão, fizeram dentro de suas possibilidades, todo o necessário para que eu trilhasse meus caminhos de formação.

Dedico este trabalho às minhas irmãs, **Cynthia** e **Nicia**, ao meu irmão, **Fernando**; meus amados, meus queridos, que me amam, me paparicam, me apoiam, me ajudam, me consolam... vocês certamente deixaram e deixam minha caminhada mais leve.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por me permitir realizar mais esse grande e desafiante projeto de vida.

Agradeço aos meu amores **Marcelo, Lucas e André**, pela colaboração, compreensão, alegria, carinhos e afagos e à minha **Patyfamília**, que torna a palavra família, sinônimo de amor e porque nunca cessam de me apoiar e incentivar em minhas conquistas.

Agradeço à **Universidade de São Paulo e Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto**. E à **CAPES**, pelo apoio financeiro ao meu projeto pesquisa.

Agradeço à minha orientadora, **Prof^a. Dr^a. Luciana Oliveira de Almeida**, pelos ensinamentos, compartilhamento de seu conhecimento e tempo, por suas correções e incentivos, pela oportunidade e confiança, bem como, por sua amizade.

Agradeço ao **Prof. Dr. Alan Grupioni**, pela ajuda direta em minha pesquisa, sugestões e oportunidade de aprendizado.

Agradeço aos técnicos dos laboratórios **Roger R. Fernandes, Fabíola S. Oliveira, Adriana L.G. de Almeida e Milla S. Tavares** e à **Imaculada J. Miguel**, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia Oral, pela ajuda sempre que precisei, pelas dicas e boa convivência ao longo desse período.

Agradeço em especial a **Lucas Dias de Oliveira, Thaís Moré Milan, Rayana L. Bighetti-Trevisan e Antônio S. Martorano**, pela incansável ajuda, pela contribuição para construção do meu projeto, pela competência, pelo carinho, pelo acolhimento, pela amizade...vocês fizeram valer à pena.

Agradeço às **minhas amigas mais queridas**, que mesmo de longe, se fazem sempre presentes com palavras de encorajamento e força. Obrigada por existirem para mim...

RESUMO

ESKENAZI, A. P. E. **Triagem de epi-drogas para a aplicação como terapia combinada na eliminação de células-tronco tumorais e reversão da quimiorresistência em câncer de cabeça e pescoço.** Dissertação (Mestrado). Ribeirão Preto. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2023. 101p.

Os carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço (HNSCC) envolvem um grupo de neoplasias derivadas do epitélio da mucosa na cavidade oral, orofaringe, hipofaringe e laringe, com incidência crescente, alta prevalência e modestas taxas de melhora na sobrevida. O tratamento convencional é geralmente multimodal, consistindo de cirurgia seguido por quimioterapia à base de cisplatina e/ou radioterapia, mas apresenta falhas associadas à quimiorresistência. Resistência aos efeitos citotóxicos da droga, alterações genéticas e epigenéticas que desregulam vias de sinalização envolvidas nos mais diversos processos celulares e a heterogeneidade dos tumores são características que potencializam o mecanismo de resistência tumoral. Alterações nos padrões epigenéticos, incluindo as modificações nas caudas de histonas, como acetilação e metilação, determinam o destino celular e são críticas para a geração das células-tronco tumorais e quimiorresistência. As epi-drogas são pequenas moléculas que têm como alvo enzimas que regulam a maquinaria epigenética e são promissoras como monoterapia ou terapia combinada. Este projeto teve como objetivo explorar o uso de epi-drogas como estratégia terapêutica para a eliminação de células-tronco tumorais e reversão da quimiorresistência em tumores de cabeça e pescoço. Foram avaliadas 23 epi-drogas e 06 agentes quimioterápicos e seu efeito inibidor em três linhagens de carcinoma oral: SCC9, CAL27 e SCC25, e suas populações selvagem (WT) e resistente à Cisplatina (CisR), e suas subpopulações de células-tronco tumorais (CTT⁺) e células diferenciadas (CTT⁻). A viabilidade celular foi realizada para a seleção das epi-drogas, com resultados dose-resposta mais favoráveis para 5-N-8-Q, Mocetinostat, Salermide e N-Oxalyglycine; bem como para o quimioterápico Disulfiram, que foi testado como uma alternativa ao uso da cisplatina para a terapia combinada. O acúmulo de CTT foi analisado por formação de esferas e citometria de fluxo e foi visto que houve redução na população celular tronco, tanto nos tratamentos em monoterapia, quanto em combinação com Disulfiram. Mocetinostat, Salermide e N-Oxalyglycine em monoterapia e Mocetinostat e Salermide combinados com Disulfiram reduziram o volume tumoral *in vivo*. Análises histológicas por HE mostraram um padrão de maior organização tecidual e a imunohistoquímica demonstrou diminuição dos marcadores de pluripotência, transição epitélio-mesênquima, agressividade e alterações nos reguladores epigenéticos, como aumento nos níveis de acetilação e metilação. A terapia combinada, Mocetinostat e Disulfiram, se mostrou a mais eficiente para eliminação de células-tronco tumorais e reversão da quimiorresistência, apontando como promissora estratégia terapêutica no combate ao carcinoma oral.

Palavras-chave: Epi-drogas, Células-tronco tumorais, Câncer oral, Quimiorresistência, HNSCC (Carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço), Epigenética, Modificações de Histonas.

ABSTRACT

ESKENAZI, A. P. E. **Screening of epi-drugs for application as a combined therapy in the elimination of cancer stem cells and overcome the chemoresistance in head and neck cancer.** Thesis (Master Degree). Ribeirão Preto. School of Dentistry of University of Ribeirão Preto. University of São Paulo, 2023. 101p.

Head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) involve a group of neoplasms derived from the mucosal epithelium in the oral cavity, oropharynx, hypopharynx and larynx, with increasing incidence, high prevalence and modest rates of improvement in survival. Conventional treatment is usually multimodal, consisting of surgery followed by cisplatin-based chemotherapy and/or radiotherapy, but has failures associated with chemoresistance. Resistance to the drug's cytotoxic effects, genetic and epigenetic alterations that deregulate signaling pathways involved in the most diverse cellular processes, and the heterogeneity of tumors are characteristics that potentiate the mechanism of tumor resistance. Changes in epigenetic patterns, including changes in histone tails such as acetylation and methylation, determine cell fate and are critical for the generation of cancer stem cells and chemoresistance. Epi-drugs are small molecules that target enzymes that regulate the epigenetic machinery and show promise as monotherapy or combination therapy. This project aimed to explore the use of epi-drugs as a therapeutic strategy for eliminating tumor stem cells and reversing chemoresistance in head and neck tumors. We evaluated 23 epi-drugs and 06 chemotherapeutic agents and their inhibitory effect on three oral carcinoma cell lines: SCC9, CAL27 and SCC25, and their wild-type (WT) and Cisplatin-resistant (CisR) populations, and their cancer stem cell subpopulations (CSC⁺) and differentiated cells (CSC⁻). Cell viability was performed to select the epi-drugs with the most favorable dose-response results for 5-N-8-Q, Mocetinostat, Salermide and N-Oxalyglycine; as well as for the chemotherapy drug Disulfiram, which was investigated as an alternative to the use of cisplatin for combined therapy. CSC accumulation was analyzed by spheres formation and flow cytometry and it was seen that there was a reduction in the stem cell population, both in monotherapy treatments and in combination with Disulfiram. Mocetinostat, Salermide and N-Oxalyglycine in monotherapy and Mocetinostat and Salermide combined with Disulfiram reduced tumor volume in vivo. Histological analyzes by HE showed a pattern of greater tissue organization and immunohistochemistry showed a decrease in pluripotency markers, epithelial-mesenchymal transition, aggressiveness and alterations in epigenetic regulators, such as an increase in acetylation and methylation levels. The combined therapy, Mocetinostat and Disulfiram, proved to be the most efficient for eliminating tumor stem cells and reversing chemoresistance, pointing to a promising therapeutic strategy in the fight against oral carcinoma.

Keywords: Epidrugs, Tumor stem cells, Chemoresistance, Oral cancer, HNSCC (Head and neck squamous cell carcinoma), Epigenetics, Histone modifications.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Moduladores das alterações epigenéticas no câncer e possíveis alvos para as epi-drogas..... **24**
- Figura 2 -** Determinação do IC₅₀ para screening dos inibidores 5-Nitroso-8-Quinolinol, ABBV-075, Apicidin, AS-8351, Bobcat 339, CPTH6, Delphinidin, DS-437, I-BET-151, ITF-2357, JIB-04, Mocetinostat, Moz-In-3, N-Oxalyglycine, Panobinostat, PBIT, Salermide, SB939, Sinefugin, Sulforaphane, SW155246, Todralazine e Valemetostat nas subpopulações CTT⁻ (células diferenciadas) e CTT⁺ (células tronco-tumorais) da linhagem CAL27 CisR..... **43**
- Figura 3 -** Determinação do IC₅₀ para screening dos inibidores 5-Nitroso-8-Quinolinol, ABBV-075, Apicidin, AS-8351, Bobcat 339, CPTH6, Delphinidin, DS-437, I-BET-151, ITF-2357, JIB-04, Mocetinostat, Moz-In-3, N-Oxalyglycine, Panobinostat, PBIT, Salermide, SB939, Sinefugin, Sulforaphane, SW155246, Todralazine e Valemetostat nas subpopulações CTT⁻ (células diferenciadas) e CTT⁺ (células tronco-tumorais) da linhagem SCC9 CisR **46**
- Figura 4 -** Determinação do IC₅₀ para screening dos inibidores 5-Nitroso-8-Quinolinol, ABBV-075, Apicidin, AS-8351, Bobcat 339, CPTH6, Delphinidin, DS-437, I-BET-151, ITF-2357, JIB-04, Mocetinostat, Moz-In-3, N-Oxalyglycine, Panobinostat, PBIT, Salermide, SB939, Sinefugin, Sulforaphane, SW155246, Todralazine e Valemetostat nas subpopulações CTT⁻ (células diferenciadas) e CTT⁺ (células tronco-tumorais) da linhagem SCC25 CisR **48**
- Figura 5 -** Determinação do IC₅₀ para screening dos fármacos quimioterápicos Bortezomib, Carboplatin, Disulfiram, Erlotinib, Lovastatin e Paclitaxel nas populações WT (células selvagens) e CisR (células resistentes à Cisplatina) da linhagem CAL27..... **52**
- Figura 6 -** Determinação do IC₅₀ para screening dos fármacos quimioterápicos Bortezomib, Carboplatin, Disulfiram, Erlotinib, Lovastatin e Paclitaxel nas populações WT (células selvagens) e CisR (células resistentes à Cisplatina) da linhagem SCC9..... **53**

| | | |
|--------------------|---|-----------|
| Figura 7 - | Determinação do IC ₅₀ para screening dos fármacos quimioterápicos Bortezomib, Carboplatin, Disulfiram, Erlotinib, Lovastatin e Paclitaxel nas populações WT (células selvagens) e CisR (células resistentes à Cisplatina) da linhagem SCC25..... | 54 |
| Figura 8 - | Imagem representativa da formação de esferas por células-tronco tumorais..... | 55 |
| Figura 9 - | Análise de viabilidade celular nas populações WT (células selvagens) e CisR (células resistentes à Cisplatina) das linhagens celulares CAL27, SCC9 e SCC25 tratadas com 5-N-8-Q (HDACi)..... | 55 |
| Figura 10 - | Análise de viabilidade celular nas populações WT (células selvagens) e CisR (células resistentes à Cisplatina) das linhagens celulares CAL27, SCC9 e SCC25 tratadas com Mocetinostat (HDACi)..... | 56 |
| Figura 11 - | Análise de viabilidade celular nas populações WT (células selvagens) e CisR (células resistentes à Cisplatina) das linhagens celulares CAL27, SCC9 e SCC25 tratadas com Salmeterol (HDACi - SIRT1/2)... | 56 |
| Figura 12 - | Análise de viabilidade celular nas populações WT (células selvagens) e CisR (células resistentes à Cisplatina) das linhagens celulares CAL27, SCC9 e SCC25 tratadas com N-Oxalylglycine (HDMi)..... | 57 |
| Figura 13 - | Análise de viabilidade celular nas populações WT (células selvagens) e CisR (células resistentes à Cisplatina) das linhagens celulares CAL27, SCC9 e SCC25 tratadas com Disulfiram (ALDHi)..... | 58 |
| Figura 14 - | Análise da subpopulação de células-tronco tumorais (CTT) da linhagem CAL27 CisR através da marcação de ALDH ^{HIGH} /CD44 ^{HIGH} por citometria de fluxo, após tratamento com inibidores em monoterapia e em terapia combinada..... | 59 |
| Figura 15 - | Análise da subpopulação de células-tronco tumorais (CTT) da linhagem SCC9 CisR através da marcação de ALDH ^{High} /CD44 ^{High} por citometria de fluxo, após tratamento com inibidores em monoterapia e em terapia combinada..... | 60 |

| | |
|--|-----------|
| Figura 16 - Análise da subpopulação de células-tronco tumorais (CTT) da linhagem SCC25 CisR através da marcação de ALDH ^{HIGH} /CD44 ^{HIGH} por citometria de fluxo, após tratamento com inibidores em monoterapia e em terapia combinada..... | 61 |
| Figura 17 - Quantificação da expressão celular de CD44 ^{LOW} da linhagem CAL27 CisR por citometria de fluxo após tratamento com inibidores Disulfiram em monoterapia, Mocetinostat em monoterapia e terapia combinada com Disulfiram e N-Oxalyglycine em monoterapia | 62 |
| Figura 18 - Quantificação da expressão celular de CD44 ^{LOW} da linhagem SCC9 CisR por citometria de fluxo após tratamento com inibidores Disulfiram em monoterapia, Mocetinostat em monoterapia e terapia combinada com Disulfiram e N-Oxalyglycine em monoterapia..... | 63 |
| Figura 19 - Quantificação da expressão celular de CD44 ^{LOW} da linhagem SCC25 CisR por citometria de fluxo após tratamento com inibidores Disulfiram em monoterapia, Mocetinostat em monoterapia e terapia combinada com Disulfiram e N-Oxalyglycine em monoterapia..... | 64 |
| Figura 20 - Avaliação da redução do peso tumoral após indução de crescimento tumoral por injeção de células CisR da linhagem CAL27 em modelo animal (Xenoinxerto) após tratamento com inibidores em monoterapia e terapia combinada..... | 65 |
| Figura 21- Avaliação da redução do volume tumoral após indução de crescimento tumoral por injeção de células CisR da linhagem CAL27 em modelo animal (Xenoinxerto) após tratamento com inibidores em monoterapia e terapia combinada A. Gráfico do volume tumoral. B. Imagem dos tumores..... | 66 |
| Figura 22 - Análise dos tecidos tumorais com H&E. Tecidos tumorais removidos dos camundongos Nude BALBc, tratados com epi-drogas em monoterapia e terapia combinada..... | 69 |

| | |
|---|-----------|
| Figura 23 - Análise dos tecidos tumorais com imunomarcção de HDAC1..... | 71 |
| Figura 24 - Análise dos tecidos tumorais com imunomarcção de SIRT1..... | 72 |
| Figura 25 - Análise dos tecidos tumorais com imunomarcção de KDM4C..... | 73 |
| Figura 26 - Análise dos tecidos tumorais com imunomarcção de SLUG..... | 74 |
| Figura 27 - Análise dos tecidos tumorais com imunomarcção de OCT4..... | 76 |
| Figura 28 - Análise dos tecidos tumorais com imunomarcção de SOX2..... | 78 |
| Figura 29 - Análise dos tecidos tumorais com imunomarcção de H3K36ac..... | 80 |
| Figura 30 - Análise dos tecidos tumorais com imunomarcção de H4K5ac..... | 81 |
| Figura 31 - Análise dos tecidos tumorais com imunomarcção de H3K9me2..... | 82 |
| Figura 32 - Análise dos tecidos tumorais com imunomarcção de H3K36me3..... | 82 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-------------------|--|-----------|
| Tabela 1 - | Grupos funcionais das Epi-drogas e suas respectivas proteínas-alvo envolvidas nos processos epigenéticos..... | 33 |
| Tabela 2 - | Fármacos quimioterápicos para seleção como estratégia terapêutica combinada e seus respectivos mecanismos de ação..... | 34 |
| Tabela 3 - | Lista de valores das curvas de concentração estabelecidas a partir do valor IC ₅₀ de referência de cada inibidor, fornecido pelo fabricante/literatura, para desenho da curva dose-resposta das subpopulações CTT ⁻ e CTT ⁺ das linhagens CAL27, SCC9 e SCC25 | 35 |
| Tabela 4 - | Fármacos quimioterápicos para Ensaio de Viabilidade Celular com as respectivas concentrações estabelecidas a partir do valor IC ₅₀ de referência fornecido pelo fabricante/literatura para desenho da curva dose-resposta das populações WT e CisR das linhagens CAL27, SCC9 e SCC25..... | 35 |
| Tabela 5 - | Epi-drogas e fármaco quimioterápico selecionados e suas respectivas concentrações para Ensaio de Formação de Esferas para as populações WT e CisR das linhagens CAL27, SCC9 e SCC25..... | 36 |
| Tabela 6 - | Epi-drogas e fármaco quimioterápico selecionados e suas respectivas concentrações utilizadas para Ensaio de Citometria de Fluxo em populações CisR das linhagens CAL27, SCC9 e SCC25..... | 37 |
| Tabela 7 - | Estratégia de tratamento em monoterapia e tratamento combinado para o modelo de Xenoenxerto <i>in vivo</i> | 38 |
| Tabela 8 - | Sistema de classificação de alterações morfológicas de tecido tumoral de carcinoma espinocelular oral..... | 39 |
| Tabela 9 - | Valores IC ₅₀ referentes às linhagens celulares quimiorresistentes CAL27, SSC9 e SCC25 e suas subpopulações CTT ⁻ e CTT ⁺ para as | |

| | |
|--|----|
| 23 epi-drogas..... | 42 |
| Tabela 10 - Valores IC ₅₀ referentes às linhagens celulares CAL27, SCC9 e SCC25 e suas populações WT e CisR tratadas com fármacos quimioterápicos visando a terapia combinada..... | 52 |
| Tabela 11 - Score dos critérios histopatológicos avaliados nos tecidos tumorais removidos dos camundongos Nude BALBc tratados com epi-drogas em monoterapia e terapia combinada..... | 68 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 18 |
| 1.1. Câncer de Cabeça e Pescoço | 18 |
| 1.2. Células-Tronco Tumorais e Mecanismos de Quimiorresistência | 19 |
| 1.3. Mecanismos Epigenéticos das Células-tronco Tumorais no Processo de Carcinogênese | 20 |
| 1.4. Emprego de Epi-drogas como estratégia terapêutica | 24 |
| 1.4.1. Alvos Terapêuticos das Epi-drogas: “Enzimas Writers: Escritoras” | 24 |
| 1.4.2. Alvos Terapêuticos das Epi-drogas: “Enzimas Erasers: Apagadoras” | 26 |
| 1.4.3. Alvos Terapêuticos das Epi-drogas: “Enzimas Readers: Leitoras” | 29 |
| 1.5. Quimioterápicos com potencial de combinação com Epi-drogas para reversão da quimiorresistência | 29 |
| | |
| 2. OBJETIVOS | 31 |
| 2.1. Objetivo Geral..... | 31 |
| 2.2. Objetivos Específicos | 31 |
| | |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 32 |
| 3.1. Cultivo Celular..... | 32 |
| 3.2. Estratégia terapêutica: Epi-Drogas e Agentes Quimioterápicos | 32 |
| 3.3. Ensaio de Viabilidade Celular | 34 |
| 3.4. Ensaio de Formação de Esferas | 36 |
| 3.5. Citometria de Fluxo..... | 36 |
| 3.6. Modelo <i>in vivo</i> - Xenoenxerto | 37 |
| 3.7. Análise Histológica – Hematoxilina & Eosina (HE)..... | 38 |
| 3.8. Imuno-Histoquímica (IHQ)..... | 39 |
| 3.9. Análise Estatística | 40 |
| | |
| 4. RESULTADOS | 41 |
| 4.1. Determinação da dose resposta IC_{50} para as Epi-drogas e agentes quimioterápicos para terapia combinada e identificação da sensibilidade das CTT ⁺ em comparação às CTT ⁻ por Ensaio de Viabilidade Celular | 41 |
| 4.2. Determinação da dose inibitória das Epi-drogas e Disulfiram para as células-tronco tumorais das linhagens selvagens e resistentes à Cisplatina..... | 54 |
| 4.3. Análise da plasticidade celular em linhagens de carcinoma oral resistentes à Cisplatina tratadas com Epi-drogas em monoterapia e terapia combinada..... | 58 |

| | |
|---|----|
| 4.4. Análise dos níveis de CD44 ^{LOW} em linhagens de carcinoma oral resistentes à Cisplatina após tratamento com Epi-drogas em monoterapia e terapia combinada | 61 |
| 4.5. Avaliação das Epi-drogas em monoterapia e terapia combinada na diminuição do peso e volume tumoral em modelo <i>in vivo</i> de Xenoenxerto..... | 64 |
| 4.6. Análise Histopatológica dos tecidos tumorais tratados com Epi-drogas em monoterapia e terapia combinada com Disulfiram..... | 67 |
| 4.7. Imunomarcção dos tecidos tumorais tratados com Epi-drogas em monoterapia e terapia combinada com Disulfiram..... | 70 |
| | |
| 5. DISCUSSÃO | 83 |
| | |
| 6. CONCLUSÃO..... | 92 |
| | |
| REFERÊNCIAS | 93 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de Cabeça e Pescoço

Os carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço (HNSCC) compõem um grupo heterogêneo de neoplasias derivadas do epitélio da mucosa na cavidade oral, glândulas salivares, orofaringe, hipofaringe e laringe, com incidência crescente, alta prevalência e baixos índices de sobrevida em 5 anos. É o sexto tipo de câncer mais comum no mundo, com dados estimados em 2018 de 890.000 novos casos e 450.000 mortes (JOHNSON et al., 2020; SHAHOUMI, 2021). Nos Estados Unidos, o câncer de cabeça e pescoço representa cerca de 4% de todos os cânceres. Em 2023, estima-se que cerca de 66.920 pessoas (49.190 homens e 17.7300 mulheres) desenvolverão essa doença, com uma expectativa de 15.400 mortes (11.210 homens e 3.980 mulheres) (2005-2023 American Society of Clinical Oncology (ASCO) (“Head and Neck Cancer - Statistics”, 2023).

Os cânceres de cavidade oral são os tumores mais comuns desse grupo, acometendo mais homens do que mulheres, na proporção 2:1 (“Oral Cavity & Oropharyngeal Cancer Key Statistics 2021”, [s.d.]). Na América Central e do Sul, o Brasil apresenta a maior incidência de câncer oral e orofaríngeo, com mais de 90% dos casos correspondendo ao carcinoma espinocelular (CEC) (LOUREDO et al., 2022). De acordo com a Estimativa 2023 do INCA, o número de novos casos de câncer da cavidade oral esperados para o Brasil, para cada ano do triênio 2023 a 2025, é de 15.190 casos, sendo 10.900 em homens e 4.200 em mulheres; valores que correspondem a um risco estimado de 10,30 casos novos a cada 100 mil homens e 3,83 a cada 100 mil mulheres (“Estimativa 2023”, 2023).

Já se encontra bem estabelecido na literatura que o tabagismo é o principal fator etiológico ambiental para o desenvolvimento do CEC oral. O caráter multifatorial desse tipo de câncer agrega ainda outros componentes de risco relacionados ao estilo de vida, incluindo a ingestão crônica de bebidas alcóolicas que associada ao fumo potencializa o risco, além de idade, dieta, infecções virais, com destaque para o HPV (papilomavírus humano), fatores hormonais e exposições ocupacionais (BRAVI et al., 2021). Além disso, mutações genéticas herdadas, fatores imunológicos e metabólicos são outras condições associadas ao seu desenvolvimento (PEREIRA et al., 2020). Recentes estudos relatam ainda, que as alterações epigenéticas também

desempenham um papel na condução da oncogênese desses tumores (JOHNSON et al., 2020). O tratamento para o carcinoma oral envolve, de modo geral, a sequência da ressecção cirúrgica, seguida das terapias adjuvantes por radiação e/ou quimioterapia (JOHNSON et al., 2020). Entretanto, diversas situações devem ser levadas em consideração ao se traçar o plano de tratamento de um paciente. O acesso à lesão tumoral, a localização anatômica e o estágio em que se encontra a doença vão determinar a abrangência no emprego dessas terapias (CHOW, 2020).

A Cisplatina (cis-diaminodicloroplatina (II) ou CDDP) vem fazendo parte do regime quimioterápico de primeira linha para tratamento de câncer de cabeça e pescoço ao longo de várias décadas, mas infelizmente, com benefícios limitados na eliminação do tumor, em razão dos mecanismos de resistência aos efeitos citotóxicos dessa droga. Alterações genéticas e epigenéticas afetam o controle de vias de sinalização envolvidas em diversos processos celulares, contribuindo para a resistência (HUNG et al., 2020). A heterogeneidade dos tumores é outra característica que potencializa a resistência tumoral. Um subgrupo de células indiferenciadas conhecidas como células-tronco tumorais (CTT) possui propriedades que as capacitam evadir aos efeitos das drogas, determinando a importância dessas células como promotoras do processo de recidiva do tumor e falha às terapias (QIN et al., 2020; LI et al., 2021)

1.2. Células-Tronco Tumorais e Mecanismos de Quimiorresistência

As células-tronco tumorais (CTT) são definidas como uma pequena subpopulação pluripotente de células nos tumores, dotadas de propriedades semelhantes às células-tronco normais. Sua capacidade de autorrenovação, diferenciação, divisão assimétrica, evasão da apoptose, escape da senescência celular e permanência em estado de quiescência (baixa ciclagem) contribui para a resistência às drogas anticâncer, além de possibilitar a recidiva do tumor e ocorrência de metástase (BIGHETTI-TREVISAN et al., 2019; SHAHOUMI, 2021). É importante ressaltar, que a presença dessas células indiferenciadas, com seu alto nível de plasticidade, interrompe o destino normal das células e em inúmeros casos são o tipo celular que vai originar o câncer (LYTLE; BARBER; REYA, 2018). Além disso, sob pressão terapêutica e/ou por alterações genéticas e epigenéticas, as células tumorais diferenciadas podem sofrer reprogramação e reverter seu fenótipo para o padrão de

células tumorais semelhantes a tronco (stemness) (LI et al., 2021). O perfil de expressão gênica determina a susceptibilidade às transformações, mas mudanças no controle epigenético também induzem a capacidade de iniciação do tumor e do estado celular mutacional, contribuindo para a aquisição ou manutenção de um fenótipo de células-tronco tumorais. Estudos têm relatado que a heterogeneidade epigenética é um fator condutor da diferença de sensibilidade das células tumorais a múltiplas terapias (LYTLE; BARBER; REYA, 2018; SHAHOUMI, 2021). Diversos esforços vêm sendo empreendidos a fim de explorar os mecanismos envolvidos na resistência terapêutica induzida por CTT e propiciar novas alternativas para o enfrentamento do câncer. Entre eles, direcionar CTT como alvo, para reverter a falha do tratamento, é uma das estratégias mais promissoras que podem trazer benefícios de longo prazo para pacientes com câncer (ZHOU; AL, 2020). A reprogramação epigenética, a partir da utilização de epi-drogas desenvolvidas para esse fim, pode ser uma alternativa, podendo também, fazer parte de uma terapia combinada com outros fármacos, visando a eliminação da resistência ao agente quimioterápico e possibilitando sucesso terapêutico no combate aos carcinomas orais.

1.3. Mecanismos Epigenéticos das Células-tronco Tumorais no Processo de Carcinogênese

Epigenética é a ciência que estuda as mudanças hereditárias na expressão gênica e na estrutura da cromatina devido a modificações químicas, sem alteração na sequência de nucleotídeos do DNA. Os padrões epigenéticos são associados a diversos fatores como estágios de desenvolvimento, exposição ambiental e dieta alimentar (DUAN et al., 2019). Essas modificações regulam a acessibilidade à cromatina, processo essencial ao desenvolvimento normal. Ao interagirem, essas alterações determinam o destino celular e a atividade gênica, regulando o fenótipo em diferentes tipos celulares nos mais diversos estágios de desenvolvimento, incluindo estados de doença como o câncer (SHARMA; KELLY; JONES, 2010). Os fatores epigenéticos são um dos pilares envolvidos nas etapas da carcinogênese, promovendo alterações em sinalizações moleculares que regulam muitas funções celulares, como crescimento, proliferação celular, diferenciação, controle do ciclo celular, danos ao DNA, senescência e apoptose. Em geral, os eventos epigenéticos envolvem metilação do DNA, modificações em histonas, a leitura dessas

modificações, a organização da cromatina e efeito de RNAs não codificantes (CHENG et al., 2019; TOMASELLI et al., 2020).

A metilação do DNA apresenta um mecanismo geral de silenciamento gênico, através da modificação covalente de citosinas em dinucleotídeos CpG no carbono 5 (5-metilcitosina) em regiões promotoras (conhecidas como Ilhas CpG). As enzimas responsáveis pelo controle da metilação são as DNMT (DNA metiltransferases), divididas em três classes DNMT1, DNMT2, DNMT3, que catalisam a transferência do grupo metil da S-adenosilmetionina para a citosina. A perda de metilação do DNA foi a primeira alteração epigenética caracterizada em células cancerosas (CASTILHO; SQUARIZE; ALMEIDA, 2017). Em diversos tumores foi observada a hipometilação global do DNA de células cancerosas, promovendo a superexpressão de proto-oncogenes, fatores de crescimento e genes envolvidos em proliferação, invasão e metástase. Outro mecanismo chave de sobrevivência dos tumores é a metilação do promotor que silencia genes supressores tumorais envolvidos na invasão, controle do ciclo celular, reparo de DNA e apoptose (SAIF; HASSOU; ENNAJI, 2020). Mudanças no padrão de metilação do DNA podem estar envolvidas na desdiferenciação de células tumorais, sugerindo que as modificações epigenéticas que ocorrem durante a reprogramação celular são críticas para a geração das CTT, podendo ser um alvo potencial para terapia combinada (BIGHETTI-TREVISAN et al., 2019).

Outro mecanismo envolvido na regulação epigenética são as modificações químicas pós-traducionais nas caudas das proteínas histonas, entre elas, acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação, sumoilação e ADP-ribosilação. Um conjunto de enzimas e proteínas estão envolvidas na regulação dessa maquinaria. Histonas acetiltransferases (HAT) e histonas metiltransferases (HMT) abrangem um grupo de enzimas responsáveis pela fixação desses sinais (“escritoras”). Histonas desacetilases (HDAC) e histonas demetilases (HDM) por sua vez, podem reverter esse processo, agindo como “apagadoras”. Ainda, o conjunto de sinais é interpretado por proteínas leitoras contendo bromo ou cromodomínios, que se ligam ao resíduo modificado de histona. A regulação dessas modificações é a chave dos processos celulares de transcrição, replicação e reparo de danos ao DNA (DI NISIO et al., 2021).

A metilação de resíduos de lisinas em histonas não promove alteração na carga geral da molécula, mas leva à ativação ou repressão da transcrição, dependendo de qual resíduo é modificado e da densidade de metilação. Metilação de histonas ocorre no contexto do câncer com as HMT envolvidas em diferentes cenários

(BRAIT; SIDRANSKY, 2011). EZH2, uma subunidade do grupo polycomb (PcG), é uma das proteínas repressoras mais conhecidas na metilação das histonas, desempenhando um papel fundamental na manutenção e diferenciação das células-tronco. Ao catalisar a trimetilação da lisina 27 na histona H3 (H3K27me3), EZH2 regula a expressão de genes que são determinantes para o equilíbrio entre a diferenciação e proliferação celular. A superexpressão de EZH2 promove a autorrenovação, impede a diferenciação das células-tronco e está associada à agressividade e ao mau prognóstico no câncer oral (CASTILHO; SQUARIZE; ALMEIDA, 2017; DUAN; DU; GUO, 2020). Histonas demetilases lisina-específicas (KDM) agem removendo as marcas da metilação (YOO et al., 2020). KDM4C (JMJD2C), faz parte das histonas demetilases da família do domínio 2 Jumonji, enzimas dependentes de Fe(II) e α -cetogluturato, que oxigenam resíduos de lisina em histonas metiladas, promovendo dessa forma, sua demetilação após a liberação de formaldeído, dióxido de carbono e ácido succínico. A compreensão dessa subfamília de enzimas estabeleceu que o processo de metilação das histonas é reversivelmente regulado por histonas lisina metiltransferases e histonas lisina demetilases (HAMADA et al., 2009). Sua desregulação está intrinsecamente ligada à tumorigênese em vários tipos de câncer, além de desempenhar um importante papel em células-tronco embrionárias e CTT (LANG et al., 2021). Estudos também relatam o papel das HMT e HDM, diferencialmente expressas nas células tumorais humanas, frequentemente relacionadas ao aumento da quimio e radiorresistência (DI NISIO et al., 2021).

A acetilação de histonas está relacionada com um estado aberto da cromatina, favorecendo o acesso à maquinaria transcricional. Trata-se de um mecanismo dinâmico e reversível, sendo regulado pela ação das HAT e HDAC. Histonas Acetil Transferases (HAT) catalisam a transferência do grupo acetil para o grupo ϵ -amino da cadeia lateral da lisina, neutralizando sua carga positiva. Com isso, a interação eletrostática, entre a histona e o DNA carregado negativamente, torna-se menos rígida, promovendo uma estrutura aberta da cromatina, levando ao DNA relaxado e acessível a fatores de transcrição (JENKE et al., 2021). Existem três famílias principais de enzimas HAT: GNAT (Hat1, Gcn5, PCAF), MYST (MOZ / Morf, Ybf2, Sas2, Tip60) e CBP/P300 (P300/CBP, Taf1). Em oposição, a desacetilação de histonas pelas enzimas HDAC, remove o grupo acetil, restaurando a carga positiva das lisinas, o que aumenta a interação com o DNA e diminui a acessibilidade aos fatores de transcrição ao promover uma conformação de cromatina fechada. As HDAC

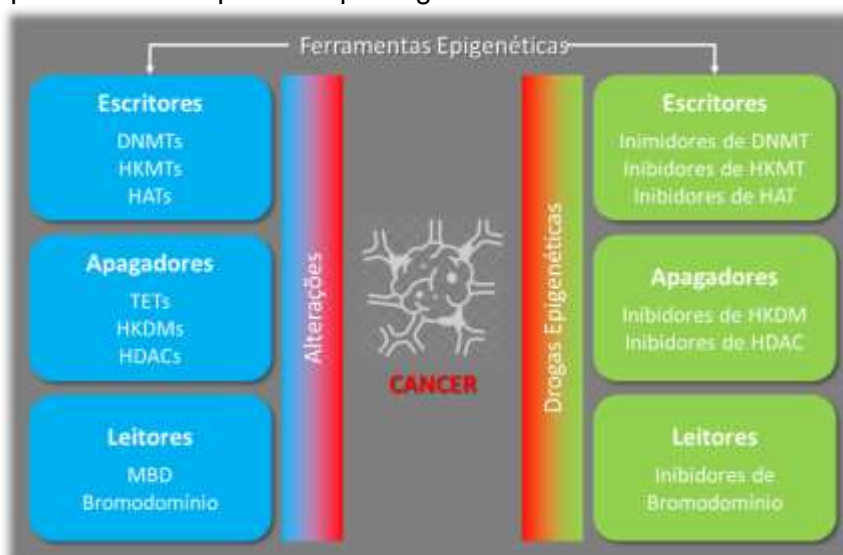
são classificadas em quatro grupos: Classe I (HDAC 1-3 e 8), expressos de forma ubíqua no núcleo de linhagens de células e tecidos humanos; Classe II, subdividida em classe IIa (HDAC 4, 5, 7 e 9) e classe IIB (HDAC 6 e 10), exibindo expressão tecido-específica e podendo se deslocar entre o núcleo e o citoplasma; Classe III ou sirtuínas (SIRT1-7), que são NAD⁺ dependentes e possuem um mecanismo catalítico muito distinto para desacetilação em comparação com outras classes de HDAC; e Classe IV (HDAC11) que é capaz de desacetilar sítios de histonas divergentes, tornando a especificidade do substrato baixa e funcionalmente redundante em certos cenários (ZHAO; SHILATIFARD; PARK; HAN, 2019). As HDAC estão frequentemente superexpressas no câncer, promovendo repressão gênica e predizendo mau prognóstico em vários tumores, por estarem envolvidas em vários processos celulares, incluindo controle do ciclo celular, diferenciação, angiogênese, invasão, adesão, migração, apoptose, reparo de DNA e autofagia (RASTOGI et al., 2016; LIU et al., 2021). As modificações epigenéticas também têm potencial para desregular processos de sinalização que modulam atividades normais das células-tronco durante a formação do tumor. Essas alterações favorecem a proliferação e manutenção das CTT, assim como a progressão e invasão do tumor. Estudos têm mostrado a inibição de HDAC promovendo a diminuição do número de CTT e redução da formação de esferas clonogênicas e regulação de genes relacionados à invasão de células HNSCC (CASTILHO; SQUARIZE; ALMEIDA, 2017; ROMANOWSKA et al., 2020).

