

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

LETÍCIA RODRIGUES DE CASTRO

**ENVOLVIMENTO DA SINALIZAÇÃO DE NFKB NO ACÚMULO DE CÉLULAS-
TRONCO TUMORAIS EM LINHAGENS CELULARES DE TUMORES DE CABEÇA
E PESCOÇO RESISTENTES À CISPLATINA**

Ribeirão Preto

2021

LETÍCIA RODRIGUES DE CASTRO

**ENVOLVIMENTO DA SINALIZAÇÃO DE NF κ B NO ACÚMULO DE CÉLULAS-
TRONCO TUMORAIS EM LINHAGENS CELULARES DE TUMORES DE CABEÇA
E PESCOÇO RESISTENTES À CISPLATINA**

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

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Oliveira de Almeida

Ribeirão Preto

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na publicação

Serviço de Documentação Odontológica

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Castro, Letícia Rodrigues de

Envolvimento da sinalização de NFkB no acúmulo de células-tronco tumorais em linhagens celulares de tumores de cabeça e pescoço resistentes à Cisplatina, Ribeirão Preto, 2021.

69 páginas.

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Biologia Oral.

Orientadora: Luciana Oliveira de Almeida.

1. Carcinoma espinocelular de cabeça de pescoço.
2. Resistência à Cisplatina.
3. Modificações epigenéticas.
4. Células-tronco tumorais.
5. NFkB.

FOLHA DE APROVAÇÃO

CASTRO, L. R. 2021. **Envolvimento da sinalização de NFkB no acúmulo de células-tronco tumorais em linhagens celulares de tumores de cabeça e pescoço resistentes à Cisplatina.** Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, 2021.

Aprovada em: _____ / _____ / _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Este manuscrito resume quase sete anos de dedicação entre o sonho do ingresso no ensino superior e sua continuidade na pós graduação. Não seria possível alcançar este sonho sem o apoio da minha família, principalmente dos meus pais, **Adriana Alves Rodrigues de Castro** e **Divino Albino de Castro**. Esse trabalho representa mais do que sumariação de uma pesquisa. Representa o acesso a um mundo pelo qual lutamos por acesso. Essa é uma conquista da nossa família.

Dedico este trabalho à **Larissa Rodrigues de Castro**, irmã caçula que me ensina e me inspira com seu planejamento e determinação. À minha tia **Daniela Alves Rodrigues**, mulher inteligente e humana que influenciou a minha formação. Aos meus avós **Regina Alves Rodrigues** e **Abel Joaquim Rodrigues**, que me ensinam o amor e o cuidado através de gestos simples. Estou um passo mais próxima de ser Doutora, apelido carinhoso dado pelo meu avô.

Às amigas que a pós graduação me trouxe: **Thaís Moré Milan**, amiga de laboratório, de vida e que me auxiliou em diversos momentos na execução deste projeto e **Viviann Ruocco Vetucci**, amiga com quem dividi as emoções na vida da pós graduação. À minha amiga **Ana Clara Gomes Rezende**, com quem tive o prazer de dividir o lar e junto dele, incertezas, felicidades, lágrimas e gargalhadas.

Todos vocês tornaram a experiência da pós graduação possível e colorida para mim. Sempre lembrarei da contribuição de cada um e espero poder retribuir todo esse amor que me foi dado. Obrigada!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Doutora **Luciana Oliveira de Almeida**, que sempre esteve presente, inclusive na bancada do laboratório. Obrigada pela oportunidade que me foi dada de integrar seu grupo de pesquisa, me ambientar ao mundo da biologia molecular e pela confiança ao me designar parte importante do seu projeto.

À Mestre **Rayana Longo Bighetti Trevisan**, que contribuiu na execução deste projeto e que com sabedoria e paciência, me trouxe calma e outro olhar para situações não planejadas.

Aos Doutores **Helena Bacha Lopes** e **Gileade Pereira Freitas**, por compartilharem comigo a perspectiva de Cirurgiões Dentistas que investiram na carreira acadêmica. Os conselhos de vocês foram valiosos na tomada de decisões.

Ao coordenador do programa de Biologia Oral e Professor, Doutor **Márcio Mateus Beloti**, que me incentivou nessa jornada através de sugestões e elogios nas minhas apresentações. Suas falas me trouxeram o sentimento de estar no caminho certo.

Aos especialistas de laboratório **Fabíola Singaretti de Oliveira**, **Roger Rodrigo Fernandes** e **Milla Sprone Tavares**, que sempre estiveram disponíveis para ensinar e auxiliar na ambientação e aprendizagem dos recursos dos laboratórios.

À Professora Doutora **Lílian Tedeschi Ramalli**, que me despertou a curiosidade para o estudo na área básica e de lesões orais através das aulas na graduação. Você me incentivou a trilhar este caminho.

À Professora Doutora **Ana Carolina Fragoso Motta**, que me acolheu em seu grupo de pesquisa e me deu oportunidade de aprender e crescer em colaboração paralela ao desenvolvimento deste projeto. Obrigada pelo espaço cedido, pelo olhar humano e pela confiança.

Processo n. 2019/05782-3, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

“Para navegar contra a corrente são necessárias condições raras: espírito de aventura,
coragem, perseverança e paixão.”

Nise da Silveira

RESUMO

CASTRO, L. R. 2021. **Envolvimento da sinalização de NFkB no acúmulo de células-tronco tumorais em linhagens celulares de tumores de cabeça e pescoço resistentes à Cisplatina.** 2021. 69 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, 2021.

O Carcinoma espinocelular (CEC) de cabeça e pescoço é uma malignidade de alta incidência e mortalidade devido a resistência das células-tronco tumorais (CTT) aos tratamentos antineoplásicos. NFkB é um fator de transcrição associado a quimiorresistência por ativar genes importantes na carcinogênese. O objetivo deste trabalho foi avaliar o papel de NFkB no acúmulo de CTT em linhagens celulares de CEC de língua resistentes a Cisplatina e se a inibição da via de NFkB poderia reverter o fenótipo de quimiorresistência. Foram realizados ensaios *in vitro* com as linhagens celulares CAL-27 e SCC-9 selvagens a resistentes a Cisplatina (CisR). TNF α foi usado como indutor e CBL0137 e Emetine como inibidores de NFkB. Foi identificado acúmulo de NFkB nas células CisR e na população de CTT; ainda, as células selvagens com TNF α e CisR apresentaram aumento de CTT, sugerindo o envolvimento de NFkB no acúmulo destas células. A administração de CBL0137 diminuiu a expressão de NFkB na CAL-27 e de CXCL8 e TNF em ambas linhagens. Emetine reduziu a expressão de NFkB na SCC-9. Os inibidores reduziram a expressão proteica de p-NFkB em ambas linhagens e causaram aumento de expressão gênica de HDAC1, 2, 9 e SIRT 1 na CAL-27 e de HDAC9 e SIRT1 na SCC-9. A administração de CBL0137 aumentou a expressão gênica de HDAC1 e HDAC11 na SCC-9. Os tratamentos reduziram os níveis de acetilação das histonas H3K9, H3K36, H3K79, H4K5 e H4K12 na CAL-27 e de H3K79, H4K5 e H4K12 na SCC9; ainda, CBL0137 reduziu H3K36 na SCC9. O tratamento de ambos inibidores combinados com Cisplatina e a monoterapia com Emetine foram capazes de reduzir o número de CTT na CAL-27 enquanto o tratamento isolado CBL0137 ou combinado com Cisplatina foram mais eficientes na SCC9. O tratamento isolado com Emetine foi mais eficiente em reduzir as CTT em ambas linhagens. Ambas drogas inibiram o potencial de formação de colônias e Emetine + Cisplatina e Emetine reduziram o número de células invasivas na CAL-27 e SCC-9, respectivamente. Emetine + Cisplatina foi o tratamento mais eficiente na inibição do potencial de migração. Com os resultados obtidos, é sugerido que

NFkB está envolvido no acúmulo de CTT em linhagens celulares resistentes à cisplatina e que a sua inibição induz a sensibilização ao tratamento, reduzindo a população de CTT e marcadores de agressividade tumoral.

Palavras-chave: Carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, quimiorresistência, células-tronco tumorais, Cisplatina, NFkB.

ABSTRACT

CASTRO, L. R. 2021. **Involvement of NFkB signaling in CSC accumulation of head and neck carcinoma cell lines resistant to chemotherapy.** 2021. 69 p. Thesis (Master's Degree) – School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 2021.

Head and neck squamous cell carcinoma is a high mortality and malignancy disease due to cancer stem cell (CSC) resistance to antineoplastic treatments. NFkB is a transcription factor associated with chemoresistance through activation of important genes in carcinogenesis. The objective of this study was to evaluate the role of NFkB in the accumulation of CSC in Cisplatin-resistant tongue squamous cell carcinoma cell lines and whether inhibition of the NFkB pathway could reverse the phenomenon of chemoresistance to this drug. In vitro assays were performed with the wild-type CAL-27 and SCC-9 cell lines resistant to Cisplatin (CisR). TNF α was used as an inducer and CBL0137 and Emetine as NFkB inhibitors. An accumulation of NFkB was found in CisR cells and in the CTT + population; further, wild-type cells with TNF α and CisR additionally increased CTT, suggesting involvement of NFkB in accumulating these cells. As IC50 and drug inhibition doses for each strain were established. Administration of CBL0137 decreased NFkB expression in CAL-27 and CXCL8 and TNF in both strains. Emetine reduced NFkB expression in SCC-9. Inhibitors reduced p-NFkB in both cell lines. The inhibitors caused increased gene expression of HDAC1, 2, 9 and SIRT 1 in CAL-27 and of HDAC9 and SIRT1 in SCC9. CBL0137 increased HDAC1 and HDAC11 in SCC9. The treatments reduce the levels of acetylation of histones H3K9, H3K36, H3K79, H4K5 and H4K12 in CAL-27 and of H3K79, H3K79, H4K5 and H4K12 in SCC9; further, CBL0137 reduced H3K36 in SCC9. The combined treatment of Emetine + Cisplatin and CBL0137 + Cisplatin and monotherapy with Emetine reduced the number of CSC in CAL-27, while CBL0137 alone or combined treatment with Cisplatin were more efficient in SCC9. The isolated Emetine treatment was more efficient in reducing CSC in both strains. Both drugs inhibited the colony formation potential and Emetine + Cisplatin and Emetine reduced the number of invasive cells in CAL-27 and SCC-9, respectively. Emetine + Cisplatin was the most efficient treatment in inhibiting the migration potential. With the results obtained, it is suggested that NFkB is related to the accumulation of CSC in CisR cell lines and that its inhibition increases the sensitivity to

treatment with Cisplatin by reducing the population of CSC and tumor aggressiveness markers.

Keywords: Head and neck squamous cell carcinoma, chemoresistance, tumor stem cells, Cisplatin, NFkB.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Identificação de NFkB nas linhagens CAL-27 e SCC-9.....	25
Figura 2. Identificação da população de CTT linhagens CAL-27 e SCC-9.....	26
Figura 3. Ensaios de MTS para a obtenção da dose IC50 das linhagens CAL-27 CisR e SCC-9 CisR para os compostos CBL0137 e Emetine.....	27
Figura 4. Ensaio de formação de esferas das linhagens celulares CAL-27 e SCC-9 CisR.....	28
Figura 5. Avaliação da expressão de NFkB, CXCL8 e TNF-a na linhagem CAL-27 e SCC-9 após administração dos inibidores CBL0137 e Emetine.....	31
Figura 6. Avaliação de p-NFkB e Ikb nas linhagens CAL-27 e SCC-9.....	32
Figura 7. Investigação dos níveis de mRNA de genes envolvidos na regulação epigenética após o tratamento com os inibidores de NFkB na linhagem CAL-27.....	35
Figura 8. Investigação dos níveis de mRNA de genes envolvidos na regulação epigenética após o tratamento com os inibidores de NFkB na linhagem SCC-9.....	36
Figura 9. Avaliação de acetilação de histonas na linhagem CAL-27 após os tratamentos com CBL0137 e Emetine.....	37
Figura 10. Avaliação de acetilação de histonas na linhagem SCC-9 após os tratamentos com CBL0137 e Emetine.....	38
Figura 11. Identificação e quantificação da população de CTT após os tratamentos com os inibidores de NFkB CBL0137 e Emetine.....	39
Figura 12. Avaliação da formação de esferas após administração isolada ou em conjunto de Emetine, CBL0137 e cisplatina nas linhagens CAL-27 e SCC-9.....	40
Figura 13. Avaliação do potencial de formação de colônias das linhagens CAL-27 e SCC-9 após o tratamento com CBL0137 e Emetine.....	42
Figura 14. Avaliação do potencial de invasão das linhagens CAL-27 e SCC-9 com os tratamentos isolados com CBL0137 e Emetine ou combinados com Cisplatina.....	43
Figura 15. Avaliação do potencial de migração da linhagem CAL-27 após administração isolada de CBL0137 e Emetine ou combinada com Cisplatina.....	45

Figura 16. Avaliação do potencial de migração da linhagem SCC-9 após administração isolada de CBL0137 e Emetine ou combinada com Cisplatina.....46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dose-resposta IC50 e de inibição de esferas de CBL0137 e Emetine para as linhagens CAL27 e SCC9.....	29
---	-----------

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4. RESULTADOS.....	24
6. CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS.....	54

1. INTRODUÇÃO

1.1. Carcinoma de cabeça e pescoço

A carcinogênese envolve alterações genéticas, epigenéticas e fatores ambientais. Esta combinação de alterações pode revelar relações funcionais entre genes e vias de sinalização que levam ao desenvolvimento de um tumor, além de identificar alvos para o estabelecimento de tratamentos mais eficazes (Yeang et al., 2008). Apesar dos extensivos esforços para melhor compreender a biologia tumoral e desenvolver novas modalidades terapêuticas, o câncer continua sendo uma das principais causas de morte em todo o mundo (Farley et al., 2016).

Aproximadamente 40% das neoplasias de cabeça e pescoço ocorrem na cavidade oral, constituindo cerca de 15% na faringe, 25% na laringe, e o restante nos sítios remanescentes, tais como glândulas salivares e tireoide (Stoeckli & Broglie, 2013). No Brasil, estimou-se 11.180 casos novos de câncer da cavidade oral em homens e 4.010 novos casos em mulheres para os anos de 2020-2022, sendo o 5º ou 6º tumor de maior incidência em homens, dependendo da região em território nacional, e 11º ou 12º tumor de maior incidência em mulheres (*Estimativa 2020: Incidência de Câncer No Brasil*, 2019). Os fatores de risco clássicos para os tumores de cabeça e pescoço são o tabagismo e o etilismo. É bem estabelecido que a infecção por papilomavírus humanos (HPVs) aumenta o risco de desenvolvimento desses tumores, principalmente na orofaringe (Lawrence et al., 2015).

O tratamento empregado para os tumores orais envolve uma abordagem multidisciplinar composta por cirurgia, radiação e/ou quimioterapia. Contudo, menos de 50% dos pacientes sobrevivem mais de 5 anos após diagnóstico. A elevada mortalidade não é devida somente às falhas loco-regionais, mas também à altas taxas de recorrência e ao aparecimento de metástases, que acometem 60% e 20% dos pacientes, respectivamente, sendo essas falhas devidas à resistência ao tratamento (Datta et al., 2016). A base molecular da resistência adquirida nesses tumores permanece desconhecida, tornando-se um fator limitante na quimioterapia (Chang & Wang, 2016). Em estágios iniciais da doença o tratamento é eficaz, entretanto, no momento do diagnóstico, a maioria dos pacientes apresenta-se em estágios avançados da doença, o que requer o uso de modalidades combinadas de tratamentos,

que além de afetarem profundamente a qualidade de vida dos pacientes, não proporcionam uma resposta satisfatória (Ausoni et al., 2016).