As enzimas leitoras epigenéticas apresentam domínios especializados para o reconhecimento de modificações covalentes específicas do nucleossomo e executam uma resposta a sinais upstream, traduzindo esse código de histonas em um resultado biológico significativo, como a regulação da transcrição através da ativação ou silenciamento gênico. Essa família envolve proteínas bromodomínio e extraterminal (BET) de quatro tipos: proteína contendo bromodomínio 2 (BRD2), BRD3, BRD4 e proteína bromodomínio específica do testículo (BRDT). A desregulação nesses domínios leitores de cromatina afetam a capacidade de leitura da cromatina de certos reguladores epigenéticos em alguns tipos de câncer (CHI; ALLIS; WANG, 2010; YANG et al., 2016). Em vista disso, explorar a regulação dos componentes dessas vias epigenéticas pode auxiliar na identificação de alvos potenciais para terapia contra a população de CTT e reversão da quimiorresistência em tumores de cabeça e pescoço.

1.4. Emprego de Epi-drogas como estratégia terapêutica

As epi-drogas são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir ou modular pequenas moléculas e têm como alvo o epigenoma ou enzimas com atividade epigenética, como DNMT, microRNA, histonas metiltransferases, demetilases, acetiltransferases e desacetilases (Figura 1) (IDRISSOU et al., 2020). Diversos estudos têm mostrado que além de seu potencial como monoterapias, as drogas epigenéticas podem agir em combinação com outras terapias anticâncer na reversão da resistência adquirida, modulando a sensibilidade das células cancerosas a outras formas de terapia anticâncer, incluindo quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, terapia com alvo molecular e imunoterapia (MOREL et al., 2020). Ao considerar as modificações epigenéticas como eventos importantes capazes de induzir a reprogramação celular e modular as propriedades das células-tronco tumorais, a utilização das epi-drogas pode promover a eliminação dessas células (BIGHETTI-TREVISAN et al., 2019).

Figura 1 – Moduladores das alterações epigenéticas no câncer e possíveis alvos para as epi-drogas



Fonte: Adaptado de (BISWAS; RAO, 2018a).

1.4.1. Alvos Terapêuticos das Epi-drogas: “Enzimas Writers: Escritoras”

As enzimas que criam modificações ao redor do genoma, ao adicionar grupamentos químicos no DNA e histonas, são referidas como writers ou escritoras (PARK; HAN, 2019). Padrões irregulares na atividade das HAT podem ocorrer tanto

pela repressão gênica geral, quando há perda dessa atividade acetiltransferase ou por sua alta expressão, e ambos estão associados ao câncer. Alguns exemplos da desregulação das HAT foram relatados em diversos tumores como, mutação de HAT p300; hiperacetilação de histonas em amostras orais de pacientes com carcinoma hepatocelular e escamoso; translocação de genes HAT; acetilação de lisina dependente de ligante do receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2 (VEGFR2), e superexpressão de AIB-1, uma HAT coativadora de um receptor nuclear de hormônio (TRISCIUOGLIO et al., 2012; DI MARTILE et al., 2020; EICH et al., 2020). CPTH6, um derivado tiazólico, é um inibidor da enzima HAT Gcn5/PCAF que inibe a acetilação das histonas H3 e H4 (TRISCIUOGLIO et al., 2012). Foi demonstrado que CPTH6 apresenta capacidade de reduzir a acetilação das histonas em células cancerosas, inibir viabilidade celular e autorenovação de CTT, bem como diminuir o crescimento in vivo de tumores derivados de células-tronco de câncer de pulmão (DI MARTILE et al., 2016; DI MARTILE et al., 2020). Delphinidin, inibe a atividade da HAT p300/CBP, o que previne a hiperacetilação de p65, regulando a função nuclear de NF- κ B (SEONG et al., 2011). O acúmulo nuclear de NF κ B está associado com a resistência à cisplatina em carcinomas de cabeça e pescoço (ALMEIDA et al., 2013). MOZ-IN-3 é um inibidor da família MYST de lisina acetiltransferases, que em células primárias induz a saída do ciclo celular e senescência, e reduz os níveis de acetilação de H3K14ac e H3K9ac nos locais de início da transcrição de EZH2, Melk e E2f2 (BAELL et al., 2018). Todralazine, derivado da hidralazina, é um antagonista do receptor β_2 adrenérgico, que vem sendo explorado como opção para tratamento oncológico. Ele inibe a acetilação de histonas H4, de uma maneira dependente da dose (MURATA et al., 2007; SHEN et al., 2017).

A metilação de histonas em resíduos de lisina, pelas lisina metiltransferases (KMT) e arginina metiltransferases (PRMT), está associada tanto com repressão quanto com ativação gênica (PARK; HAN, 2019). As KMT adicionam radicais metil de s-adenosilmetionina (SAM) a lisinas, em caudas de histonas (MCCABE et al., 2017). A metilação da lisina pode existir em um estado mono-, di- ou trimetilado, implicando na complexidade dos mecanismos reguladores. Geralmente, a trimetilação da histona 3 lisina 4 (H3K4), H3K36 e H3K79 está correlacionada com ativação da expressão gênica, enquanto a di- e trimetilação de H3K9, H3K27 e H4K20 estão ligadas à repressão gênica (PARK; HAN, 2019). DS-437 é um inibidor da proteína arginina metil transferase (PRMT5), aumentada em um grande número de cânceres,

incluindo câncer de mama. DS-437 mostrou resultados significativos nos efeitos antitumorais da terapia direcionada ao anticorpo monoclonal anti-erbB2/neu em camundongos BALB/c portadores de tumores CT26Her2 (câncer de cólon com alta expressão de HER2) pela inibição da função Treg e indução da imunidade tumoral (NAGAI et al., 2019). Sinefungin é um nucleosídeo isolado de *Streptomyces griseolus* e *Streptomyces incarnatus*, conhecido por sua ação como inibidor competitivo de HMT dependentes de SAM (S-Adenosyl-L-methionine), exibindo atividade antiviral, antiparasitária e antitumoral. Foi demonstrado que Sinefungin reduziu o tumor nos pulmões em um modelo de câncer em camundongo (DECULTOT et al., 2020). Valemetostat, inibe a atividade de EZH1 e EZH2, inibindo acúmulo global de H3K27me3 que ocorre em vários tipos de câncer, incluindo a maioria dos linfomas malignos e vários tumores sólidos (HONMA et al., 2017; YAMAGISHI et al., 2019).

Padrões de metilação do DNA, alterados nas células cancerosas, levam à expressão gênica aberrante, promovendo hipometilação de regiões intergênicas, levando à ativação de elementos transponíveis e aumento da instabilidade genômica, ou à hipermetilação dos promotores de muitos genes supressores de tumor, resultando em perda da função supressora em células cancerosas e tumores (MCCABE; BRANDES; VERTINO, 2009). Os genomas de mamíferos codificam três DNA metiltransferases: as metiltransferases de novo DNMT3A e DNMT3B e a metiltransferase de manutenção DNMT1 (JURKOWSKA; JURKOWSKI; JELTSCH, 2011). SW155246 é um inibidor seletivo da enzima DNMT1 que inibiu a metilação global em células HeLa e também demonstrou a capacidade de demetilizar citosinas *in vivo* (KILGORE et al., 2013).

1.4.2. Alvos Terapêuticos das Epi-drogas: “Enzimas Erasers: Apagadoras”

As modificações pós-traducionais em histonas e modificações covalentes no DNA podem ser removidas por um grupo de enzimas conhecidas como apagadoras (BISWAS; RAO, 2018a; PARK; HAN, 2019). As enzimas HDAC removem o radical acetil da cauda das histonas, levando a um estado de condensação da cromatina e silenciamento gênico transcricional. HDAC interferem na transcrição de genes que regulam funções celulares essenciais, como regulação do ciclo celular, crescimento celular e apoptose e são frequentemente encontradas superexpressas em vários tipos de câncer, tornando-se portanto, um alvo importante para a terapia epigenética

(SHARMA; KELLY; JONES, 2010; AHN, 2018). Muitas moléculas inibidoras relatadas recentemente incluem HDAC como alvos epigenéticos (COSSÍO; ESTELLER; BERDASCO, 2020). 5-Nitroso-8-Quinololinol (5-N-8-Q), um inibidor pan-histona desacetilase, mostrou atividade antiproliferativa em cultura de tecidos de células de câncer de mama humano e ação antitumoral em camundongos portadores de células leucêmicas P388 e L1210 (MARTIROSYAN et al., 2006). Apicidin induz a acetilação das histonas H3 e H4, e foi observado inibindo proliferação celular, apoptose e autofagia em células CEC e apresentou atividades antitumorais em várias células tumorais humanas, como leucemia, câncer cervical, gástrico e células de câncer de mama (AHN; AHN; YOON, 2011). ITF-2357 inibiu a atividade de HDAC, interrompendo o crescimento de células tumorais de glioblastoma (GBM) ou promovendo apoptose, além de reduzir CTT e crescimento tumoral de GBM em modelos xenoenxertos em camundongos (MARAMPON et al., 2019). Mocetinostat, um inibidor de HDAC classe I, seletivo para HDAC 1 e 2, está implicado no silenciamento epigenético de genes reguladores imunológicos em células tumorais e imunes e apresentou atividade antitumoral em pacientes com malignidades hematológicas; *in vivo* induziu a parada do ciclo celular e a apoptose, além de inibir o crescimento tumoral (BRIERE et al., 2018; GRIVAS et al., 2019). Panobinostat é um pan-HDACi aprovado para tratamento de mieloma múltiplo, causando parada do ciclo celular e apoptose. (VAN VEGGEL; WESTERMAN; HAMBERG, 2018; PACHECO et al., 2021). SB939 promoveu inibição da proliferação, migração e invasão em várias células de câncer de mama humano por vias de sinalização EMT mediadas por IL-6 / STAT3 *in vitro* e *in vivo*, indicando que SB939 é um HDACi antimetastático promissor (CHEN et al., 2020b). Sulforaphane é um inibidor natural de HDAC, com atividades antitumorais no câncer de mama, pulmão, próstata e cólon (JUSTIN et al., 2020). Salermide é um inibidor das sirtuínas (SIRT), histonas desacetilases dependentes de coenzima NAD⁺. No câncer foi relatado o papel das SIRT na inativação da transcrição e modificações pós-traducional de proteínas supressoras de tumor como p53 e p73, na regulação do reparo do DNA, progressão do ciclo celular, estabilidade cromossômica e também no acúmulo de CTT (ROTILI et al., 2012; ZHOU et al., 2018; MU et al., 2019).

As histonas demetilases, especificamente as KDM (Lisina demetilases) são compostas por duas famílias de proteínas com base na organização de seus domínios catalíticos e no tipo de mecanismo oxidativo para a reação de demetilação. A família

KDM contendo o domínio Jumonji (JMJC) utiliza 2-oxoglutarato (2-OG; α -cetoglutarato) como cofator. KDM1A (LSD1, BHC110, AOF2) e KDM1B (LSD2) utilizam flavina adenina dinucleotídeo (FAD) como cofator para a atividade de demetilação (PARK; HAN, 2019). JMJD3 (KDM6B) é uma das histonas demetilases de H3K27me₃, relacionada com a regulação da tumorigênese, através da inibição da expressão do fator de transcrição OCT4, diminuindo CTT e crescimento tumoral em câncer de mama; sugerindo JMJD3 como um alvo potencial para superar a resistência mediada por CTT (BIGHETTI-TREVISAN et al., 2019). A lisina demetilase 5B (KDM5B) é responsável por apagar o marcador de ativação H3K4me_{2/3}. O papel de KDM5B é amplamente estudado em vários tipos de tumores, como câncer de mama, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular e câncer de pulmão. Em carcinomas de células escamosas orais (OSCC), o silenciamento dessa HDM atenua a formação de esferas e a expressão de marcadores de células-tronco e inibe a migração e invasão celular (ZHENG et al., 2019). A inibição de KDM5B por AS-8351 diminuiu proliferação, migração e EMT (transição epitélio-mesênquima) de câncer de mama (ZHANG et al., 2019). JIB-04, faz a inibição farmacológica das demetilases Jumonji; bloqueia a demetilação de H3K4me₃ *in vivo*, radiosensibiliza tumores e prolonga a sobrevivência de camundongos portadores de tumor (BAYO et al., 2018). A lisina demetilase 4C (KDM4C), está relacionada com a alteração da transcrição através da modificação nos padrões de metilação das histonas H3K36 e H3K9 (VOUGIOUKLAKIS; NAKAMURA; SALOURA, 2018). N-Oxalylglycine, um análogo de amida do α -cetoglutarato, foi relatado como inibidor de JMJD2C (KDM4C) em ensaio *in vitro*. Foi demonstrado que JMJD2C está associada ao crescimento do câncer escamoso esofágico, e JMJD2A, 2B e 2C estão envolvidas no câncer de próstata (HAMADA et al., 2009). PBIT é um inibidor das enzimas JARID1 B (também conhecidas como KDM5B). Foi descrito o papel de PBIT na modulação dos níveis de H3K4me₃ nas células e atenuação da proliferação de células tumorais de mama UACC-812 (SAYEGH et al., 2013).

A família de enzimas TET catalisam o processo de demetilação do DNA, reconhecendo a 5-metilcitosina e oxidando o grupo metil em 5-hidroximetilcitosina (5hmC) por meio de um mecanismo dependente de Fe (II) / alfa-cetoglutarato e tem sido implicada na desregulação epigenética de vários tipos de câncer. Foi avaliado o composto Bobcat339, que tem atividade inibidora contra TET1 e TET2. TET1 é frequentemente superexpressa em alguns tipos de câncer de mama e em leucemias (MLL) e estudos clínicos revelaram que as mutações TET2 são preditivas de melhora da sobrevida de pacientes com MLL (CHUA et al., 2019; WEIRATH et al., 2022).

1.4.3. Alvos Terapêuticos das Epi-drogas: “Enzimas Readers: Leitoras”

As modificações epigenéticas são reconhecidas e interpretadas por proteínas efetoras com domínios leitores para decifrar marcas epigenéticas específicas. São exemplos, proteínas de domínios de ligação a metil ou proteínas de bromodomínio extra terminal (BET). A proteína BET BRD4 é um regulador transcricional chave em vários tipos de câncer. Outras proteínas de bromodomínio BET incluem BRD2, BRD3 e BRDT (BISWAS; RAO, 2018b; COSSÍO; ESTELLER; BERDASCO, 2020). A inibição de BET se tornou um alvo terapêutico largamente utilizado no combate ao neuroblastoma de alto risco e em outros tipos de câncer (SHI et al., 2022). ABBV-075 é um inibidor pan-BET oral que induz a morte celular e regressão tumoral em xenoinxertos de leucemia mieloide aguda, mieloma múltiplo, câncer de pulmão, próstata e mama (PIHA-PAUL et al., 2019). I-BET151, um inibidor específico de BET, reduziu o crescimento de células de glioblastoma e meduloblastoma, pela diminuição da transcrição de oncogenes importantes para a proliferação dessas células (LONG et al., 2014).

1.5. Quimioterápicos com potencial de combinação com Epi-drogas para reversão da quimiorresistência

Possibilidades de sucesso pela terapia combinada com o uso de epi-drogas se destacam como uma estratégia promissora para superar a quimiorresistência envolvendo CTT em carcinoma oral (MOREL et al., 2019). Agentes quimioterápicos frequentemente utilizados na clínica são alternativas possíveis. Bortezomib, um inibidor de proteassoma, induz a parada do ciclo celular e a apoptose e tem sido aplicado em terapias para tratamento de mieloma múltiplo, alguns tipos de linfoma, bem como em outros tipos de câncer (TAN et al., 2019; MAHMOUDIAN et al., 2021). Carboplatin, um derivado de platina, apresenta atividade antitumoral ao interagir com bases de DNA, desencadeando muitos processos que levam à morte da célula cancerosa. É geralmente administrado em monoterapia ou em terapia combinada no tratamento de câncer de ovário, testículo, cabeça e pescoço e câncer de pulmão de pequenas células (SUN et al., 2022; SZEFLER; CZELEŃ, 2023). Disulfiram, um agente quelante de cobre e zinco e inibidor irreversível de aldeído desidrogenase (ALDH), já estabelecido como uma droga antialcoolismo, tem mostrado sua ação

antitumoral ao induzir apoptose de células cancerosas em linhagens celulares e inibir o crescimento de células tumorais em modelo animal. Recentemente, mostrou atividade na inibição de células-tronco tumorais de câncer pancreático expressando altos níveis de aldeído desidrogenase, bem como em células de câncer de mama triplo negativo. Sua administração como terapia combinada ou como uma molécula encapsulada em nanopartículas para aumento da eficácia tem sido considerada. (HAILE et al., 2012; NECHUSHTAN et al., 2015; WU et al., 2019; WANG et al., 2022). Erlotinib é um derivado da quinazolina que inibe seletiva e reversivelmente a atividade do receptor transmembrana tirosina quinase do fator de crescimento epidermal (EGFR), frequentemente expresso em muitos tumores epiteliais. As vias de sinalização do EGFR estão envolvidas na proliferação de células cancerosas, apoptose, angiogênese, invasão e metástases. Erlotinib tem sido utilizado como terapia no câncer de pulmão de células não pequenas e câncer pancreático avançado e também foi avaliado com várias outras terapias direcionadas (BARESCHINO et al., 2007; PIPERDI; PEREZ-SOLER, 2012; KELLY et al., 2015). Lovastatin, pertencente à classe química das estatinas, é um metabólito secundário isolado de fungos, com efeitos anti-inflamatório, neuroprotetor e antitumoral. Foi demonstrada sua atividade inibitória na proliferação celular e regulação de vias de sinalização, induzindo a apoptose e a interrupção do ciclo celular em diversos tipos de câncer, como mama, cólon, fígado e pulmão. Ainda, foi sugerido seu uso combinado com outras drogas quimioterápicas para redução da resistência às drogas das células tumorais, com o objetivo de potencializar o efeito terapêutico dessas drogas (XIE et al., 2021). Paclitaxel é um quimioterápico usado para tratamento de muitos tumores sólidos, incluindo câncer de mama, ovário, pulmão e cabeça e pescoço. Seu alvo molecular é a tubulina, que ao ser polimerizada, interfere na função dos microtúbulos na mitose, resultando em parada mitótica seguida de apoptose. Além disso, elimina células tumorais induzindo divisão multipolar aberrante e interferindo no transporte e sinalização celular dependente de microtúbulos (MEKHAIL, MARKMAN, 2002; SMITH; CHEN; XU, 2022).

Assim, uma investigação mais detalhada para selecionar os compostos mais efetivos para o sucesso dessas terapias, contribuirá significativamente para o progresso na busca pela remissão do tumor e melhora no prognóstico do câncer de cabeça e pescoço.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo desse trabalho foi explorar o uso de epi-drogas como estratégia terapêutica para eliminar células-tronco tumorais e reverter a quimiorresistência em linhagens celulares de tumores de cabeça e pescoço.

2.2. Objetivos Específicos

- Realizar uma triagem entre 23 epi-drogas e selecionar aquelas capazes de reduzir especificamente a população de células-tronco tumorais de linhagens celulares resistentes ao quimioterápico Cisplatina;
- Investigar se a resistência induzida pela Cisplatina promove um fenótipo de multirresistência a outros agentes quimioterápicos frequentemente utilizados na clínica, tais como, Bortezomib, Carboplatin, Disulfiram, Erlotinib, Lovastatin Paclitaxel;
- Selecionar um potencial agente quimioterápico para a utilização em combinação com as epi-drogas;
- Avaliar a eficiência das epi-drogas mais promissoras, como monoterapia ou terapia combinada, na agressividade (*in vitro* e *in vivo*), redução da população de células-tronco tumorais (*in vitro* e *in vivo*) e redução do volume tumoral (*in vivo*).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultivo Celular

As linhagens celulares de carcinoma de cabeça e pescoço, CAL27, SCC9 e SCC25 (linhagens imortalizadas derivadas de carcinoma espinocelular de língua de três pacientes do sexo masculino) foram obtidas previamente da American Type Culture Collection (ATCC) e cultivadas em Dulbecco's modified Eagle's Medium – DMEM (CAL27) e Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 – DMEM/F12 (SSC9 e SCC25) suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) e coquetel de antibióticos (ATB) e antimicóticos e mantidas em incubadora à temperatura controlada de 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Neste trabalho foram analisadas as linhagens celulares selvagens (WT), CAL27 WT, SCC9 WT e SCC25 WT e resistentes à Cisplatina, CAL27 CisR, SCC9 CisR e SCC25 CisR; resistência previamente estabelecida pelo nosso grupo de pesquisa, bem como suas subpopulações de CTT⁻ (células não-tronco ou células diferenciadas) e CTT⁺ (células-tronco tumorais), conforme descrito em Lima de Oliveira et al. (2022), (LIMA DE OLIVEIRA et al., 2022).

3.2. Estratégia terapêutica: Epi-Drogas e Agentes Quimioterápicos

Foram avaliadas 23 epi-drogas adquiridas da Cayman Chemical (Michigan – USA). A Tabela 1 descreve os grupos funcionais dos quais cada composto faz parte e os alvos epigenéticos inibidos por cada composto.

Tabela 1- Grupos funcionais das Epi-drogas e suas respectivas proteínas-alvo envolvidas nos processos epigenéticos

| WRITERS: "escritoras" - incluem histonas acetiltransferases (HAT), histonas metiltransferases (HMT) e DNA metiltransferases (DNMT) | |
|--|--------------------------------------|
| COMPOSTO | FUNÇÃO |
| CPTH6 (hydrobromide) | Inibidor HAT (KAT - Gcn5/pCAF) |
| Delphinidin (chloride) / Ephdine | inibidor HAT (p300/CBP) |
| MOZ-IN-3 / VM-8014 | inibidor HAT |
| Todalazine (hydrochloride) / Apirachol / Binazine / Ecarazine | Inibidor HAT |
| DS-437 | inibidor HMT (PRMT5/PRMT7) |
| Sinefungin/Antibiotic A9145 / Antibiotic 32232RP / RP32232 | inibidor HMT |
| Valemetostat / DS-3201b / (R)-OR-S2 | inibidor HMT (EZH1 e EZH2) |
| SW155246 | inibidor DNMT (DNMT1) |
| ERASERS: "apagadoras" - histonas desacetilases (HDAC), histonas demetilases (HDM) e DNA demetilases | |
| COMPOSTO | FUNÇÃO |
| 5-Nitroso-8-Quinolinol / Hydrom III / NSC3852 | inibidor HDAC |
| Apicidin / OSI2040 | inibidor HDAC |
| ITF2357 / Givinostat | inibidor HDAC (classe I e II) |
| Mocetinostat / MGCD0103 | inibidor HDAC (classe I -1 e 2) |
| Panobinostat / LBH-589 | inibidor HDAC |
| Salermide | inibidor HDAC (SIRT1 e SIRT2) |
| SB939 / Pracinostat | inibidor HDAC |
| Sulforaphane / SFN | inibidor HDAC (classe I e II) |
| AS-8351 / NCI51355 / NSC51355 | inibidor HDM |
| JIB-04 / JHDM Inhibitor VII / NSC693627 | Inibidor HDM (Jumonji) |
| N-Oxalylglycine / NOG | Inibidor HDM (JMJD2A, JMJD2C) |
| PBIT | inibidor HDM (família JARID1) |
| Bobcat 339 | Inibidor DNMT demetilase (TET1/TET2) |
| READERS: "leitoras" - leitores de acetil-lisina, que incluem proteínas contendo bromodomínio | |
| COMPOSTO | FUNÇÃO |
| ABBV-075 / Mivebresib | inibidor BET (BRD2, BRD4 e BRDT) |
| I-BET151 / GSK1210151A | inibidor BET (BRD2, BRD3 e BRD4) |

Fonte: ("Home | Cayman Chemical", [s.d.])

Foram avaliados seis agentes quimioterápicos adquiridos da Cayman Chemical (Michigan – USA), para seleção como estratégia da terapia combinada com as epi-drogas adquiridas. A Tabela 2 mostra cada fármaco e seu respectivo mecanismo de ação.

Tabela 2- Fármacos quimioterápicos para seleção como estratégia terapêutica combinada e seus respectivos mecanismos de ação

| QUIMIOTERÁPICOS | |
|-----------------|---|
| COMPOSTO | FUNÇÃO |
| Bortezomib | Inibidor de atividade do proteassoma |
| Carboplatin | Agente alquilante derivado de platina |
| Disulfiram | Inibidor de aldeído desidrogenase (ALDH) |
| Erlotinib | Inibidor de receptor tirosina-quinase |
| Lovastatin | Inibidor de proliferação celular – induz apoptose |
| Paclitaxel | Inibidor de mitose (se liga à proteína tubulina dos microtúbulos) |

Fonte: (“Home | Cayman Chemical”, [s.d.]

3.3. Ensaio de Viabilidade Celular

O ensaio foi realizado pelo método de redução do reagente Alamar Blue através da utilização do kit Alamar Blue™ Cell Viability Reagente (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA). Este teste quantifica a conversão por redução da resazurina (7-hidroxi-10-oxidofenoxazin-10-ium-3-ona), o ingrediente ativo do reagente Alamar Blue, de cor azul, em resofurina, um composto de cor rosa fluorescente. Ao mudar do estado oxidado para o reduzido é possível a quantificação através da realização da leitura colorimétrica e/ou fluorimétrica, com a absorbância espectrofotométrica nos comprimentos de onda de 570 e 600nm ou 540 e 630nm (RAMBERSAD, 2012).

As células foram semeadas em placas de 96 poços, com a densidade pré-definida de $2,5 \times 10^3$ células para a linhagem CAL27, $3,0 \times 10^3$ células para a linhagem SCC9; e $3,5 \times 10^3$ células para a linhagem SCC25. Cada condição foi feita em quadruplicata para as duas subpopulações CTT⁻ e CTT⁺ de cada linhagem e foram avaliadas 10 concentrações diferentes para o desenho da curva dose-resposta e determinação da dose IC₅₀ de cada inibidor; e 6 concentrações diferentes com a mesma finalidade para cada fármaco quimioterápico. A duração de cada experimento foi de 4 dias; no primeiro dia foi realizada a contagem e o plaqueamento das células

em placas 96 poços; no segundo dia foi feita a troca dos meios; no terceiro dia foi realizado o tratamento com o composto selecionado (por 24 horas) e no quarto dia foi feito o preparo do reagente Alamar Blue, adicionado 100µl da solução (90µl de células+meio:10µl de reagente Alamar Blue) por poço e incubado por 4h a 37°C protegido da luz. Os resultados foram obtidos através da média de três experimentos independentes utilizando o equipamento Epoch 2 Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments Inc, Winooski – USA) e utilização do programa Gen5TS205 para construção dos gráficos com as respectivas curvas dose-resposta IC₅₀ de cada epidroga (Tabela 3) e dos fármacos quimioterápicos (Tabela 4).

Tabela 3 - Lista de valores das curvas de concentração estabelecidas a partir do valor IC₅₀ de referência de cada inibidor, fornecido pelo fabricante/literatura, para desenho da curva dose-resposta das subpopulações CTT⁻ e CTT⁺ das linhagens CAL27, SCC9 e SCC25

| Inibidor | Concentrações (µM) | | | | | | | | | |
|-----------------|--------------------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|
| CPTH6 | 0 | 5,0 | 15,0 | 30,0 | 50,0 | 65,0 | 80,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 |
| Delphinidin | 0 | 5,0 | 15,0 | 30,0 | 45,0 | 60,0 | 75,0 | 90,0 | 105,0 | 120,0 |
| Moz- In-3 | 0 | 0,005 | 0,01 | 0,015 | 0,02 | 0,025 | 0,03 | 0,04 | 0,05 | 0,06 |
| Todralazine | 0 | 30,0 | 40,0 | 50,0 | 60,0 | 70,0 | 80,0 | 90,0 | 100,0 | 150,0 |
| DS-437 | 0 | 1,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 25,0 | 50,0 | 75,0 | 100,0 | 125,0 |
| Sinefugin | 0 | 0,1 | 0,5 | 1,0 | 2,5 | 5,0 | 7,5 | 10,0 | 15,0 | 20,0 |
| Valemetostat | 0 | 0,0005 | 0,001 | 0,0025 | 0,005 | 0,008 | 0,01 | 0,02 | 0,03 | 0,04 |
| SW155246 | 0 | 0,5 | 1,0 | 2,0 | 4,0 | 8,0 | 12,0 | 20,0 | 30,0 | 40,0 |
| 5-N-8-Q | 0 | 1,0 | 3,0 | 5,0 | 7,0 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | 30,0 | 40,0 |
| Apicidin | 0 | 0,0001 | 0,0003 | 0,0005 | 0,0007 | 0,0014 | 0,002 | 0,003 | 0,004 | 0,005 |
| ITF-2357 | 0 | 0,0005 | 0,001 | 0,003 | 0,01 | 0,02 | 0,03 | 0,04 | 0,05 | 0,06 |
| Mocetinostat | 0 | 0,1 | 0,3 | 1,0 | 2,0 | 3,0 | 5,0 | 7,5 | 10,0 | 15,0 |
| Panobinostat | 0 | 0,001 | 0,01 | 0,02 | 0,03 | 0,04 | 0,05 | 0,06 | 0,07 | 0,08 |
| Salermide | 0 | 10,0 | 20,0 | 30,0 | 35,0 | 40,0 | 45,0 | 50,0 | 55,0 | 60,0 |
| SB939 | 0 | 0,025 | 0,05 | 0,1 | 0,15 | 0,2 | 0,25 | 0,3 | 0,325 | 0,35 |
| Sulforaphane | 0 | 1,0 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 20,0 | 25,0 | 30,0 | 35,0 | 40,0 |
| AS-8351 | 0 | 0,5 | 1,0 | 2,5 | 5,0 | 7,5 | 10,0 | 12,5 | 15,0 | 20,0 |
| JIB-04 | 0 | 0,05 | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,8 | 1,0 | 1,2 | 1,5 |
| N-Oxalylglycine | 0 | 10,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 250,0 | 400,0 | 500,0 | 750,0 | 900,0 |
| PBIT | 0 | 1,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 25,0 | 50,0 | 75,0 | 100,0 | 125,0 |
| Bobcat 339 | 0 | 10,0 | 25,0 | 50,0 | 75,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 300,0 |
| ABBV-075 | 0 | 0,005 | 0,01 | 0,02 | 0,03 | 0,035 | 0,04 | 0,05 | 0,06 | 0,07 |
| I-BET-151 | 0 | 0,1 | 0,25 | 0,5 | 0,75 | 1,0 | 1,5 | 2,0 | 3,0 | 5,0 |

Fonte: Autor

Tabela 4 - Fármacos quimioterápicos para Ensaio de Viabilidade Celular com as respectivas concentrações estabelecidas a partir do valor IC₅₀ de referência fornecido pelo fabricante/literatura para desenho da curva dose-resposta das populações WT e CisR das linhagens CAL27, SCC9 e SCC25

| Quimioterápico | Concentrações (µM) | | | | | |
|----------------|--------------------|-------|------|-------|-------|-------|
| Bortezomib | 0 | 0,05 | 0,1 | 0,15 | 0,3 | 0,5 |
| Carboplatin | 0 | 10,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 |
| Disulfiram | 0 | 5,0 | 10,0 | 20,0 | 50,0 | 100,0 |
| Erlotinib | 0 | 1,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 20,0 |
| Lovastatin | 0 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 30,0 | 60,0 |
| Paclitaxel | 0 | 0,005 | 0,01 | 0,02 | 0,05 | 0,1 |

Fonte: Autor

3.4. Ensaio de Formação de Esferas

A capacidade de crescer sob condições de baixa adesão é uma das características das células-tronco tumorais (ALMEIDA et al., 2016). O Ensaio de Formação de Esferas permite quantificar alterações no acúmulo das células-tronco após administração de compostos químicos ou após mudanças na expressão de genes específicos promovidas após transfecção celular. Foram semeadas aproximadamente $1,5 \times 10^3$ células das linhagens CAL27 WT/CAL27 CisR e SCC9 WT/SCC9 CisR e $3,0 \times 10^3$ células da linhagem SCC25 WT/SCC25 CisR em ultra-low attachment 96-well plates (Corning, New York, USA) que permaneceram em cultura por 5 dias. Os tratamentos com as epi-drogas 5-N-8-Q, Mocetinostat, Salermide, N-Oxalylglycine e fármaco Disulfiram, foram realizados no momento do plaqueamento e permaneceram até o final do experimento. As concentrações utilizadas nos tratamentos para as epi-drogas e fármaco selecionados estão sumarizadas na Tabela 5. As esferas foram fotografadas e contadas em microscópio de luz Nikon Eclipse Ti (NIKON - Melville, NY). A realização do experimento se deu em triplicata.

Tabela 5 - Epi-drogas e fármaco quimioterápico selecionados e suas respectivas concentrações para Ensaio de Formação de Esferas para as populações WT e CisR das linhagens CAL27, SCC9 e SCC25

| Inibidor | Concentrações (μM) | | | |
|-----------------|---------------------------------|------|------|-------|
| 5-N-8-Q | 0 | 5,0 | 15,0 | 30,0 |
| Mocetinostat | 0 | 5,0 | 15,0 | 30,0 |
| Salermide | 0 | 5,0 | 15,0 | 30,0 |
| N-Oxalylglycine | 0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 |
| Disulfiram | 0 | 5,0 | 10,0 | 20,0 |

Fonte: Autor

3.5. Citometria de Fluxo

A população de células-tronco tumorais das linhagens CAL27 CisR, SCC9 CisR e SCC25 CisR 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 anti-CD44-APC (BD Biosciences). Cerca de 2×10^6 células foram utilizadas para cada condição. Os tratamentos foram realizados por 24 horas, previamente ao experimento, com o fármaco selecionado, Disulfiram, em monoterapia; com as epi-drogas 5-N-8-Q, Mocetinostat e Salermide em

monoterapia e em tratamento combinado com Disulfiram e para a epi-droga N-Oxalyglycine em monoterapia, nas condições descritas na Tabela 6. 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 remoção do excesso da enzima, as células foram incubadas com o anticorpo anti-CD44-APC à concentração de 1:200 em tampão Aldefluor, por 25 minutos a 4°C sob agitação constante. Em seguida, as células foram ressuspensas em tampão Aldefluor e analisadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA), no laboratório multiusuário de Imagens de Alta Resolução e Estudos Celulares (LIAREC) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP). As amostras foram preparadas em triplicata para cada uma das linhagens de células (GUIMARÃES et al., 2016).

Tabela 6 - Epi-drogas e fármaco quimioterápico selecionados e suas respectivas concentrações utilizadas para Ensaio de Citometria de Fluxo em populações CisR das linhagens CAL27, SCC9 e SCC25

| Inibidor | Concentração (µM) |
|----------------|-------------------|
| 5-N-8-Q | 15,0 |
| Mocetinostat | 5,0 |
| Salermide | 10,0 |
| N-Oxalyglycine | 25,0 |
| Disulfiram | 10,0 |

Fonte: Autor

3.6. Modelo *in vivo* - Xenoenxerto

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA-FCFRP) aprovou esse experimento (nº N°19.1.1070.60.6). Camundongos machos Nude BALBc, foram adquiridos do biotério central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (SP, Brasil) e foram devidamente alojados, tratados e mantidos em instalações e condições adequadas durante todo o experimento. Aproximadamente 1×10^6 células da linhagem CAL27 CisR foram injetadas para induzir a formação de tumores nos lados superiores direito e esquerdo no dorso dos camundongos. As células preparadas foram injetadas utilizando agulhas calibre 0,25mm, em volume igual a 100µL em região subcutânea do dorso (lados esquerdo e direito) dos animais. Para sedação, foram administradas

quetamina e xilasina (doses: 70mg/Kg e 10mg/Kg, respectivamente) previamente à injeção das células tumorais. Para acompanhar o estado dos animais, os mesmos foram examinados e pesados a cada dois dias. Após 18 dias da injeção das células, quando o crescimento do tumor se tornou perceptível, os animais foram divididos aleatoriamente em nove grupos com três camundongos por grupo para o tratamento com as epi-drogas e fármaco selecionados, em monoterapia e terapia combinada, por oito ciclos, conforme condições constantes na Tabela 7. Todas as doses descritas foram injetadas por via intraperitoneal. Após o primeiro ciclo, a sequência se deu com sete ciclos de tratamento com intervalos de três dias.

Tabela 7 - Estratégia de tratamento em monoterapia e tratamento combinado para o modelo de Xenoenxerto *in vivo*

| Ciclos | Grupos (n=3)/Tratamento | Dosagem |
|----------|-------------------------------|------------------|
| 1º ao 8º | 1 - Controle | Sem tratamento |
| | 2 - Disulfiram | 40mg/kg |
| | 3 - 5-N-8-Q | 8mg/kg |
| | 4 - 5-N-8-Q + Disulfiram | 8mg/kg + 40mg/kg |
| | 5 - Mocetinostat | 2mg/kg |
| | 6 - Mocetinostat + Disulfiram | 2mg/kg + 40mg/kg |
| | 7 - Salermide | 5mg/kg |
| | 8 - Salermide + Disulfiram | 5mg/kg + 40mg/kg |
| | 9 - N- Oxalyglycine | 1,8mg/kg |

Fonte: Autor

Os animais foram examinados diariamente e a cada dois dias foram pesados, seguido de contenção (sem anestesia) para obtenção das dimensões dos tumores no dorso bilateral, com o auxílio de um paquímetro. Os animais foram monitorados até o tumor atingir o volume de 2 cm³ ou ocorrer ulceração do tumor. Após 29 dias do início dos tratamentos, os camundongos foram primeiramente anestesiados e, na sequência, realizada a eutanásia. Os tecidos tumorais foram removidos, medidos, pesados e processados para posterior análise histológica e imunomarcção. O volume dos tumores foi expresso em mm³ e calculado de acordo com a fórmula (comprimento x largura²)/2 (JENSEN et al., 2008).

3.7. Análise Histológica – Hematoxilina & Eosina (HE)

Para a coloração com HE (Hematoxilina e Eosina), as lâminas foram incubadas em xileno por 1 hora, seguido de hidratação com gradiente de etanol (100%, 95% e 70%) e água deionizada. As lâminas foram mergulhadas em solução de eosina por 5 minutos, e hematoxilina por aproximadamente 1 minuto.

Posteriormente, foi realizada a desidratação das lâminas com gradiente de etanol (70%, 95% e 100%), e xileno (respectivamente). As lâminas foram montadas utilizando Eukitt Quick-hardening mounting medium (Sigma Aldrich) e avaliadas e quantificadas em microscópio óptico.

Para a análise do tecido tumoral corado com HE, foram utilizados os critérios do sistema de classificação de Bryne (WAGNER et al., 2017). Esse sistema gera valores (scores) para cada critério morfológico analisado, classificando-os de 1 a 4 e ao final é realizada a soma dos scores obtidos em cada condição; sendo o score 16 o valor máximo e associado ao grau de diferenciação histopatológica no fronte de invasão tumoral; sendo os valores de 4 a 8 bem diferenciados, de 8 a 12 moderadamente diferenciados e 12 a 16 pouco diferenciados (VEDAM; BOAZ; NATARAJAN, 2014). Quatro critérios morfológicos foram analisados para a obtenção do score de Bryne, sendo eles, o nível de queratinização, pleomorfismo, invasividade e resposta do hospedeiro (inflamação presente) (Tabela 8).

Tabela 8 - Sistema de classificação de alterações morfológicas de tecido tumoral de carcinoma espinocelular oral

| Parâmetro Morfológico | Sistema de Classificação por Score | | | |
|-----------------------|------------------------------------|----------|-----------|---------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Queratinização | Muito | Moderado | Pouco | Sem |
| Pleomorfismo | Pouco | Moderado | Abundante | Extremo |
| Invasividade | Pouco | Moderado | Abundante | Extremo |
| Inflamação | Muito | Moderado | Pouco | Sem |

Fonte: VEDAM; BOAZ; NATARAJAN, 2014

3.8. Imuno-Histoquímica (IHQ)

Os tecidos tumorais obtidos do experimento in vivo foram processados e os cortes histológicos foram preparados no Laboratório Multiusuário de Histotécnica (LMH) no Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP).

Para o ensaio de imuno-histoquímica, as lâminas foram desparafinizadas em estufa a 65°C, em seguida incubadas em xileno por 1 hora e hidratadas conforme a sequência: lavagens em etanol (100%, 95% e 70%) e água deionizada. Na sequência, as lâminas foram incubadas em tampão citrato pH 6.0. Posteriormente foi realizado o bloqueio das peroxidases endógenas com solução de metanol e peróxido de

hidrogênio e adicionado nos tecidos solução de bloqueio (VECTASTAIN Universal Quick kit - Vector Laboratories) por 1 hora. Os anticorpos primários HDAC1 (1:100), SIRT1 (1:20), KDM4C (1:10), SLUG (1:40), OCT4 (1:50), SOX2 (1:50), H3K36ac (1:100), H4K5ac (1:1000), H3K9me2 (1:200) e H3K36me3 (1:100), foram incubados overnight. No dia seguinte, foi adicionado o anticorpo secundário Biotinylated Pan-specific Universal Antibody (VECTASTAIN Universal Quick kit - Vector Laboratories) por 30 minutos. Após secagem das lâminas, foi adicionado Streptavidin/Peroxidase Complex (VECTASTAIN Universal Quick kit) nos tecidos por 5 minutos e, em seguida, adicionada uma solução contendo Impact DAB reagent 1 e Impact DAB diluent (IMPACT DAB - Vector Laboratories) por 2 minutos nos tecidos. Na sequência, foi realizada a contra-coloração com hematoxilina, e desidratação das lâminas com etanol e xileno. As lâminas foram montadas utilizando Eukitt Quick-hardening mounting medium (Sigma Aldrich) e foram tiradas 5 fotos de cada condição no microscópio trinocular para campo claro e fluorescência modelo DMLB, marca Leica Microsystems Wetzlar GmbH (Germany) equipado com câmera DFC300FX e software de aquisição e análise de imagens LAS versão 4.1.0 no aumento de 20x, no LAB 3D BIO – Laboratório Multiusuário para Análises de Imagens Tridimensionais de Tecidos Biológicos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP).

3.9. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software *GraphPad Prism* (*GraphPad Software, version 5.0*). O valor de IC_{50} para as 23 epi-drogas e os 6 fármacos quimioterápicos foi determinado utilizando a regressão não linear de log (inibidor) vs resposta normalizada. Para os ensaios de citometria de fluxo, foram realizadas as análises *one-way ANOVA* com pós-teste de *Dunnett's Multiple Comparison Test*. Já para as análises do ensaio de esferas e volume e peso referentes ao crescimento tumoral por xenoinxerto, a comparação entre dois grupos foi realizada pelo teste *T de Student*; e para a comparação entre 3 ou mais grupos foi utilizado *two-way ANOVA* com pós-teste de *Bonferroni's multiple comparisons test*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos (sendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

4. RESULTADOS

4.1. Determinação da dose resposta IC_{50} para as Epi-drogas e agentes quimioterápicos para terapia combinada e identificação da sensibilidade das CTT^+ em comparação às CTT^- por Ensaio de Viabilidade Celular

Foi avaliado o efeito inibitório de 23 epi-drogas nas subpopulações de células-tronco tumorais (CTT^+) e células não-tronco ou diferenciadas (CTT^-) das três linhagens quimiorresistentes CAL27 CisR, SCC9 CisR e SCC25 CisR, bem como para os 06 agentes quimioterápicos nas populações de células tumorais selvagens (WT) e células tumorais resistentes à Cisplatina (CisR) das respectivas linhagens. A sensibilidade das linhagens de células cancerosas aos compostos foi avaliada através do ensaio de viabilidade celular utilizando o reagente Alamar Blue e o tratamento com os inibidores foi realizado nas duas populações, com o objetivo de selecionar compostos atuando com mais especificidade na redução das células-tronco tumorais, afetando o mínimo possível a população de células tumorais diferenciadas. O valor IC_{50} expresso, refere-se à concentração do fármaco necessária para eliminar cinquenta por cento das células tumorais in vitro (BAG; GHORAI, 2016). Nossos resultados mostraram quanto às epi-drogas que, considerando as três linhagens, obtivemos os valores IC_{50} conforme Tabela 9 abaixo:

Tabela 9 - Valores IC₅₀ referentes às linhagens celulares quimiorresistentes CAL27, SSC9 e SCC25 e suas subpopulações CTT⁻ e CTT⁺ para as 23 epi-drogas (Ñ.conv.=não convergente)

| Inibidor | IC ₅₀ Ref. | CAL27 | | SCC9 | | SCC25 | |
|-----------------|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | | IC ₅₀ CTT ⁻ | IC ₅₀ CTT ⁺ | IC ₅₀ CTT ⁻ | IC ₅₀ CTT ⁺ | IC ₅₀ CTT ⁻ | IC ₅₀ CTT ⁺ |
| CPTH6 | 100,0µM | 38,29µM | 45,49µM | 8,63µM | 13,43µM | 46,62µM | 32,83µM |
| DELPHINIDIN | 30,0µM | 41,58µM | 59,77µM | 253,60µM | 401,60µM | 323,00µM | 436,70µM |
| MOZ-IN-3 | 0,018µM | 0,09µM | 0,07µM | 0,12µM | 0,12µM | 0,05µM | 0,08µM |
| TODRALAZINE | 15,0µM | 1023,0µM | 1997,0µM | 557,6µM | 368,6µM | 957,60µM | 952,60µM |
| DS-437 | 10,0 µM | 24,71µM | 21,09µM | 108,40µM | 123,20µM | 95,75µM | 119,50µM |
| SINEFUGIN | 5,0 µM | 153,90µM | 291,10µM | 115,30µM | 260,10µM | 37,94µM | 52,25µM |
| VALEMETOSTAT | 0,005µM | 0,13µM | 0,18µM | 0,30µM | 0,35µM | 0,31µM | 0,37µM |
| SW155246 | 1,2 µM | 25,37µM | 35,24µM | 37,77µM | 34,45µM | 26,86µM | 47,59µM |
| 5-N-8-Q | 10,0µM | 28,89µM | 20,55µM | 23,30µM | 16,52µM | 23,42µM | 22,59µM |
| APICIDIN | 0,0007µM | 0,003µM | 0,004µM | 0,014µM | 0,011µM | 0,01µM | 0,02µM |
| ITF-2357 | 0,012µM | 0,24µM | 0,23µM | 0,47µM | 0,20µM | Ñ Conv. | 0,99µM |
| MOCETINOSTAT | 0,3 µM | 3,96µM | 3,72µM | 14,61µM | 13,0µM | 21,03µM | 14,87µM |
| PANOBINOSTAT | 0,04µM | 0,30µM | 0,19µM | 0,29µM | 0,43µM | 0,39µM | 0,69µM |
| SALERMIDE | 20,0µM | 11,64µM | 10,96µM | 30,04µM | 22,46µM | 14,71µM | 14,49µM |
| SB939 | 0,077µM | 4,73µM | 3,01µM | 5,08µM | 1,28µM | 0,86µM | 1,57µM |
| SULFORAPHANE | 15,0µM | 29,72µM | 24,45µM | 69,92µM | 58,45µM | 46,94µM | 98,62µM |
| AS-8351 | 2,5 µM | 31,55µM | 26,78µM | 29,53µM | 27,10µM | 57,14µM | 71,56µM |
| JIB-04 | 0,435µM | 1,46µM | 2,62µM | 0,91µM | 1,33µM | 2,13µM | 3,36µM |
| N-OXALYLGLYCINE | 250,0 µM | 114,60µM | 89,06µM | 154,70µM | 146,60µM | 110,80µM | 124,60µM |
| PBIT | 6,0µM | 108,8µM | 88,61µM | 31,60µM | 33,23µM | 31,71µM | 33,42µM |
| BOBCAT 339 | 50,0µM | 145,1µM | 147,7µM | 841,4µM | 1426,0µM | 872,7µM | 1700,0µM |
| ABBV-075 | 0,031µM | 0,09µM | 0,08µM | 0,24µM | 0,25µM | 0,41µM | 0,63µM |
| I-BET-151 | 0,5 µM | 18,05µM | 16,68µM | 9,92µM | 8,98µM | 47,35µM | 58,04µM |

Fonte: Autor

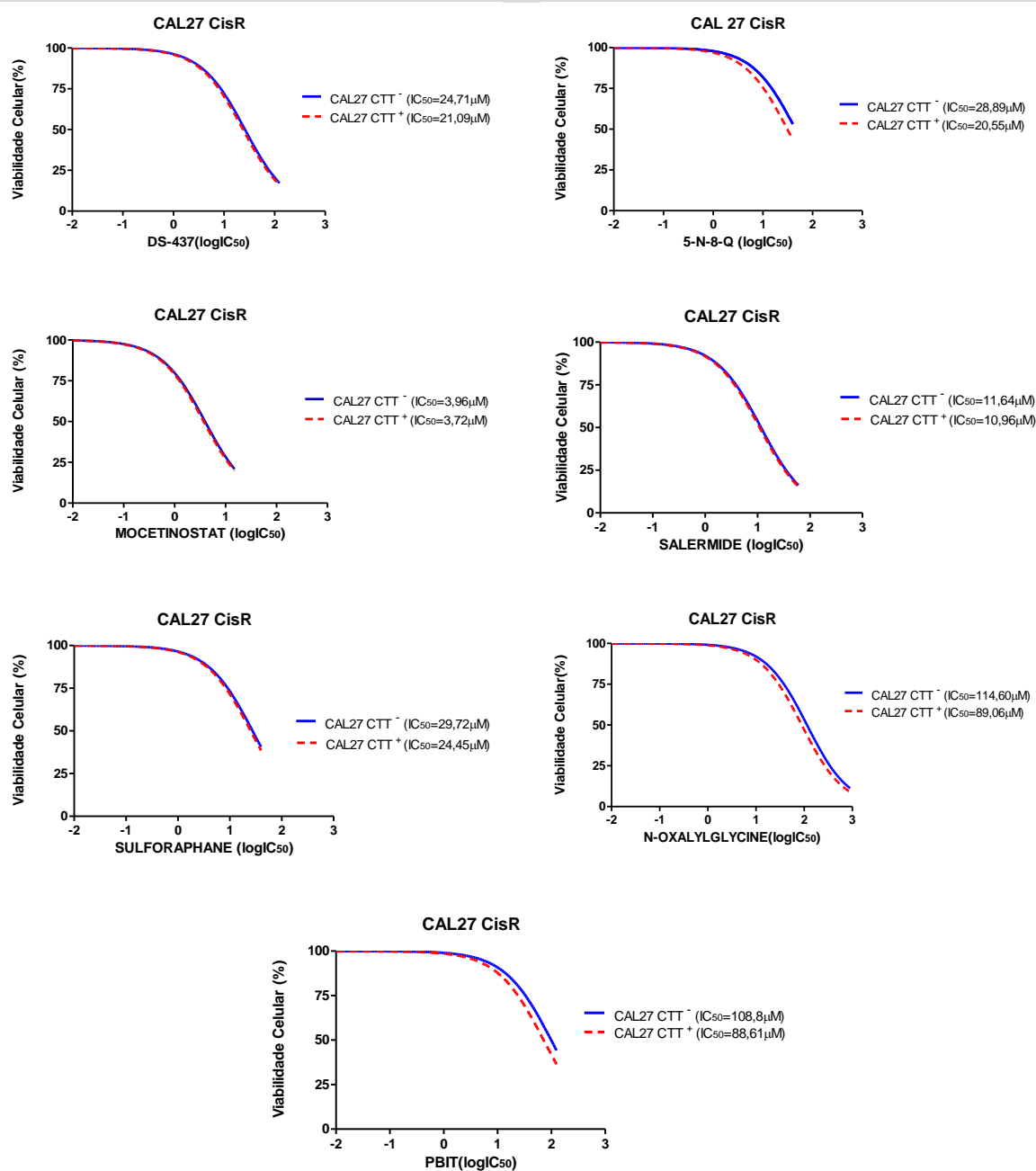
Para a seleção das epi-drogas com respostas mais favoráveis, foi considerada a sensibilidade de pelo menos duas, dentre as três linhagens celulares através de dois critérios: linhagens CTT⁺ apresentando valores IC₅₀ próximos ao valor de referência ou dentro do intervalo das concentrações utilizadas para a construção da curva foram considerados quimiossensíveis, enquanto IC₅₀ maior que as concentrações pré-estabelecidas foram considerados quimiorresistentes. O segundo critério levou em consideração maior sensibilidade da população CTT⁺, expresso pela apresentação de menor valor IC₅₀, quando comparado à sua respectiva população CTT⁻.

Observamos para a linhagem CAL27, que a população CTT⁺ foi mais sensível aos inibidores DS-437 (inibidor de Arginina Metiltransferase); 5-N-8-Q, Mocetinostat, Salermide, Sulforaphane (inibidores de HDAC) e N-Oxalylglycine e PBIT (inibidores de Histona Demetilase - HDM), quando comparada à população CTT⁻ (Tabela 9 e Figura 2A). Os inibidores CPTH6, Delphinidin, Moz-In-3, Todralazine, Sinefugin,

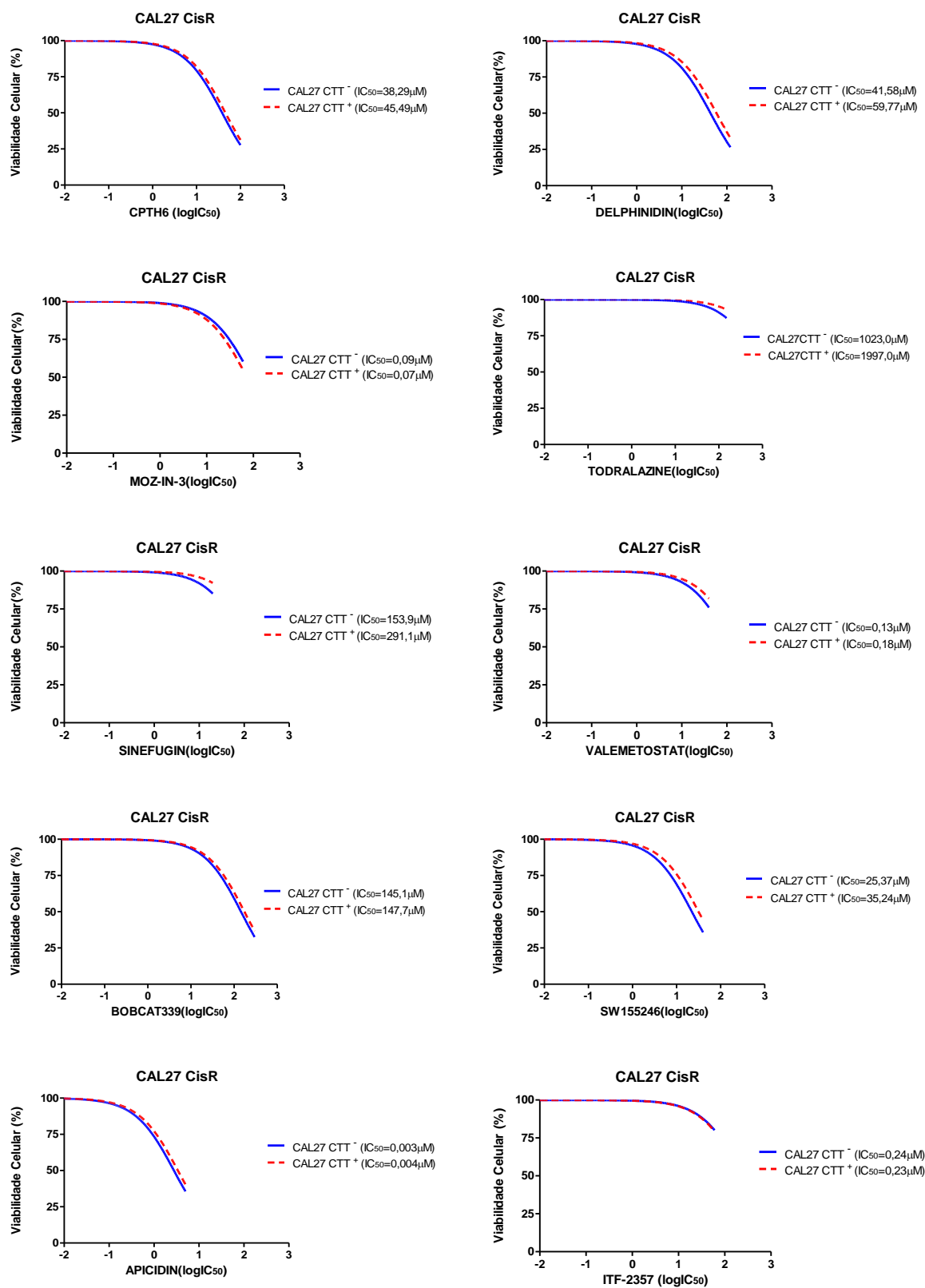
Valemetostat, SW155246, Apicidin, ITF-2357, Panobinostat, SB939, AS-8351, JIB-04, Bobcat 339, ABBV-075 e I-BET-151 não atenderam aos critérios estabelecidos não se mostrando eficazes para o estabelecimento de uma dose IC_{50} que mantivesse a viabilidade celular para essa linhagem (Tabela 9 e Figura 2B).

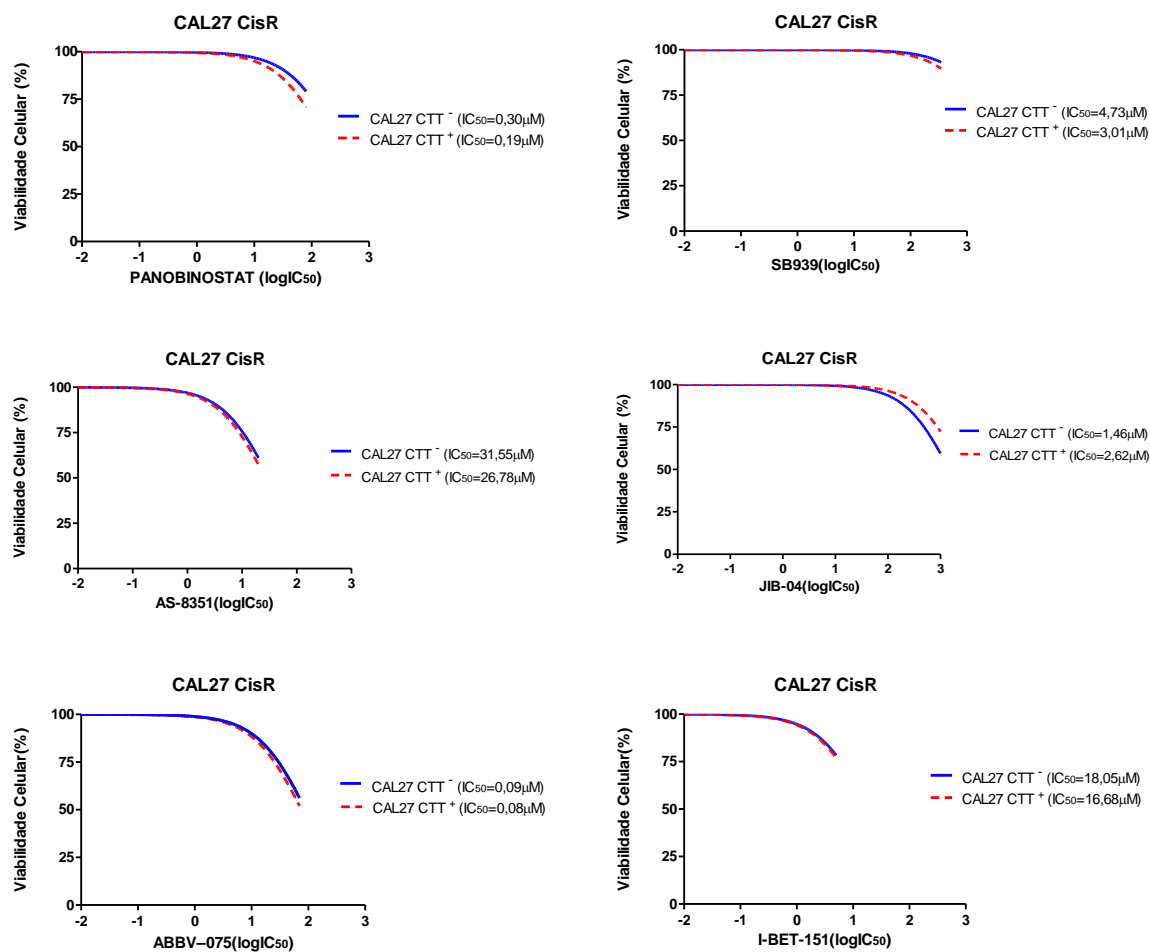
Figura 2 - Determinação do IC_{50} para screening dos inibidores 5-Nitroso-8-Quinolinol, ABBV-075, Apicidin, AS-8351, Bobcat 339, CPTH6, Delphinidin, DS-437, I-BET-151, ITF-2357, JIB-04, Mocetinostat, Moz-In-3, N-Oxalyglycine, Panobinostat, PBIT, Salermide, SB939, Sinefugin, Sulforaphane, SW155246, Todralazine e Valemetostat nas subpopulações CTT⁻ (células diferenciadas) e CTT⁺ (células tronco-tumorais) da linhagem CAL27 CisR

A



B



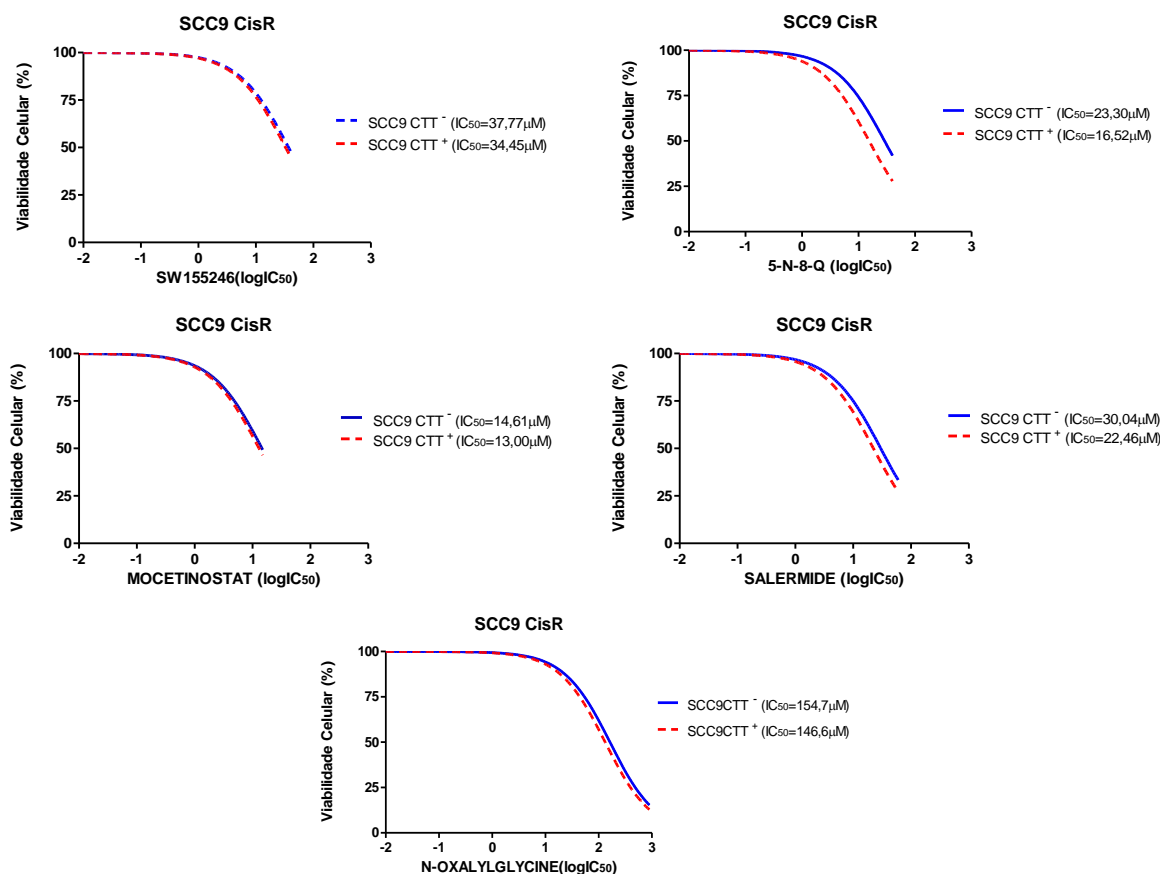


Fonte: Autor

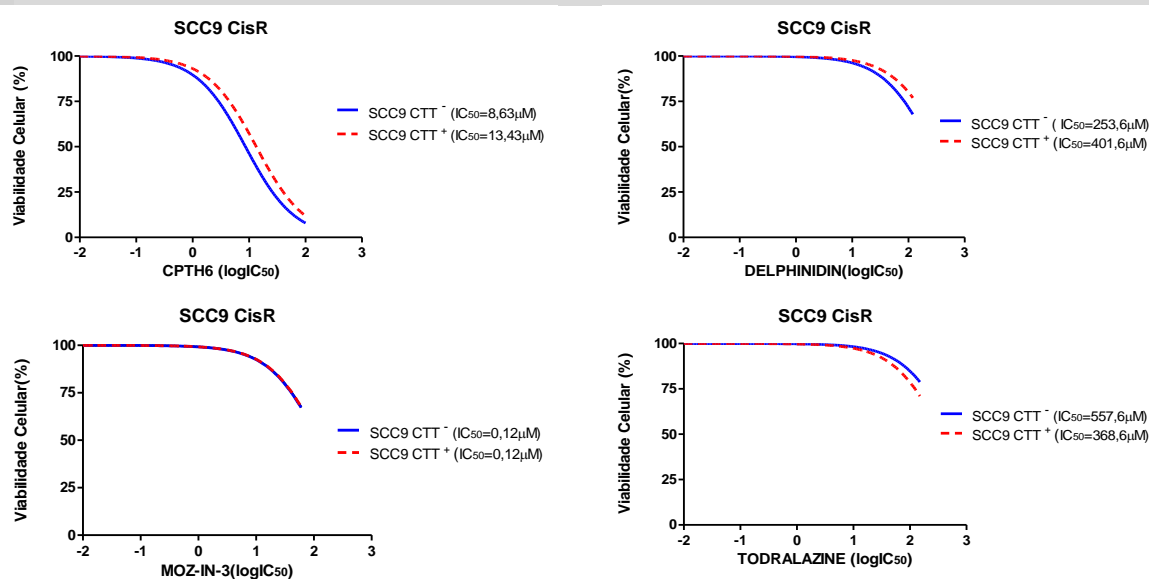
Resultados favoráveis para a linhagem celular SCC9, atendendo aos critérios estabelecidos, ocorreram para os inibidores SW155246 (DNMTi), 5-Nitroso-8-Quinolinol, Mocetinostat, Salermide (HDACi) e N-Oxalyglycine (HDMi) (Tabela 9 e Figura 3A). Os inibidores CPTH6, Delphinidin, Moz-In-3, Todralazine, DS-437, Sinefugin, Valemetostat, Apicidin, ITF-2357, Panobinostat, SB939, Sulforaphane, AS-8351, JIB-04, PBIT, Bobcat 339, ABBV-075 e I-BET-151 não atenderam ao critério estabelecido, não se mostrando eficazes para o estabelecimento de uma dose IC₅₀ que mantivesse a viabilidade celular para essa linhagem (Tabela 9 e Figura 3B).