Um dos maiores impedimentos para a melhora da taxa de sobrevivência de pacientes com tumores de cabeça e pescoço, é a falta de entendimento dos mecanismos pelos quais as células resistentes ao tratamento sobrevivem em meio a uma população de células tumorais heterogêneas (Ghosh et al., 2016). A presença de uma subpopulação específica de células, denominada células tronco tumorais, está sendo identificada em vários tipos de tumores, inclusive em carcinoma de cabeça e pescoço, comportando-se como progenitor tumoral (Almeida et al., 2016). O papel dessas células na progressão tumoral e formação de metástase em carcinomas de cabeça e pescoço é um importante ponto que precisa ser esclarecido para a eliminação da doença (Méry et al., 2016).

1.2. Células-tronco tumorais

A teoria das células-tronco tumorais é baseada em evidências experimentais de que o estado de diferenciação das células em um tumor não é igual, semelhante ao dos tecidos normais, com algumas células-tronco raras e indiferenciadas responsáveis pela manutenção de toda a população de células do tumor. Estas células compartilham várias propriedades fundamentais com as células-tronco normais, como a autorrenovação (Antoniou et al., 2013). As células-tronco tumorais possuem capacidade de renovar-se indefinidamente e permanecerem em um estado indiferenciado. A segunda propriedade é a divisão assimétrica, a qual é responsável por dar origem a células-filhas diferenciadas que compõem a maior parte do tumor e são caracterizadas por propagação rápida e limitada. Em terceiro lugar, as células-tronco tumorais são resistentes às agressões eletromagnéticas e químicas, principalmente devido à sua replicação infrequente, a ativação aumentada de mecanismos de reparo de DNA, ao sistema de efluxo de drogas ativado e ao aumento das defesas contra espécies reativas de oxigênio (Colak & Medema, 2014; Kaiser, 2015; Lou & Dean, 2007; Skvortsov et al., 2015).

Assim como células-tronco normais, as células-tronco tumorais retêm a habilidade de se dividir assimetricamente dando origem a células mais diferenciadas; ou simetricamente resultando em células-filhas que mantêm as mesmas propriedades de células-tronco. Esta habilidade de autorrenovação permite que as células-tronco tumorais perpetuem o tumor (Le,

2014) . Estas células também apresentam a expressão de típicos marcadores de superfície como CD133, CD44, CD24, CD166 e Lgr5, além da expressão de marcadores funcionais como a atividade de Wnt e ALDH1 (Paldino et al., 2014). Em tumores de cabeça e pescoço, a associação de altos níveis da proteína de superfície celular CD44 e a atividade aumentada da enzima de desintoxicação celular ALDH1 são eficientes na identificação da subpopulação de células-tronco tumorais (Zhang et al., 2012).

Grande parte da resistência a quimioterapia e radioterapia parece estar relacionada a presença das células-tronco tumorais (Almeida et al., 2017a; Dalerba & Clarke, 2007; Guimarães et al., 2016; Wagner et al., 2016) Estudos recentes têm demonstrado que a quimioterapia ou radioterapia são tratamentos efetivos na eliminação da massa tumoral, mas falham em destruir as células-tronco e, dessa forma, a mortalidade do câncer permanece alta porque posteriormente, estas células promovem o reaparecimento do tumor (Gopalan et al., 2013). Explorar maneiras de eliminar ou diferenciar as células-tronco do câncer pode definir novas estratégias terapêuticas para o tratamento do carcinoma de cabeça e pescoço (Méry et al., 2016).

1.3. Resistência a quimioterapia

A resistência adquirida sobre agentes quimioterápicos é um importante problema no tratamento do câncer. Estima-se que 7,5 milhões de pacientes morrem a cada ano em todo o mundo devido a falhas na terapia contra o câncer como consequência da resistência adquirida ao tratamento (Ran, 2015).

Drogas utilizadas na quimioterapia convencional têm como alvo as células tumorais em intensa proliferação celular. Estes fármacos dizimam a maioria das células proliferativas, reduzindo o tamanho do tumor imediatamente, mas não atuam sobre as células-tronco quiescentes, que posteriormente são ativadas e dão origem a uma nova massa tumoral, causando recidivas e metástase (Plaks et al., 2015).

A Cisplatina é uma das drogas mais frequentemente usadas na quimioterapia. Este fármaco foi introduzido em testes clínicos no início da década de 70 e os resultados demonstraram que essa droga era um dos mais eficazes agentes quimioterápicos disponíveis para o tratamento de diversos tumores sólidos. Nestas neoplasias, o tratamento com a

Cisplatina obteve boas respostas como monoterapia ou em associação em regimes de poliquimioterapia, uma vez que possui efeito sinérgico com numerosos agentes como alquilantes, antibióticos e antimetabólitos (Ali et al., 2013). Porém, alguns tipos de tumor desenvolveram resistência a este quimioterápico, respondendo bem à Cisplatina no início do tratamento, com diminuição de até 70% das células; contudo, a taxa de morte das células do câncer gradualmente diminui para 15-20% com o passar do tempo (Germani et al., 2014). A cisplatina também é o agente utilizado com maior frequência para o tratamento dos carcinomas de cabeça e pescoço. Quando combinada com radioterapia, a Cisplatina melhora a preservação do órgão e acentua a qualidade de vida dos pacientes. Entretanto, como dito anteriormente, a sobrevida média dos pacientes não melhorou significativamente, havendo necessidade de criação de novas abordagens terapêuticas.

Tem sido observado que as células-tronco tumorais não são apenas resistentes ao tratamento com Cisplatina, mas também são acumuladas após o tratamento em tumores de cabeça e pescoço (Nör et al., 2014). Uma vez que a resistência à quimioterapia contribui para a falha no tratamento, evitar a falta de resposta dos tratamentos atuais e daqueles que serão desenvolvidos futuramente é fundamental (Wilting & Dannenberg, 2012).

1.4. A via de sinalização de NFkB

NFkB é uma proteína nuclear que se liga à elementos acentuadores da cadeia leve da imunoglobulina kappa. NFkB liga-se ao DNA e ativa a expressão de muitos genes-alvo, atuando como um fator de transcrição. A família de NFkB é composta por cinco membros (p65-RelA, RelB, c-Rel, NF-kB1-p50 e NF-kB2-p52) que interagem formando heterodímeros (Hoesel & Schmid, 2013). A ativação de NFkB é regulada por duas principais vias: a via clássica ou canônica, relacionada principalmente à regulação do heterodímero RelA:p50, que sob condições não-estimuladas permanecem localizadas no citoplasma através de interações com proteínas inibitórias da família Ikb. Através da ação de diversos estímulos, como TNF- α , IL-1, vírus, agentes genotóxicos e radiação ionizante, as proteínas Ikb são fosforiladas por proteínas do complexo Ikb quinase (IKK), promovendo a perda da interação entre Ikb e NFkB e sinalizando para a ubiquitinação de Ikb e posterior degradação por proteassoma. Em seguida, NFkB pode ser translocado para o núcleo para exercer sua atividade como fator de transcrição (Baud & Karin, 2009). A via não-canônica de NFkB é ativada por diferentes

classes de receptores, incluindo BAFFER, LTbR, CD40, RANK, TNFR2 e Fn14. Esses receptores induzem a ativação da quinase NIK, que fosforila e ativa predominantemente IKKa que, por sua vez, induz a fosforilação da proteína p100 resultando em sua ubiquitinação e degradação parcial, formando a subunidade p52 de NFkB (S. C. Sun, 2011).

A sinalização de NFkB é encontrada alterada em diversos tipos de tumores incluindo tumores sólidos e hematológicos e é um importante fator de transcrição envolvido no processo de carcinogênese, capaz de promover a indução de todos os seis processos celulares que são marcadores da progressão tumoral através da ativação transcricional de genes relacionados à proliferação, angiogênese, metástase, stress celular, migração, inflamação e autofagia (Canino et al., 2015; S. Ghosh & Karin, 2002; Hanahan & Weinberg, 2011; Rayet & Gélinas, 1999). O acúmulo nuclear de NFkB está associado com a resistência à cisplatina em carcinomas de cabeça e pescoço através da redução dos níveis de acetilação de histonas e a modulação da expressão de genes da maquinaria de reparo do DNA, além de estar envolvido na regulação de genes associados com a diferenciação celular, como Sox2 e Nanog (Almeida et al., 2014; Liu et al., 2010). A redução dos níveis de NFkB diminui o acúmulo das células-tronco tumorais e sensibiliza as células tumorais à quimio e radioterapia, podendo ser uma opção promissora para melhorar a eficiência das terapias convencionais (Wagner et al., 2016).

CBL0137 é um fármaco que inibe NFkB indiretamente. Esta droga pertence a classe das curaxinas que age inibindo o complexo FACT (Facilitador da transcrição da cromatina). FACT é um grupo de proteínas remodeladoras envolvidas no processo de transcrição, replicação e reparo do DNA. O complexo é composto pelas subunidades SSRP1 e SPT16, altamente expressas em células tumorais e em células indiferenciadas, sendo considerado um marcador das células-tronco tumorais (Maluchenko et al., 2016). Normalmente, FACT está ligado a proteínas histonas com a função de desmontar e remontar o octamêro de histonas para disponibilizar a dupla-fita de DNA para a transcrição gênica. Entretanto, com a administração de CBL0137, FACT é sequestrado das histonas para a dupla fita de DNA, causando o esgotamento da FACT nos nucleossomos, o que impede o processo de replicação (H. W. Chang et al., 2018). Via inibição de FACT, CBL0137 inibe a transcrição de NFkB ao impedir a ligação da RNA polimerase II (Gasparian et al., 2011). Em Glioblastoma, CBL0137 induz apoptose e diminui a proliferação das células tumorais, reduzindo o volume do tumor (Barone et al., 2017). Em combinação com a Cisplatina, CBL0137 reduziu a população de células-tronco tumorais em carcinoma de pulmão (De et al., 2018a).

Outra droga que inibe indiretamente NFkB é o Emetine, um agente anti-protozoário que atua impedindo a fosforilação da proteína inibidora do NFkB, o Ikb. Como Emetine impede a fosforilação de Ikb, NFkB fica agregado a sua proteína inibidora no citoplasma celular e não pode se translocar para o núcleo para atuar na transcrição gênica. Resultados recentes indicam que a inibição por Emetine ativa a apoptose de linhagem primária de pacientes portadores de linfoma de células B (Aoki et al., 2017). A exposição de linhagens celulares de Carcinoma mucoepidermoide a Emetine aumentou a eficiência do tratamento radioterápico e quimioterápico com Cisplatina (Wagner et al., 2018).

O papel chave de NFkB na carcinogênese e a identificação das etapas críticas que levam à sua ativação estão apenas começando a serem desvendados. A principal dificuldade, é que alterações na sinalização de NFkB não são mediadas por mutações gênicas, mas por estímulos à resposta inflamatória que se originam do próprio microambiente tumoral, no qual as células-tronco tumorais estão presentes (Nakanishi & Toi, 2005). Dessa forma, um melhor entendimento do mecanismo de resistência mediado pelas células-tronco requer futuros estudos envolvendo vias de sinalização que participam da resistência adquirida, como a sinalização de NFkB. A inibição de NFkB pode ser uma estratégia promissora para a redução da população de células-tronco tumorais e sensibilização às terapias atuais utilizadas no tratamento do carcinoma oral.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Este projeto teve como objetivo identificar o papel da sinalização de NFkB em linhagens celulares de tumores de cabeça e pescoço resistentes ao tratamento com Cisplatina, seu envolvimento no acúmulo de células-tronco tumorais e sua aplicação como alvo terapêutico.

2.2 Específicos

1. Quantificar o acúmulo de NFkB nas linhagens celulares resistentes à Cisplatina previamente estabelecidas.
2. Identificar a presença de NFkB na população de células-tronco tumorais.
3. Caracterizar o envolvimento de NFkB em alterações do comportamento das linhagens quimiorresistentes, como aumento do potencial proliferativo, de invasão e migração.
4. Investigar o papel de NFkB na regulação epigenética das células quimiorresistentes.
5. Demonstrar se a redução dos níveis de NFkB, mediada por compostos inibitórios da proteína, pode reverter o fenótipo de quimiorresistência e diminuir a população de células-tronco tumorais.
6. Analisar a eficiência da inibição de NFkB de forma isolada e em associação à Cisplatina para eliminar as células-tronco tumorais, diminuir a agressividade e reverter o fenótipo de quimiorresistência.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultivo celular

As linhagens celulares de carcinoma espinocelular de língua CAL-27 e SCC-9 foram obtidas previamente da American Type Culture Collection (ATCC) e cultivadas em Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) e Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM F12) suplementados com 10% de soro bovino fetal e 1% de coquetel de antibióticos e antimicóticos (Corning, USA) 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 e resistentes à Cisplatina (CAL-27 CisR e SCC-9 CisR) estabelecidas previamente através da administração seriada de Cisplatina com a finalidade de induzir resistência ao fármaco.

3.2. Ensaio de proliferação celular

2,5x10³ células foram plaqueadas em 200 µl Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) suplementados com 10% de soro bovino fetal e 1% de coquetel de antibióticos e antimicóticos (Corning, USA) em uma placa de 96 poços. A placa foi mantida em incubadora à temperatura controlada de 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. No terceiro dia, os poços foram tratados com as concentrações de 0 µM, 0,1 µM, 0,25 µM, 0,5 µM, 0,75 µM, 1,0 µM, 2,0 µM, 5,0 µM, 7,5 µM e 10 µM de CBL0137 e Emetine (Cayman Chemical Company, USA). No quarto dia, o ensaio de proliferação celular foi realizado pelo teste de atividade mitocondrial das células pelo método da redução do MTS (difeniltetrazólio) através da utilização do kit CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, USA). Esse teste quantifica a conversão do MTS em formazan que é uma substância solúvel em meio de cultura, cuja concentração pode ser determinada pela densidade óptica de 490 nm (Epoch 2 microplate reader, BioTek, USA). Cada condição foi analisada em quintuplicata.

3.3. Ensaio de formação de esferas

2×10^3 células de cada condição de interesse foram semeadas em triplicata em 500 μ l de Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) e Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM F-12) suplementados com 10% de soro bovino fetal e 1% de coquetel de antibióticos e antimicóticos (Corning, USA). As placas de cultura de baixa adesão de 24 poços (Corning, USA) foram tratadas com CBL0137 (Cayman Chemical Company, USA) e Emetine (hydrochloride) (Cayman Chemical Company, USA) nas concentrações de 0,1 μ M, 0,25 μ M, 0,5 μ M, 0,75 μ M e 1 μ M e Recombinant Humano TNF- α (PreproTech, USA) na concentração de 10 ng/mL. As placas foram mantidas por 7 dias em incubadora à temperatura controlada de 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após os 7 dias de plaqueamento, as esferas foram contadas e fotografadas no microscópio de luz invertido Nikon Eclipse Ti (Melville, New York 11747 800-52-NIKON, USA). Este ensaio foi realizado em triplicata.