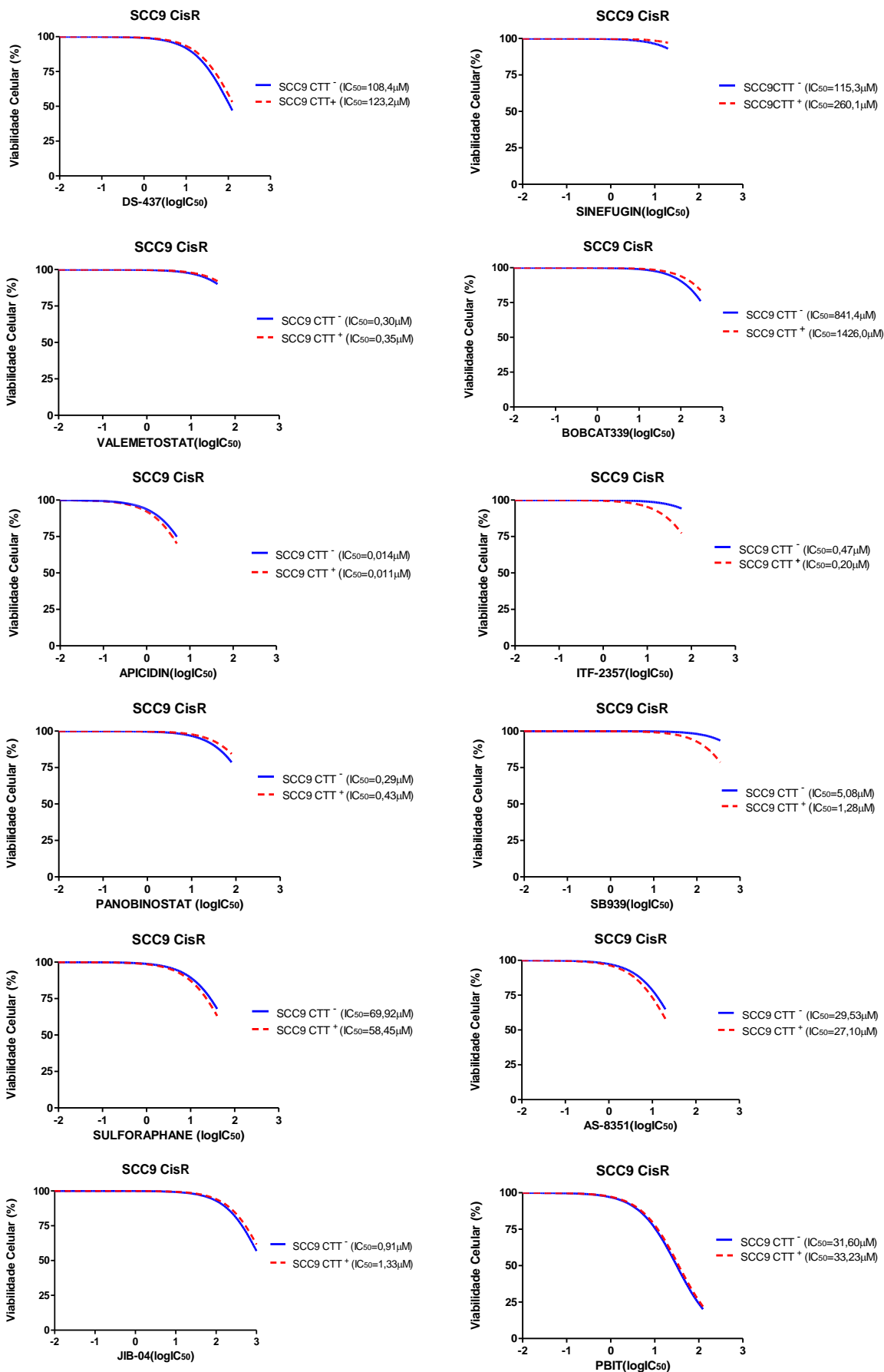
Figura 3 - Determinação do IC₅₀ para screening dos inibidores 5-Nitroso-8-Quinolinol, ABBV-075, Apicidin, AS-8351, Bobcat 339, CPTH6, Delphinidin, DS-437, I-BET-151, ITF-2357, JIB-04, Mocetinosat, Moz-In-3, N-Oxalylglycine, Panobinostat, PBIT, Salermide, SB939, Sinefungin, Sulforaphane, SW155246, Todralazine e Valemetostat nas subpopulações CTT⁻ (células diferenciadas) e CTT⁺ (células tronco-tumorais) da linhagem SCC9 CisR

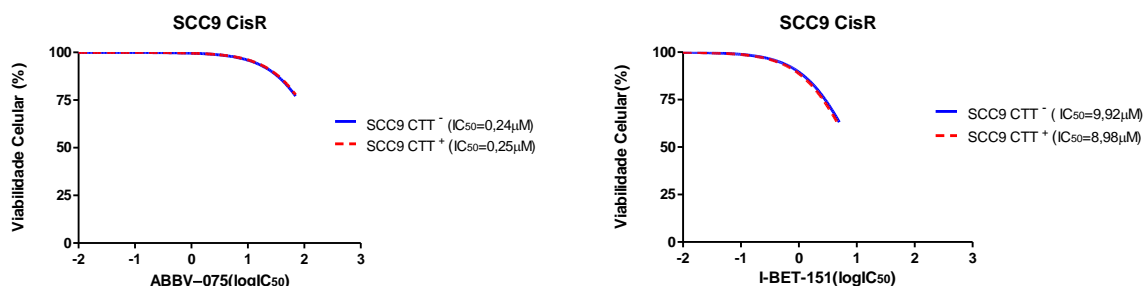
A



B



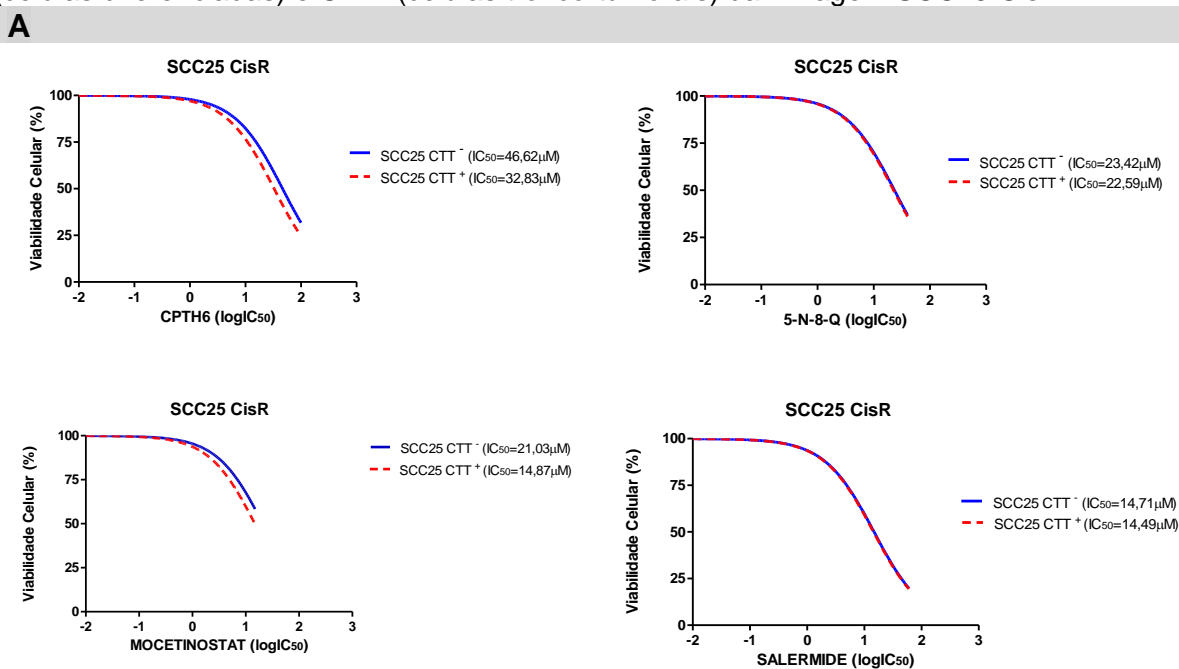




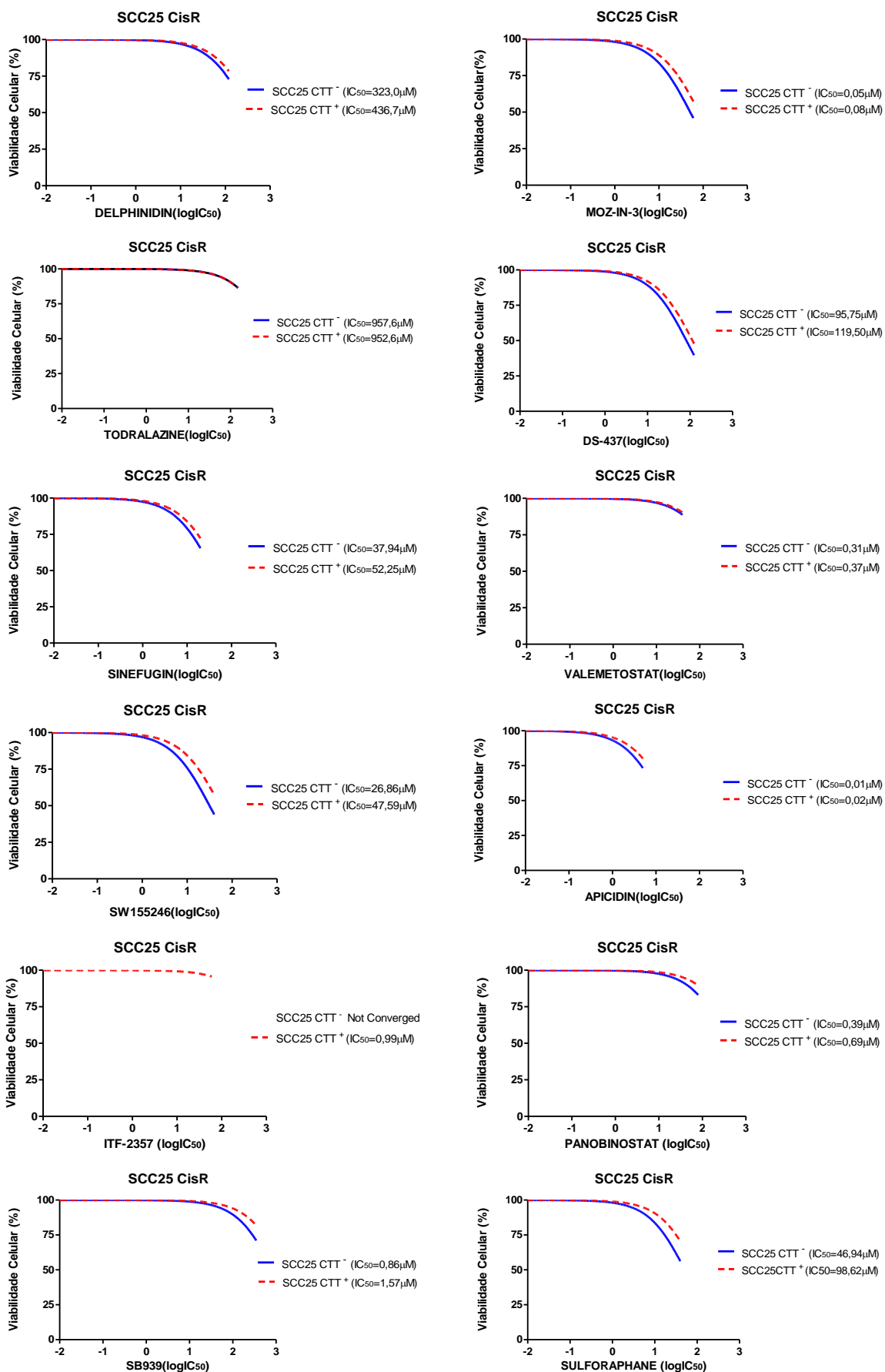
Fonte: Autor

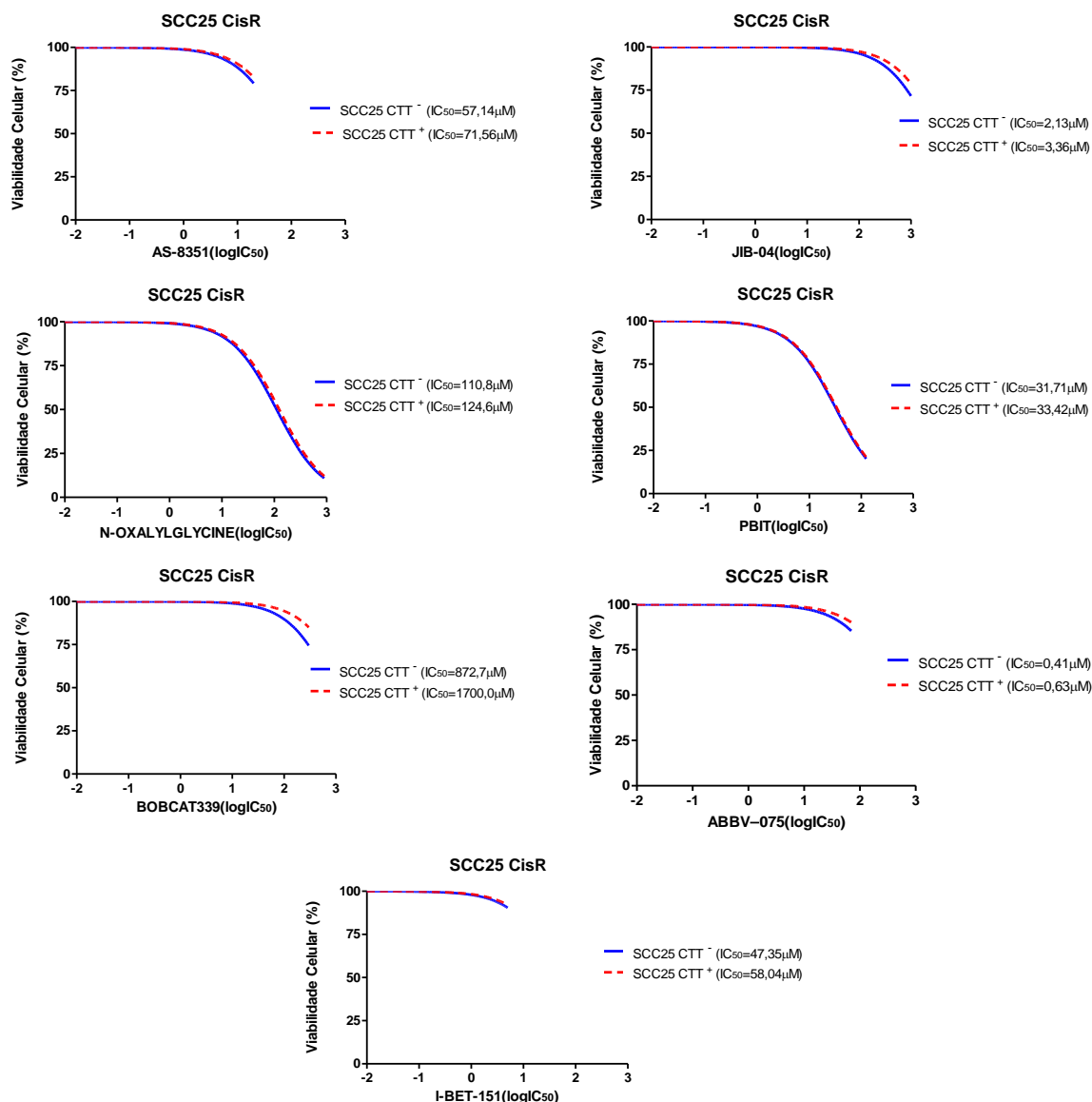
A linhagem celular SCC25 apresentou valores para estabelecimento de uma dose IC_{50} quimiossensibilizante para um menor número de inibidores, com resultados favoráveis apenas para os inibidores CPTH6 (HATi), 5-Nitroso-8-Quinolinol, Mocetinostat e Salermide (HDACi), sinalizando um padrão de maior resistência desse tipo celular às epi-drogas avaliadas (Tabela 9 e Figura 4A). Da mesma forma, os inibidores Delphinidin, Moz-In-3, Todralazine, DS-437, Sinefugin, Valemetostat, SW155246, Apicidin, ITF-2357, Panobinostat, SB939, Sulforaphane, AS-8351, JIB-04, N-Oxalylglycine, PBIT, Bobcat 339, ABBV-075 e I-BET-151 não atenderam aos critérios estabelecidos (Tabela 9 e Figura 4B).

Figura 4 - Determinação do IC_{50} para screening dos inibidores 5-Nitroso-8-Quinolinol, ABBV-075, Apicidin, AS-8351, Bobcat 339, CPTH6, Delphinidin, DS-437, I-BET-151, ITF-2357, JIB-04, Mocetinostat, Moz-In-3, N-Oxalylglycine, Panobinostat, PBIT, Salermide, SB939, Sinefugin, Sulforaphane, SW155246, Todralazine e Valemetostat nas subpopulações CTT⁻ (células diferenciadas) e CTT⁺ (células tronco-tumorais) da linhagem SCC25 CisR



B





Fonte: Autor

O estabelecimento de uma dose que afetou a viabilidade celular nas 3 linhagens estudadas, com maior sensibilidade na subpopulação CTT⁺, ocorreu para os inibidores 5-Nitroso-8-Quinolinol, Mocetinostat e Salermide, todos inibidores de Histonas desacetilases. Para a epi-droga 5-Nitroso-8-Quinolinol, a subpopulação CTT⁻ da linhagem CAL27 (IC_{50} CTT⁻=28,89 μM) foi mais resistente do que as subpopulações CTT⁻ das linhagens SCC9 (IC_{50} CTT⁻=23,30 μM) e SCC25 (IC_{50} CTT⁻=23,42 μM). Em relação à subpopulação CTT⁺, a maior resistência ocorreu na linhagem SCC25 (IC_{50} CTT⁺=22,59 μM) em comparação com as linhagens CAL27 (IC_{50} CTT⁺=20,55 μM) e SCC9 (IC_{50} CTT⁺=16,52 μM). Para a epi-droga Mocetinostat, houve maior resistência da subpopulação CTT⁻ da linhagem SCC25 (IC_{50} CTT⁻=21,03 μM) em comparação com as subpopulações CTT⁻ das linhagens CAL27 (IC_{50}

CTT⁻=3,96 μ M) e SCC9 (IC₅₀ CTT⁻=14,61 μ M). Em relação à subpopulação CTT⁺, a maior resistência também ocorreu na linhagem SCC25 (IC₅₀ CTT⁺=14,87 μ M) em comparação com as linhagens CAL27 (IC₅₀ CTT⁺=3,72 μ M) e SCC9 (IC₅₀ CTT⁺=13,0 μ M). Para a epi-droga Salermide, foi possível observar maior resistência para a linhagem SCC9, tanto para a subpopulação CTT⁻ quanto para a subpopulação CTT⁺ (SCC9: IC₅₀ CTT⁻=30,04 μ M e IC₅₀ CTT⁺=22,46 μ M) em comparação com as linhagens CAL27 (IC₅₀ CTT⁻=11,64 μ M e IC₅₀ CTT⁺=10,96 μ M) e SCC25 (IC₅₀ CTT⁻=14,71 μ M e IC₅₀ CTT⁺=14,49 μ M).

Tendo em vista, o objetivo do experimento *in vivo* em avaliar a eficiência das epi-drogas mais promissoras, a epi-droga N-Oxalyglycine - um inibidor de Histona Desacetilase - também foi selecionada, pois atendeu ao critério estabelecido de pelo menos duas linhagens atendendo aos parâmetros de quimiossensibilidade. Para a epi-droga N-Oxalyglycine, entre as 3 linhagens, houve maior resistência da subpopulação CTT⁻ da linhagem SCC9 (IC₅₀ CTT⁻=154,70 μ M) em comparação com as subpopulações CTT⁻ das linhagens CAL27 (IC₅₀ CTT⁻=114,60 μ M) e SCC25 (IC₅₀ CTT⁻=110,80 μ M). Em relação à subpopulação CTT⁺, os maiores valores de IC₅₀ também ocorreram na linhagem SCC9 (IC₅₀ CTT⁺=146,60 μ M) em comparação com as linhagens CAL27 (IC₅₀ CTT⁺=89,06 μ M) e SCC25 (IC₅₀ CTT⁺=124,6 μ M), sendo que, essa última teve valor IC₅₀ das CTT⁺ maior que sua correspondente CTT⁻, indicando maior resistência dessa subpopulação, nessa linhagem (Tabela 9).

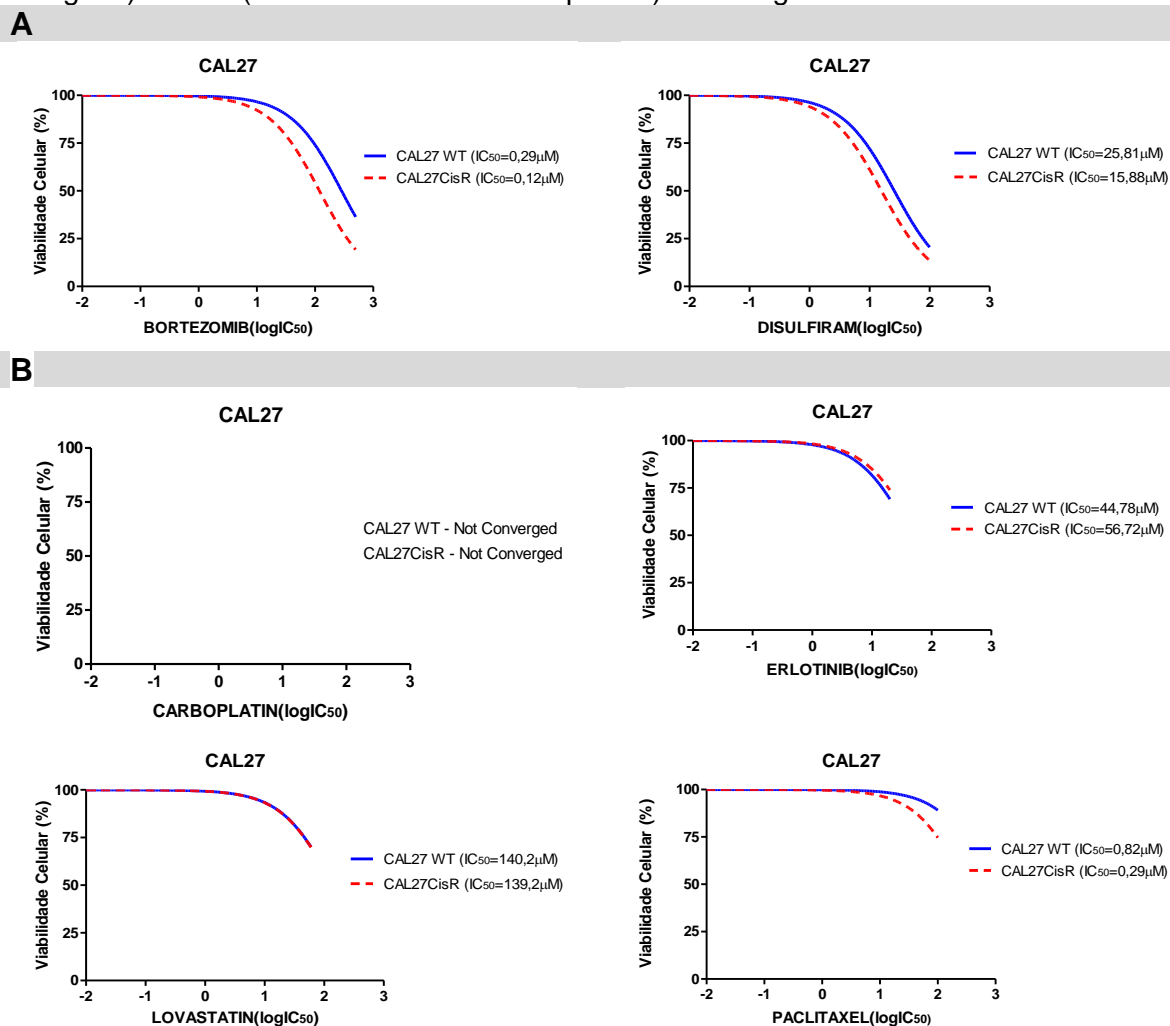
Sensibilidade das linhagens celulares resistentes à Cisplatina (CisR) aos fármacos quimioterápicos foi determinada por comparação com células selvagens (WT). Linhagens de células tumorais apresentando IC₅₀ maior do que as concentrações pré-estabelecidas foram consideradas resistentes, enquanto valores IC₅₀ similares ou constantes no intervalo das concentrações foram considerados quimiossensíveis. Para serem candidatos à terapia combinada, foi estabelecido o critério de maior sensibilidade da população CisR, expressa pela apresentação de menor valor IC₅₀, quando comparado à sua respectiva população WT, nas três linhagens. Para a linhagem CAL27, obtivemos resultados favoráveis para os inibidores Bortezomib e Disulfiram (Tabela10 e Figura 5A). Os inibidores Carboplatin, Erlotinib, Lovastatin e Paclitaxel não atenderam aos critérios estabelecidos (Tabela10 e Figura 5B).

Tabela 10 - Valores IC₅₀ referentes às linhagens celulares CAL27, SCC9 e SCC25 e suas populações WT e CisR tratadas com fármacos quimioterápicos visando a terapia combinada (Ñ Conv.= não convergente)

| QUIMIOTERÁPICO | IC ₅₀ Ref. | CAL27 | | SCC9 | | SCC25 | |
|----------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|
| | | IC ₅₀ WT | IC ₅₀ CisR | IC ₅₀ WT | IC ₅₀ CisR | IC ₅₀ WT | IC ₅₀ CisR |
| BORTEZOMIB | 0,1µM | 0,29µM | 0,12µM | 0,17µM | 0,10µM | 0,23µM | 0,29µM |
| CARBOPLATIN | 10,0µM | Ñ Conv. | Ñ Conv. | Ñ Conv. | 852,8µM | Ñ Conv. | Ñ Conv. |
| DISULFIRAM | 20,0 µM | 25,81µM | 15,88µM | 9,09µM | 0,63µM | 55,41µM | 39,46µM |
| ERLOTINIB | 2,5µM | 44,78µM | 56,72µM | 10,40µM | 0,48µM | 22,35µM | 59,53µM |
| LOVASTATIN | 15,0µM | 140,2µM | 139,2µM | 69,58µM | 35,77µM | 146,6µM | 161,0µM |
| PACLITAXEL | 0,01µM | 0,82µM | 0,29µM | 0,11µM | 0,20µM | 1,49µM | 0,50µM |

Fonte: Autor

Figura 5 - Determinação do IC₅₀ para screening dos fármacos quimioterápicos Bortezomib, Carboplatin, Disulfiram, Erlotinib, Lovastatin e Paclitaxel nas populações WT (células selvagens) e CisR (células resistentes à Cisplatina) da linhagem CAL27



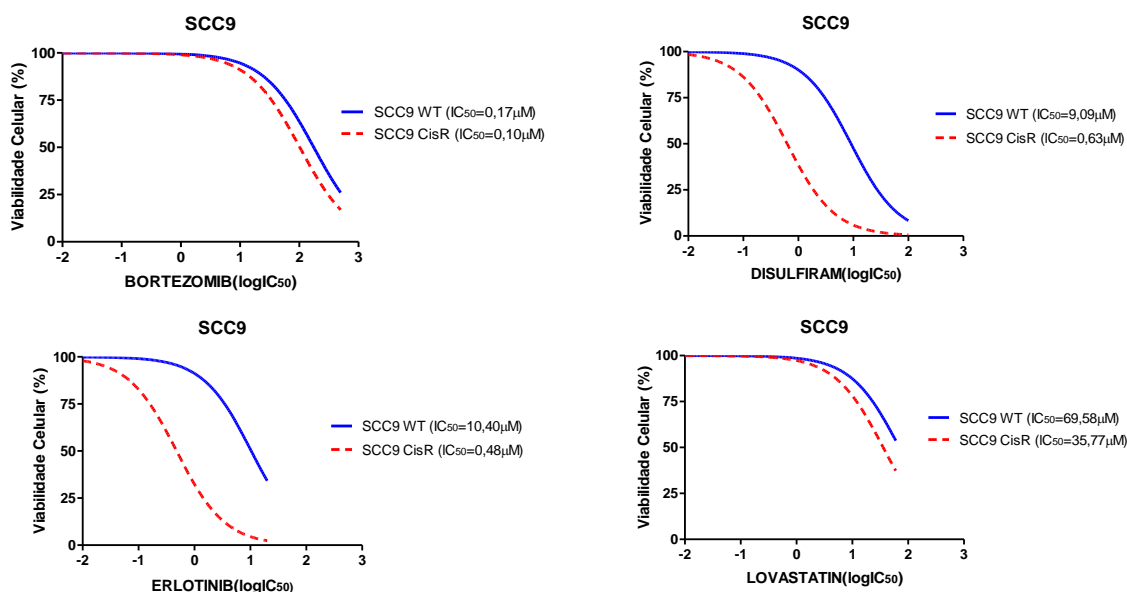
Fonte: Autor

Resultados favoráveis para a linhagem celular SCC9 ocorreram para os inibidores Bortezomib, Disulfiram, Erlotinib e Lovastatin (Tabela 10 e Figura 6A). Os

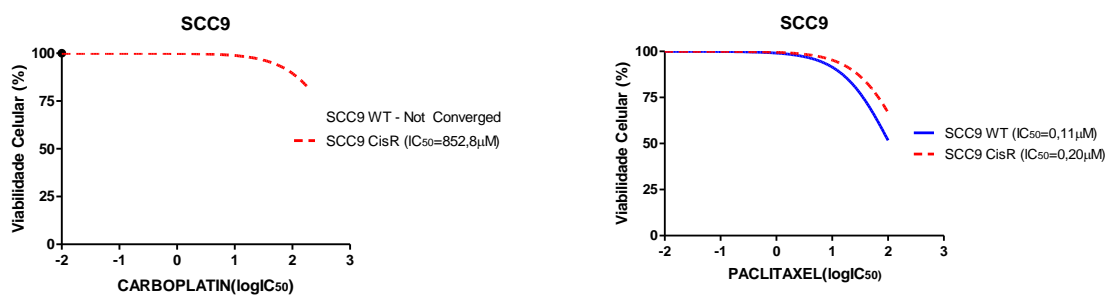
inibidores Carboplatin e Paclitaxel não se mostraram eficazes para estabelecimento de uma dose IC_{50} que afetasse a viabilidade celular para essa linhagem (Tabela 10 e Figura 6B).

Figura 6 - Determinação do IC_{50} para screening dos fármacos quimioterápicos Bortezomib, Carboplatin, Disulfiram, Erlotinib, Lovastatin e Paclitaxel nas populações WT (células selvagens) e CisR (células resistentes à Cisplatina) da linhagem SCC9

A



B

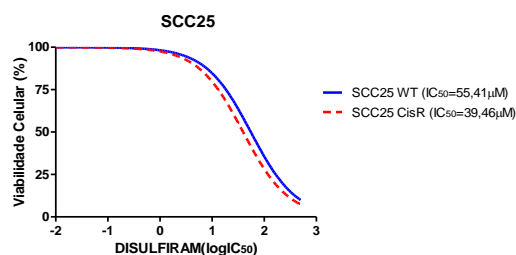


Fonte: Autor

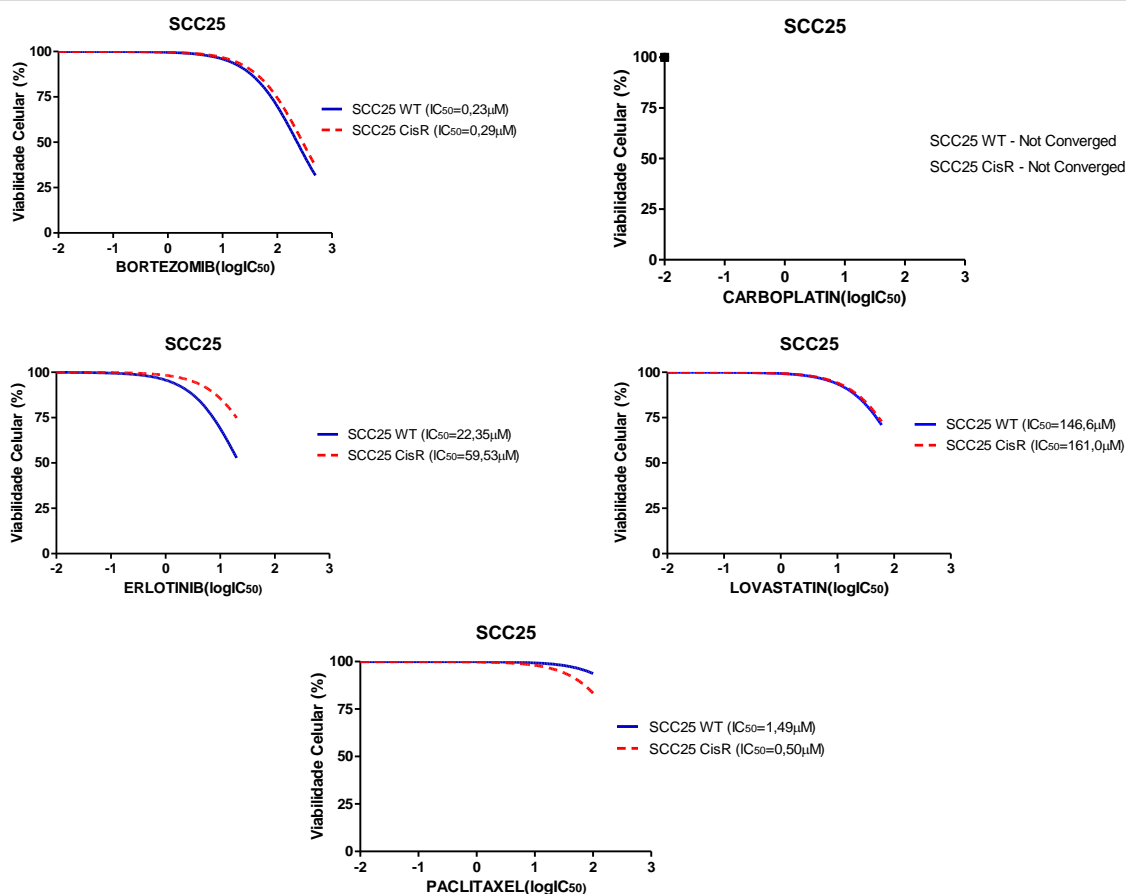
Para a linhagem SCC25, obtivemos resultados favoráveis apenas para o inibidor Disulfiram (Tabela 10 e Figura 7A). Os inibidores Bortezomib, Carboplatin, Erlotinib, Lovastatin e Paclitaxel não se mostraram eficazes para estabelecimento de uma dose IC_{50} que afetasse a viabilidade celular para essa linhagem (Tabela 10 e Figura 7B).

Figura 7 - Determinação do IC_{50} para screening dos fármacos quimioterápicos Bortezomib, Carboplatin, Disulfiram, Erlotinib, Lovastatin e Paclitaxel nas populações WT (células selvagens) e CisR (células resistentes à Cisplatina) da linhagem SCC25

A



B



Fonte: Autor

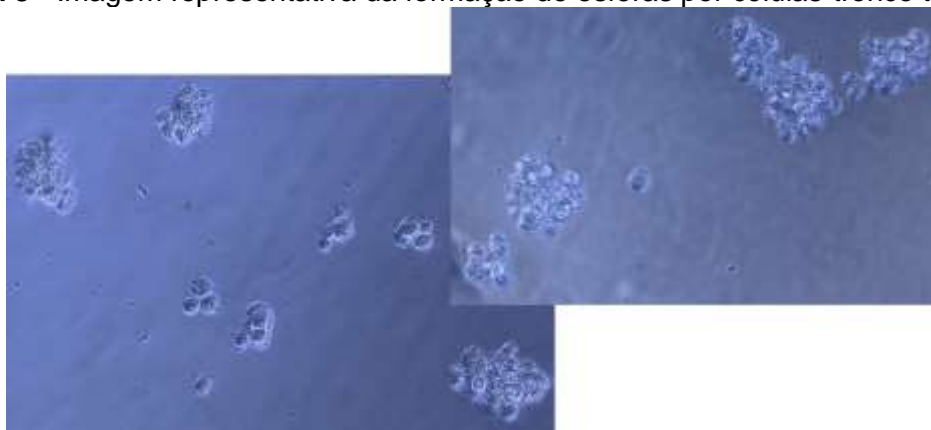
Dessa forma, o estabelecimento de uma dose quimiossensibilizante, que manteve a viabilidade celular nas 3 linhagens avaliadas ocorreu apenas para o inibidor Disulfiram.

4.2. Determinação da dose inibitória das Epi-drogas e Disulfiram para as células-tronco tumorais das linhagens selvagens e resistentes à Cisplatina

Para os inibidores 5-Nitroso-8-Quinolinol, Mocetinostat, Salermide, N-Oxalylglycine e Disulfiram foram estabelecidas as doses inibitórias específicas para

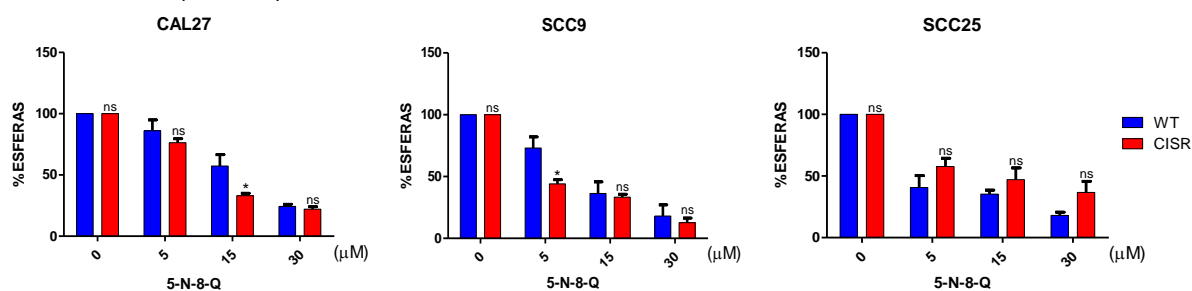
as CTT das linhagens selvagem e resistente, através do ensaio de esferas (Figura 8), para CAL27, SCC9 e SCC25, conforme Figuras 9 a 13.