3.4. PCR em tempo real

A extração de RNA das linhagens celulares foi realizada utilizando o reagente SV Total RNA isolation System (Promega, USA) conforme instruções do fabricante. Posteriormente o RNA foi tratado com DNase e purificado. A síntese de cDNA seguiu o protocolo da GoScript™ Reverse Transcription System (Promega, USA). A expressão dos genes de interesse foi quantificada utilizando-se o sistema SybrGreen com o kit GoTaq qPCR Master Mix (Promega, USA), através da fórmula 2- $\Delta\Delta$ CT utilizando-se o gene endógeno β -actina como normalizador em termociclador StepOne (Applied Biosystems, USA). Os primers utilizados (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific; Sigma-Aldrich; USA) são listados abaixo:

Primer	Sequência foward	Sequência reverse
HDAC1	AGTGCGGTGGTCTTACAGTG	CCTCCCAGCATCAGCATAGG.
HDAC2	TGCTACTACTACGACGGTGATA	TATTTTGTCAATTTCTTCGGCAG

HDAC9	ACACATTACCAGGAGCACAAGA	GCTGCTTCTCCTCTCTGCCACT
HDAC11	CTACAACCGCCACACATCTACCCA	ATGTTCCCTCTCCACCTTATCCAG
SIRT1	GAAACAATACCTCCACCTGA	TCCACATGAAACAGACACCC
NFkB- RELA	GAATCCAGTGTGTGAAGAAGC	CACACGATTCAGGTCGTAGTC
CXCL8	GGCAGCCTTCCTGATTTCTG	AAATTTGGGGTGGAAGGTTTG
TNF	CTTTGGAGTGATCGGCCCCC	TCGAGAAGATGATCTGACTGCCT
B-actina	GCCTCGCTGTCCACCTTCCA	AGAAAGGGTGTAACGCAACTAAG

3.5. Extração de proteínas totais e Western Blot

As linhagens foram plaqueadas em uma placa de 6 poços contendo DMEM com 10% de soro bovino fetal e 1% de coquetel de antibiótico e antifúngico com concentração de células próxima a 4×10^5 para obtenção de 80% de confluência. As células foram lisadas com tampão Pierce Ripa Buffer (Thermo-Scientific, USA) com inibidor de protease. O lisado das células foi submetido ao sonicador 3x por 10 segundos. As proteínas foram quantificadas com o Kit Pierce BCA protein assay (ThermoFisher Scientific, MA, USA). O resultado foi obtido após leitura na densidade óptica de 562 nm (Epoch2 microplate reader, BioTek, Vermont, USA) e as amostras foram padronizadas em 30 μ g. O lisado foi submetido à SDS-PAGE. As proteínas foram transferidas para a membrana de PVDF (Millipore, Billerica, MA, USA). A membrana foi bloqueada com 5% de leite ou 5% de BSA. Foram utilizados anticorpos secundários (Cell signaling technology, USA; Sigma-Aldrich, USA) conjugados com horseradish peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, USA) e a concentração das proteínas foi obtida por reação quimioluminescente (ECL SuperSignal - Pierce, USA). Cada experimento foi analisado em duplicata. Os anticorpos secundários são listados abaixo:

Anticorpo	Concentração	Solução	Anticorpo monoclonal
Histone H3 (1B1B2)	1:1.500	5% de BSA	Mouse IgG
Acetyl-Histone H3 (Lys9) (C5B11)	1:3.000	5% de BSA	Rabbit IgG
Acetyl-Histone H3 (Lys 36)	1:1.000	5% de BSA	Rabbit IgG
Acetyl-Histone H3 (Lys 79)	1:1.000	5% de BSA	Rabbit IgG

Acetyl-Histone H4 (Lys5) (D12B3)	1:2.000	5% de BSA	Rabbit IgG
Acetyl-Histone H4 (Lys 12)	1:2.000	5% de BSA	Rabbit IgG
Phospho-IkB alpha (Ser32)	1:1.000	5% de Leite	Rabbit IgG
NF-kB p65 (D14E12)	1:1.500	5% de BSA	Rabbit IgG
Phospho-NF-kB p65 (Ser536) (93H1)	1:1.500	5% de BSA	Rabbit IgG
GAPDH (D16H11) XP	1:8.000	5% de Leite	Rabbit IgG

3.6. Citometria de fluxo

A população de células-tronco foi quantificada pela atividade enzimática de ALDH1, utilizando-se o kit Aldefluor (StemCell Technologies, Durham, NC, USA), combinada à expressão do anticorpo CD44-APC (BD Biosciences). Foram utilizadas 6×10^5 células para cada condição. As células foram tratadas com Cisplatina (Cayman Chemical Company, USA) na concentração de 5 μM , Recombinant Humano TNF- α (PrepoTech, USA) na concentração de 10 ng/mL, CBL0137 (Cayman Chemical Company, USA) na concentração de 0,75 μM para CAL27 e SCC9 e Emetine (hydrochloride) (Cayman Chemical Company, USA) na concentração de 0,5 μM na para CAL27 e 0,75 μM para SCC9. 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, posteriormente foram lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo anti-CD44-APC à concentração de 1:200 em tampão Aldefluor, por 25 minutos à 4°C sob agitação constante. Após lavagens com PBS, as células foram ressuspensas em tampão Aldefluor e analisadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA).

3.7. Ensaio de formação de colônias

1×10^3 células de cada condição foram plaqueadas em 500 μl de DMEM com 10% de soro bovino fetal e 1% de coquetel de antibiótico e antifúngico em placas de 24 poços e mantidas em cultura por 10 dias. Os tratamentos foram realizados no quarto dia com os fármacos Cisplatina (Cayman Chemical Company, USA) na concentração de 5 μM

Recombinant Humano TNF- α (PreproTech, USA) na concentração de 10 ng/mL, CBL0137 (Cayman Chemical Company, USA) na concentração de 0,75 μ M para CAL27 e SCC9 e Emetine (hydrochloride) (Cayman Chemical Company, USA) na concentração de 0,5 μ M para CAL27 e 0,75 μ M para SCC9. Os poços foram lavados com PBS e fixados com solução de metanol e ácido acético e corados por 30 minutos com cristal violeta. As fotos foram realizadas no microscópio LASV 4.0 Image Analysis Software (Leica Biosystem, IL, USA) com aumento de 1.25x e as imagens foram adquiridas digitalmente com estéreo-microscópio acoplado a uma câmera digital de alta resolução DC 300F. A quantificação das colônias foi realizada através do programa ImageJ. Cada condição foi analisada em triplicata.

3.8. Ensaio de migração celular

1×10^5 células de cada condição foram plaqueadas em 500 μ L de DMEM com 10% de soro bovino fetal e 1% de coquetel de antibiótico e antifúngico em uma placa de 24 poços. Após 2 dias, em quase 100% de confluência, as células foram tratadas com Cisplatina (Cayman Chemical Company, USA) na concentração de 5 μ M Recombinant Humano TNF- α (PreproTech, USA) na concentração de 10 ng/mL, CBL0137 (Cayman Chemical Company, USA) na concentração de 0,75 μ M para CAL27 e SCC9 e Emetine (hydrochloride) (Cayman Chemical Company, USA) na concentração de 0,5 μ M para CAL27 e 0,75 μ M para SCC9. Após 24 horas do tratamento, os poços foram esvaziados e com uma ponteira de 200 μ L estéril, foi realizado um defeito vertical e um horizontal no centro de cada poço, com a finalidade de remover as células aderidas daquela área. Cada poço foi lavado com PBS estéril (DPBS, 1X Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, Corning, USA) e recebeu 500 μ L de DMEM para manutenção da viabilidade celular. Os poços foram fotografados no microscópio de luz invertido Nikon Eclipse Ti (Melville, New York 11747 800-52-NIKON, USA) nos tempos de 0, 12, 24 e 36 horas após a realização dos defeitos. A área aberta de quatro pontos diferentes em cada poço foi quantificada através do programa ImageJ. Este ensaio foi realizado em triplicata.

3.9. Ensaio de invasão celular

2×10^3 células de cada condição foram plaqueadas em $120 \mu\text{l}$ de DMEM suplementado com 1% de antibiótico sobre insertos compatíveis com placas de 24 poços, contendo $30 \mu\text{l}$ de matrigel (Matrigel Matrix Basement Membrane 10 Millimeters, Corning, USA). Os poços abaixo dos insertos receberam $250 \mu\text{l}$ de DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de coquetel de antibiótico e antifúngico. A placa foi tratada com Cisplatina (Cayman Chemical Company, USA) na concentração de $5 \mu\text{M}$ Recombinant Humano TNF- α (PreproTech, USA) na concentração de 10 ng/mL , CBL0137 (Cayman Chemical Company, USA) na concentração de $0,75 \mu\text{M}$ para CAL27 e SCC9 e Emetine (hydrochloride) (Cayman Chemical Company, USA) na concentração de $0,5 \mu\text{M}$ na para CAL27 e $0,75 \mu\text{M}$ para SCC9 e mantida em cultura por 4 dias. Os insertos foram lavados com PBS e fixados com metanol por 6 minutos em -20°C . A membrana porosa, que constitui a base do inserto, foi corada com cristal violeta por 10 minutos. Os insertos foram lavados com água deionizada para remover o corante excedente e o matrigel foi removido com o auxílio de hastes de algodão. Com uma lâmina de bisturi foi realizada a remoção da membrana do inserto, que em seguida, foi montada em lâmina de vidro com eukitt® quick-hardening mounting médium (Sigma-Aldrich, USA). As células foram contadas e fotografadas no microscópio de luz invertido Nikon Eclipse Ti (Melville, New York 11747 800-52-NIKON, USA) para avaliar a capacidade de invasão das diferentes condições analisadas. Este ensaio foi realizado em duplicata.

3.10. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas através de dois testes estatísticos com o auxílio do software GraphPad Prism (GraphPad Software, version 5.0) e um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. Para avaliação de vários grupos, foi usado o One Way ANOVA não paramétrico pelo teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunns que realiza teste comparativo entre todos os pares de colunas. Para avaliação entre dois grupos, foi usado o T test não paramétrico através do teste Mann-Whitney.

4. RESULTADOS

4.1. Identificação de NFkB nas linhagens celulares CAL-27 e SCC-9

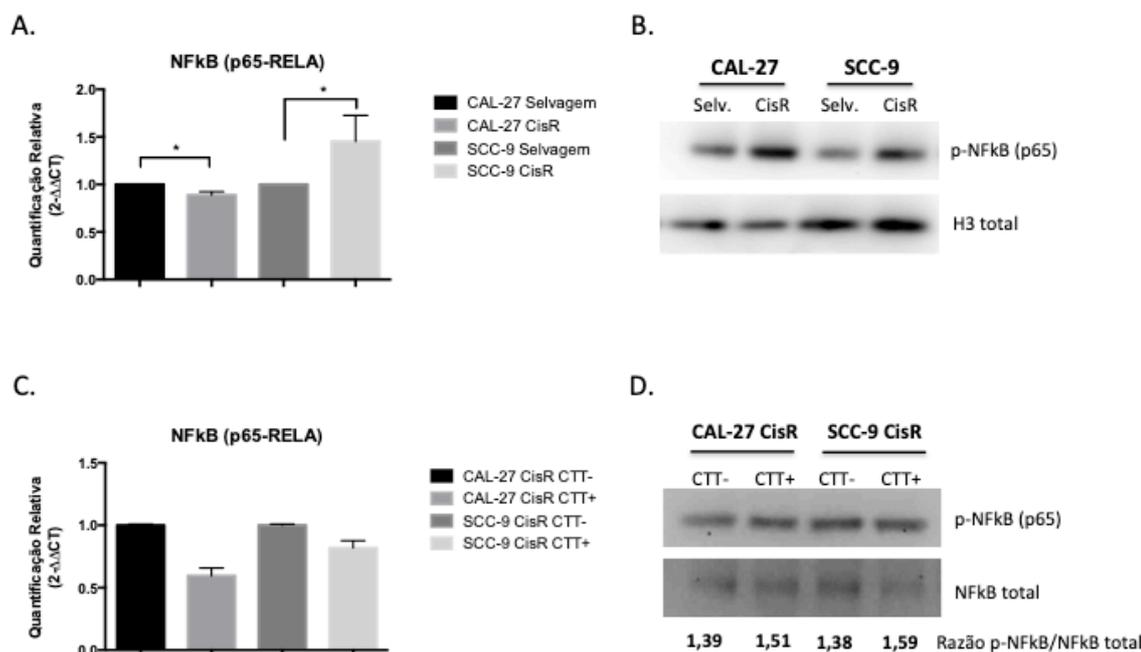
Para mimetizar *in vitro* as células quimiorresistentes que desafiam o tratamento antineoplásico com cisplatina, foram adquiridas as linhagens celulares de Carcinoma espinocelular de língua CAL-27 e SCC-9. As linhagens selvagens foram expostas a doses variadas de Cisplatina a fim de estabelecer as células com fenótipo de quimiorresistência. As linhagens foram estabelecidas previamente ao início deste projeto.

Para avaliar os níveis de mRNA de NFkB nas linhagens celulares CAL-27 e SCC-9, foi realizado o ensaio de PCR quantitativo para o gene RELA (p65), uma subunidade do NFkB (Figura 1.A). Esta subunidade foi escolhida para representar NFkB total, por este motivo, p65-RELA será referida nesta dissertação como NFkB. Foi observado pequeno decréscimo na expressão gênica de NFkB na linhagem CAL-27 CisR. Em contrapartida, foi demonstrado aumento significativo de NFkB na linhagem SCC-9 CisR em comparação a linhagem selvagem (**p<0,01).

Em seguida, os níveis da proteína phospho-p65 (p-NFkB) foram avaliados (Figura 1.B). Esta proteína é a forma ativa de NFkB, encontrada no núcleo celular após a degradação de IκB por proteassoma. Apesar da CAL-27 CisR não ter apresentado aumento de mRNA de NFkB, neste ensaio, foi observado maior marcação de p-NFkB em ambas linhagens CisR, confirmando o acúmulo de NFkB ativo nas células resistentes à Cisplatina em ambas linhagens.

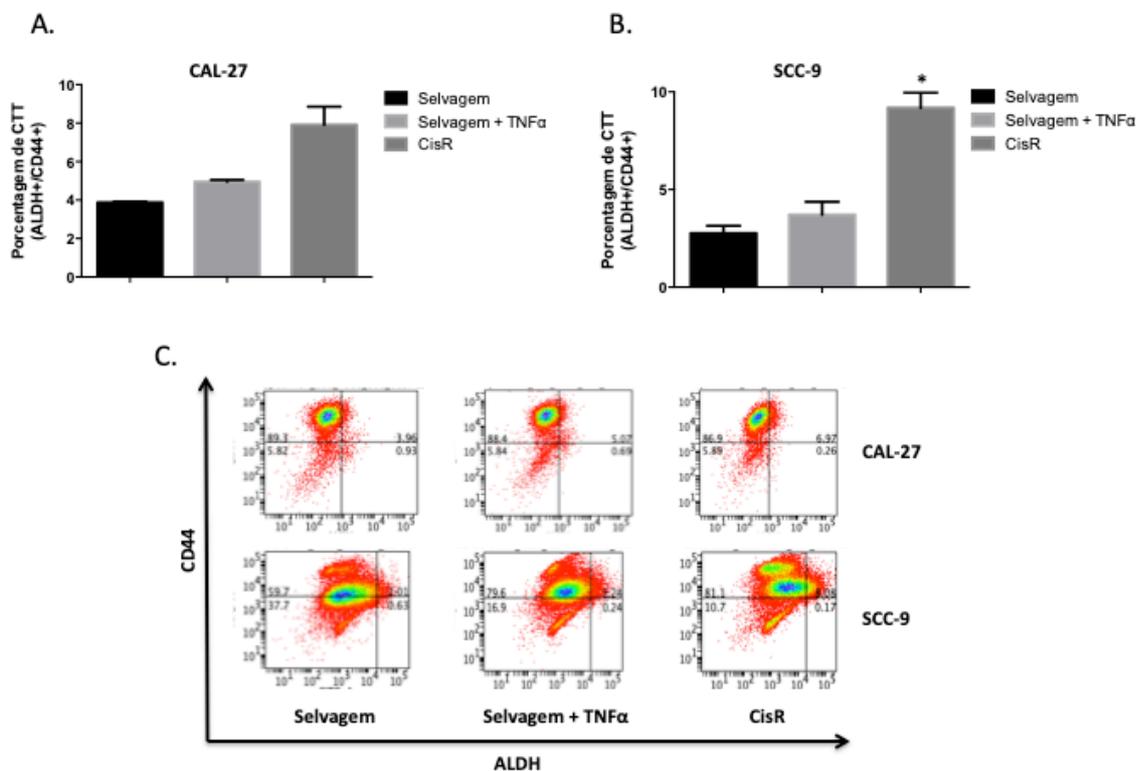
Previamente, as populações de CTT (CTT+) e não CTT (CTT-) das linhagens CisR foram isoladas por citometria de fluxo (*Cell Sorting*) com dupla marcação para ALDH1 e CD44. Com as CTT- e CTT+ em cultura, foi realizado a extração de RNA, síntese de cDNA e lise de proteína para os ensaios de PCR em tempo real e western blot. No PCR em tempo real foi observado menor expressão de NFkB nas células CTT+ em ambas linhagens (Figura 1.C). Entretanto, no western blot, a normalização de pNFkB por NFkB total demonstrou aumento na expressão proteica de p-NFkB em ambas linhagens CTT+ (Figura 1.D). Assim, foi observado que a forma ativa de NFkB está acumulada nas linhagens CisR e de forma mais acentuada, nas células-tronco tumorais.