Figura 8 - Imagem representativa da formação de esferas por células-tronco tumorais



Fonte: Autor

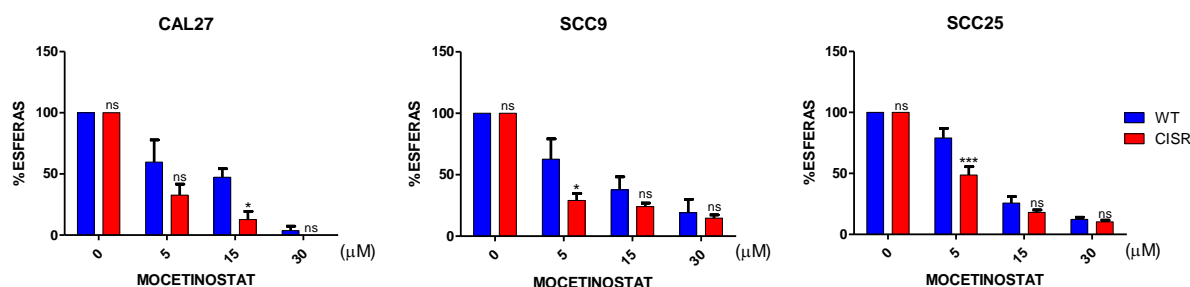
Figura 9 - Análise de viabilidade celular nas populações WT (células selvagens) e CisR (células resistentes à Cisplatina) das linhagens celulares CAL27, SCC9 e SCC25 tratadas com 5-N-8-Q (HDACi)



Fonte: Autor

De acordo com a Figura 9, foi observado para as 3 linhagens, que o tratamento com 5-N-8-Q reduziu a população de células-tronco tumorais tanto no fenótipo WT quanto no CisR em todas as concentrações com redução mais significativa na concentração de 30 μM. De maneira geral, redução estatisticamente significativa do fenótipo CisR, ocorreu na concentração de 15 μM, quando comparado ao fenótipo WT para a linhagem CAL27 ($p < 0,05$) e na concentração de 5 μM para a linhagem SCC9 ($p < 0,05$). Nas demais concentrações, o fenótipo CisR também se mostrou mais sensível ao tratamento quando comparado ao fenótipo WT, mas sem diferença estatística. E o contrário foi observado na linhagem SCC25. A dose inibitória IC_{50} estabelecida foi de 15 μM, pois foi possível observar redução significativa em 50% da população celular tronco em comparação ao controle (sem tratamento).

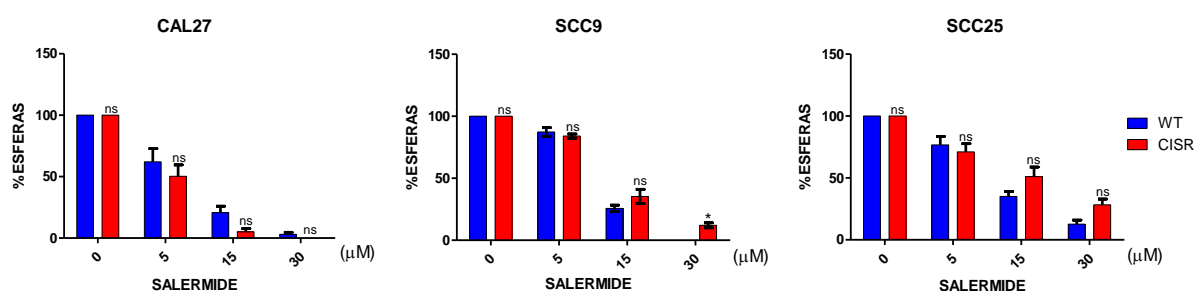
Figura 10 - Análise de viabilidade celular nas populações WT (células selvagens) e CisR (células resistentes à Cisplatina) das linhagens celulares CAL27, SCC9 e SCC25 tratadas com Mocetinoestat (HDACi)



Fonte: Autor

A Figura 10 indicou que para as 3 linhagens, quando tratadas com o inibidor Mocetinoestat, houve redução da população de células-tronco tumorais tanto no fenótipo WT quanto no CisR em todas as concentrações, com redução mais significativa na concentração de 30 μM. O fenótipo CisR se mostrou mais sensível ao tratamento quando comparado ao fenótipo WT, com redução estatisticamente significativa na concentração de 15 μM para CAL27 ($p < 0,05$) e 5 μM para SCC9 ($p < 0,05$) e SCC25 ($p < 0,001$). A dose inibitória IC_{50} estabelecida foi de 5 μM para o inibidor Mocetinoestat, pois foi possível observar redução significativa em 50% da população celular tronco quando comparada com o grupo controle.

Figura 11 - Análise de viabilidade celular nas populações WT (células selvagens) e CisR (células resistentes à Cisplatina) das linhagens celulares CAL27, SCC9 e SCC25 tratadas com Salermide (HDACi - SIRT1/2)

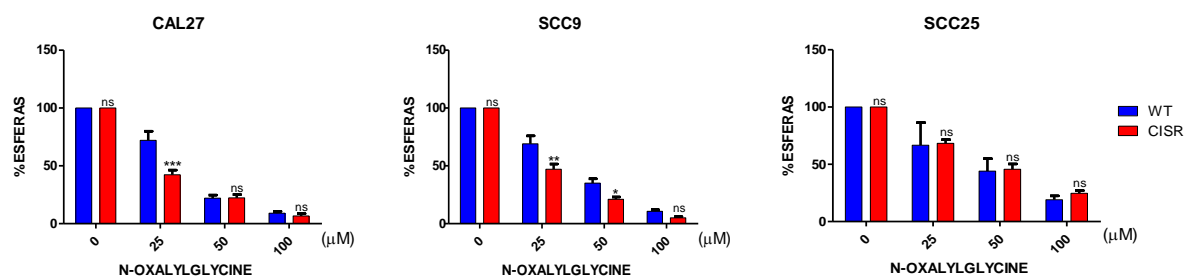


Fonte: Autor

De acordo com os dados obtidos na Figura 11, foi observado que para as 3 linhagens, o inibidor Salermide reduziu a população de células-tronco tumorais tanto no fenótipo WT quanto no CisR em todas as concentrações, com redução mais

significativa na concentração de 30 μM . Nessa concentração, para a linhagem CAL27, o fenótipo CisR se mostrou mais sensível quando comparado ao fenótipo WT, e o contrário foi observado nas linhagens SCC9 e SCC25. CAL27 CisR mostrou maior sensibilidade quando comparado ao fenótipo WT em todas as concentrações (5, 15 e 30 μM), sem diferença estatística. Já para SCC9, não houve redução na população tronco do fenótipo CisR quando comparado ao WT nas concentrações 15 μM e 30 μM . Houve maior resistência para o fenótipo CisR na concentração de 30 μM ($p < 0,05$). O mesmo padrão foi observado para a linhagem SCC25, mas sem diferença estatística. A dose inibitória IC_{50} estabelecida a partir da análise dos resultados dos dados da Figura 11, foi de 10 μM para o inibidor Salermide, pois foi possível observar redução em 50% da população celular tronco entre as concentrações de 5 e 15 μM das linhagens WT e CisR, em comparação ao controle.

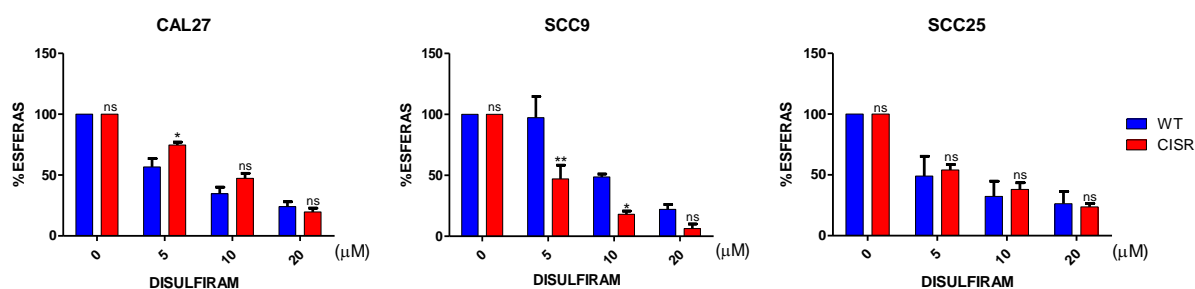
Figura 12 - Análise de viabilidade celular nas populações WT (células selvagens) e CisR (células resistentes à Cisplatina) das linhagens celulares CAL27, SCC9 e SCC25 tratadas com N-Oxalyglycine (HDMI)



Fonte: Autor

A Figura 12, indicou que nas 3 linhagens CAL27, SCC9 e SCC25 o inibidor N-Oxalyglycine promoveu a redução da população de células-tronco tumorais tanto no fenótipo WT quanto no CisR em todas as concentrações, com redução mais significativa na concentração de 100 μM . De maneira geral, nas linhagens CAL27 e SCC9 o fenótipo CisR se mostrou mais sensível ao tratamento quando comparado ao fenótipo WT, em todas as concentrações, sendo estatisticamente significante nas concentrações de 25 μM para CAL27 ($p < 0,001$) e 25 μM ($p < 0,01$) e 50 μM ($p < 0,05$) para SCC9. Já para SCC25, ocorreu o oposto; maior resistência para o fenótipo CisR quando comparado ao WT em todas as concentrações, sem diferença estatística. A dose inibitória IC_{50} estabelecida foi de 25 μM , pois foi possível observar redução significativa em 50% da população celular tronco a partir dessa concentração.

Figura 13 - Análise de viabilidade celular nas populações WT (células selvagens) e CisR (células resistentes à Cisplatina) das linhagens celulares CAL27, SCC9 e SCC25 tratadas com Disulfiram (ALDH_i)



Fonte: Autor

De acordo com a Figura 13, foi observado que o inibidor Disulfiram reduziu a população de células-tronco tumorais tanto no fenótipo WT quanto no CisR, em todas as concentrações nas 3 linhagens, CAL27, SCC9 e SCC25, com redução mais significativa na concentração de 20 μM. De maneira geral, na linhagem CAL27 CisR houve aumento da população tronco em comparação à WT, nas concentrações de 5 e 10 μM, com diferença estatística em 5 μM ($p < 0,05$). Para a linhagem SCC9, houve maior sensibilidade do fenótipo CisR em todas as concentrações, com diferença estatística nas concentrações de 5 μM ($p < 0,01$) e 10 μM ($p < 0,05$). A linhagem SCC25 se comportou como a linhagem CAL27, mas não houve diferença significativa entre os fenótipos WT e CisR em nenhuma das concentrações. A dose inibitória IC₅₀ estabelecida foi de 10 μM para o inibidor Disulfiram, pois foi possível observar redução significativa em 50% da população celular tronco a partir dessa concentração.

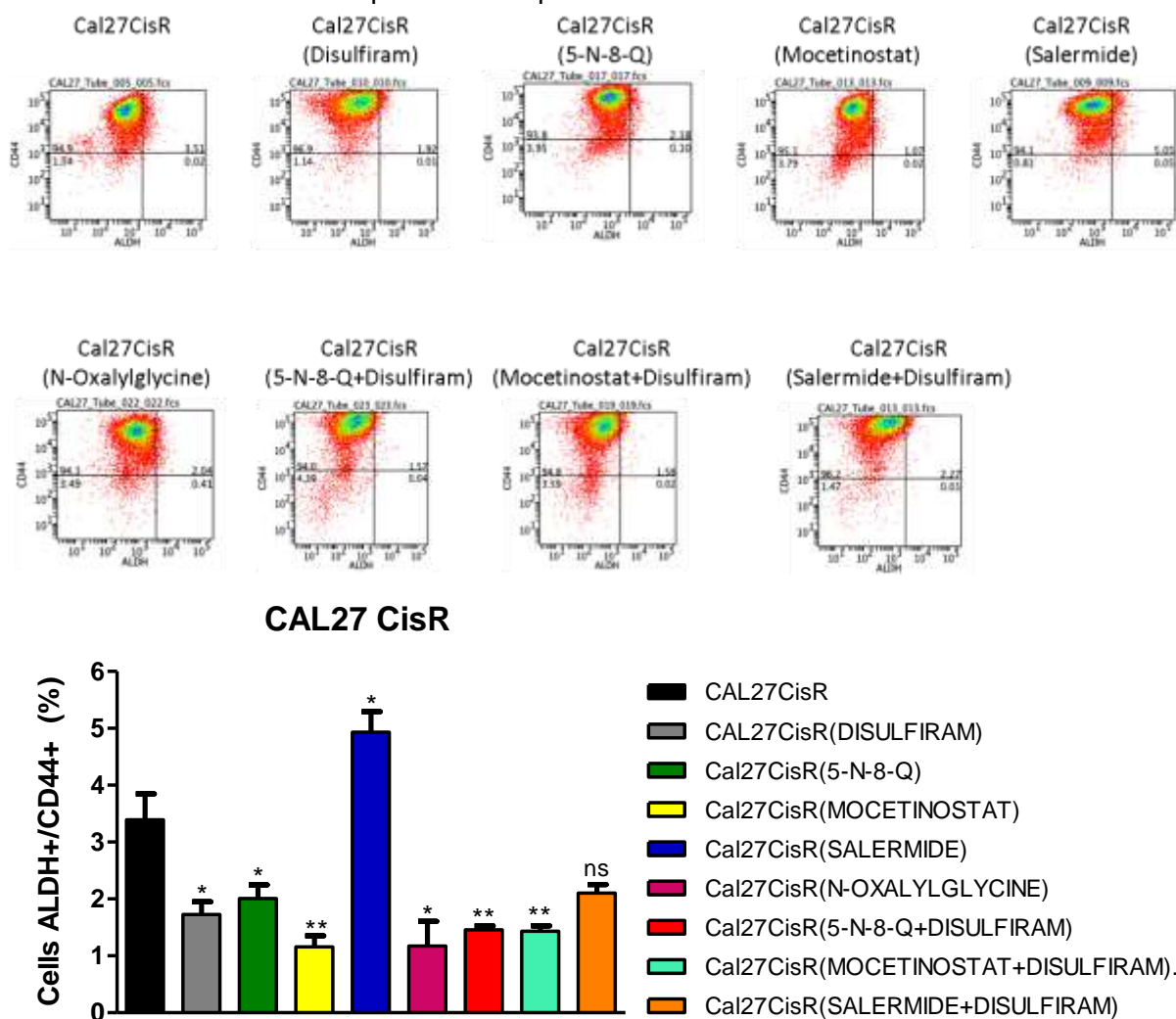
4.3. Análise da plasticidade celular em linhagens de carcinoma oral resistentes à Cisplatina tratadas com Epi-drogas em monoterapia e terapia combinada

O ensaio de citometria de fluxo foi realizado com o objetivo de quantificar os níveis de plasticidade celular após o tratamento das linhagens resistentes com inibidores 5-N-8-Q, Mocetinostat, Salermide, e N-Oxalyglycine em monoterapia e terapia combinada com Disulfiram. Os tratamentos foram realizados nas concentrações indicadas na Tabela 6.

Foi observado que, para a linhagem CAL27 CisR (Figura14), após o tratamento com Disulfiram, houve uma redução estatisticamente significativa na população de CTT em comparação ao controle ($p < 0,05$). Em relação às epi-drogas, houve diminuição de CTT após os tratamentos em monoterapia com 5-N-8-Q

($p < 0,05$), Mocetinostat ($p < 0,01$) e N-Oxalylglycine ($p < 0,05$). De forma oposta, o tratamento em monoterapia com Salermide apresentou um aumento estatisticamente significativo na população de CTT em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Em combinação com Disulfiram, as epi-drogas 5-N-8-Q ($p < 0,01$) e Mocetinostat ($p < 0,01$) diminuíram de forma significativa a população de CTT. Os melhores resultados foram observados com a administração de Mocetinostat e N-Oxalylglycine em monoterapia e as terapias combinadas envolvendo 5-N-8-Q+Disulfiram e Mocetinostat+Disulfiram.

Figura 14 - Análise da subpopulação de células-tronco tumorais (CTT) da linhagem CAL27 CisR através da marcação de ALDH^{HIGH}/CD44^{HIGH} por citometria de fluxo, após tratamento com inibidores em monoterapia e em terapia combinada

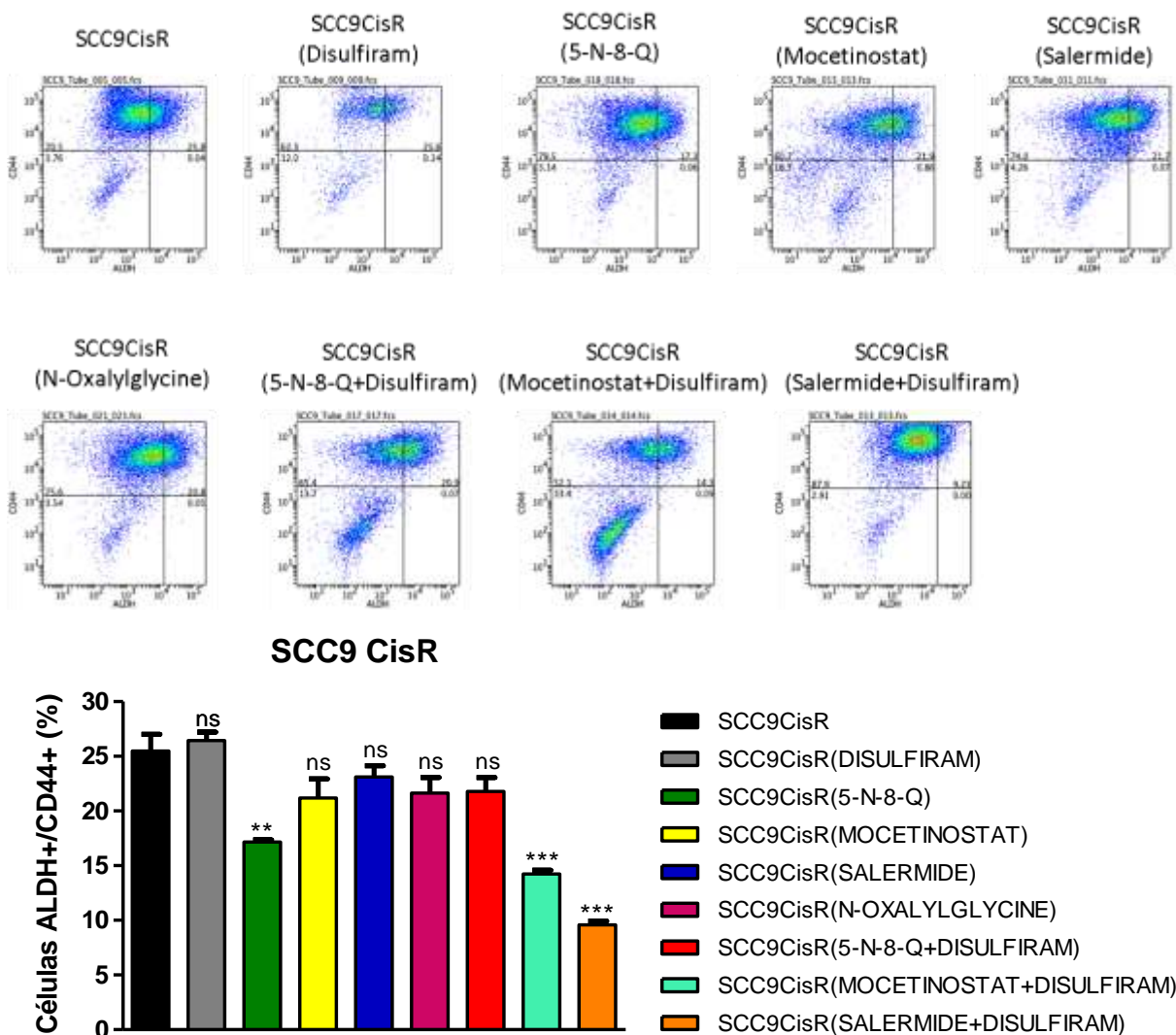


Fonte: Autor

A linhagem SCC9 CisR não apresentou diferença na população de CTT após o tratamento com Disulfiram. Nos tratamentos em monoterapia, houve redução apenas para o inibidor 5-N-8-Q ($p < 0,01$). Os tratamentos combinados também

mostraram redução de CTT para Mocetinostat+Disulfiram ($p<0,001$) e Salermide+Disulfiram ($p<0,001$) (Figura15). Os melhores resultados para a linhagem SCC9 CisR se deram com a administração de 5-N-8-Q em monoterapia e as terapias combinadas envolvendo Mocetinostat+Disulfiram e Salermide+Disulfiram.

Figura 15 - Análise da subpopulação de células-tronco tumorais (CTT) da linhagem SCC9 CisR através da marcação de ALDH^{HIGH}/CD44^{HIGH} por citometria de fluxo, após tratamento com inibidores em monoterapia e em terapia combinada

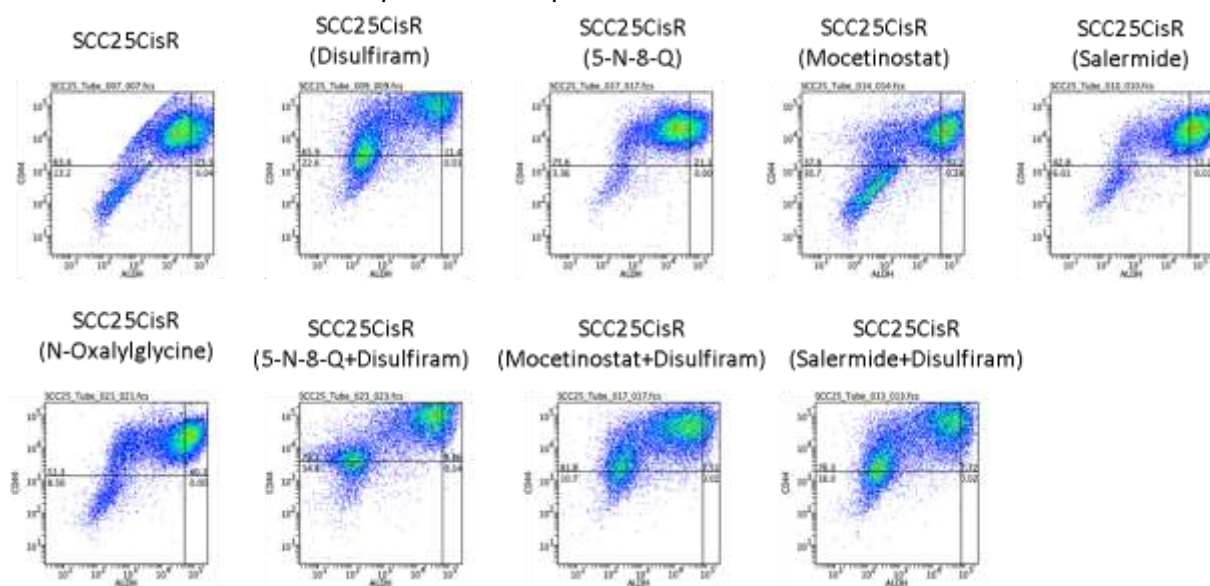


Fonte: Autor

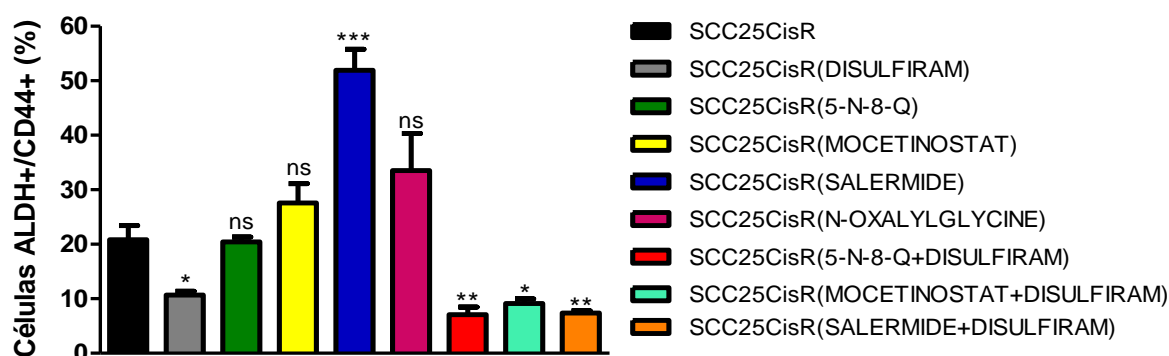
Foi observado para a linhagem SCC25 CisR (Figura 16), quando tratada com Disulfiram, que houve uma redução estatisticamente significativa na população de CTT em comparação ao controle ($p<0.05$). Já quando submetida às monoterapias ocorreu aumento de CTT para Salermide ($p<0,001$). De forma oposta, quando submetidas ao tratamento com as epi-drogas 5-N-8-Q, Mocetinostat e Salermide em combinação com Disulfiram, todas as condições diminuíram as células ALDH^{HIGH}/CD44^{HIGH}, com

diferença estatística para todas as combinações: 5-N-8-Q+Disulfiram ($p < 0,01$); Mocetinostat+Disulfiram ($p < 0,05$) e Salermide+Disulfiram ($p < 0,01$). Os melhores resultados para a linhagem SCC25 CisR, se deram com a administração de Disulfiram em monoterapia e as terapias combinadas envolvendo 5-N-8-Q+Disulfiram, Mocetinostat+Disulfiram e Salermide+Disulfiram.

Figura 16- Análise da subpopulação de células-tronco tumorais (CTT) da linhagem SCC25 CisR através da marcação de ALDH^{HIGH}/CD44^{HIGH} por citometria de fluxo, após tratamento com inibidores em monoterapia e em terapia combinada



SCC25 CisR



Fonte: Autor

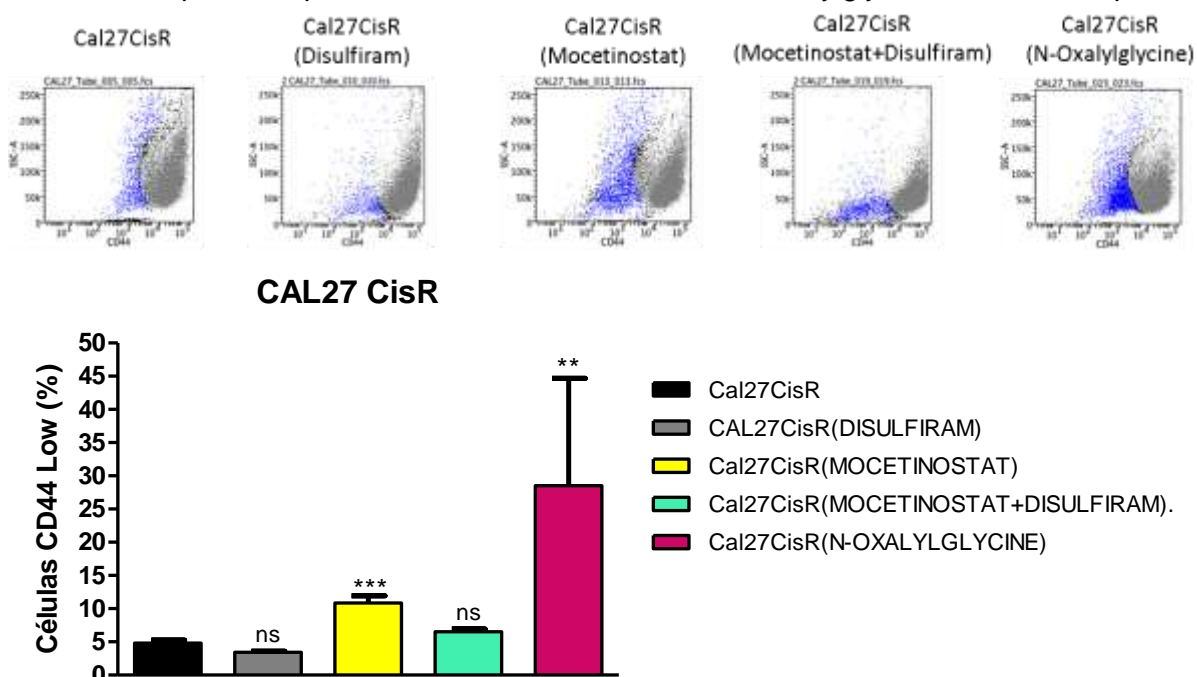
4.4. Análise dos níveis de CD44^{LOW} em linhagens de carcinoma oral resistentes à Cisplatina após tratamento com Epi-drogas em monoterapia e terapia combinada

Após a análise do experimento de citometria de fluxo, foi observada uma redução na marcação de CD44, maior do que de ALDH, e por essa razão, optamos

por investigar a perda de expressão de CD44 através da quantificação de CD44^{LOW} para os tratamentos com os inibidores Mocetinostat (em monoterapia e terapia combinada com Disulfiram) e N-Oxalyglycine.

Para a linhagem CAL27 CisR (Figura 17), os tratamentos com Disulfiram em monoterapia e Mocetinostat+Disulfiram não apresentaram diferenças na população de CD44^{LOW} comparadas ao controle. Quando analisado o tratamento em monoterapia com Mocetinostat, observou-se um aumento de células CD44^{LOW} estatisticamente significativo em relação ao controle ($p < 0,001$), sugerindo maior diferenciação celular. E, após tratamento com N-Oxalyglycine houve um aumento nos níveis de CD44^{LOW}, estatisticamente significativo, em relação à população celular controle ($p < 0,01$).

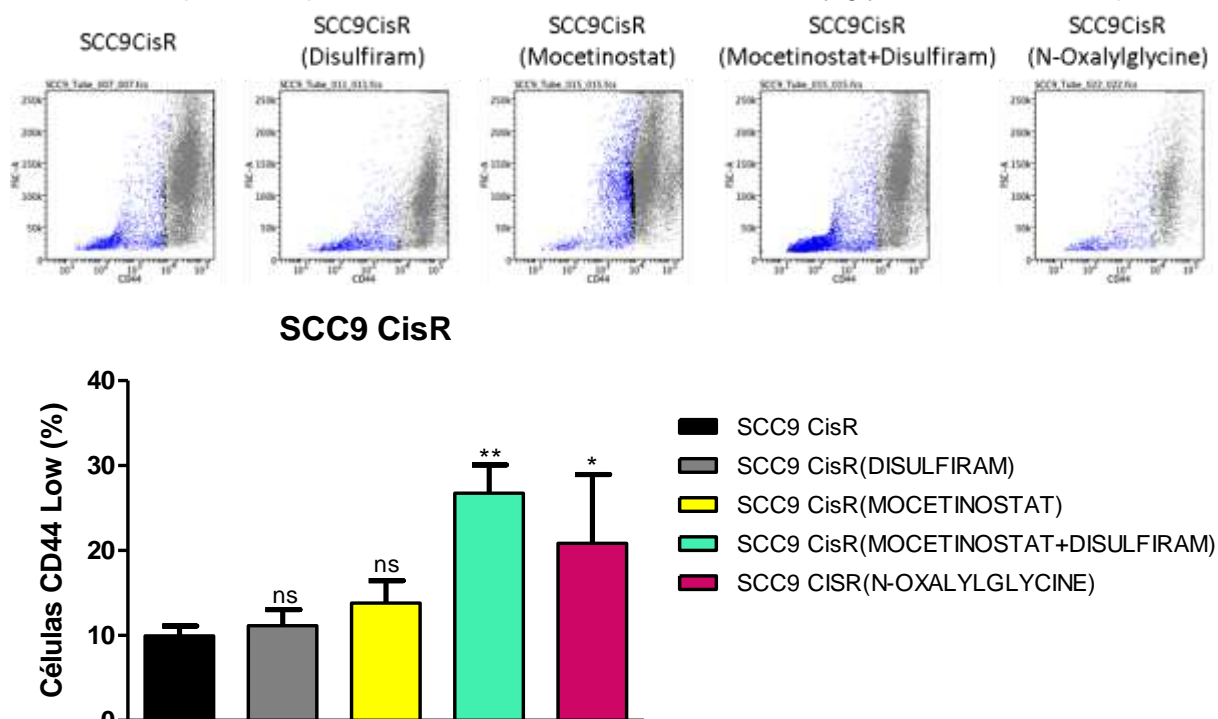
Figura 17 - Quantificação da expressão celular de CD44^{LOW} da linhagem CAL27 CisR por citometria de fluxo após tratamento com inibidores Disulfiram em monoterapia, Mocetinostat em monoterapia e terapia combinada com Disulfiram e N-Oxalyglycine em monoterapia



Fonte: Autor

Para a linhagem SCC9 CisR (Figura 18), foi observado que o tratamento com terapia combinada Mocetinostat + Disulfiram aumentou os níveis de CD44^{LOW} em comparação ao controle ($p < 0,01$), sugerindo maior diferenciação celular. De forma semelhante, após tratamento com N-Oxalyglycine houve um aumento nos níveis de CD44^{LOW}, estatisticamente significativo, em relação à população controle ($p < 0,05$).

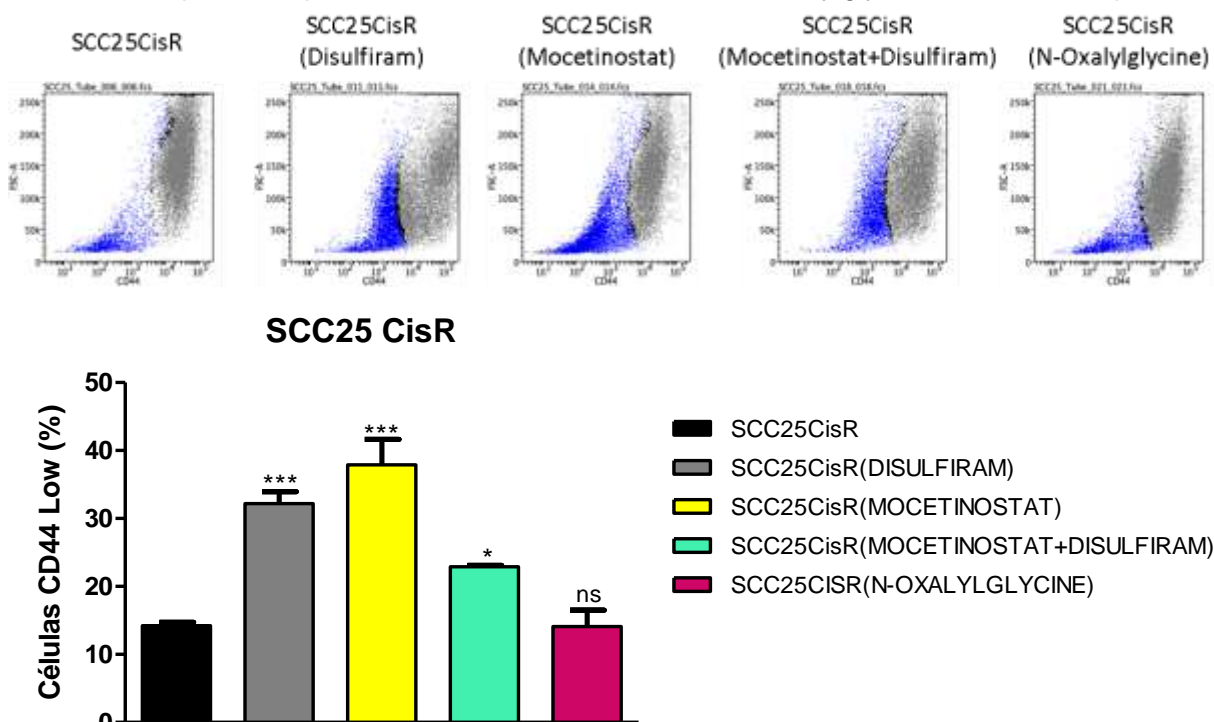
Figura 18 - Quantificação da expressão celular de CD44^{LOW} da linhagem SCC9 CisR por citometria de fluxo após tratamento com inibidores Disulfiram em monoterapia, Mocetinostat em monoterapia e terapia combinada com Disulfiram e N-Oxalylglycine em monoterapia



Fonte: Autor

Para a linhagem SCC25 CisR (Figura 19), foi observado em relação à população CTT controle, um aumento estatisticamente significativo nos níveis de CD44^{LOW} após tratamento com Disulfiram ($p < 0,001$), monoterapia com Mocetinostat ($p < 0,001$) e terapia combinada – Mocetinostat + Disulfiram ($p < 0,05$), sugerindo maior diferenciação celular.

Figura 19 - Quantificação da expressão celular de CD44^{LOW} da linhagem SCC25 CisR por citometria de fluxo após tratamento com inibidores Disulfiram em monoterapia, Mocetinostat em monoterapia e terapia combinada com Disulfiram e N-Oxalylglycine em monoterapia

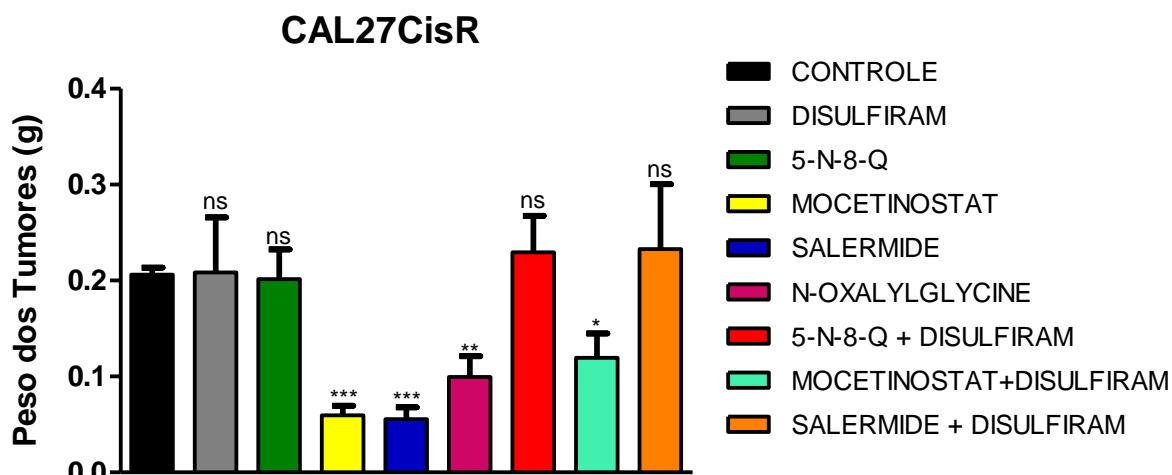


Fonte: Autor

4.5. Avaliação das Epi-drogas em monoterapia e terapia combinada na diminuição do peso e volume tumoral em modelo *in vivo* de Xenoenxerto

Em relação ao peso dos tumores, após sua remoção ao final do experimento, foi observado que não houve diferença estatística na redução do peso tumoral do grupo tratado com Disulfiram em relação ao grupo controle. Após o tratamento em monoterapia com a epi-droga 5-Nitroso-8-Quinolinol, houve uma pequena redução não estatisticamente significante do peso tumoral em relação ao grupo controle, sugerindo uma resposta não favorável na redução do peso tumoral para esse composto. Após o tratamento em monoterapia, houve redução estatisticamente significante do peso tumoral em relação ao grupo controle para as epi-drogas Mocetinostat ($p < 0,001$) e Salermide ($p < 0,001$), bem como para o tratamento em combinação para Mocetinostat e Disulfiram ($p < 0,05$), sugerindo a melhor resposta na redução do peso tumoral para esses compostos. Foi observado que após o tratamento em monoterapia com a epi-droga N-Oxalylglycine, houve redução estatisticamente significante do peso tumoral em relação ao grupo controle ($p < 0,01$), sugerindo uma resposta favorável na redução do peso tumoral para esse composto (Figura 20).

Figura 20- Avaliação da redução do peso tumoral após indução de crescimento tumoral por injeção de células CisR da linhagem CAL27 em modelo animal (Xenoenxerto) após tratamento com inibidores em monoterapia e terapia combinada.

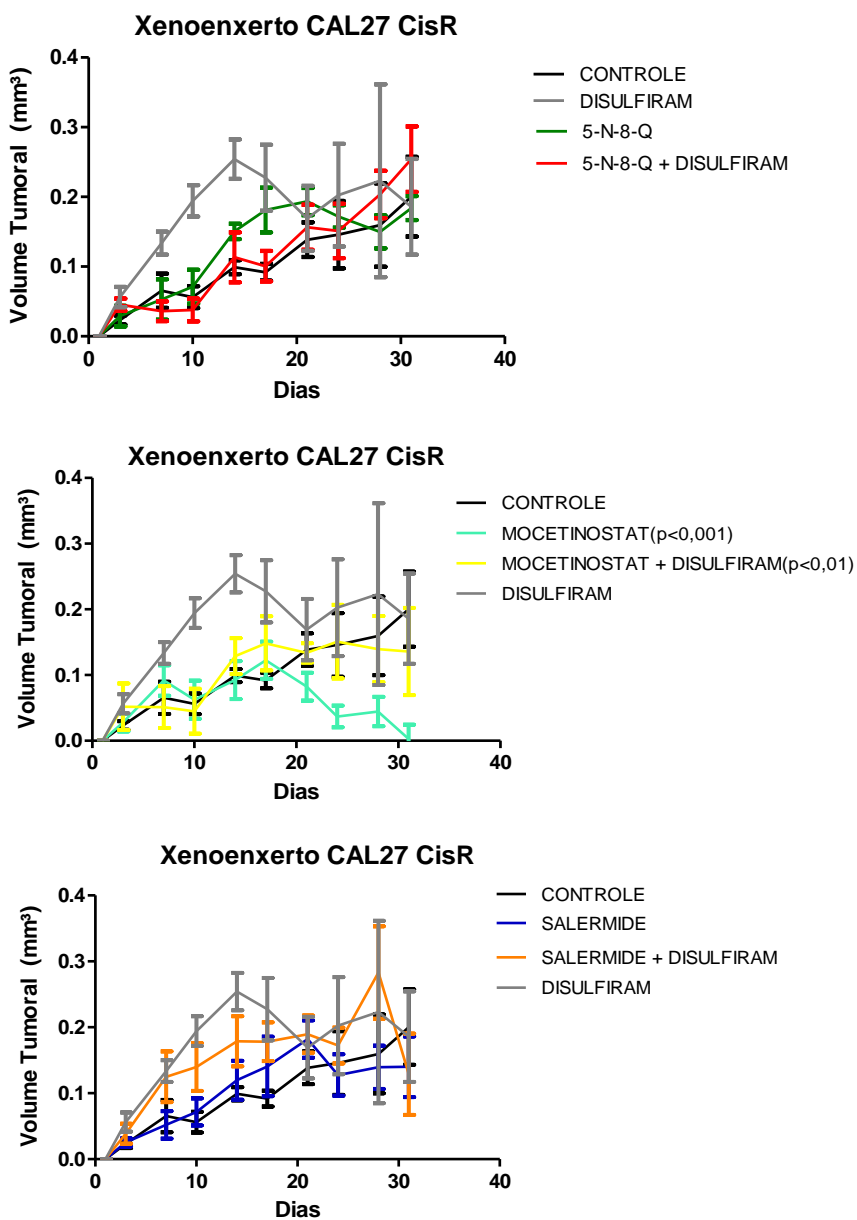


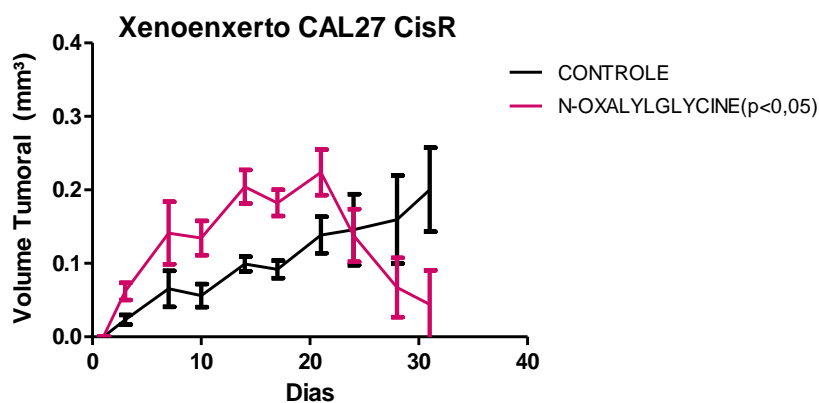
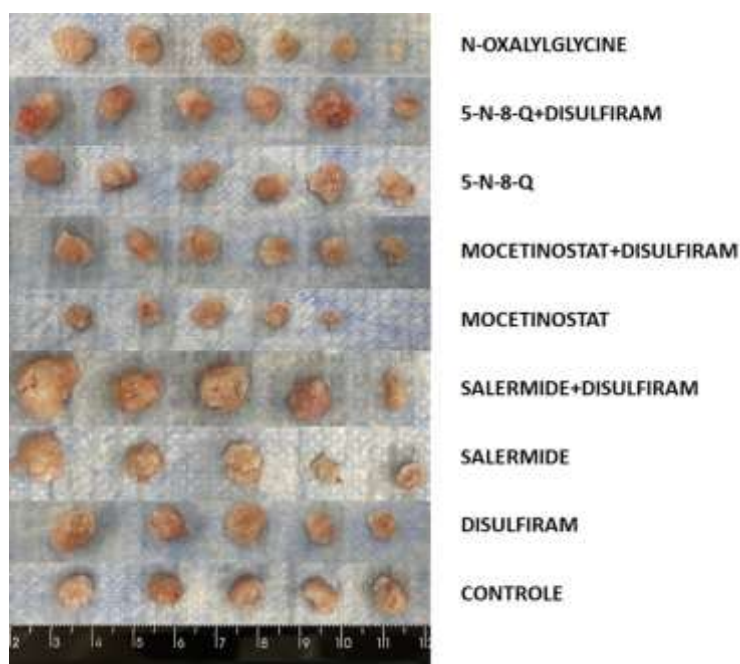
Fonte: Autor

Após o acompanhamento do crescimento tumoral, foi observado que quando tratado com Disulfiram, houve inicialmente um aumento no volume tumoral em relação ao controle e ao final do tratamento houve uma redução se assemelhando ao volume tumoral do grupo controle. Houve pequena redução do volume tumoral em monoterapia com a epi-droga 5-N-8-Q em relação ao grupo controle ao final do tratamento e foi observado que o tratamento combinado estimulou um aumento volumétrico do tumor ao final do tratamento, quando comparado ao grupo controle, sugerindo resposta pouco favorável na redução do volume tumoral para esse composto. O tratamento em monoterapia com a epi-droga Mocetinostat mostrou melhor resposta para redução do volume do tumor em comparação ao grupo controle ($p < 0,001$). Em relação à terapia combinada com Mocetinostat e Disulfiram, o crescimento foi semelhante ao grupo controle, com resposta favorável na redução do volume tumoral ao final do tratamento ($p < 0,01$). Após o tratamento em monoterapia com a epi-droga Salermide houve aumento de volume em relação ao grupo controle, seguido de uma diminuição ao final do tratamento, sugerindo melhor resposta na redução do volume tumoral para esse composto. Em relação à terapia combinada com Salermide e Disulfiram foi observado o mesmo padrão de resposta da monoterapia. Foi observado que quando tratado com a epi-droga N-Oxalylglycine, inicialmente houve aumento no volume do tumor em relação ao grupo controle, com resposta favorável de redução do volume do tumor ao final do tratamento ($p < 0,05$) (Figura 21A e B).

Figura 21 - Avaliação da redução do volume tumoral após indução de crescimento tumoral por injeção de células CisR da linhagem CAL27 em modelo animal (Xenoenxerto) após tratamento com inibidores em monoterapia e terapia combinada A. Gráfico do volume tumoral. B. Imagem dos tumores

A



**B**

Fonte: Autor

4.6. Análise Histopatológica dos tecidos tumorais tratados com Epi-drogas em monoterapia e terapia combinada com Disulfiram

As características observadas na análise histopatológica foram graduadas conforme o score da Tabela 8 e os resultados podem ser observados na Tabela 11 e Figura 22. O grupo controle apresentou características de carcinoma espinocelular do subtipo adenoescamoso, com maiores características de malignidade, tais como: maior pleomorfismo celular, perda de diferenciação celular, aumento da relação núcleo citoplasma, elevado número de mitoses atípicas e nucléolos evidentes. Também se observou áreas de disqueratose, pérolas córneas e áreas de necrose tecidual. Os grupos tratados com as epi-drogas tiveram padrões distintos de resposta

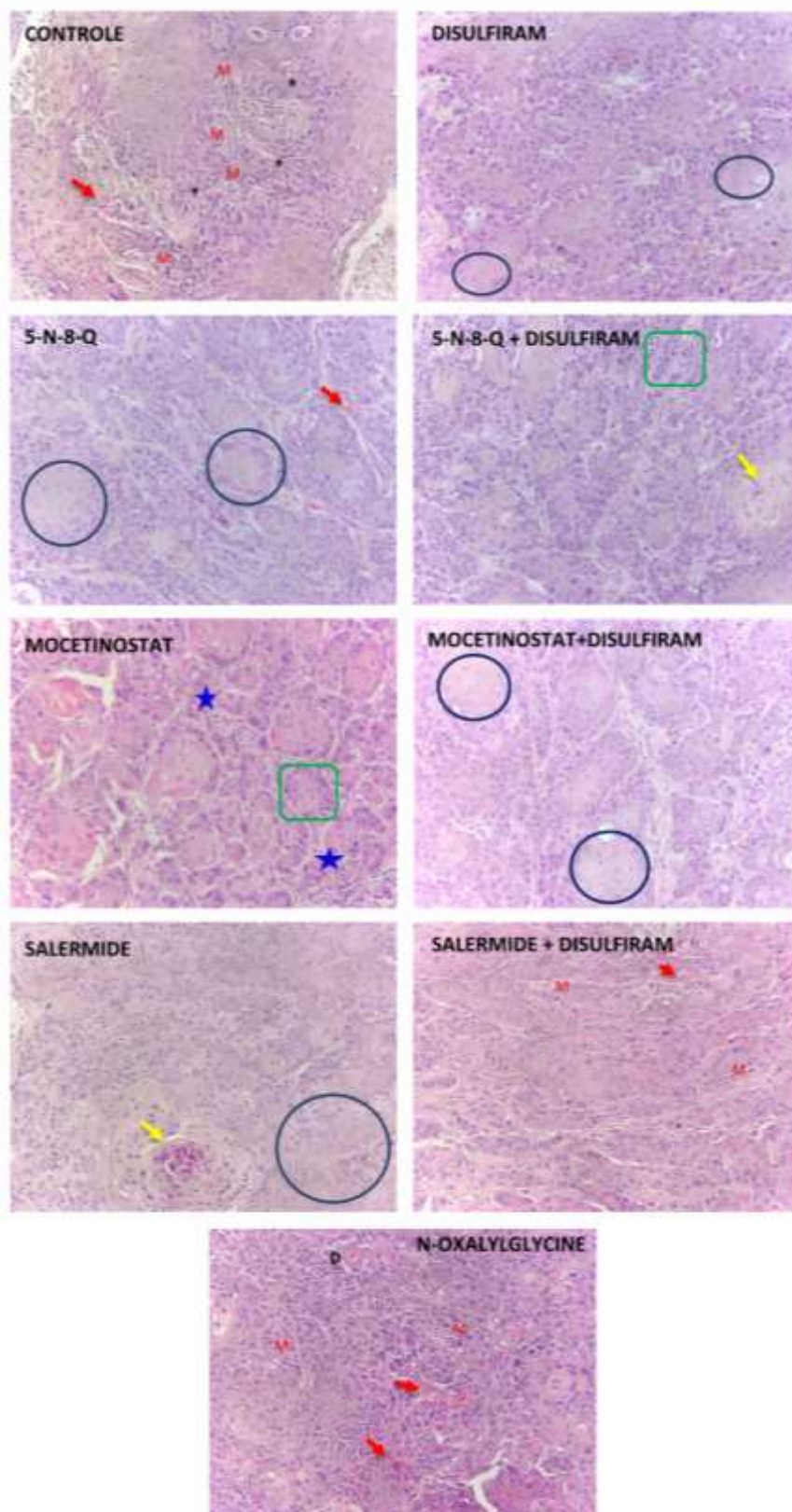
celular. Todos os tratamentos mantiveram um padrão alto de pleomorfismo celular, com baixa queratinização, presença de infiltrado inflamatório, pérolas de queratina e estado moderadamente diferenciado. No entanto, em todos os tratamentos foi possível observar a presença de áreas menos celularizadas quando comparadas ao tecido tumoral do grupo controle. Ainda, a morfologia celular dos tratamentos nos mostra células com núcleos maiores e bem diferenciadas, além de menores áreas de mitoses atípicas. No geral, todos os tratamentos foram capazes de manter uma maior organização tecidual, porém, pela análise do fronte invasivo desses tecidos, os tecidos tratados com Mocetinostat e N-Oxalyglycine tiveram maior índice de invasividade quando comparado ao grupo controle e aos demais grupos tratados e menor organização tecidual quando comparados aos outros tratamentos.

Tabela 11 - Score dos critérios histopatológicos avaliados nos tecidos tumorais removidos dos camundongos Nude BALBc tratados com epi-drogas em monoterapia e terapia combinada

| Grupo | Queratinização | Pleomorfismo | Invasividade | Inflamação | Bryne's Score |
|---------------------------|----------------|--------------|--------------|------------|---------------|
| Controle (Sem tratamento) | 3 | 4 | 1 | 2 | 10 |
| Disulfiram | 3 | 4 | 1 | 3 | 11 |
| 5-N-8-Q | 3 | 4 | 1 | 2 | 10 |
| 5-N-8-Q+Disulfiram | 3 | 4 | 1 | 2 | 10 |
| Mocetinostat | 3 | 4 | 3 | 2 | 12 |
| Mocetinostat+Disulfiram | 3 | 4 | 1 | 2 | 10 |
| Salermide | 2 | 4 | 1 | 1 | 8 |
| Salermide+Disulfiram | 3 | 4 | 1 | 2 | 10 |
| N-Oxalyglycine | 3 | 4 | 3 | 1 | 11 |

Fonte: Autor

Figura 22 - Análise dos tecidos tumorais com H&E. Tecidos tumorais removidos dos camundongos Nude BALBc, tratados com epi-drogas em monoterapia e terapia combinada



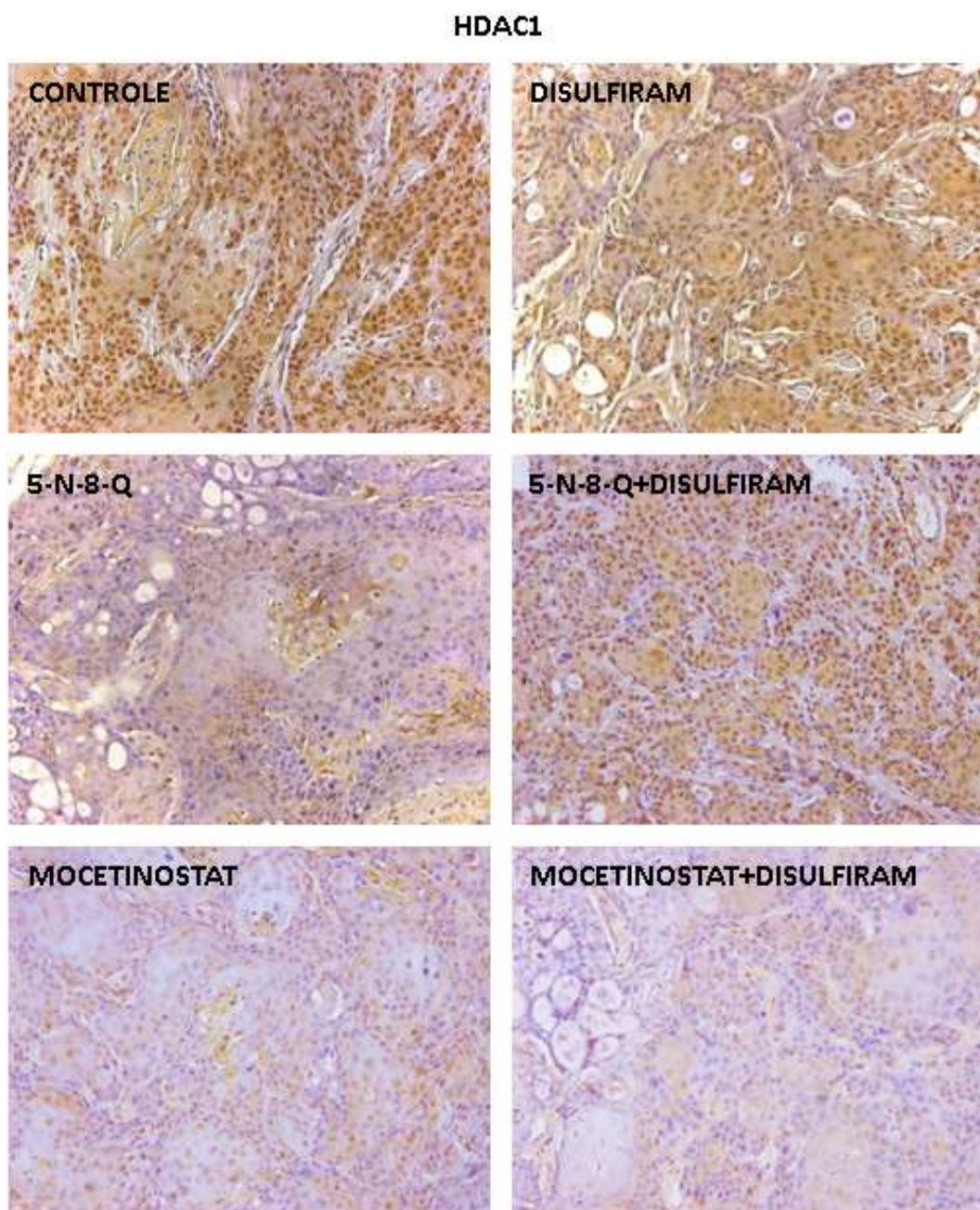
LEGENDA: D= disqueratose / M= mitoses atípicas / Seta vermelha= vasos sanguíneos / Seta amarela = pérola córnea / Círculo Azul= áreas menos celularizadas / Quadrado verde= núcleos maiores / Estrela azul= infiltrado inflamatório / *= aspecto mesenquimal

Fonte: Autor

4.7. Imunomarcção dos tecidos tumorais tratados com Epi-drogas em monoterapia e terapia combinada com Disulfiram

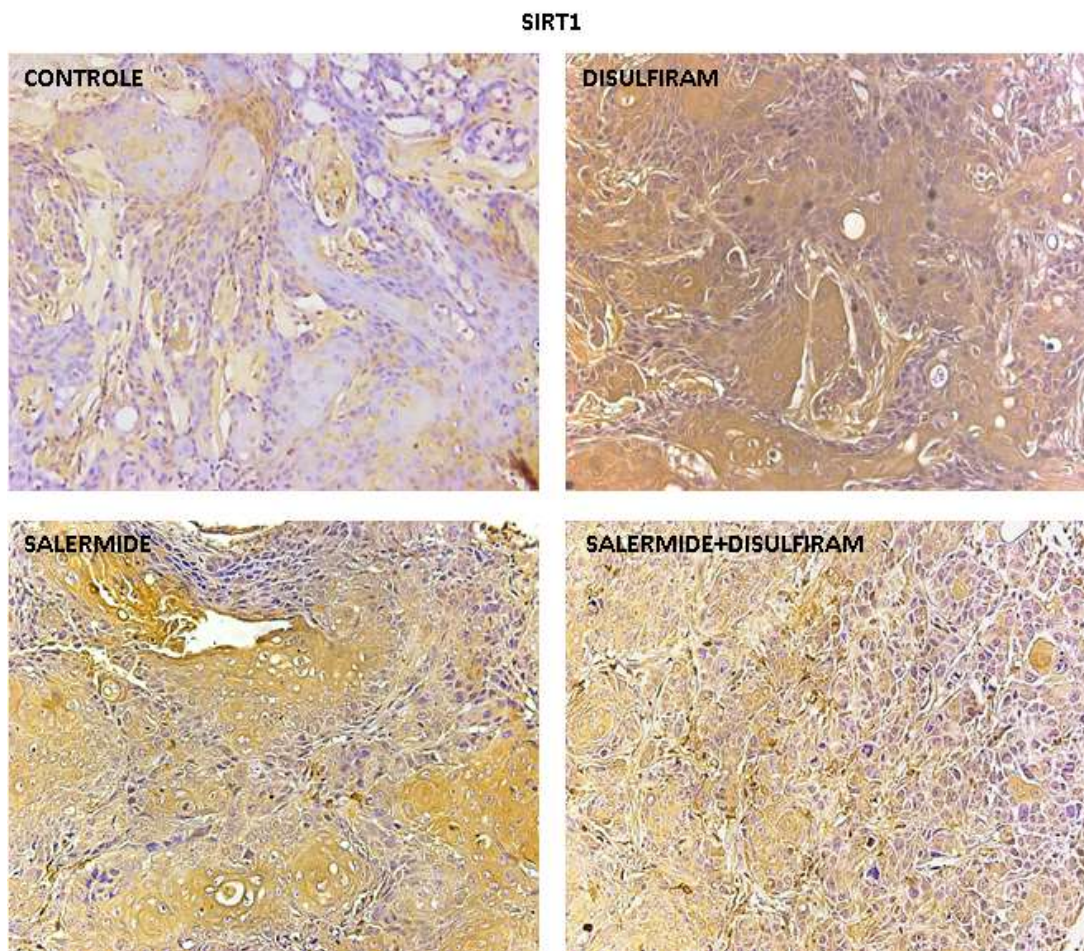
Foram realizadas análises de imuno-histoquímica para identificar as proteínas alvo de cada epi-droga investigada. As proteínas analisadas foram as histonas desacetilases HDAC1 e SIRT-1, histona demetilase KDM4C, o fator transcricional envolvido no processo de transição epitélio-mesênquima e aquisição de um fenótipo multirresistente aos tratamentos, SLUG (NAKAMURA et al., 2018; YANG et al., 2020), além de OCT4 e SOX2, fatores transcricionais envolvidos na manutenção da pluripotência e autorrenovação de células-tronco tumorais (KIM et al., 2015; PATRA, 2020). Para a análise do aumento de modificações em histonas foram analisadas as histonas acetiladas H3K36ac, H4K5ac e as histonas metiladas H3K9me2 e H3K36me3.

Ao avaliar HDAC1 (Figura 23), foi observada marcação nuclear no tecido tumoral controle, com alta expressividade. Os tratamentos com os inibidores de HDAC que se mostraram eficazes na redução dessa proteína foram os tratamentos com 5-Nitroso-8-Quinolinol e Mocetinostat em monoterapia e Mocetinostat+Disulfiram. A monoterapia com Disulfiram e o tratamento combinado com 5-Nitroso-8-Quinolinol+Disulfiram não apresentaram redução nos níveis dessa proteína.

Figura 23 - Análise dos tecidos tumorais com imunomarcção de HDAC1

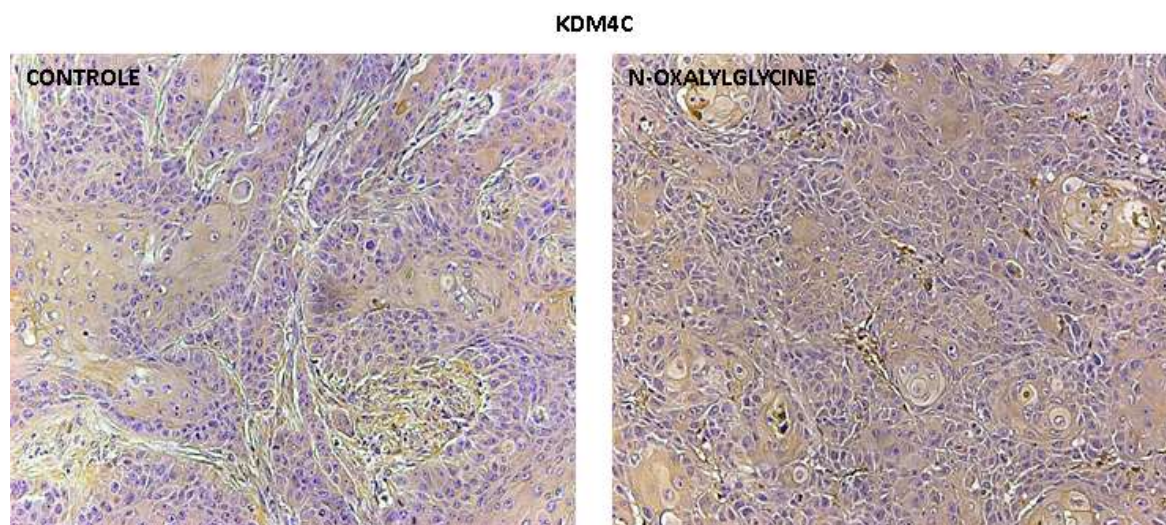
Fonte: Autor

A análise de outra histona desacetilase, SIRT1 (Figura 24), mostrou pouca marcação nuclear no tecido tumoral controle. Já nos grupos tratados com os inibidores dessa enzima, tanto a monoterapia com Salermide, quanto a terapia combinada de Salermide+Disulfiram mostraram marcação nuclear negativa para SIRT1, no entanto houve aumento desse marcador no citoplasma. O grupo tratado com Disulfiram apresentou algumas células com marcação nuclear positiva para SIRT1 e maior predomínio de marcação citoplasmática quando comparado ao grupo controle.

Figura 24 - Análise dos tecidos tumorais com imunomarcção de SIRT1

Fonte: Autor

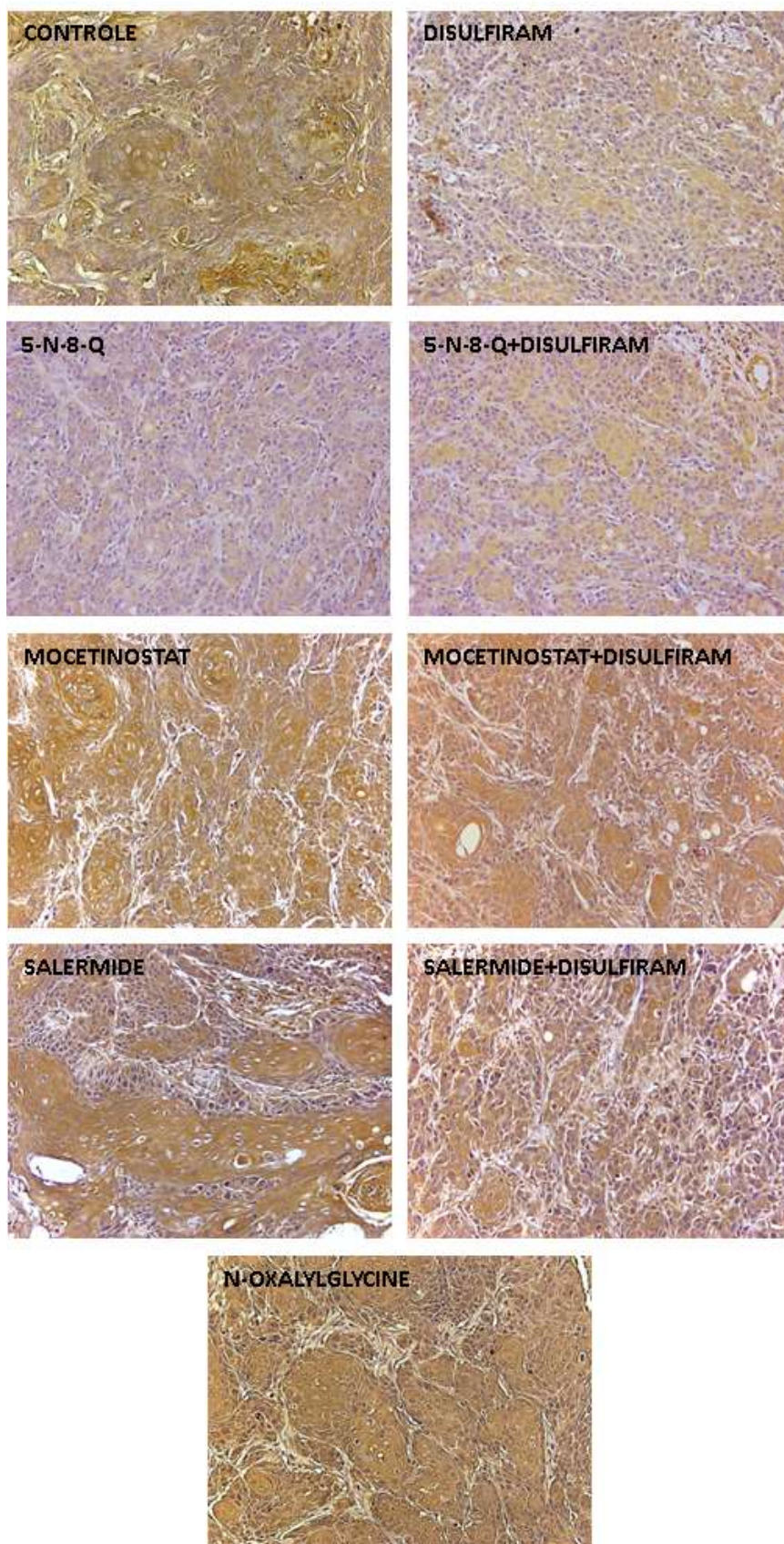
A histona demetilase KDM4C, demetila as histonas H3K9 e H3K36, regulando epigeneticamente muitos tipos de câncer, como o glioblastoma, carcinoma de esôfago, pulmão, pâncreas e mama (CHEN et al., 2020a). Nós não observamos marcação nuclear positiva para KDM4C no tecido tumoral controle e nem no tecido tratado com o inibidor dessa proteína, N-oxalyglycine (Figura 25).

Figura 25 - Análise dos tecidos tumorais com imunomarcação de KDM4C

Fonte: Autor

Avaliando o fator de transcrição SLUG (Figura 26), envolvido no processo de transição epitélio-mesênquima, quimiorresistência e manutenção de genes de plasticidade celular tronco (GRUBELNIK et al., 2020; (RECOUVREUX et al., 2020; ROBINSON et al., 2021), o tecido tumoral controle apresentou marcação citoplasmática positiva e pouca marcação nuclear evidente. Os grupos tratados com Disulfiram, 5-Nitroso-8-Quinolinol e 5-Nitroso-8-Quinolinol+Disulfiram reduziram os níveis dessa proteína tanto nuclear quanto citoplasmática. No entanto, o tecido tumoral tratado com N-oxalyglycine expressou mais SLUG nuclear e citoplasmático, ocorrendo o mesmo padrão de marcação citoplasmática nos tratamentos com Mocetinostat, Salermide e seus combinados Mocetinostat+Disulfiram e Salermide+Disulfiram.