Figura 1. Identificação de NFkB nas linhagens CAL-27 e SCC-9.



Fonte: Castro (2021). A. Diminuição da expressão gênica de NFkB na CAL-27 CisR e aumento de expressão de NFkB na linhagem SCC-9. B. Acúmulo da proteína p-NFkB nas linhagens CAL-27 e SCC-9 CisR. C. Expressão gênica reduzida de NFkB nas células CTT+ de ambas linhagens. D. Acúmulo de p-NFkB nas células CTT+ de ambas linhagens. * $p < 0,05$.

Sabendo do acúmulo de p-NFkB nas células CisR e nas células CTT+ nas linhagens CAL-27 e SCC-9, foi realizado o ensaio de citometria de fluxo com dupla marcação para o marcador de superfície CD44 e a enzima de desintoxicação celular ALDH1, utilizados para a identificação da população de células-tronco em tumores de cabeça e pescoço (Zhang et al., 2012) (Figura 2). A citometria de fluxo visou quantificar a população de CTT nas células selvagens, selvagem + TNF α e CisR. TNF α é um fármaco indutor de NFkB (Nakanishi & Toi, 2005; Squarize et al., 2006). Esta droga foi administrada na concentração de 10 ng/mL para observar se a resposta celular com aumento de NFkB nas células selvagem induziria o acúmulo de CTT, assim como observado nas células CisR. As células CisR da linhagem SCC-9 apresentaram aumento significativo na população de CTT. Apesar do teste estatístico não ter mostrado diferença entre os outros grupos analisados, é possível observar que houve aumento de CTT após a ativação da via de NFkB com a administração de TNF α e nas células CisR da linhagem CAL-27.

Figura 2. Identificação da população de CTT linhagens CAL-27 e SCC-9.

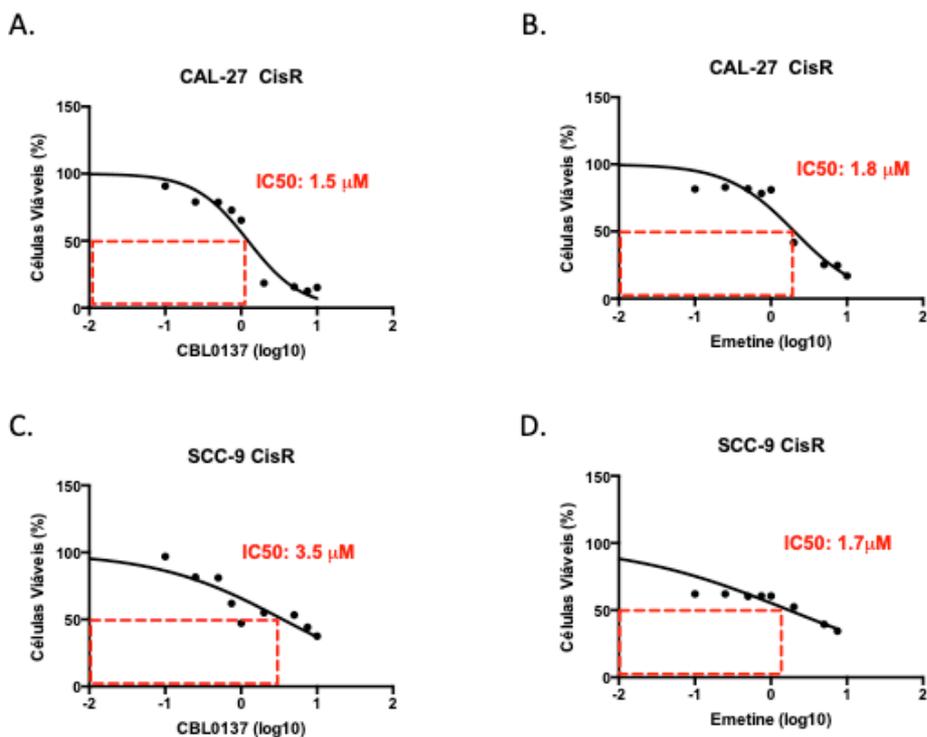
Fonte: Castro (2021). Aumento da população de CTT após administração de TNF α e nas células CisR em ambas linhagens, demonstrando que a indução e o acúmulo de NF κ B ocasiona aumento da população de CTT. *p<0,05.

4.2. Estabelecimento da dose IC₅₀ das linhagens CAL-27 CisR e SCC-9 CisR diante da administração de CBL0137 e Emetine

Sabendo que o acúmulo de NF κ B em células CisR e em CTT+ está relacionado a quimiorresistência, foram utilizadas duas drogas inibidoras de NF κ B, CBL0137 e Emetine, com a finalidade de avaliar o comportamento celular após a inibição de NF κ B. Como o nosso principal objetivo foi avaliar o papel de NF κ B no acúmulo de CTT, inicialmente foi necessário estabelecer a dose-resposta IC₅₀ – responsável pela morte de 50% das células - para evitar a administração de doses que reduzissem significativamente a viabilidade celular da população tumoral heterogênea. Para estabelecer a dose IC₅₀ de CBL0137 e Emetine foram realizados ensaios de MTS (Figura 3). Foi observado que a população global de células da linhagem CAL-27 foi mais sensível à administração de CBL0137 (1,5 μ M vs 3,5 μ M -

SCC-9), enquanto a SCC-9 foi mais sensível à administração de Emetine ($1,7 \mu\text{M}$ vs $1,8 \mu\text{M}$ - CAL-27) (Tabela 1).

Figura 3. Ensaios de MTS para a obtenção da dose IC50 das linhagens CAL-27 CisR e SCC-9 CisR para os compostos CBL0137 e Emetine.



Fonte: Castro (2021).

4.4. Estabelecimento das doses de CBL0137 e Emetine capazes de inibir o acúmulo CTT nas linhagens CAL-27 e SCC-9 CisR

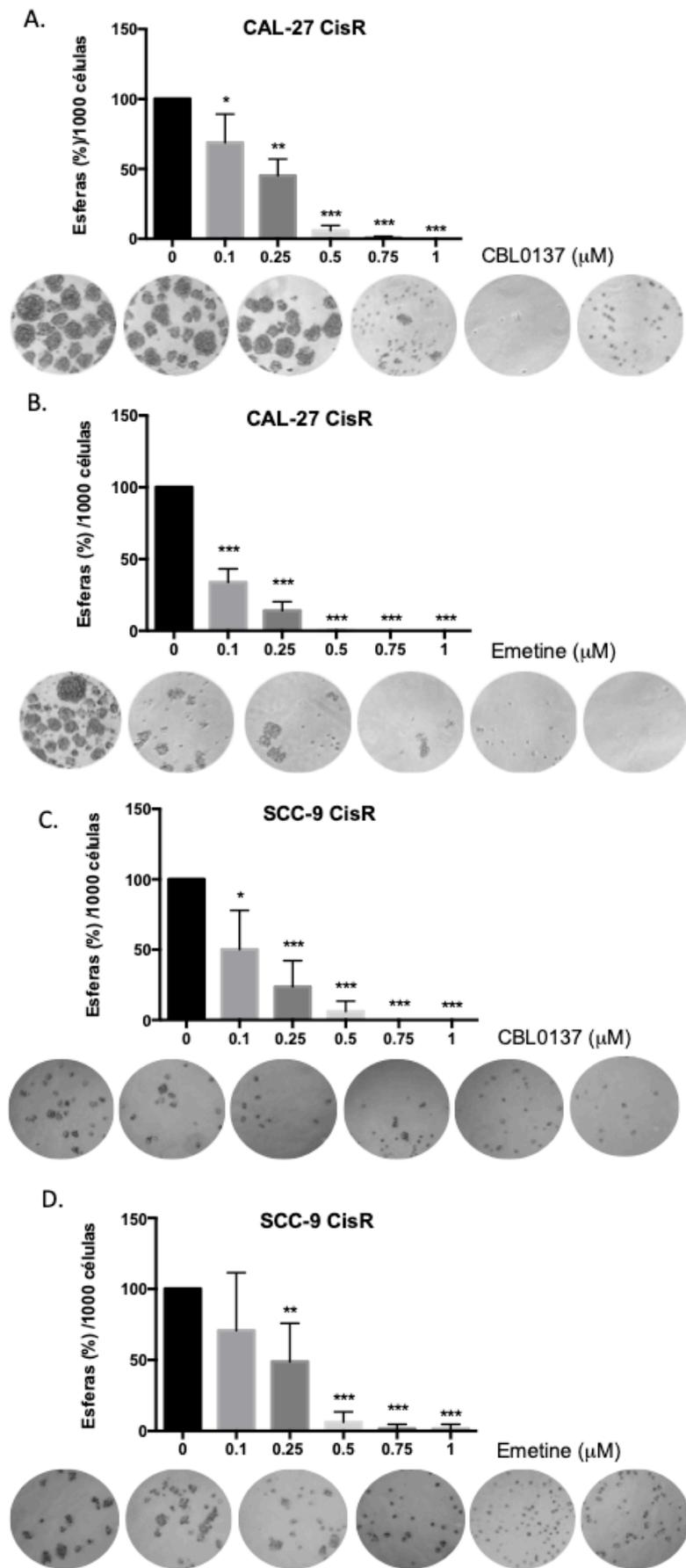
Em seguida, a dose IC50 dos compostos foi determinada especificamente para a população de CTT através do ensaio de formação de esferas. As esferas são unidades compostas por quatro ou mais células resultantes da proliferação celular de CTT em cultura celular de baixa adesão, ou seja, condição na qual as células crescem suspensas no meio de cultura. Apenas as CTT têm capacidade de sobreviver e se proliferar nesta condição, portanto, neste ensaio, é avaliada apenas a resposta da população de CTT. Foram testadas as doses de $0 \mu\text{M}$, $0,1 \mu\text{M}$, $0,25 \mu\text{M}$, $0,5 \mu\text{M}$, $0,75 \mu\text{M}$ e $1 \mu\text{M}$. (Figura 4).

Para a linhagem CAL-27, a administração de $0,75 \mu\text{M}$ de CBL0137 foi eficiente para reduzir em mais de 90% as CTT e foi escolhida para as futuras análises (Figura 4.A). A linhagem CAL-27 foi mais sensível à administração de Emetine, sendo a menor dose ($0,1 \mu\text{M}$)

suficiente para reduzir em mais de 50% a população de CTT ($p < 0,001$). A dose de $0,5 \mu\text{M}$ de Emetine dizimou completamente a população de CTT e foi selecionada para os experimentos posteriores (Figura 4.B). Pode-se notar que a população de CTT é mais sensível à inibição de NFkB do que a massa heterogênea de células tumorais, uma vez que as doses IC50 de CBL0137 e Emetine necessárias para reduzir em 50% a população global de células foi 2,5 vezes maior para CBL0137 e 3 vezes maior para Emetine.

Foi observado que a linhagem SCC-9 respondeu melhor à administração de CBL0137, na qual as menores doses foram suficientes para reduzir significativamente o número de esferas ($0,1 \mu\text{M}$; $p < 0,05$). A dose de $0,75 \mu\text{M}$ foi suficiente para dizimar a população de CTT e esta foi escolhida para os experimentos posteriores (Figura 4.C). Em relação ao Emetine, nenhuma das doses foi eficiente para extinguir a população de CTT, mas nota-se que a partir da dose de $0,75 \mu\text{M}$, houve uma redução de mais de 90% no número de esferas, sendo esta dose escolhida para os experimentos posteriores (Figura 4.D). Percebe-se aqui que a população de CTT foi mais sensível à inibição da expressão gênica de NFkB promovida pelo CBL0137 do que a população global de células (IC50 4,7 vezes maior). As doses de CBL0137 e Emetine capazes de inibir a formação de esferas em ambas linhagens estão dispostas na tabela 1.

Figura 4. Ensaio de formação de esferas das linhagens celulares CAL-27 e SCC-9 CisR.



Fonte: Castro (2021). A avaliação da formação de esferas realizada para determinar as doses de CBL0137 e Emetine capazes de inibir a manutenção de CTT através da inibição de NFkB. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Tabela 1- Dose-resposta IC50 e de inibição de esferas de CBL0137 e Emetine para as linhagens CAL27 e SCC9.

Linhagens CisR	Dose IC50 CBL0137	Dose IC50 Emetine
CAL-27	1,5 μ M	1,8 μ M
SCC-9	3,5 μ M	1,7 μ M
Linhagens CisR	Dose de inibição de CTT - CBL0137	Dose de inibição de CTT - Emetine
CAL-27	0,75 μ M	0,5 μ M
SCC-9	0,75 μ M	0,75 μ M

Fonte: Castro (2021).