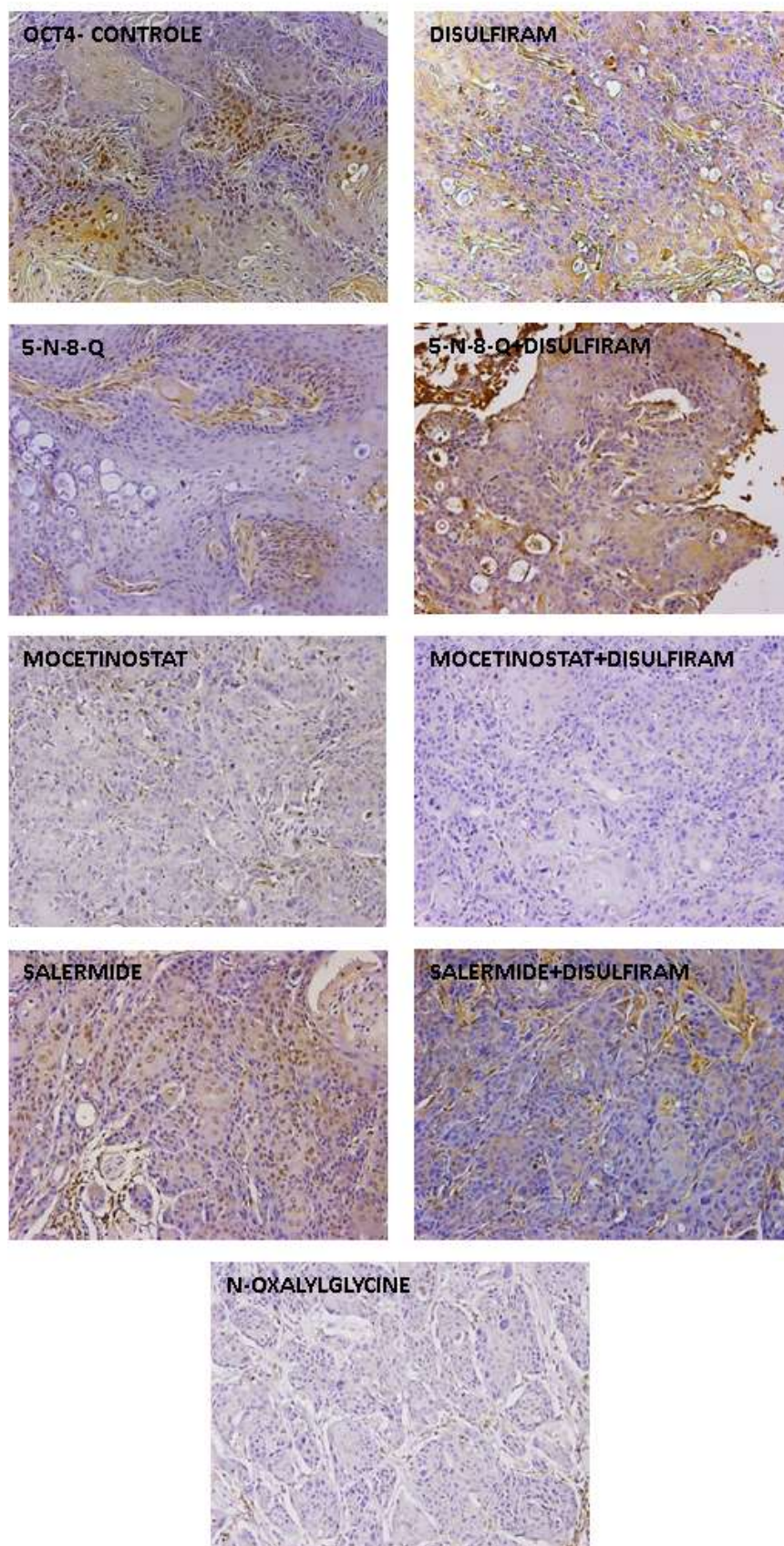
Figura 26 - Análise dos tecidos tumorais com imunomarcção de SLUG



Fonte: Autor

Para avaliar o acúmulo das células-tronco tumorais foram analisadas as proteínas OCT4 e SOX2 (NOVAK et al., 2020) (Figuras 27e 28). Em relação a OCT4, o tecido tumoral controle apresentou marcação em algumas regiões pontuais do tumor, sugerindo a distribuição das células-tronco tumorais em nichos. Com exceção do tratamento com Salermide, que não apresentou diferenças na redução dos níveis dessa proteína em relação ao controle, todos os outros tratamentos tanto em monoterapia quanto em terapia combinada se mostraram eficazes na completa redução de OCT4 (Figura 27).

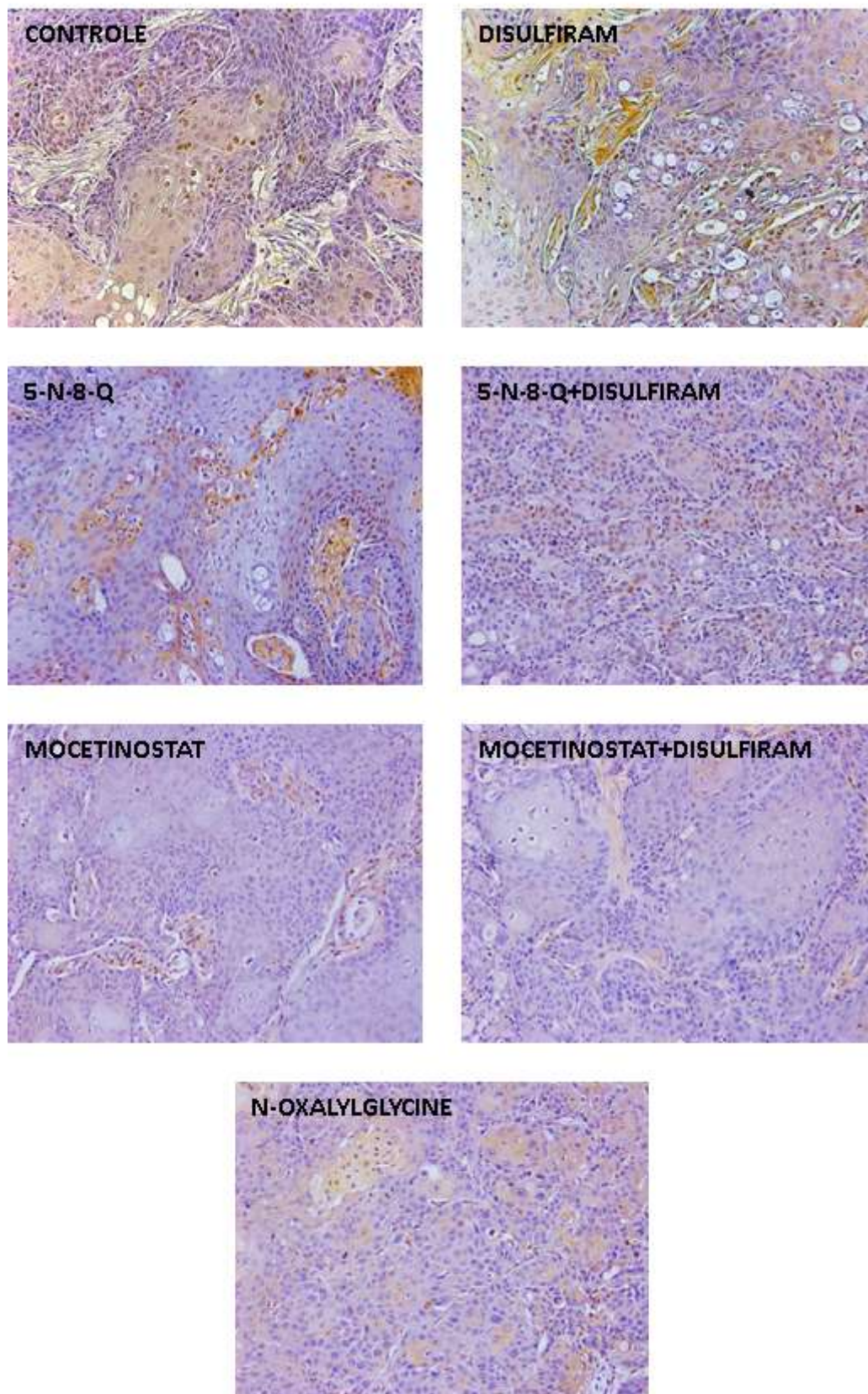
Figura 27 - Análise dos tecidos tumorais com imunomarcção de OCT4



Fonte: Autor

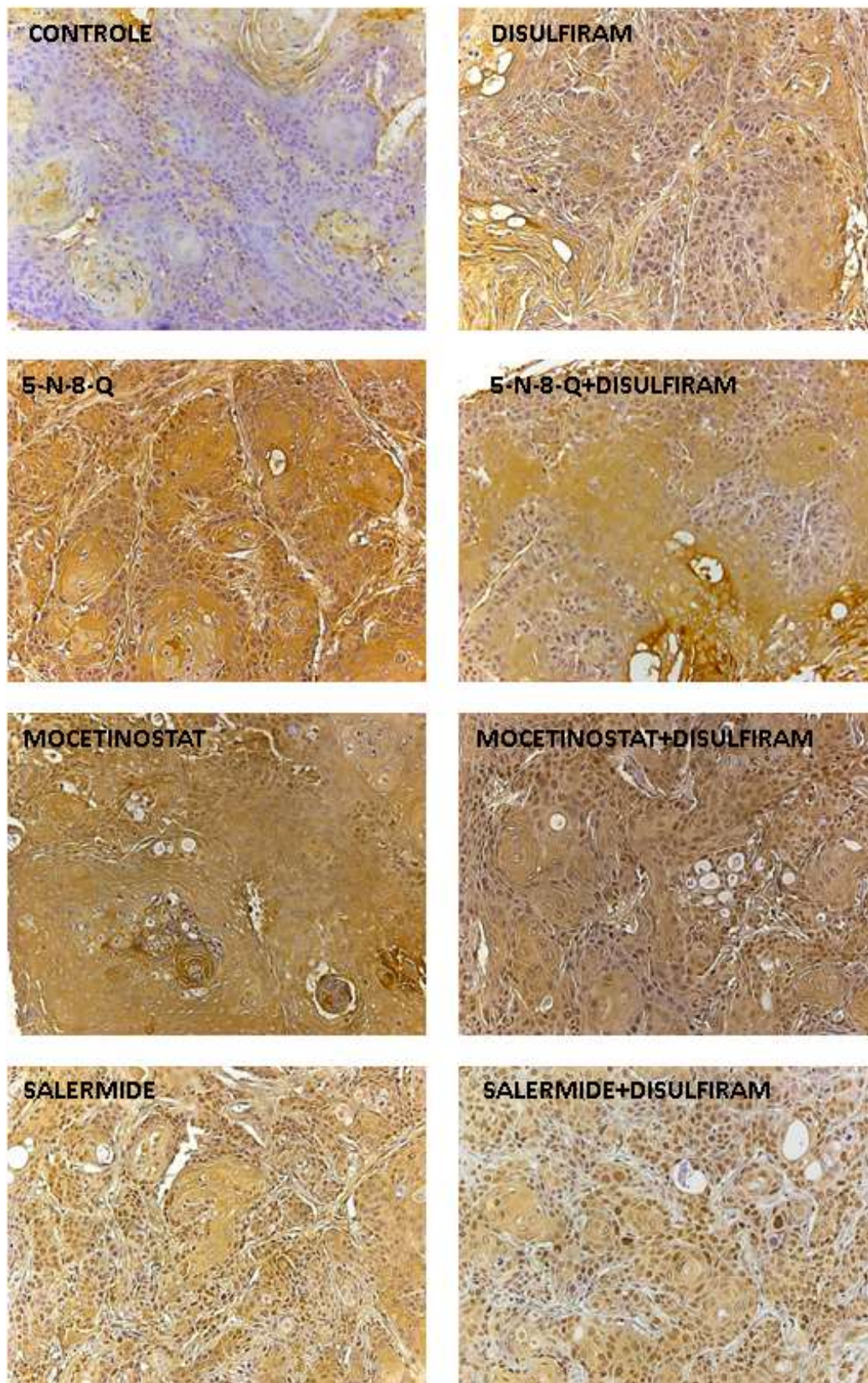
Avaliando SOX2 (Figura 28), foi observada uma grande marcação nuclear para o tecido tumoral controle em alguns nichos. Os tratamentos com Mocetinostat, Mocetinostat+Disulfiram e N-Oxalyglycine foram os mais eficazes na redução de SOX2. Porém os tratamentos com Disulfiram, 5-Nitroso-8-Quinolinolol e 5-Nitroso-8-Quinolinolol+Disulfiram apresentaram algumas marcações nucleares positivas para essa proteína em algumas ilhas celulares, como característico das células-tronco tumorais (RIZZINO; WUEBBEN, 2016).

Figura 28 - Análise dos tecidos tumorais com imunomarcção de SOX2

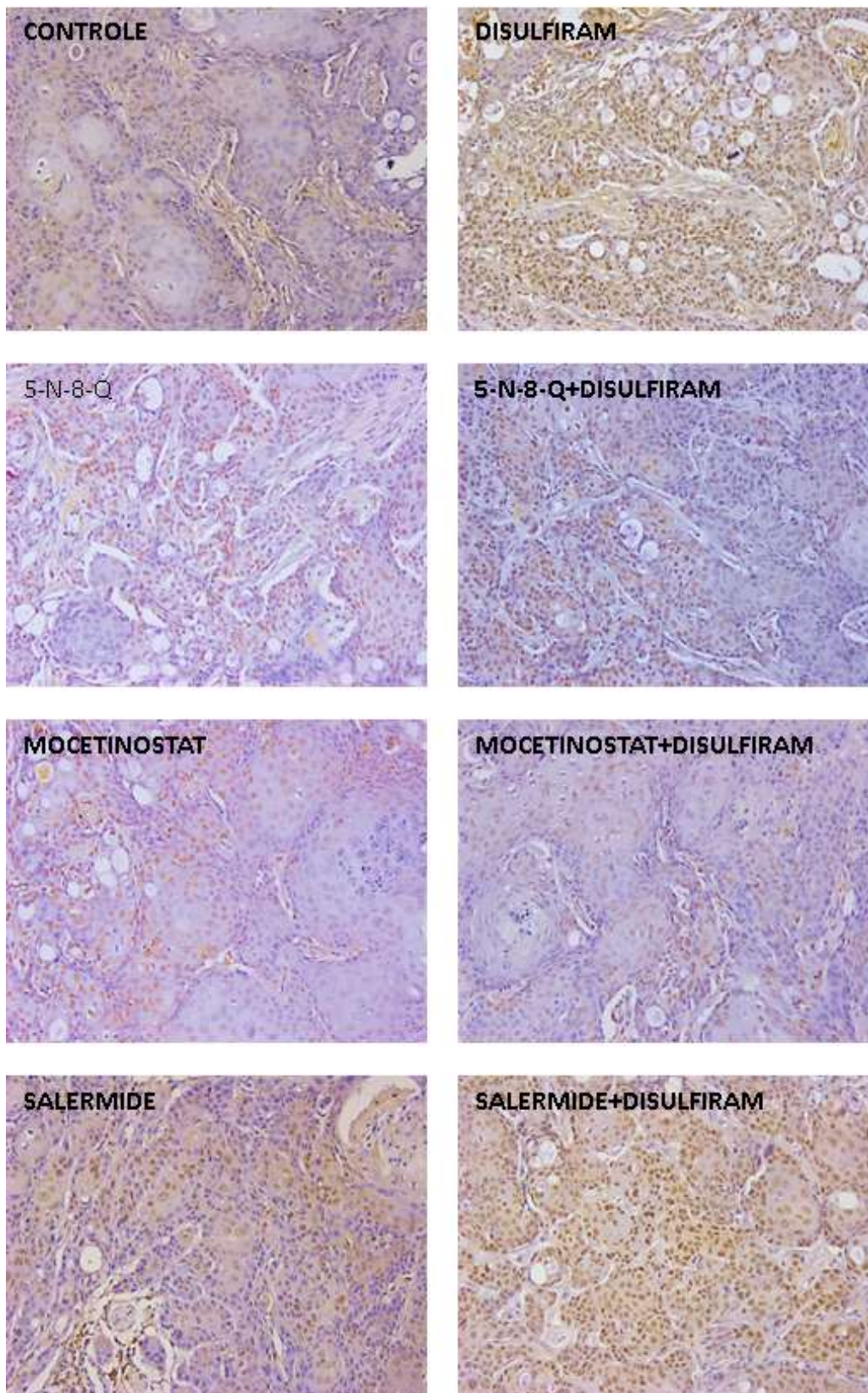


Fonte: Autor

As histonas acetiladas H3K36ac (Figura 29) e H4K5ac (Figura 30), responsáveis pela transcrição gênica e reversão do caráter repressivo tumoral, foram analisadas. O tecido tumoral controle apresentou marcações nucleares negativas para as histonas H3K36ac e H4K5ac, indicando caráter repressivo tumoral. Já nos tecidos tratados, todas as terapias foram capazes de reverter esse padrão epigenético, aumentando os níveis de acetilação, observando marcações nucleares positivas para essas proteínas. Sendo que, para H4K5ac, a monoterapia com Disulfiram e a combinação Salermide+Disulfiram foram mais eficazes no aumento dessa proteína.

Figura 29 - Análise dos tecidos tumorais com imunomarcção de H3K36ac**H3K36ac**

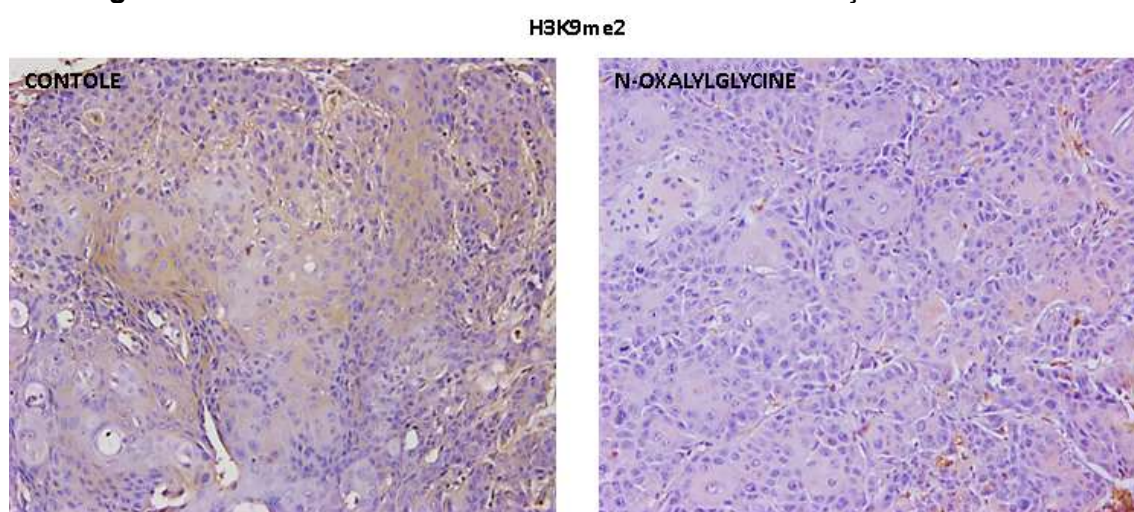
Fonte: Autor

Figura 30 - Análise dos tecidos tumorais com imunomarcção de H4K5ac**H4K5ac**

Fonte: Autor

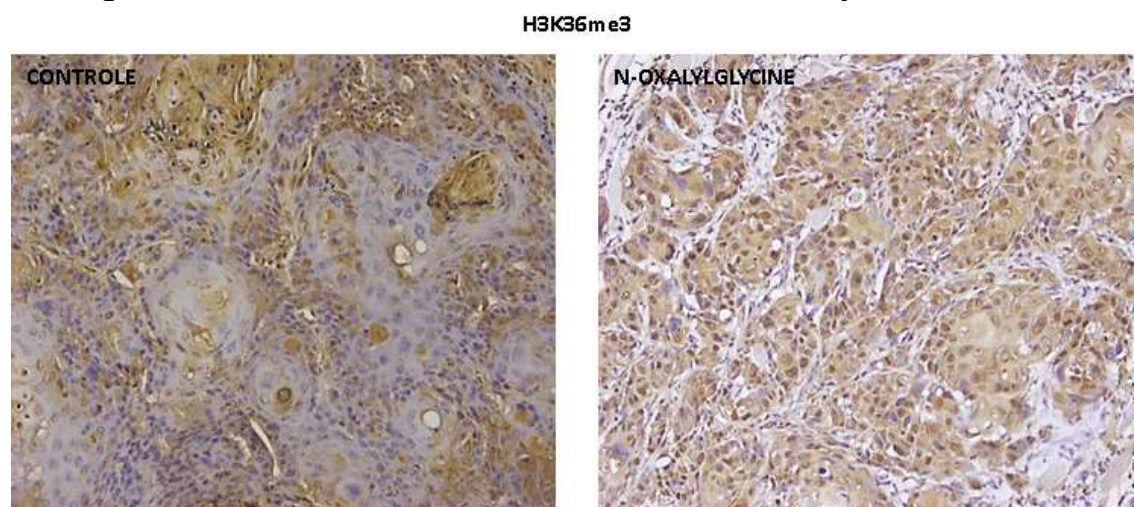
As histonas metiladas H3K9me2 (repressora transcricional) (Figura 31) e H3K36me3 (ativadora transcricional) (Figura 32) também foram analisadas. O tecido tumoral controle mostrou marcação nuclear negativa para H3K9me2 e H3K36me3, assim como o tecido tratado com N-Oxalylglycine para a histona H3K9me2. Ocorreu o inverso para a histona H3K36me3, onde o tratamento com a mesma epi-droga se mostrou eficiente no aumento dessa proteína, revertendo assim, o caráter repressivo desse tumor.

Figura 31 - Análise dos tecidos tumorais com imunomarcação de H3K9me2



Fonte: Autor

Figura 32 - Análise dos tecidos tumorais com imunomarcação de H3K36me3



Fonte: Autor

5. DISCUSSÃO

A compreensão do paradigma saúde-doença no contexto do câncer de cabeça e pescoço é o que tem levado pesquisadores e estudiosos a buscar incansavelmente novas alternativas terapêuticas que revertam o sombrio panorama de sobrevida geral e o prognóstico ruim que paira sobre os pacientes acometidos por essa neoplasia (MALI, 2022).

As alterações epigenéticas no câncer são múltiplas e dinâmicas e podem favorecer a tumorigênese e progressão ou ainda o aumento da resistência a terapias, levando a falhas no tratamento e recorrência do tumor. A resistência tumoral geralmente envolve um pequeno grupo de células-tronco tumorais que, utilizando a maquinaria epigenética, são capazes de ativar genes de pluripotência e resistência a múltiplas drogas e reprimir genes supressores tumorais, hipoacetilando e hipermetilando histonas (incluindo hipoacetilação de histonas H3 e H4 e metilação de histonas H3K9); promovendo o acúmulo de diversas propriedades que as capacitam evadir aos tratamentos convencionais, se mantendo intactas e repovoando o tumor. Portanto, a possibilidade de reverter as alterações epigenéticas, potencialmente prejudiciais e promotoras da quimiorresistência, eliminando as CTT, pode ter implicações terapêuticas muito significativas (ROTILI et al., 2012; BIGHETTI-TREVISAN et al., 2019; CHENG et al., 2019; HANAHAN, 2022; LIANG; TURCAN, 2022). Esse foi o objeto de nosso estudo, que utilizou linhagens celulares derivadas de carcinoma oral de língua: CAL27 selvagem (WT); SCC9 selvagem (WT); SCC25 selvagem (WT) e as versões resistentes à cisplatina CAL27 CisR; SCC9 CisR; SCC25 CisR, incluindo suas subpopulações não-tronco e tronco tumoral (respectivamente, CTT⁻ e CTT⁺).

Já se encontra estabelecido na literatura, o uso das chamadas epi-drogas, como opção de monoterapia ou terapia combinada contra diversos tipos de câncer. Esses inibidores epigenéticos, vêm sendo desenvolvidos e explorados e sua utilização tem mostrado indução na diferenciação, interrupção do crescimento ou apoptose de células tumorais (DI MARTILE et al., 2016; BISWAS; RAO, 2018b; CHENG et al., 2019). Um grande progresso tem sido feito no desenvolvimento dessas drogas que visam os reguladores epigenéticos, com muitos compostos sob avaliação em estudos clínicos. Entretanto, embora existam muitos estudos em andamento, até o momento,

somente oito terapias epigenéticas foram aprovadas e comercializadas pelo Food and Drug Administration (FDA), sendo seis para tratamento de malignidades hematológicas e duas para uso em tumores sólidos. Essa limitada atuação nos tumores sólidos, onde se encontram as neoplasias de cabeça e pescoço, esbarra na complexidade da regulação epigenética e nas restrições em estudos, ensaios clínicos e tecnologias voltadas para esse fim. Portanto, novos horizontes direcionados à alteração de epigenomas reversíveis, são uma alternativa atraente para o tratamento dessas malignidades (CHENG et al., 2019; JIN et al., 2021; FENG; DE CARVALHO, 2022; LIANG; TURCAN, 2022; FEEHLEY et al., 2023). Atentos a esse panorama, realizamos nesse trabalho, a triagem de 23 epi-drogas e selecionamos os compostos que mostraram resultados mais promissores *in vitro* e *in vivo* para redução de células-tronco tumorais e reversão da quimiorresistência em linhagens resistentes à cisplatina de carcinoma espinocelular oral. Os alvos epigenéticos foram divididos em 3 categorias principais baseadas na função enzimática modulatória das marcas epigenéticas nos nucleossomos, incluindo nesse rol, as enzimas escritoras, que adicionam modificações covalentes; enzimas apagadoras, que catalisam a remoção dessas marcas; e leitoras, proteínas que reconhecem essas modificações específicas (LU et al., 2018; BISWAS; RAO, 2018b; CHENG et al., 2019;). De um conjunto contendo oito compostos do grupo escritoras, treze do grupo apagadoras e dois do grupo leitoras, selecionamos através do ensaio de viabilidade celular, quatro epi-drogas: 5-Nitroso-8-Quinolinol, Mocetinostat e Salermide (inibidores de HDAC) e N-Oxalylglycine (inibidor de Histona demetilase); todos, compostos do grupo das enzimas apagadoras, que se mostraram capazes de inibir, de forma dependente da dose, a proliferação de células-tronco tumorais das três linhagens estudadas (CAL27CTT⁺, SSC9CTT⁺ e SCC25CTT⁺), com valores de IC₅₀ na faixa micromolar, ressaltando seu uso potencial no contexto celular (Tabela 9). Nossos achados estão em consonância com diversos estudos que têm apontado os alvos apagadores como os mais estudados para intervenções farmacológicas. Lu et al., 2018, relatou cinco epi-fármacos direcionados às HDAC aprovados para uso clínico e outros inibidores de HDAC, como Entinostat e CUDC-907, participando de ensaios clínicos para tratamento de câncer avançado (LU et al., 2018). Também foram relatados vários HDACi aprovados pela FDA para o tratamento do linfoma cutâneo de células T, incluindo Vorinostat, Romidepsina e Belinostat (LIANG; TURCAN, 2022). Panobinostat é um pan-HDACi aprovado para tratamento de mieloma múltiplo com

eficácia antitumoral demonstrada em diferentes linhagens celulares e modelos de xenoenxerto (PACHECO et al., 2021). Esse inibidor constou em nosso painel de triagem, mas não demonstrou resultados favoráveis (Tabela 9). Ainda, estudos pré-clínicos sugerem que a terapia epigenética com inibidores de lisina demetilase pode ser eficaz em grupos selecionados de pacientes no tratamento de carcinoma pulmonar de pequenas células (SCLC) e em outros tipos de câncer (MOREL et al., 2019), sinalizando um achado interessante para a epi-droga N-Oxalylglycine selecionada em nossa triagem.

Nosso grupo e outros demonstraram que o tratamento com cisplatina, o agente quimioterápico padrão ouro contra o câncer de cabeça e pescoço, promove o acúmulo de CTT, provavelmente por meio de mecanismos envolvendo perda de acetilação global de histonas e reprogramação epigenética, resultando no estabelecimento de variantes celulares quimiorresistentes (SHEN et al., 2012; CASTILHO; SQUARIZE; ALMEIDA, 2017; LIMA DE OLIVEIRA et al., 2022; MILAN et al., 2022). Investigamos se a resistência induzida pela cisplatina promoveu um fenótipo de multirresistência a outros agentes quimioterápicos frequentemente utilizados na clínica, e verificamos que para os seis compostos avaliados, Bortezomib, Carboplatin, Disulfiram, Erlotinib, Lovastatin e Paclitaxel, não houve um fenótipo de multirresistência para as células CisR das três linhagens de carcinoma oral (Tabela 10). Observamos que o fármaco Disulfiram, uma droga antialcoolismo, que mata as células cancerosas induzindo a apoptose, se mostrou eficaz para o estabelecimento de uma dose quimiossensibilizante nas três linhagens avaliadas (CAL27 CisR, SCC9 CisR e SCC25 CisR). Além disso, Disulfiram mostrou eficácia na redução da população de células-tronco quimiorresistentes em ensaio de esferas, bem como diminuição nos níveis de plasticidade em duas de nossas linhagens celulares (CAL27 CisR e SCC25 CisR). Concordando com nossos achados, outros autores relataram o efeito antitumoral de Disulfiram *in vitro*, em modelo animal e também como atividade na redução de células-tronco e demonstraram que em combinação com cisplatina e vinorelbina, esse composto foi bem tolerado e promoveu aumento de sobrevida em pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas recém-diagnosticado (NECHUSHTAN et al., 2015; WANG et al., 2022). Pelos nossos resultados, Disulfiram em monoterapia *in vivo*, não mostrou redução de peso e volume tumoral, se mantendo semelhante ao grupo controle. Também mostrou marcação negativa para HDAC1 e pouca marcação nuclear para SIRT1. Para SLUG a marcação foi negativa. Houve

completa redução de OCT4 nos tecidos tumorais tratados com Disulfiram, mas ocorreu marcação positiva em ilhas celulares para SOX2. Nas histonas, H3K36ac e H4K5Ac houve expressiva marcação dessas proteínas após tratamento com esse inibidor em monoterapia. Pelos nossos resultados, Disulfiram se mostrou eficiente como tratamento alternativo ao uso da cisplatina na redução de células-tronco tumorais.

Estudos tem mostrado a limitação das epi-drogas como alternativas terapêuticas em monoterapia. Jin et al.2021, relatou que assim como os inibidores de DNMT, a ação de HDACi como agente único, mostrou-se limitada e as respostas foram raras em tumores sólidos. Um estudo de fase III de vorinostat (HDACi) como monoterapia de segunda linha em mesotelioma avançado em pacientes tratados previamente com quimioterapia não mostrou melhora na sobrevida global em comparação ao grupo placebo (JIN et al., 2021). A aplicação de inibidores visando os alvos HDAC em cânceres não hematológicos vem mostrando uma eficácia limitada como agentes individuais, mas demonstraram utilidade clínica em terapia combinada (FEEHLEY et al., 2023), podendo desempenhar papéis importantes na sinergia com outras terapias antitumorais ou na reversão da resistência adquirida à terapia (MOREL et al., 2019). Ensaios clínicos recentes incluem combinações de agentes epigenéticos com quimioterapia citotóxica, terapias hormonais e inibidores do ponto de controle imunológico. O uso combinado de inibidores de HDAC e inibidores de DNMT em doses baixas pode reverter a resistência a agentes citotóxicos, induzindo a remoção de alterações epigenéticas adquiridas que conduzem ao fenótipo de resistência (JIN et al., 2021). Além disso, esses estudos sugerem que baixas doses de drogas epigenéticas podem reprogramar células tumorais, ressensibilizando-as às terapias convencionais (PACHECO et al., 2021).

Inibidores de histona desacetilase representam uma classe das epi-drogas, capazes de regular a expressão gênica por meio da modulação da acetilação de histonas, resultando em diferenciação, parada do ciclo celular, apoptose e diminuição da angiogênese; permitindo o restabelecimento do equilíbrio na expressão e na função normal de várias proteínas que podem reverter o início, a progressão e a resistência à terapia tumoral (JIN et al., 2021). Em nosso trabalho, o ensaio de esferas envolvendo o inibidor pan-HDAC, 5-N-8-Q em monoterapia, foi eficiente em reduzir a população celular tronco tumoral das 3 linhagens, tanto da população WT quanto da população CisR. Quando analisamos as linhagens celulares CisR tratadas com esse

composto em monoterapia e em terapia combinada com Disulfiram, através do ensaio de citometria de fluxo, observamos que a população de células-tronco foi diminuída na presença de 5-N-8-Q em monoterapia e, a redução mais expressiva ocorreu quando houve a combinação entre 5-N-8-Q e Disulfiram, sugerindo que essas células estão perdendo plasticidade, o que pode indicar que esteja ocorrendo um processo de diferenciação, com conseqüente redução de seu potencial tronco, sinalizando uma boa resposta do tratamento combinado para essa epi-droga. Nas análises de imunomarcagem, 5-N-8-Q em monoterapia e terapia combinada, mostrou redução expressiva nos níveis de HDAC1 em monoterapia e maior expressão quando em terapia combinada. Corroborando os resultados, ocorreu aumento nos níveis de acetilação das histonas H3K36ac e H4K5ac nas duas condições (mono e terapia combinada); redução dos níveis de SLUG, tanto em monoterapia quanto em terapia combinada; o mesmo ocorrendo para a marcação de OCT4. De forma geral, 5-N-8-Q em monoterapia e em terapia combinada com Disulfiram, foi eficiente na redução de CTT, diminuição dos níveis de HDAC, aumento nos níveis de acetilação e diminuição nos níveis de marcadores de CTT e agressividade; mostrando assim, um bom resultado, pois foi capaz de promover modificações na maquinaria epigenética em linhagens de CEC oral. Estudos mostram que em uma triagem composta de pequenas moléculas direcionadas a reguladores epigenéticos em três linhagens de células de leucemia (AML) pediátricas, 5-N-8-Q induziu especificamente a parada do crescimento e a apoptose nessas linhagens, sem interromper a diferenciação normal de neutrófilos (WIGGERS et al., 2019). Outro estudo, investigou o mecanismo de ação do 5-N-8-Q em células de câncer de mama humano MCF-7 e verificou que a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) estava envolvida nas respostas apoptóticas e de diferenciação celular para 5-N-8-Q em células MCF-7 (MARTIROSYAN et al., 2006).

Quando avaliamos a epi-droga Mocetinostat, inibidor de HDAC Classe 1, seletivo para HDAC1 e 2, verificamos sua eficiência como monoterapia, na redução das CTT com maior sensibilidade do fenótipo CisR em todas as linhagens. Entretanto, redução muito expressiva ocorreu para as três linhagens, quando submetidas à combinação entre Mocetinostat e Disulfiram, sugerindo a perda da plasticidade celular dessas células tratadas quando comparadas ao grupo controle e sinalizando uma promissora resposta para CEC oral tratado em combinação com essa epi-droga. Ótimos resultados na redução do peso e volume tumoral foram obtidos após o

tratamento com esse inibidor tanto em monoterapia quanto em terapia combinada, sugerindo resposta bastante favorável desse composto para redução de peso e volume tumoral em células tumorais quimiorresistentes de carcinoma oral. As análises de imunomarcação corroboraram os achados positivos para Mocetinostat. Tecido tumoral tratado com essa epi-droga em monoterapia e terapia combinada, mostrou redução expressiva nos níveis de HDAC1; ocorrendo esperado aumento nos níveis de acetilação com marcação positiva para as histonas acetiladas H3K36ac e H4K5ac em ambas as condições, mono e terapia combinada; regulação negativa ocorreu para OCT4 e SOX2. De forma geral, o inibidor de histona desacetilase, Mocetinostat, em monoterapia e em terapia combinada com Disulfiram, foi muito eficiente na redução de CTT, diminuição dos níveis de HDAC, aumento nos níveis de acetilação e diminuição nos níveis de marcadores de CTT; sinalizando bons resultados na redução da proliferação das CTT e indução da diferenciação em células tumorais em linhagens de CEC oral. Em concordância com nossos achados, modelos de xenoenxerto e linhagens de células tumorais sólidas, incluindo carcinoma de células uroteliais, com mutação CREBBP e EP300 (genes HAT), exibiram atividade de acetilação aumentada após utilização de Mocetinostat como agente único (GRIVAS et al., 2019). Também consistente com nossos estudos, foi mostrada diminuição das principais populações tumorais de linhagens de células de câncer de pulmão (NSCLC) *in vitro*, além de aumento de acetilação de histonas após o tratamento com Mocetinostat em monoterapia. Ainda, foi relatada que a combinação de Mocetinostat e um inibidor de checkpoint (PD-L1), apresentam atividade antitumoral aumentada em comparação com qualquer terapia isolada em dois modelos de tumor singênico de câncer de cólon (BRIERE et al., 2018).