4.5. Avaliação da via de sinalização de NFkB após administração de CBL0137 e Emetine

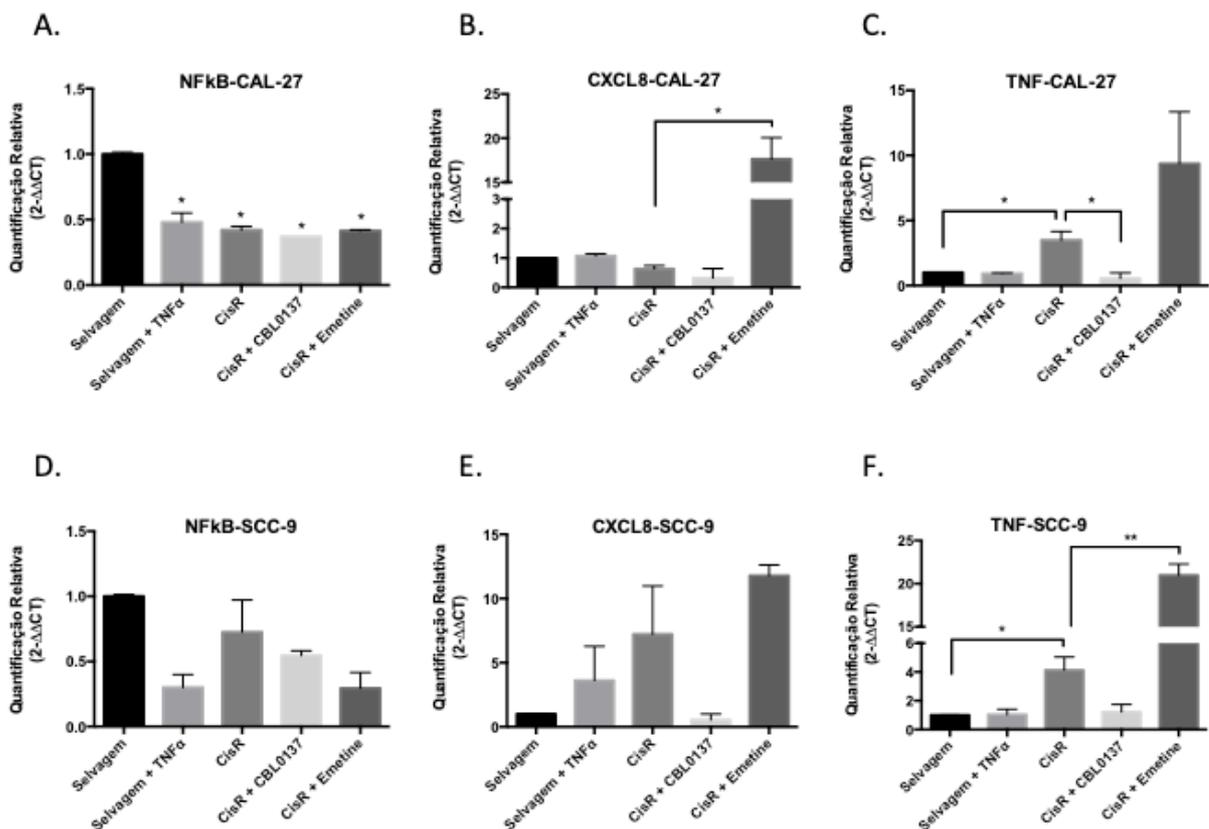
A técnica de PCR quantitativa em tempo real foi utilizada para avaliar a modulação de expressão gênica de componentes da via de NFkB (NFkB - RELA, I κ B e CXCL8) após a administração dos fármacos. Para induzir a expressão de NFkB, as células selvagens foram tratadas com TNF α . CXCL8 é o um gene que expressa a interleucina 8, uma quimiocina excretada por células tumorais que induz a angiogênese, migração, invasão e metástase (Xu et al., 2020). CXCL8 é regulado por NFkB, sendo relacionado ao prognóstico desfavorável de alguns tumores, entre eles, o carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (Wilson et al., 2008; Xu et al., 2020). O fator de necrose tumoral (TNF) é uma citocina que regula a apoptose, inflamação e proliferação celular, sendo super expressa em diversas patologias inflamatórias. Esta citocina atua como indutor de NFkB, sendo ambos considerados como marcadores de resistência a quimioterapia e radioterapia (Zhu et al., 2019).

Os resultados obtidos na avaliação de mRNA de NFkB da linhagem CAL-27 demonstraram diminuição na expressão para todas as condições analisadas em comparação à linhagem selvagem (Figura 5.A). A administração de CBL0137 reduziu discretamente os níveis de mRNA de NFkB em comparação à linhagem CisR enquanto Emetine não promoveu alteração. CXCL8 apresentou uma pequena redução na linhagem CisR e a administração de Emetine reverteu significativamente o efeito observado na quimiorresistência (p<0,05)

(Figura 5.B). TNF foi observado aumentado na linhagem CisR em comparação à selvagem ($p < 0,05$). Houve redução significativa de TNF após administração de CBL0137 ($p < 0,05$), chegando aos níveis de expressão das células selvagem. Interessantemente, houve aumento da expressão de TNF após a administração de Emetine, mas esse resultado não apresentou significância estatística (Figura 5.C).

A linhagem SCC-9 mostrou resultados de expressão gênica compatíveis com o esperado após o tratamento com os inibidores. Houve redução de NFkB após administração de Emetine e CBL0137 (Figura 5.D). CXCL8 foi aumentada na linhagem CisR e apresentou diminuição significativa após administração de CBL0137, cujos níveis de expressão foram semelhantes à linhagem selvagem (Figura 5.E). Para TNF, o resultado foi semelhante ao obtido com a linhagem CAL-27. A linhagem SCC-9 CisR apresentou expressão aumentada de TNF em comparação à linhagem selvagem ($p < 0,05$), redução após a administração de CBL0137 e um aumento significativo com a administração de Emetine ($p < 0,01$) (Figura 5.F).

Figura 5. Avaliação da expressão de NFkB, CXCL8 e TNF- α na linhagem CAL-27 (A, B e C respectivamente) e SCC-9 (D, E e F respectivamente) após administração dos inibidores CBL0137 e Emetine.



Fonte: Castro (2021). Diminuição de NFkB em ambas linhagens com os tratamentos com CBL0137 e Emetine e de CXCL8 e TNF com o tratamento com CBL0137. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Foi observado um padrão de super expressão de CXCL8 e TNF nas linhagens CAL-27 e SCC-9 após a administração de Emetine. Esses dados contrastam com o esperado. A nossa hipótese para explicar o resultado observado é que ocorra o aumento de mRNA em primeiro momento para suprir a falta das proteínas reguladas por NFkB em resposta a inibição de IκB por Emetine. Esta super expressão não foi observada após o tratamento com CBL0137, visto que este fármaco atua na inibição da transcrição gênica. Nós gostaríamos de ter demonstrado a nossa hipótese através de ensaios utilizando RNA de interferência para NFkB, mas, infelizmente não tivemos tempo hábil para realizar esses experimentos.

Em seguida, foram realizados ensaios de western blot para avaliação da expressão proteica de p-NFkB e IκB. Para a linhagem CAL-27, houve aumento de p-NFkB após administração de TNF α . Como observado anteriormente, p-NFkB está acumulado na linhagem CisR e houve uma redução expressiva após o tratamento com Emetine e uma leve redução após a administração de CBL0137. A normalização de p-NFkB foi realizada por NFkB total (Figura 6.A). Na avaliação de IκB, foi observado aumento após administração de TNF α e redução na linhagem CisR comparada com a selvagem. O tratamento com Emetine não alterou os níveis de IκB e o tratamento com CBL0137 promoveu uma redução de IκB (Figura 6.B). Como observado nas análises de mRNA, a linhagem SCC-9 parece ter respondido melhor à administração dos fármacos. Foi observado um leve aumento de p-NFkB após a administração de TNF α e diminuição após administração de Emetine. Como observado anteriormente, a linhagem CisR apresenta acúmulo de p-NFkB quando comparada à linhagem selvagem. O tratamento com CBL0137 não reduziu de forma expressiva os níveis de p-NFkB (Figura 6.C). Em relação ao IκB, houve diminuição acentuada após administração de TNF α ($p < 0,05$) e níveis reduzidos na linhagem CisR comparada à linhagem selvagem. A administração de Emetine promoveu forte acúmulo de IκB ($p < 0,01$) e CBL0137 induziu um leve acúmulo (Figura 6.D). O resultado de aumento de IκB após a administração de Emetine está em consonância com o esperado, visto que Emetine inibe NFkB impedindo a fosforilação de IκB e posterior degradação.

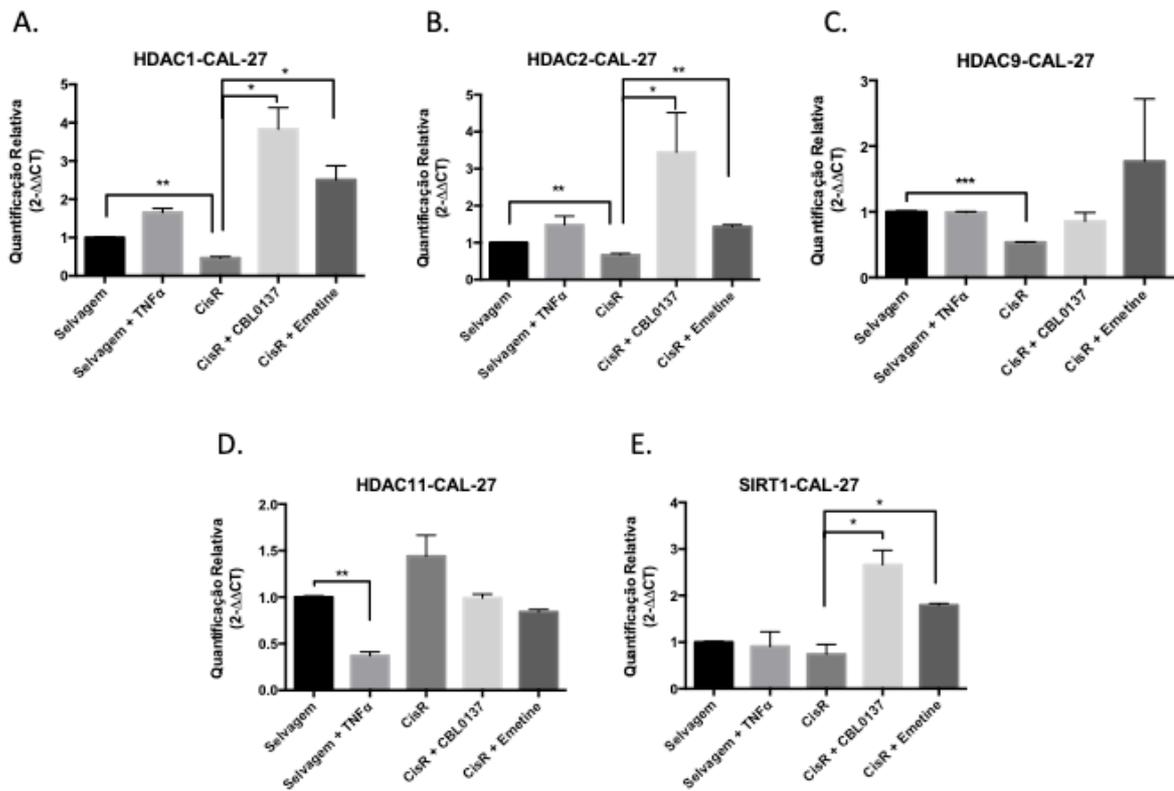
Fonte: Castro (2021). 6.A. Redução de p-NFkB com os tratamentos Emetine e CBL0137 e de (B) Ikb com administração de CBL0137 na linhagem CAL-27. 7.C. Redução de expressão de p-NFkB e super expressão de (D) Ikb após o tratamento com Emetine na linhagem SCC-9. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.6. Investigação de modificações epigenéticas reguladas por NFkB

As alterações epigenéticas são mudanças que ocorrem no DNA sem que ocorra a substituição dos pares de base nitrogenada. A regulação da cromatina através da acetilação e deacetilação das histonas é um dos mecanismos estudados com a finalidade de entender o comportamento molecular das células. A acetilação é o processo de adição de um grupo acetil coenzima A nas lisinas localizadas na cauda N-terminal das histonas (Loidl, 1994). O resultado é o relaxamento da cromatina, disponibilizando regiões de interesse para transcrição gênica. A deacetilação, em contrapartida, ocasiona a compactação da cromatina através da retirada do grupo acetil, promovida por enzimas histona deacetilases (HDAC) (Pazin & Kadonaga, 1997). A regulação da cromatina ocorre através da interação entre cargas positivas e negativas das histonas e a dupla fita de DNA. Esta dinâmica guia o comportamento celular, visto que a acetilação disponibiliza e a deacetilação inviabiliza determinadas regiões da cromatina para transcrição gênica (Sterner & Berger, 2000).

Para investigar se NFkB, como um fator de transcrição, pode regular a expressão gênica de histonas deacetilases, foram realizados ensaios de PCR quantitativa em tempo real para os genes HDAC1, HDAC2, HDAC9, HDAC11 e SIRT1. Para a linhagem CAL-27, nós observamos que a quimiorresistência à cisplatina promoveu uma intensa regulação da expressão de genes envolvidos na regulação da maquinaria epigenética (Figura 7). Os níveis de mRNA de HDAC1 ($p < 0,01$) (Figura 7.A), HDAC2 ($p < 0,01$) (Figura 7.B), HDAC9 ($p < 0,001$) (Figura 7.C) e SIRT1 (Figura 7.E) foram observados reduzidos na linhagem CisR em comparação a linhagem selvagem e a administração dos inibidores de NFkB foram eficientes em reverter o efeito observado na linhagem CisR. Apenas o gene HDAC11 foi observado aumentado na linhagem CisR e seus níveis foram diminuídos após os tratamentos com CBL0137 3 Emetine (Figura 7.D). Esses resultados sugerem que NFkB reduz os níveis de expressão de histonas deacetilases.

Figura 7. Investigação dos níveis de mRNA de genes envolvidos na regulação epigenética após o tratamento com os inibidores de NFkB na linhagem CAL-27.

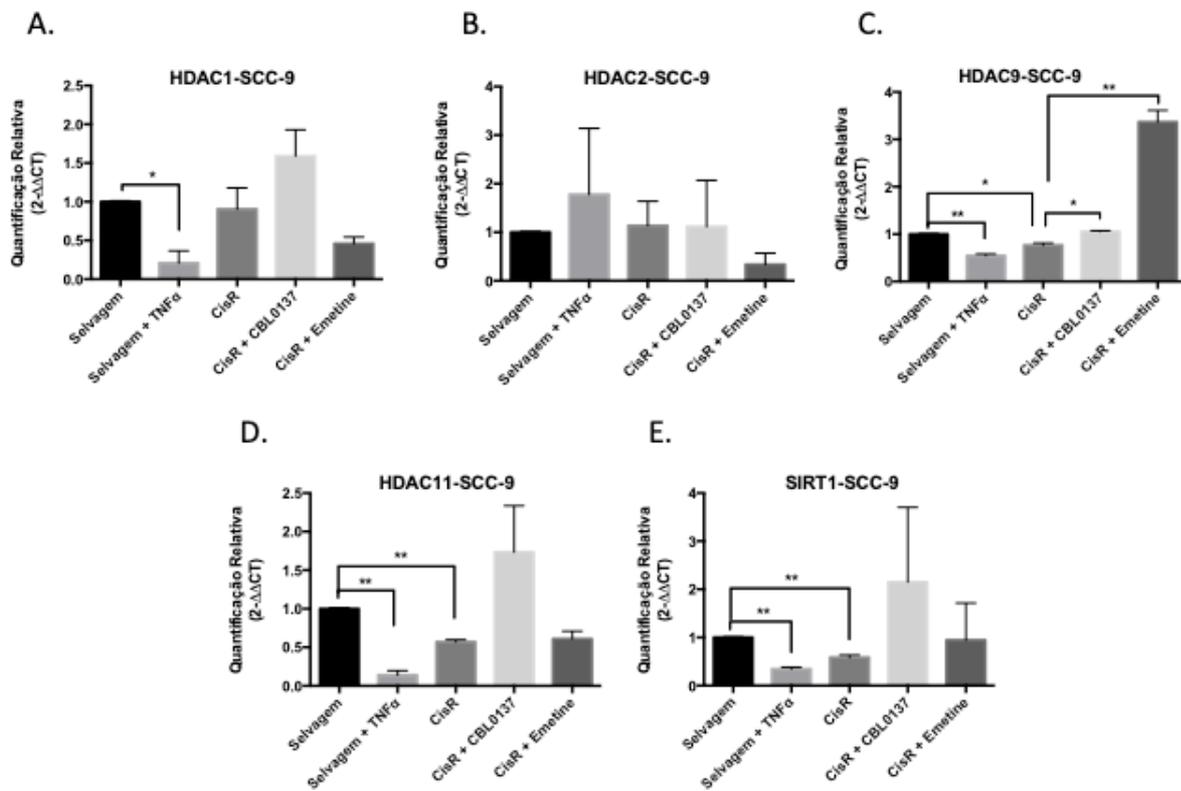


Fonte: Castro (2021). Aumento de HDAC1, 2 e SIRT1 com administração de CBL0137 e Emetine em comparação as células CisR. HDAC9 e 11 apresentaram aumento e diminuição de expressão com administração dos inibidores, respectivamente, porém, não apresentaram diferença estatística * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Para a linhagem SCC-9, HDAC1 (Figura 8.A), HDAC9 ($p < 0,05$) (Figura 8.C), HDAC11 ($p < 0,01$) (Figura 8.D) e SIRT1 ($p < 0,01$) (Figura 8.E) apresentaram diminuição de expressão gênica nas células CisR em comparação as selvagens e nas células tratadas com TNF α ($p < 0,05$ para HDAC1 e $p < 0,01$ para HDAC9, HDAC11 e SIRT1). Foi observado que a inibição farmacológica de NFkB reverteu o perfil de expressão promovido pela quimiorresistência e a administração de CBL0137 apresentou um efeito mais acentuado do que a administração de Emetine.

Não houve diferença entre os grupos para expressão de HDAC2 na linhagem SCC9, porém, observou-se maior expressão com administração de TNF α e diminuição com o tratamento com Emetine (Figura 8.B). Como observado para a CAL-27, esses resultados sugerem que NFkB participa da regulação epigenética controlando os níveis de expressão de histonas deacetilases.

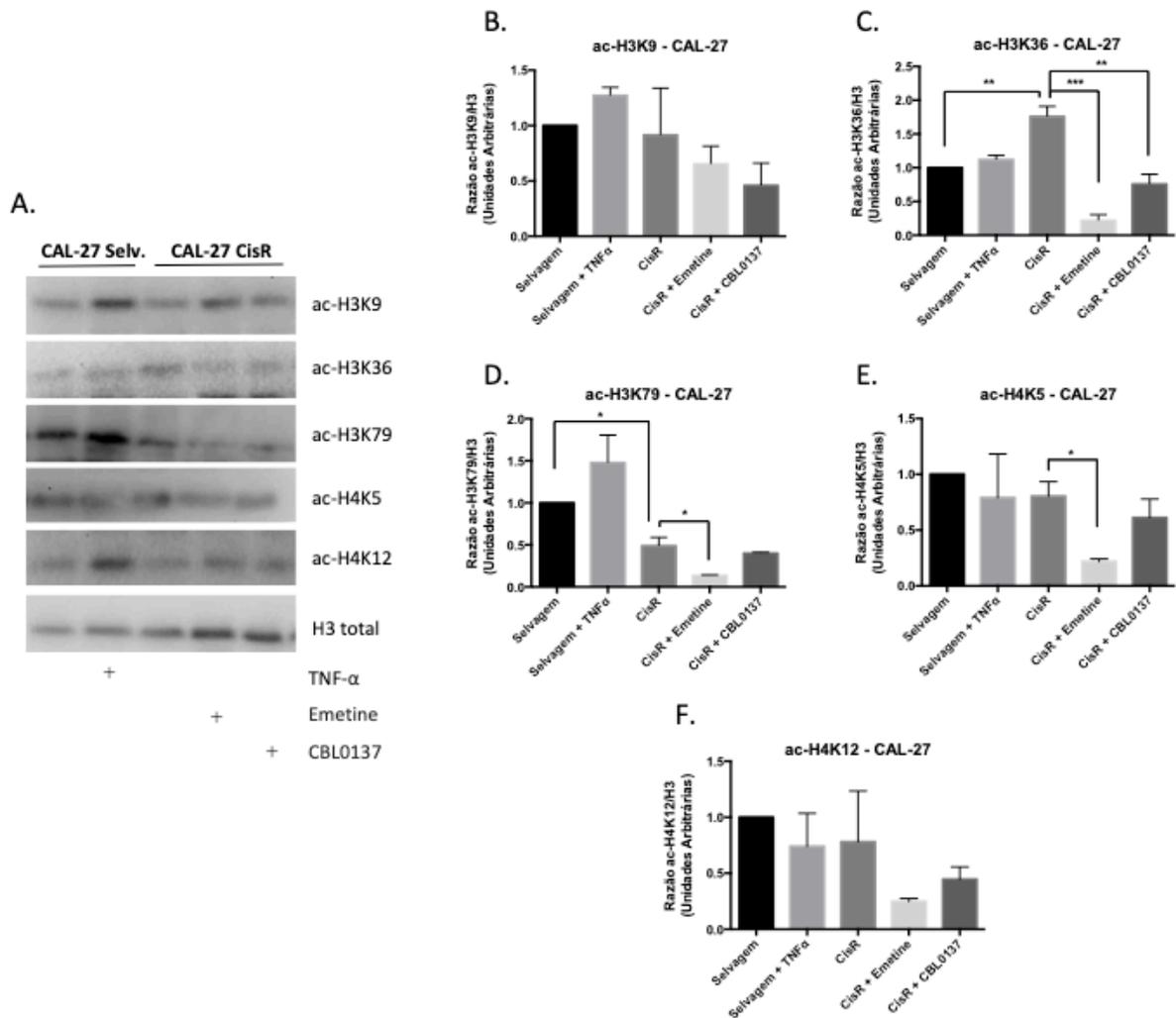
Figura 8. Investigação dos níveis de mRNA de genes envolvidos na regulação epigenética após o tratamento com os inibidores de NFkB na linhagem SCC-9.



Fonte: Castro (2021). Aumento na expressão de HDAC1, 11 e SIRT1 com administração de CBL0137 e de HDAC9 após tratamento com Emetine. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Uma vez que nós observamos uma regulação dos níveis de mRNA de histonas deacetiladas promovida por NFkB, nós buscamos identificar se essa regulação afeta os níveis de acetilação de histonas. Foi avaliado a acetilação das histonas H3K9, H4K36, H3K79, H4K5 e H4K12. Na linhagem CAL-27 foi observado que o tratamento com TNF α promoveu um aumento nos níveis de acetilação das histonas H3K9, H3K36 e H3K79 (Figura 9.A, B, C e D). Em comparação com a linhagem selvagem, a linhagem CisR aumentou significativamente os níveis de acetilação de H3K36 ($p < 0,01$) (Figura 9.C) e reduziu os níveis de acetilação de H3K79 ($p < 0,05$) (Figura 9.D). Os inibidores de NFkB, CBL0137 e Emetine foram eficientes em reduzir os níveis de acetilação de todas as histonas analisadas. CBL0137 reduziu de forma significativa a acetilação da histona H3K36 ($p < 0,01$) (Figura 9.C) e Emetine reduziu de forma significativa H3K36 ($p < 0,001$) (Figura 9.C), H3K79 ($p < 0,05$) (Figura 9.D) e H4K5 ($p < 0,05$) (Figura 9.E).

Figura 9. Avaliação de acetilação de histonas na linhagem CAL-27 após os tratamentos com CBL0137 e Emetine.

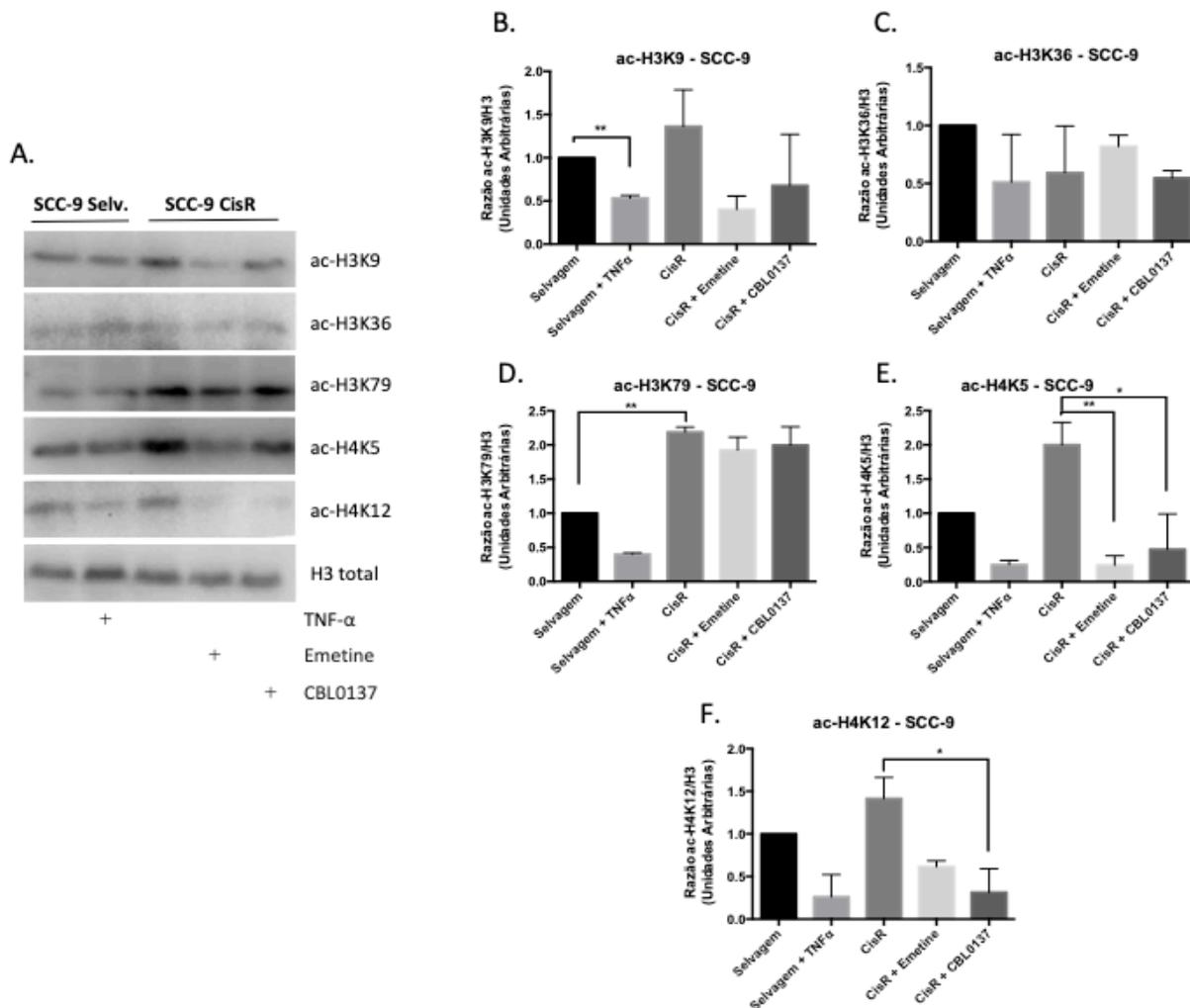


Fonte: Castro (2021). Diminuição de acH3K36, acH3K79 e de H4K5 após tratamento com Emetine. acH3K79 diminuiu com administração de CBL0137. Apesar de não apresentar diferença estatística, também foi observado redução da expressão acde H3K9, acH3K79, acH4K5 e H4K12 após tratamento com CBL0137 e de acH3K9 e acH4K12 após administração de Emetine. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A linhagem SCC-9 demonstrou uma forte regulação de acetilação de histonas promovida pela quimiorresistência (Figura 10). Em comparação à linhagem selvagem, a linhagem CisR apresentou aumento de acetilação das histonas H3K9 (Figura 10.B), H3K79 ($p < 0,01$) (Figura 10.D), H4K5 (Figura 10.E) e H4K12 (Figura 10.F). Emetine e CBL0137 foram eficientes em reverter o fenótipo reduzindo a acetilação das histonas H3K9, H4K5 e H4K12, sendo que Emetine reduziu de forma significativa a acetilação de H4K5 ($p < 0,01$) (Figura 10.E) e CBL0137 reduziu significativamente a acetilação de H4K5 ($p < 0,05$) (Figura 10.E) e H4K12 ($p < 0,05$) (Figura 10.F). Estes resultados estão em consonância com o aumento da expressão das HDAC em ambas linhagens demonstradas acima por PCR. Estes resultados

sugerem que NFkB está envolvido na regulação epigenética da expressão gênica e a inibição da via de NFkB promove a deacetilação de histonas através da regulação da expressão gênica de HDAC, o que pode silenciar a expressão de genes alvo de NFkB e impedir a progressão tumoral.

Figura 10. Avaliação de acetilação de histonas na linhagem SCC-9 após os tratamentos com CBL0137 e Emetine.

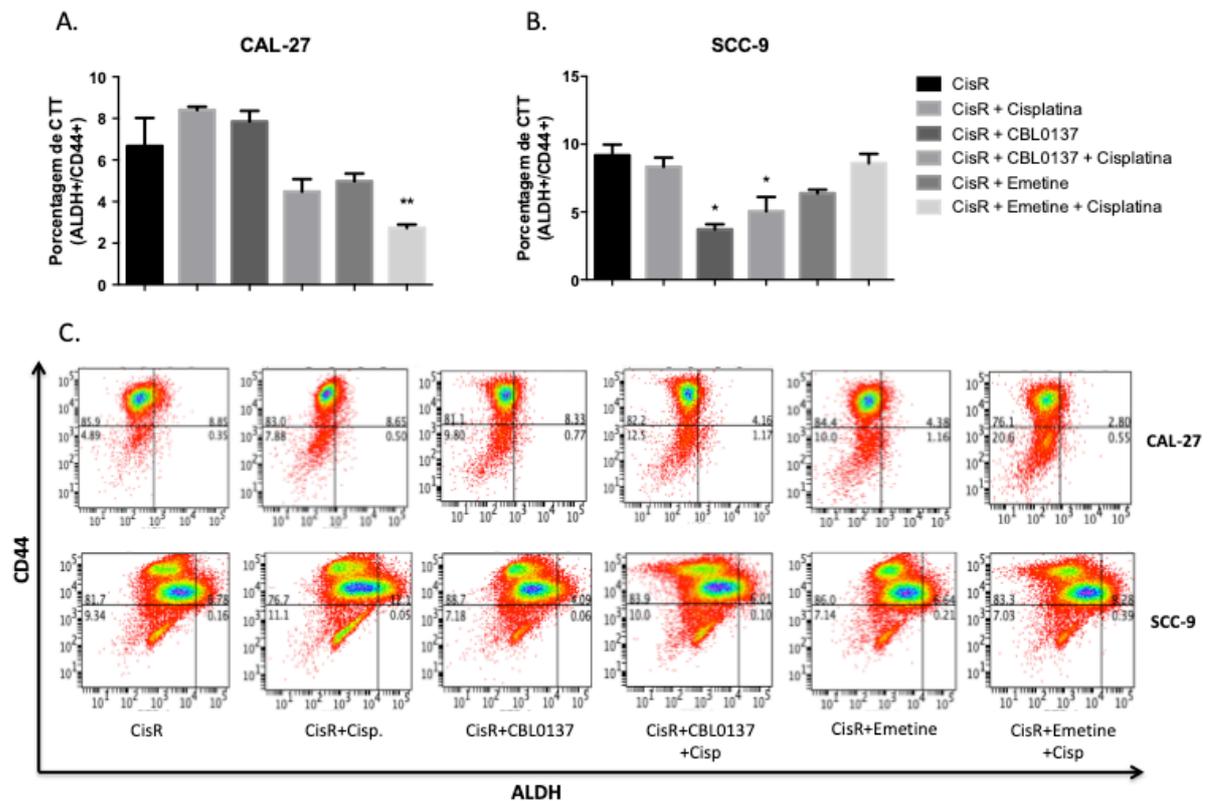


Fonte: Castro (2021). Redução de acH4K5 após tratamento com ambos inibidores e de acH4K12 após tratamento com CBL0137. Apesar de não haver diferença estatística, é observado redução acentuada de acH3K9 com administração das duas drogas inibidoras de NFkB e de acH4K12 após tratamento com Emetine. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.6. Avaliação da eficiência da inibição de NFkB para reverter a resistência das células-tronco tumorais à cisplatina

Para avaliar se a inibição de NFkB através da ação farmacológica de CBL0137 e Emetine resultariam na diminuição da população de CTT, foram realizados ensaios de citometria de fluxo com dupla marcação para CD44 e ALDH1 (Figura 11). Para ambas as linhagens foi observado que a administração de Cisplatina como monoterapia não é capaz de diminuir a população de CTT. Na avaliação da linhagem CAL-27 (Figura 11.A), o tratamento mais eficiente na diminuição das CTT foi a combinação de Emetine + Cisplatina ($p < 0,01$), no qual houve decréscimo de mais de 60% das CTT. O tratamento com CBL0137 + Cisplatina e Emetine sozinho também apresentaram diminuição, porém, não apresentaram diferença estatística. Na avaliação da linhagem SCC-9 (Figura 11.B), o tratamento isolado com CBL0137 foi o mais eficiente na diminuição das CTT ($p < 0,05$), seguido pelo tratamento combinado de CBL0137 + Cisplatina. ($p < 0,05$).