Ainda no rol dos inibidores de HDAC, a epi-droga Salermide, inibidor da família da sirtuínas, SIRT-1 e SIRT-2 (SAJNANI et al., 2021) foi eficiente em monoterapia para reduzir as CTT nas 3 linhagens, tanto da população WT quanto da população CisR, com diferenças na sensibilidade do fenótipo CisR entre as linhagens. Na análise das linhagens celulares CisR submetidas à combinação entre Salermide e Disulfiram, uma redução muito expressiva ocorreu para as três linhagens, sugerindo a perda da plasticidade dessas células tratadas em combinação quando comparadas ao grupo controle e sinalizando uma promissora reposta para o CEC oral resistente à cisplatina. Também observamos ótimos resultados na redução do peso em monoterapia, mas pequeno aumento no peso tumoral quando em terapia combinada. Para o volume

tumoral ocorreu redução após o tratamento com esse inibidor tanto em monoterapia, quanto em terapia combinada, sugerindo uma resposta favorável desse composto para redução de peso e volume tumoral em células tumorais quimiorresistentes de carcinoma oral. As análises de imunomarcação mostraram diferentes respostas para Salermide. Ocorreu redução nos níveis de SIRT1 no tecido tumoral tratado com essa epi-droga em monoterapia e terapia combinada. Estudos mostram que SIRT1 encontra-se acumulada em câncer de pulmão e de es fago (BEHNISCH-CORNWELL et al., 2021). Ocorreu aumento nos níveis de acetilação com marcação positiva para as histonas acetiladas H3K36ac e H4K5ac em ambas as condições, mono e terapia combinada, com destaque para a alta expressão de H4K5ac para o tratamento combinado. Regulação negativa ocorreu para OCT4 apenas na combinação entre Salermide e Disulfiram. De forma geral, o inibidor de histona de SIRT, Salermide, mostrou melhores respostas em terapia combinada com Disulfiram, sinalizando uma promissora opção na redução da proliferação das CTT e reversão de quimiorresistência em linhagens de CEC oral. Testados em células de leucemia humana U937, inibidores de SIRT1 e SIRT2 mostraram grande indução de apoptose e alta eficiência na diferenciação granulocítica. Quando testados em leucemia humana, bem como em linhagens celulares de câncer de mama humano e de cólon, esses inibidores se mostraram potentes agentes antiproliferativos e, ainda se mostraram eficazes contra CTT, em carcinoma colorretal e células-tronco de câncer de glioblastoma multiforme de pacientes (ROTILI et al., 2012).

Nos diversos tipos de câncer, ocorre desativação de importantes genes supressores tumorais por hipermetilação ou ativação de oncogenes por demetilação, promovendo uma expressão gênica desregulada e crescimento celular descontrolado (FEEHLEY et al., 2023). Histonas demetilases, como a KDM4C, estão envolvidas com a progressão e regulação de diversos tipos de câncer, como o glioblastoma, carcinoma de es fago, mama, pulmão e pâncreas, através da demetilação das histonas H3K9 e H3K36 (VOUGIOUKLAKIS; NAKAMURA; SALOURA, 2018; CHEN et al., 2020a). KDM4C atua ativando a via c-Myc (oncogene) e reprimindo a via p-53 (supressor tumoral) e quando superexpressa, favorece a tumorigênese e quando silenciada, mostra níveis de proliferação celular baixos e aumento da apoptose (LEE et al., 2021). Pesquisas apontam que a inibição de KDM4C tem se mostrado uma alternativa de tratamento no câncer de cabeç a e pescoço, especialmente quando combinada com inibidores de tirosina quinase (MALI, 2022). Em nossa pesquisa,

selecionamos a epi-droga N-Oxalylglycine, um inibidor de histona lisina demetilase contendo o domínio C de Jumonji e exploramos seus efeitos nas linhagens celulares de CEC oral. Analisamos a eficiência dessa epi-droga apenas em monoterapia e obtivemos redução das CTT nas 3 linhagens celulares, tanto da população WT quanto da população CisR. Na análise das linhagens celulares CisR tratadas com esse composto, observamos que a população de células-tronco mostrou grande redução para duas linhagens (CAL27 CisR e SCC9 CisR) e um aumento para a linhagem SCC25 CisR. Ótimos resultados na redução do peso e volume tumoral ocorreram após o tratamento com N-Oxalylglycine, sugerindo uma resposta favorável desse composto para redução de peso e volume tumoral em células tumorais quimiorresistentes de carcinoma oral. A análise da imunomarcagem com KDM4C mostrou um padrão inesperado, pois nossos resultados mostraram que ocorreu expressão negativa dessa proteína, tanto no tecido tumoral controle quanto no tratado com o seu inibidor. O tratamento com N-Oxalylglycine implicou em aumento nos níveis de metilação com marcação positiva para as histonas metiladas H3K36me3 (transcritora), indicando reversão do caráter repressivo desse tumor. Entretanto, para H3K9me2 não houve marcação nem para o tecido controle, nem para o tecido tumoral tratado com essa epi-droga. Marcação negativa ocorreu para OCT4 e SOX2. De forma geral, o inibidor de histona demetilase, mostrou resposta positiva na redução da proliferação das CTT, sinalizada também pela regulação negativa das proteínas OCT4 e SOX2, fundamentais no processo de aquisição e manutenção da pluripotência celular; bem como diminuição de peso e volume tumoral, além de aumento na expressão de histonas metiladas, o que pode favorecer a reversão da quimiorresistência em linhagens de CEC oral.

Já se encontra estabelecido na literatura que CD44 é um marcador para células-tronco tumorais com implicações importantes na progressão do HNSCC (WANG et al., 2009). CD44 contribui significativamente para o aumento dos mecanismos tumorigênicos, como proliferação celular, metástase, invasão, migração e stemness e, estudos apontam que CTT expressando esse marcador mostram um comportamento de maior resistência à quimioterapia e podem dar origem à progressão da doença durante a terapia ou à doença recorrente pós-terapia (ZHAO et al., 2016; HASSN MESRATI et al., 2021). Observamos nos grupos tratados com Disulfiram, Mocetinostat, Mocetinostat+Disulfiram e N-Oxalylglycine um aumento na marcação de CD44^{LOW}. Esse resultado corrobora com nossos achados para a seleção

e tratamento com essas epi-drogas, que de modo geral, mostraram redução de células-tronco tumorais. Aumento nos níveis desse marcador sugerem diminuição das CTT pela perda da plasticidade celular, indicando uma tendência à diferenciação celular em carcinoma espinocelular oral, o que pode levar a melhores respostas na reversão da quimiorresistência desse grupo de tumores. ZHAO et al., 2016, em estudo com células de adenocarcinomas pancreáticos (PDAC), mostrou células CD44^{LOW} menos clonogênicas e invasivas quando comparadas às CD44^{HIGH}; além de menor capacidade de formação de esferas e menor expressão de marcadores tronco, se mostrando mais epiteliais e menos invasivas. Ainda, mostrou em experimento *in vivo*, que camundongos implantados com células CD44^{HIGH} desenvolveram crescimento tumoral rápido e metástase, responderam inicialmente à gencitabina, mas rapidamente desenvolveram resistência; ao passo que os tumores de células CD44^{LOW}, se mantiveram responsivos à gencitabina durante um longo esquema de tratamento (ZHAO et al., 2016). IONKINA et al., 2021, analisaram a correlação entre transição epitélio-mesênquima e alterações na proliferação celular e desregulação do ciclo celular durante a progressão do câncer e observaram que, entre células CD44^{HIGH} e CD44^{LOW} derivadas de câncer metastático de mama, células CD44^{LOW} exibiram níveis regulados positivamente dos genes de parada do crescimento, bem como menores níveis de marcadores de proliferação e divisão celular (IONKINA et al., 2021). Estudos sugerem a importância de mais investigações quanto ao papel da alta ou baixa expressão de CD44 associada à melhora ou piora das características clínico-patológicas dos cânceres, mas reafirmam o papel da alta expressão de CD44 contribuindo significativamente para o aumento dos mecanismos tumorigênicos (HASSN MESRATI et al., 2021).

6. CONCLUSÃO

A desregulação epigenética tem sido reconhecida como um fator preponderante na proliferação e autorrenovação de células-tronco tumorais e aquisição da quimiorresistência nos tumores sólidos, onde estão incluídos os carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço. As epi-drogas têm se despontado como uma alternativa para modular a sensibilidade dos tumores a outras drogas, eliminar CTT e superar a resistência à terapia. Nossos resultados demonstraram que as epi-drogas inibidoras de HDAC; 5-N-8-Q, Mocetinostat e Salermide; a epi-droga inibidora de histona demetilase, N-Oxalyglycine e o fármaco Disulfiram, são capazes de inibir, de forma dependente da dose, a proliferação de células-tronco das três linhagens estudadas. A administração das epi-drogas em monoterapia e em combinação com Disulfiram foi, de modo geral, efetiva na redução de células-tronco tumorais *in vivo*, na redução de peso e volume tumorais, além de promover a diminuição de HDAC1 e SIRT1, com conseqüente aumento nos níveis de acetilação e metilação de histonas; e ainda mostrar menor expressão dos marcadores de pluripotência e apresentar maior organização tecidual. De todas as combinações testadas, verificamos que a terapia combinada entre Mocetinostat e Disulfiram foi a mais promissora para a eliminação de células-tronco tumorais e reversão da quimiorresistência em tumores de cabeça e pescoço.

REFERÊNCIAS

- AHN, M.-Y. HDAC inhibitor apicidin suppresses murine oral squamous cell carcinoma cell growth in vitro and in vivo via inhibiting HDAC8 expression. **Oncology Letters**, v. 16, n. 5, p. 6552–6560, nov. 2018.
- AHN, M.-Y.; AHN, S.-G.; YOON, J.-H. Apicidin, a histone deaceylase inhibitor, induces both apoptosis and autophagy in human oral squamous carcinoma cells. **Oral Oncology**, v. 47, n. 11, p. 1032–1038, 1 nov. 2011.
- 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, 2013.
- ALMEIDA, L. O. et al. Profiling the Behavior of Distinct Populations of Head and Neck Cancer Stem Cells. **Cancers**, v. 8, n. 1, p. 7, 4 jan. 2016.
- BAELL, J. B. et al. Inhibitors of histone acetyltransferases KAT6A/B induce senescence and arrest tumour growth. **Nature**, v. 560, n. 7717, p. 253–257, ago. 2018.
- BAG, A.; GHORAI, P. K. Development of Quantum Chemical Method to Calculate Half Maximal Inhibitory Concentration (IC50). **Molecular Informatics**, v. 35, n. 5, p. 199–206, maio 2016.
- BARESCHINO, M. A. et al. Erlotinib in cancer treatment. **Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 18 Suppl 6, p. vi35-41, jun. 2007.
- BAYO, J. et al. Jumonji Inhibitors Overcome Radioresistance in Cancer through Changes in H3K4 Methylation at Double-Strand Breaks. **Cell Reports**, v. 25, n. 4, p. 1040- 1050.e5, 23 out. 2018.
- BEHNISCH-CORNWELL, S. et al. Correlation Analysis of Protein Expression of 10 HDAC/Sirtuin Isoenzymes with Sensitivities of 23 Anticancer Drugs in 17 Cancer Cell Lines and Potentiation of Drug Activity by Co-Treatment with HDAC Inhibitors. **Cancers**, v. 14, n. 1, p. 187, 31 dez. 2021.
- BIGHETTI-TREVISAN, R. L. et al. Cancer Stem Cells: Powerful Targets to Improve Current Anticancer Therapeutics. **Stem Cells International**, v. 2019, p. 9618065, 12 nov. 2019.
- BISWAS, S.; RAO, C. M. Epigenetic tools (The Writers, The Readers and The Erasers) and their implications in cancer therapy. **European Journal of Pharmacology**, v. 837, p. 8–24, 15 out. 2018a.
- BISWAS, S.; RAO, C. M. Epigenetic tools (The Writers, The Readers and The Erasers) and their implications in cancer therapy. **European Journal of Pharmacology**, v. 837, p. 8–24, 15 out. 2018b.
- BRAIT, M.; SIDRANSKY, D. Cancer epigenetics: above and beyond. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 21, n. 4, p. 275–288, maio 2011.
- BRAVI, F. et al. Lessons learned from the INHANCE consortium: An overview of recent results on head and neck cancer. **Oral Diseases**, v. 27, n. 1, p. 73–93, 2021.
- BRIERE, D. et al. The class I/IV HDAC inhibitor mocetinostat increases tumor antigen presentation, decreases immune suppressive cell types and augments checkpoint inhibitor therapy. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 67, n. 3, p. 381–392, 1 mar. 2018.

CASTILHO, R. M.; SQUARIZE, C. H.; ALMEIDA, L. O. 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.

CHEN, G.-Q. et al. Histone Demethylase KDM4C Is Required for Ovarian Cancer Stem Cell Maintenance. **Stem Cells International**, v. 2020, p. 8860185, 29 ago. 2020a.

CHEN, J. et al. Pracinostat (SB939), a histone deacetylase inhibitor, suppresses breast cancer metastasis and growth by inactivating the IL-6/STAT3 signalling pathways. **Life Sciences**, v. 248, p. 117469, 1 maio 2020b.

CHENG, Y. et al. Targeting epigenetic regulators for cancer therapy: mechanisms and advances in clinical trials. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 4, p. 62, 17 dez. 2019.

CHI, P.; ALLIS, C. D.; WANG, G. G. Covalent histone modifications: miswritten, misinterpreted, and miserased in human cancers. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 7, p. 457–469, jul. 2010.

CHOW, L. Q. M. Head and Neck Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 1, p. 60–72, 2 jan. 2020.

CHUA, G. N. L. et al. Cytosine-Based TET Enzyme Inhibitors. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, n. 2, p. 180–185, 31 jan. 2019.

COSSÍO, F. P.; ESTELLER, M.; BERDASCO, M. Towards a more precise therapy in cancer: Exploring epigenetic complexity. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 57, p. 41–49, ago. 2020.

DECULTOT, L. et al. Asymmetric Total Synthesis of C9'-epi-Sinefungin. **Organic Letters**, v. 22, n. 14, p. 5594–5599, 17 jul. 2020.

DI MARTILE, M. et al. Histone acetyltransferase inhibitor CPTH6 preferentially targets lung cancer stem-like cells. **Oncotarget**, v. 7, n. 10, p. 11332–11348, 8 fev. 2016.

DI MARTILE, M. et al. Inhibition of lysine acetyltransferases impairs tumor angiogenesis acting on both endothelial and tumor cells. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR**, v. 39, p. 103, 5 jun. 2020.

DI NISIO, E. et al. The Role of Histone Lysine Methylation in the Response of Mammalian Cells to Ionizing Radiation. **Frontiers in Genetics**, v. 12, p. 639602, 30 mar. 2021.

DUAN, R.; DU, W.; GUO, W. EZH2: a novel target for cancer treatment. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 13, p. 104, 28 jul. 2020.

DUAN, Y.-T. et al. New Promises to Cure Cancer and Other Genetic Diseases/Disorders: Epi-drugs Through Epigenetics. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 12, p. 972–994, 2019.

EICH, M.-L. et al. EZH2-targeted therapies in cancer: hype or a reality. **Cancer Research**, v. 80, n. 24, p. 5449–5458, 15 dez. 2020.

Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2023-incidencia-de-cancer-no-brasil>>. Acesso em: 5 abr. 2023.

FEEHLEY, T. et al. Drugging the epigenome in the age of precision medicine. **Clinical Epigenetics**, v. 15, n. 1, p. 6, 11 jan. 2023.

FENG, S.; DE CARVALHO, D. D. Clinical advances in targeting epigenetics for cancer therapy. **The FEBS Journal**, v. 289, n. 5, p. 1214–1239, 2022.

GRIVAS, P. et al. Mocetinostat for patients with previously treated, locally advanced/metastatic urothelial carcinoma and inactivating alterations of acetyltransferase genes. **Cancer**, v. 125, n. 4, p. 533–540, 15 fev. 2019.

GRUBELNIK, G. et al. Expression of NANOG and Its Regulation in Oral Squamous Cell Carcinoma. **BioMed Research International**, v. 2020, p. 8573793, 17 jul. 2020.

GUIMARÃES, D. M. et al. Sensitizing mucoepidermoid carcinomas to chemotherapy by targeted disruption of cancer stem cells. **Oncotarget**, v. 7, n. 27, p. 42447–42460, 7 jun. 2016.

HAILE, C. N. et al. The Impact of Disulfiram Treatment on the Reinforcing Effects of Cocaine: A Randomized Clinical Trial. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. e47702, 8 nov. 2012.

HAMADA, S. et al. Synthesis and activity of N-oxalylglycine and its derivatives as Jumonji C-domain-containing histone lysine demethylase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 10, p. 2852–2855, 15 maio 2009.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, jan. 2022.

HASSN MESRATI, M. et al. CD44: A Multifunctional Mediator of Cancer Progression. **Biomolecules**, v. 11, n. 12, p. 1850, 9 dez. 2021.

Head and Neck Cancer - Statistics. Disponível em: <<https://www.cancer.net/cancer-types/head-and-neck-cancer/statistics>>. Acesso em: 5 abr. 2023.

Home | Cayman Chemical. Disponível em: <<https://www.caymanchem.com/>>. Acesso em: 17 maio. 2023.

HONMA, D. et al. Novel orally bioavailable EZH1/2 dual inhibitors with greater antitumor efficacy than an EZH2 selective inhibitor. **Cancer Science**, v. 108, n. 10, p. 2069–2078, out. 2017.

HUNG, C.-C. et al. Direct Binding of Cisplatin to p22phox, an Endoplasmic Reticulum (ER) Membrane Protein, Contributes to Cisplatin Resistance in Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) Cells. **Molecules**, v. 25, n. 17, p. 3815, 21 ago. 2020.

IDRISSOU, M. et al. Epi-drugs as triple-negative breast cancer treatment. **Epigenomics**, v. 12, n. 8, p. 725–742, abr. 2020.

IONKINA, A. A. et al. Transcriptome analysis of heterogeneity in mouse model of metastatic breast cancer. **Breast cancer research: BCR**, v. 23, n. 1, p. 93, 27 set. 2021.

JENKE, R. et al. Anticancer Therapy with HDAC Inhibitors: Mechanism-Based Combination Strategies and Future Perspectives. **Cancers**, v. 13, n. 4, p. 634, 5 fev. 2021.

JENSEN, M. M. et al. Tumor volume in subcutaneous mouse xenografts measured by microCT is more accurate and reproducible than determined by 18F-FDG-microPET or external caliper. **BMC Medical Imaging**, v. 8, p. 16, 16 out. 2008.

- JIN, N. et al. Advances in epigenetic therapeutics with focus on solid tumors. **Clinical Epigenetics**, v. 13, n. 1, p. 83, 20 abr. 2021.
- JOHNSON, D. E. et al. Head and neck squamous cell carcinoma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 6, n. 1, p. 92, dez. 2020.
- JURKOWSKA, R. Z.; JURKOWSKI, T. P.; JELTSCH, A. Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. **Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology**, v. 12, n. 2, p. 206–222, 24 jan. 2011.
- JUSTIN, S. et al. Chronic Sulforaphane Administration Inhibits Resistance to the mTOR-Inhibitor Everolimus in Bladder Cancer Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 11, p. 4026, 4 jun. 2020.
- KELLY, K. et al. Adjuvant Erlotinib Versus Placebo in Patients With Stage IB-IIIa Non-Small-Cell Lung Cancer (RADIANT): A Randomized, Double-Blind, Phase III Trial. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 34, p. 4007–4014, dez. 2015.
- KILGORE, J. A. et al. Identification of DNMT1 Selective Antagonists Using a Novel Scintillation Proximity Assay. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 27, p. 19673–19684, 5 jul. 2013.
- KIM, B. W. et al. Clinical significance of OCT4 and SOX2 protein expression in cervical cancer. **BMC Cancer**, v. 15, n. 1, p. 1015, 26 dez. 2015.
- LANG, T. et al. Disruption of KDM4C-ALDH1A3 feed-forward loop inhibits stemness, tumorigenesis and chemoresistance of gastric cancer stem cells. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, p. 1–3, 22 set. 2021.
- LEE, D. H. et al. Histone demethylase KDM4C controls tumorigenesis of glioblastoma by epigenetically regulating p53 and c-Myc. **Cell Death & Disease**, v. 12, n. 1, p. 1–14, 18 jan. 2021.
- LI, W. (JESS) et al. MicroRNA-34a: Potent Tumor Suppressor, Cancer Stem Cell Inhibitor, and Potential Anticancer Therapeutic. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 640587, 8 mar. 2021.
- LIANG, Y.; TURCAN, S. Epigenetic Drugs and Their Immune Modulating Potential in Cancers. **Biomedicines**, v. 10, n. 2, p. 211, fev. 2022.
- LIMA DE OLIVEIRA, J. et al. Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: A route to acquired cisplatin resistance through epigenetics in HNSCC. **Oral Diseases**, 11 abr. 2022.
- LIU, J. et al. SOX4 maintains the stemness of cancer cells via transcriptionally enhancing HDAC1 revealed by comparative proteomics study. **Cell & Bioscience**, v. 11, 2021.
- LONG, J. et al. The BET Bromodomain Inhibitor I-BET151 Acts Downstream of Smoothed Protein to Abrogate the Growth of Hedgehog Protein-driven Cancers. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 51, p. 35494–35502, 19 dez. 2014.
- LOUREDO, B. V. R. et al. Epidemiology and survival outcomes of lip, oral cavity, and oropharyngeal squamous cell carcinoma in a southeast Brazilian population. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 27, n. 3, p. e274–e284, maio 2022.
- LU, W. et al. Computer-Aided Drug Design in Epigenetics. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, p. 57, 12 mar. 2018.

- LYTLE, N. K.; BARBER, A.; REYA, T. Stem cell fate in cancer growth, progression and therapy resistance. **Nature Reviews Cancer**, v. 18, n. 11, p. 669–680, nov. 2018.
- MAHMOUDIAN, M. et al. Bortezomib-loaded lipidic-nano drug delivery systems; formulation, therapeutic efficacy, and pharmacokinetics. **Journal of Microencapsulation**, v. 38, n. 3, p. 192–202, 3 abr. 2021.
- MALI, S. B. Epigenetics: Promising journey so far but ways to go in head neck cancer. **Oral Oncology**, v. 135, p. 106194, 1 dez. 2022.
- MARAMPON, F. et al. Histone deacetylase inhibitor ITF2357 (givinostat) reverts transformed phenotype and counteracts stemness in in vitro and in vivo models of human glioblastoma. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 145, n. 2, p. 393–409, 1 fev. 2019.
- MARTIROSYAN, A. et al. Actions of a histone deacetylase inhibitor NSC3852 (5-nitroso-8-quinolinol) link reactive oxygen species to cell differentiation and apoptosis in MCF-7 human mammary tumor cells. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 317, n. 2, p. 546–552, maio 2006.
- MCCABE, M. T. et al. Targeting Histone Methylation in Cancer. **Cancer Journal (Sudbury, Mass.)**, v. 23, n. 5, p. 292–301, 2017.
- MCCABE, M. T.; BRANDES, J. C.; VERTINO, P. M. Cancer DNA Methylation: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. **Clinical Cancer Research: an Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 15, n. 12, p. 3927–3937, 15 jun. 2009.
- MEKHAIL, T. M.; MARKMAN, M. Paclitaxel in cancer therapy. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 3, n. 6, p. 755–766, jun. 2002.
- MILAN, T. M. et al. Epigenetic modifications control loss of adhesion and aggressiveness of cancer stem cells derived from head and neck squamous cell carcinoma with intrinsic resistance to cisplatin. **Archives of Oral Biology**, v. 141, p. 105468, 1 set. 2022.
- MOREL, D. et al. Combining epigenetic drugs with other therapies for solid tumours - past lessons and future promise. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 17, n. 2, p. 91–107, set. 2019.
- MOREL, D. et al. Combining epigenetic drugs with other therapies for solid tumours - past lessons and future promise. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 17, n. 2, p. 91–107, fev. 2020.
- MU, N. et al. Inhibition of SIRT1/2 upregulates HSPA5 acetylation and induces pro-survival autophagy via ATF4-DDIT4-mTORC1 axis in human lung cancer cells. **Apoptosis**, v. 24, n. 9, p. 798–811, 1 out. 2019.
- MURATA, K. et al. A novel mechanism for drug-induced liver failure: inhibition of histone acetylation by hydralazine derivatives. **Journal of Hepatology**, v. 46, n. 2, p. 322–329, fev. 2007.
- NAGAI, Y. et al. PRMT5 Associates With the FOXP3 Homomer and When Disabled Enhances Targeted p185erbB2/neu Tumor Immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 174, 8 fev. 2019.
- NAKAMURA, R. et al. Reciprocal expression of Slug and Snail in human oral cancer cells. **PLoS ONE**, v. 13, n. 7, p. e0199442, 3 jul. 2018.

NECHUSHTAN, H. et al. A Phase IIb Trial Assessing the Addition of Disulfiram to Chemotherapy for the Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. **The Oncologist**, v. 20, n. 4, p. 366–367, abr. 2015.

NOVAK, D. et al. SOX2 in development and cancer biology. **Seminars in Cancer Biology**, v. 67, n. Pt 1, p. 74–82, dez. 2020.

Oral Cavity & Oropharyngeal Cancer Key Statistics 2021. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/oral-cavity-and-oropharyngeal-cancer/about/key-statistics.html>>. Acesso em: 5 abr. 2023.

PACHECO, M. B. et al. Hydralazine and Panobinostat Attenuate Malignant Properties of Prostate Cancer Cell Lines. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 7, p. 670, 13 jul. 2021.

PARK, J. W.; HAN, J.-W. Targeting epigenetics for cancer therapy. **Archives of Pharmacal Research**, v. 42, n. 2, p. 159–170, 2019.

PATRA, S. K. Roles of OCT4 in pathways of embryonic development and cancer progression. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 189, p. 111286, jul. 2020.

PEREIRA, N. F. et al. Association between oral hygiene and head and neck cancer in Brazil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 23, p. e200094, 16 set. 2020.

PIHA-PAUL, S. A. et al. First-in-Human Study of Mivebresib (ABBV-075), an Oral Pan-Inhibitor of Bromodomain and Extra Terminal Proteins, in Patients with Relapsed/Refractory Solid Tumors. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 25, n. 21, p. 6309–6319, 1 nov. 2019.

PIPERDI, B.; PEREZ-SOLER, R. Role of Erlotinib in the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer. **Drugs**, v. 72, n. 0 1, p. 10.2165/1163018-S0-000000000–00000, 19 jun. 2012.

QIN, S. et al. Emerging role of tumor cell plasticity in modifying therapeutic response. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, p. 228, 7 out. 2020.

RAMPERSAD, S. N. Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 9, p. 12347–12360, 10 set. 2012.

RASTOGI, B. et al. Overexpression of HDAC9 promotes oral squamous cell carcinoma growth, regulates cell cycle progression, and inhibits apoptosis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 415, n. 1, p. 183–196, 1 abr. 2016.

RECOUVREUX, M. V. et al. Glutamine depletion regulates Slug to promote EMT and metastasis in pancreatic cancer. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 9, p. e20200388, 7 set. 2020.

RIZZINO, A.; WUEBBEN, E. L. Sox2/Oct4: A delicately balanced partnership in pluripotent stem cells and embryogenesis. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1859, n. 6, p. 780–791, jun. 2016.

ROBINSON, M. et al. Characterization of SOX2, OCT4 and NANOG in Ovarian Cancer Tumor-Initiating Cells. **Cancers**, v. 13, n. 2, p. 262, 12 jan. 2021.

ROMANOWSKA, K. et al. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Epigenetic Landscape. **Diagnostics**, v. 11, n. 1, p. 34, 27 dez. 2020.

ROTILI, D. et al. Discovery of Safermid-Related Sirtuin Inhibitors: Binding Mode Studies and Antiproliferative Effects in Cancer Cells Including Cancer Stem Cells. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 24, p. 10937–10947, 27 dez. 2012.

SAIF, I.; HASSOU, N.; ENNAJI, M. M. Chapter 26 - Ninety Years of DNA Methylation. Em: ENNAJI, M. M. (Ed.). **Emerging and Reemerging Viral Pathogens**. [s.l.] Academic Press, 2020. p. 587–617.

SAJNANI, A. K. et al. In-Silico Analysis of Chromatin Modifiers and Profiling of Histone Deacetylases (HDAC's) in Human Oral Cancer. **Chonnam Medical Journal**, v. 57, n. 3, p. 176–184, set. 2021.

SAYEGH, J. et al. Identification of small molecule inhibitors of Jumonji AT-rich interactive domain 1B (JARID1B) histone demethylase by a sensitive high throughput screen. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 13, p. 9408–9417, 29 mar. 2013.

SEONG, A.-R. et al. Delphinidin, a specific inhibitor of histone acetyltransferase, suppresses inflammatory signaling via prevention of NF- κ B acetylation in fibroblast-like synoviocyte MH7A cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 410, n. 3, p. 581–586, 8 jul. 2011.

SHAHOUMI, L. A. Oral Cancer Stem Cells: Therapeutic Implications and Challenges. **Frontiers in Oral Health**, v. 2, 2021.

SHARMA, S.; KELLY, T. K.; JONES, P. A. Epigenetics in cancer. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 1, p. 27–36, 1 jan. 2010.

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, jul. 2012.

SHEN, M. et al. Quantitative high-throughput phenotypic screening of pediatric cancer cell lines identifies multiple opportunities for drug repurposing. **Oncotarget**, v. 9, n. 4, p. 4758–4772, 19 dez. 2017.

SHI, X. et al. Targeting bromodomain and extra-terminal proteins to inhibit neuroblastoma tumorigenesis through regulating MYCN. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, p. 1021820, 16 set. 2022.

SMITH, E. R.; CHEN, Z.-S.; XU, X.-X. 11 - Paclitaxel and cancer treatment: Non-mitotic mechanisms of paclitaxel action in cancer therapy. Em: SWAMY, M. K.; PULLAIAH, T.; CHEN, Z.-S. (Eds.). **Paclitaxel**. [s.l.] Academic Press, 2022. p. 269–286.

SUN, L. et al. Cetuximab-Based vs Carboplatin-Based Chemoradiotherapy for Patients With Head and Neck Cancer. **JAMA otolaryngology-- head & neck surgery**, v. 148, n. 11, p. 1022–1028, 1 nov. 2022.

SZEFLER, B.; CZELEŃ, P. Will the Interactions of Some Platinum (II)-Based Drugs with B-Vitamins Reduce Their Therapeutic Effect in Cancer Patients? Comparison of Chemotherapeutic Agents such as Cisplatin, Carboplatin and Oxaliplatin—A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 2, p. 1548, 12 jan. 2023.

- TAN, C. R. C. et al. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Bortezomib. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 58, n. 2, p. 157–168, 1 fev. 2019.
- TOMASELLI, D. et al. Epigenetic Polypharmacology: A New Frontier for Epi-Drug Discovery. **Medicinal Research Reviews**, v. 40, n. 1, p. 190–244, jan. 2020.
- TRISCIUOGLIO, D. et al. CPTH6, a Thiazole Derivative, Induces Histone Hypoacetylation and Apoptosis in Human Leukemia Cells. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 2, p. 475–486, 16 jan. 2012.
- VAN VEGGEL, M.; WESTERMAN, E.; HAMBERG, P. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Panobinostat. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 57, n. 1, p. 21–29, 1 jan. 2018.
- VEDAM, V. K. V.; BOAZ, K.; NATARAJAN, S. Prognostic Efficacy of Nuclear Morphometry at Invasive Front of Oral Squamous Cell Carcinoma: An Image Analysis Microscopic Study. **Analytical Cellular Pathology**, v. 2014, p. 1–9, 2014.
- VOUGIOUKLAKIS, T.; NAKAMURA, Y.; SALOURA, V. Critical roles of protein methyltransferases and demethylases in the regulation of embryonic stem cell fate. **Epigenetics**, v. 12, n. 12, p. 1015–1027, 16 jan. 2018.
- WAGNER, V. P. et al. Bryne's grading system predicts poor disease-specific survival of oral squamous cell carcinoma: a comparative study among different histologic grading systems. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 123, n. 6, p. 688–696, 1 jun. 2017.
- WANG, L. et al. Anticancer effects of disulfiram: a systematic review of in vitro, animal, and human studies. **Systematic Reviews**, v. 11, n. 1, p. 109, 2 jun. 2022.
- WANG, S. J. et al. CD44 variant isoforms in head and neck squamous cell carcinoma progression. **The Laryngoscope**, v. 119, n. 8, p. 1518–1530, ago. 2009.
- WEIRATH, N. A. et al. Small Molecule Inhibitors of TET Dioxygenases: Bobcat339 Activity Is Mediated by Contaminating Copper(II). **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, n. 5, p. 792–798, 12 maio 2022.
- WIGGERS, C. R. M. et al. Epigenetic drug screen identifies the histone deacetylase inhibitor NSC3852 as a potential novel drug for the treatment of pediatric acute myeloid leukemia. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 66, n. 8, p. e27785, 2019.
- WU, L. et al. Disulfiram and BKM120 in Combination with Chemotherapy Impede Tumor Progression and Delay Tumor Recurrence in Tumor Initiating Cell-Rich TNBC. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 236, 18 jan. 2019.
- XIE, L. et al. An overview on the biological activity and anti-cancer mechanism of lovastatin. **Cellular Signalling**, v. 87, p. 110122, 1 nov. 2021.
- YAMAGISHI, M. et al. Targeting Excessive EZH1 and EZH2 Activities for Abnormal Histone Methylation and Transcription Network in Malignant Lymphomas. **Cell Reports**, v. 29, n. 8, p. 2321–2337.e7, 19 nov. 2019.
- YANG, A. Y. et al. Natural compound-derived epigenetic regulators targeting epigenetic readers, writers and erasers. **Current topics in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 7, p. 697–713, 2016.

YANG, L. et al. Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, p. 8, 7 fev. 2020.

YOO, J. et al. Advances in Histone Demethylase KDM3A as a Cancer Therapeutic Target. **Cancers**, v. 12, n. 5, p. 1098, 28 abr. 2020.

ZHANG, Z.-G. et al. KDM5B promotes breast cancer cell proliferation and migration via AMPK-mediated lipid metabolism reprogramming. **Experimental Cell Research**, v. 379, n. 2, p. 182–190, 15 jun. 2019.

ZHAO, S. et al. CD44 expression level and isoform contributes to pancreatic cancer cell plasticity, invasiveness and response to therapy. **Clinical Cancer Research: an Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 22, n. 22, p. 5592–5604, 15 nov. 2016.

ZHAO, Z.; SHILATIFARD, A. Epigenetic modifications of histones in cancer. **Genome Biology**, v. 20, 2019.

ZHENG, Y.-C. et al. Lysine demethylase 5B (KDM5B): A potential anti-cancer drug target. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 161, p. 131–140, 1 jan. 2019.

ZHOU, J.; AL, E. Evolving insights: how DNA repair pathways impact cancer evolution. **Cancer Biology & Medicine**, v. 17, n. 4, p. 805–827, 15 nov. 2020.

ZHOU, Z. et al. Recent advances in inhibitors of sirtuin1/2: an update and perspective. **Future Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 8, p. 907–934, 1 abr. 2018.