Figura 11- Identificação e quantificação da população de CTT após os tratamentos com os inibidores de NFkB CBL0137 e Emetine.

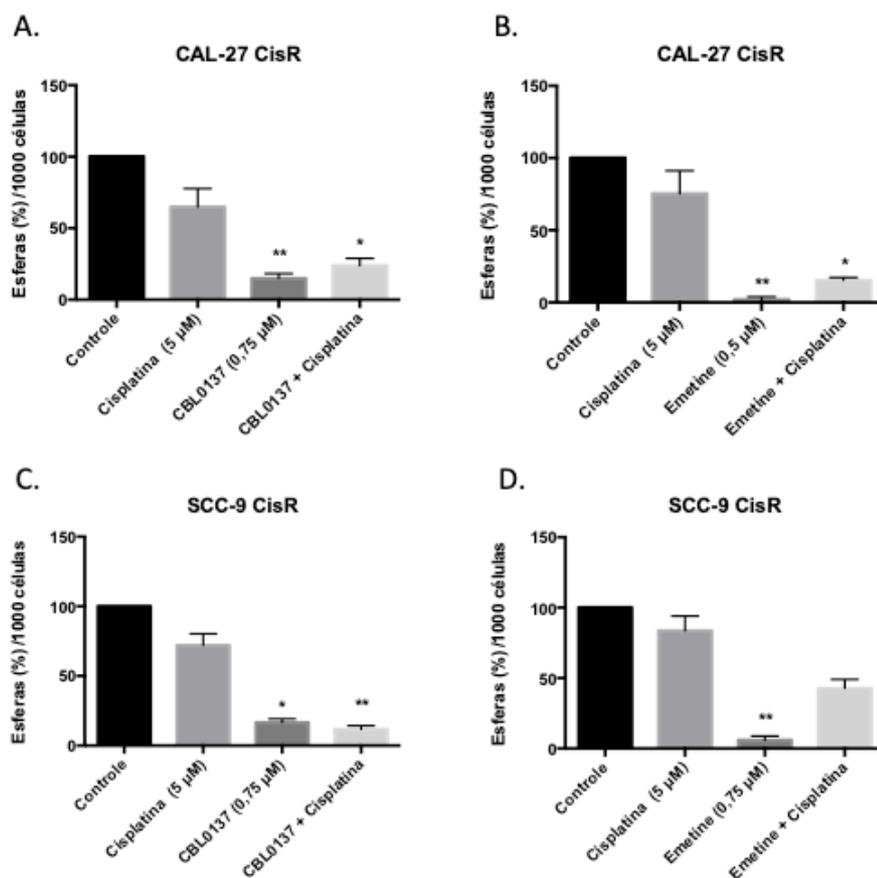


Fonte: Castro (2021). A. Diminuição do número de CTT com administração combinada de Emetine + Cisplatina, CBL0137 + Cisplatina e Emetine na linhagem CAL-27. B. Os tratamentos com CBL0137, e CBL0137 + Cisplatina foram eficientes em reduzir a quantidade de CTT na linhagem SCC-9.

O potencial da inibição farmacológica de NFkB em diminuir a população de CTT também foi avaliado pelo ensaio de formação de esferas (Figura 12). Assim como em outros

trabalhos, foi observado que a monoterapia com Cisplatina não é eficiente para eliminar as CTT (Almeida et al., 2017a; Guimarães et al., 2016; Nör et al., 2014). Para ambas as linhagens, foi observado que a administração isolada de Emetine é mais eficiente para eliminar a população de CTT (Figuras 12.B e 12.D - $p < 0,01$). Quando em combinação com Cisplatina, CBL0137 foi mais eficiente na linhagem SCC-9 (Figura 12.C), reduzindo significativamente a população de CTT ($p < 0,01$). Para a linhagem CAL-27, Emetine em combinação com Cisplatina apresentou uma resposta melhor do que a associação CBL0137 + Cisplatina (Figuras 12.A e 12.B - $p < 0,05$), porém a combinação das drogas não foi mais eficiente do que a administração de Emetine como monoterapia para reduzir as CTT (Figura 12.B).

Figura 12- Avaliação da formação de esferas após administração isolada ou em conjunto de Emetine, CBL0137 e cisplatina nas linhagens CAL-27 e SCC-9.

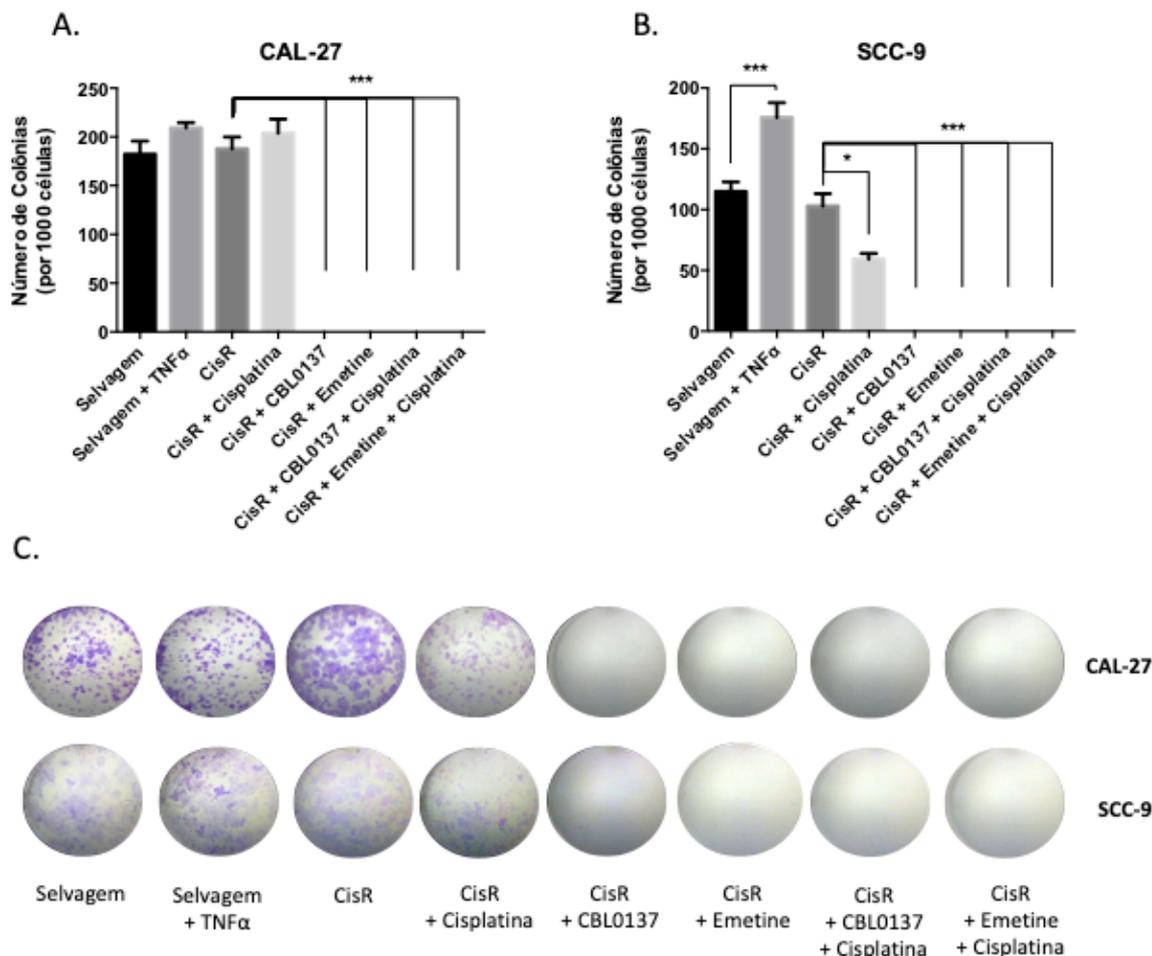


Fonte: Castro (2021). 12.A e B. Tratamento com Emetine, CBL0137, Emetine + Cisplatina e CBL0137 + Cisplatina foram eficientes em reduzir a quantidade de CTT na linhagem CAL-27. Para a linhagem SCC-9, os tratamentos com Emetine, CBL0137 + Cisplatina e CBL0137 foram eficazes em reduzir em mais de 80% o número de CTT.

4.7. Avaliação do potencial de agressividade das linhagens tumorais após a inibição farmacológica de NFkB

Os tumores malignos possuem a característica de rápido crescimento através da proliferação celular. Como mencionado anteriormente, as CTT são responsáveis pelo aumento da massa tumoral ao originar células em diferentes estágios de diferenciação, denominada divisão assimétrica. Inicialmente foi avaliado, através do ensaio de formação de colônias, se a inibição farmacológica de NFkB seria capaz de reduzir o potencial proliferativo das linhagens analisadas (Figura 13). Surpreendentemente, não foram observadas diferenças no potencial clonogênico entre as linhagens selvagem e CisR, porém, é possível observar que a linhagem CAL-27 CisR originou colônias muito maiores do que a linhagem CAL-27 selvagem (Figura 13.C). A administração de TNF α induziu um aumento na formação de colônias que foi mais significativo na linhagem SCC-9 ($p < 0,001$) (Figura 13.B). A administração de Cisplatina como monoterapia não exerceu qualquer efeito sobre a linhagem CAL-27 (Figura 13.A) mas reduziu o número de colônias observadas na linhagem SCC-9 ($p < 0,05$) (Figura 13.B). Para ambas linhagens, os tratamentos isolados com CBL0137 e Emetine, assim como os inibidores associados a Cisplatina, foram eficientes na inibição completa de formação de colônias ($P < 0,001$) (Figura 13.A, B e C). Estes dados sugerem relação intrínseca entre a expressão de NFkB e a propagação de células tumorais.

Figura 13- Avaliação do potencial de formação de colônias das linhagens CAL-27 e SCC-9 após o tratamento com CBL0137 e Emetine.

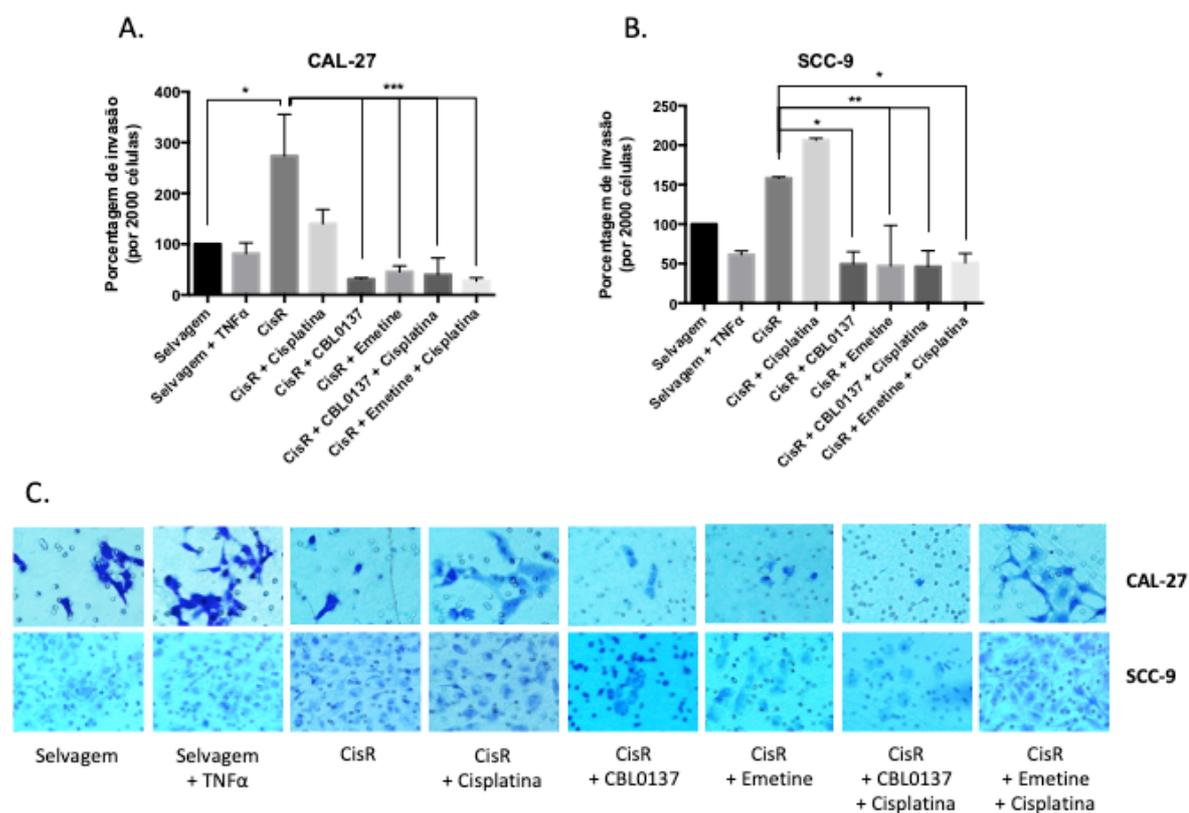


Fonte: Castro (2021). Os tratamentos isolados e combinados de CBL0137 e Emetine com Cisplatina foram eficientes para zerar a contagem de colônias nas linhagens CAL-27 e SCC-9.

O caráter invasivo é um marcador de agressividade das neoplasias malignas. Após a proliferação celular e aumento expansivo do tumor, as células tumorais tendem a invadir tecidos e espaços adjacentes ao local de acometimento primário. Sabendo que NF κ B é relacionado a ativação de invasão, este ensaio buscou avaliar se a inibição de NF κ B, de forma isolada ou combinada com o tratamento com Cisplatina, é capaz de diminuir o potencial invasivo das linhagens analisadas. De forma oposta ao esperado, a indução de NF κ B pela administração de TNF α não aumentou o potencial de invasão (Figura 14.A, B e C), mas as linhagens resistentes à Cisplatina apresentaram um potencial invasivo muito superior à linhagem selvagem, que pode ser observado de forma mais significativa para a linhagem CAL-27 ($p < 0,05$) (Figura 14.A). Os inibidores farmacológicos de NF κ B reduziram significativamente a invasão das células CAL-27 CisR tanto como monoterapia quanto em

combinação com a Cisplatina ($p < 0,001$) (Figura 14.A). Em relação à linhagem SCC-9, a administração de Emetine como monoterapia e CBL0137 em combinação com Cisplatina foram os tratamentos mais eficientes para reduzir o potencial invasivo da linhagem CisR ($p < 0,01$), embora a administração de CBL0137 sozinho e a associação de Emetine com Cisplatina também tenham reduzido de forma significativa a invasão de SCC-9 CisR ($p < 0,05$) (Figura 14.B). Estes resultados mostram que ambas drogas reduziram significativamente o potencial invasivo das linhagens CisR a níveis inferiores aos das linhagens selvagens, reafirmando o papel importante de NFkB no fenótipo agressivo do tumor.

Figura 14- Avaliação do potencial de invasão das linhagens CAL-27 e SCC-9 com os tratamentos isolados com CBL0137 e Emetine ou combinados com Cisplatina.

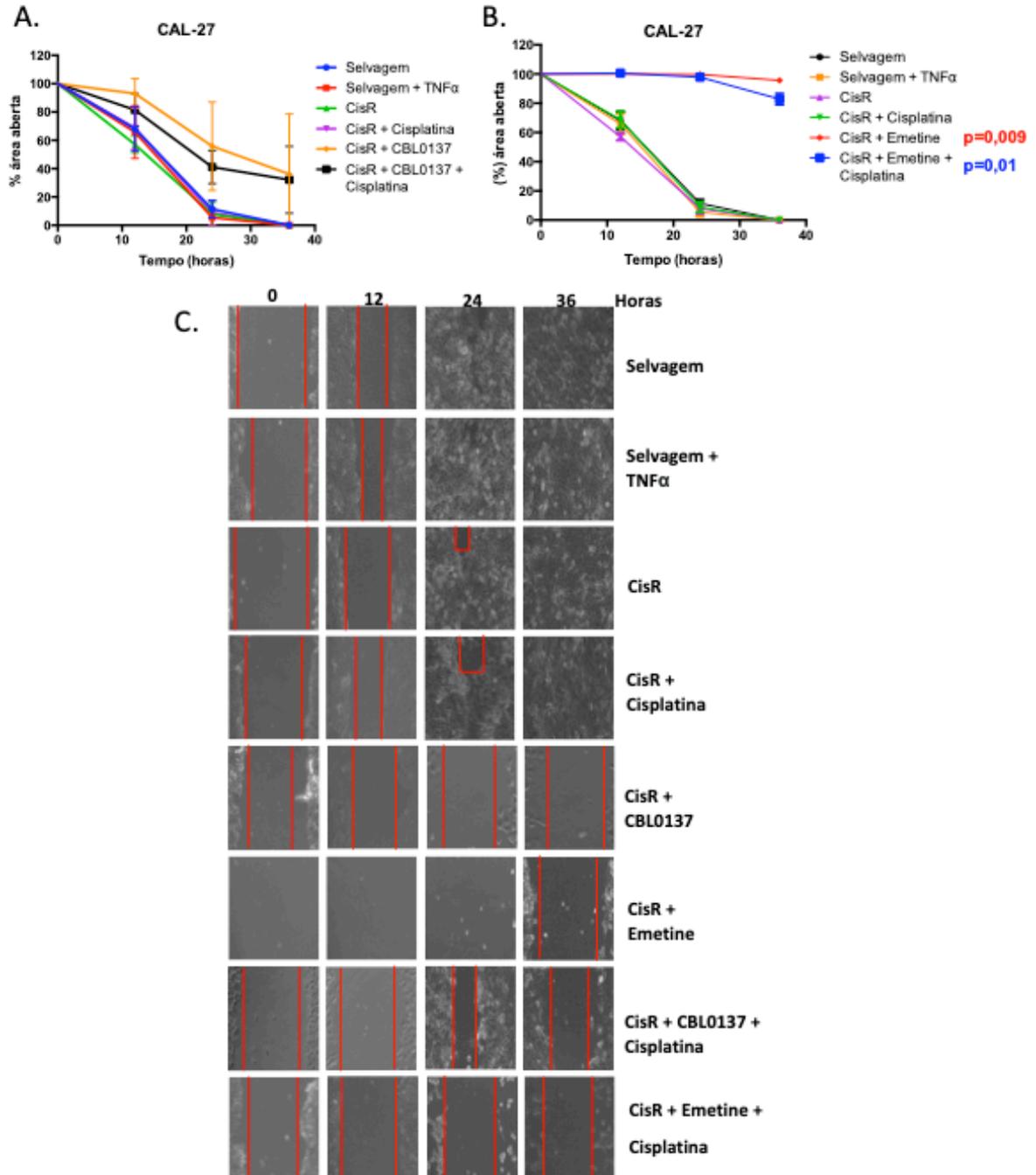


Fonte: Castro (2021). Ambas linhagens apresentaram redução de células invasivas com administração dos fármacos inibidores. CAL-27 foi mais sensível a Emetine e Emetine + Cisplatina, enquanto SCC-9 mostrou sensibilidade semelhante entre os tratamentos isolados CBL0137 e Emetine ou combinados com Cisplatina.

Após a expansão tumoral e a invasão de tecidos vizinhos, as células iniciam o processo de migração para se espalharem em outros tecidos ou regiões, visando a metástase. Em seguida, buscou-se avaliar se a capacidade de migração celular seria alterada com a inibição de NFkB. Na linhagem CAL-27 (Figura 15), foi observado que após 36 horas, as

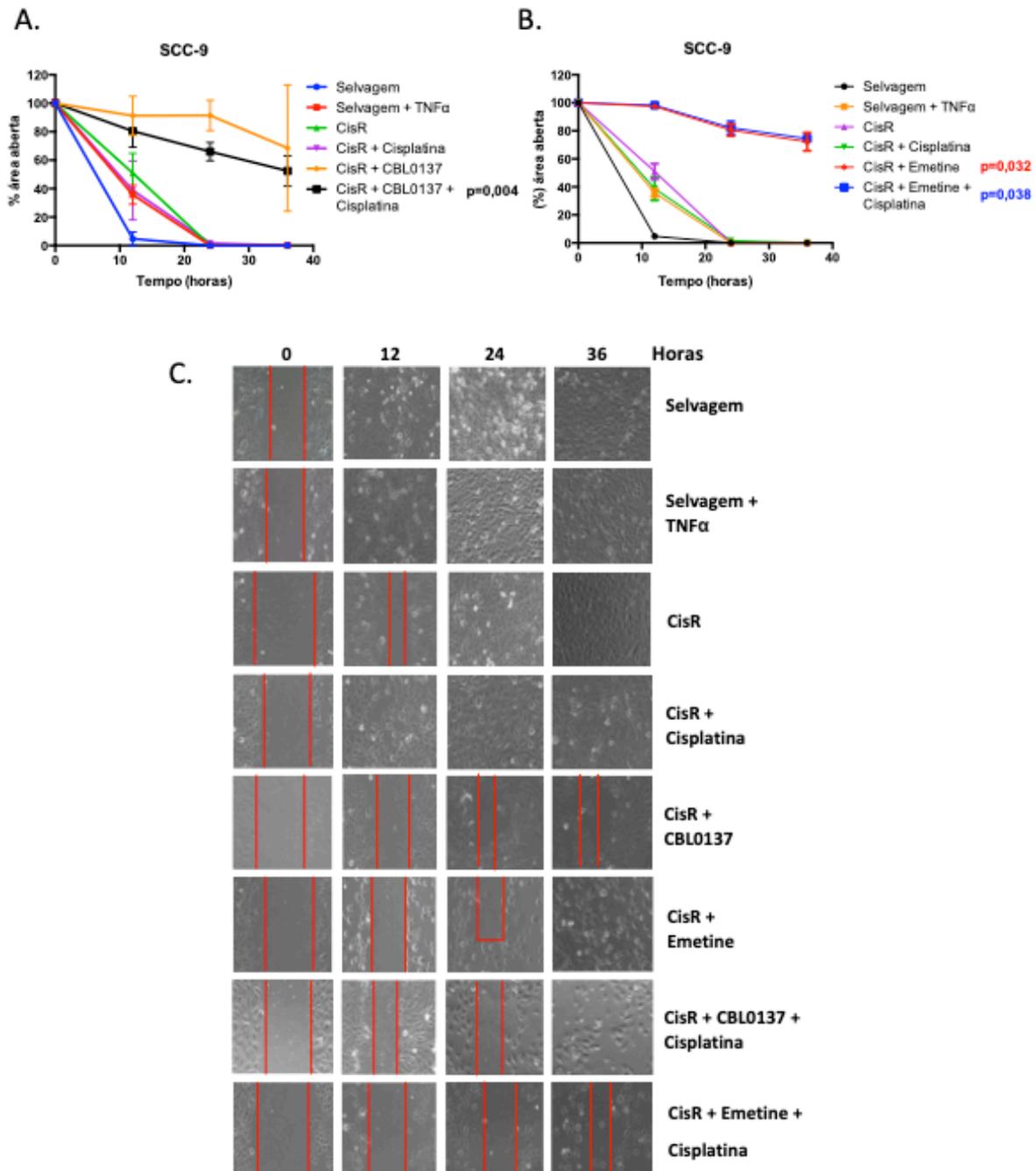
células dos grupos selvagem, selvagem + TNF α , CisR e CisR + Cisplatina já haviam migrado para cobrir toda a área aberta (Figura 15.A, B e C). Com relação a inibição farmacológica de NFkB, os tratamentos com Emetine e Emetine + Cisplatina foram eficazes na redução do potencial de migração em mais de 95% (p=0,009) e 65% (p=0,01) (Figura 15.B), respectivamente. Os tratamentos com CBL0137 + Cisplatina e CBL0137 também reduziram o potencial de migração das células em 40% e 25%, porém não apresentaram significância estatística (Figura 15.A). Para a linhagem SCC-9 (Figura 16), foi observado um potencial de migração ainda maior do que para a CAL-27 nos grupos onde NFkB está presente, sendo que, após 24h, as células dos grupos selvagem, selvagem + TNF α , CisR e CisR + Cisplatina já haviam migrado para cobrir toda a área aberta (Figura 16.A, B e C). Foi observado que a administração de Emetine (p=0,032) como monoterapia ou em associação com a Cisplatina (p=0,038) foram muito eficientes em reduzir a migração celular, diminuindo as taxas em 70% e 60% respectivamente (Figura 16.B). CBL0137 sozinho foi menos eficiente em reduzir o potencial de migração do que quando administrado em associação com a Cisplatina (p=0,004) (Figura 16.A). Esses resultados indicaram que ambas linhagens parecem ser mais sensíveis ao tratamento com Emetine em comparação a CBL0137, mas responderam bem a todos tratamentos empregados sugerindo que a inibição de NFkB, associada ou não a Cisplatina, diminui a agressividade do tumor em relação a capacidade de migrar para outros tecidos.

Figura 15- Avaliação do potencial de migração da linhagem CAL-27 após administração isolada de CBL0137 e Emetine ou combinada com Cisplatina.



Fonte: Castro (2021). A linhagem CAL-27 se mostrou mais sensível ao tratamento isolado de Emetine e de Emetine + Cisplatina na redução do potencial migratório. Os tratamentos com Emetine e Emetine + Cisplatina tiveram maior efeito sobre a linhagem SCC-9, mostrando maior área aberta em comparação aos outros grupos analisados.

Figura 16- Avaliação do potencial de migração da linhagem SCC-9 após administração isolada de CBL0137 e Emetine ou combinada com Cisplatina.



Fonte: Castro (2021). A linhagem CAL-27 se mostrou mais sensível ao tratamento isolado de CBL0137 e CBL0137 + Cisplatina na redução do potencial migratório. Os tratamentos com Emetine e Emetine + Cisplatina tiveram maior efeito sobre a linhagem SCC-9, mostrando maior área aberta em comparação aos outros grupos analisados.

5. DISCUSSÃO

NFkB é um fator de transcrição que está acumulado em diversos tumores malignos, incluindo o CEC de cabeça e pescoço (Monisha et al., 2016). A ativação da via de sinalização de NFkB tem sido associada a resistência a Cisplatina e ao acúmulo de células-tronco tumorais, entretanto, ainda não foi elucidado qual o papel de NFkB no acúmulo de células-tronco em CEC oral (Almeida et al., 2014; Lagunas & Meléndez-Zajgla, 2008).

Os nossos resultados demonstraram o acúmulo de NFkB nas linhagens resistentes ao quimioterápico Cisplatina, previamente estabelecidas pelo nosso grupo, e na população de células-tronco tumorais destas linhagens. Resultados anteriores já haviam demonstrado a associação entre acúmulo de NFkB em linhagens de CEC de cabeça e pescoço e a resistência à Cisplatina, entre carcinoma mucoepidermoide e a resistência à radio e quimioterapia e acúmulo de células-tronco tumorais (Almeida et al., 2014; Wagner et al., 2016; Wagner et al., 2018). A inibição farmacológica de NFkB induziu o aumento de expressão gênica de histonas deacetilases e reduziu a acetilação de histonas. Ainda, a inibição de NFkB reverteu o fenótipo de quimiorresistência ao reduzir o potencial proliferativo, invasivo e migratório das linhagens quimiorresistentes, demonstrando ser eficiente como alvo no tratamento de CEC de cabeça e pescoço.

Estes resultados demonstraram um aumento da forma ativa da proteína NFkB nas linhagens celulares quimiorresistentes, as quais foram induzidas à resistência adaptativa à Cisplatina através da exposição prolongada a doses crescentes do fármaco, e também o seu aumento na população de células-tronco tumorais. Estes resultados estão de acordo com outros estudos que identificaram acúmulo de NFkB em células resistentes a Cisplatina, como câncer de ovário, carcinoma nasofaríngeo, câncer de pulmão de células pequenas, entre outros, corroborando com a hipótese de que a expressão aumentada de NFkB está relacionada com o aumento das células-tronco tumorais e a resistência a Cisplatina (Kan et al., 2020; Ryan et al., 2019; Shen et al., 2021; Wagner et al., 2016)

Através da administração farmacológica de TNF α , um ativador da via de NFkB, foi observado que o aumento da expressão de NFkB resultou no aumento da população de células-tronco tumorais. Assim, sabendo do aumento de NFkB nas linhagens quimiorresistentes e conseqüente acúmulo de células-tronco nessas linhagens, além do

aumento de NFkB nas células-tronco, nós consideramos NFkB como um potencial alvo para reverter a quimiorresistência e reduzir a população de células-tronco tumorais.

Para identificar se a inibição de NFkB reverteria o fenótipo de quimiorresistência das linhagens analisadas, foram selecionados dois fármacos inibidores de NFkB: CBL0137 e Emetine. CBL0137 atua impedindo a transcrição gênica ao inibir o complexo FACT, um grupo de proteínas exclusivas de cromatina responsáveis por desmontar e montar o nucleossomo, disponibilizando a cromatina para transcrição. Emetine inibe NFkB impedindo a fosforilação de IκB, impedindo a translocação de NFkB para o núcleo da célula, mantendo NFkB inativo no citoplasma celular. Ambos fármacos inibem indiretamente NFkB e foram reportados como eficientes no tratamento de melanoma, glioblastoma, carcinoma renal, câncer de pulmão, câncer de pulmão de células pequenas, câncer de próstata e tumor de nasofaringe (Bi et al., 2019; De et al., 2018b; Kuang et al., 2017; Ryan et al., 2019; Wu et al., 2019).

As linhagens celulares, assim como os tumores, são compostas por uma população heterogênea de células em diferentes estágios de diferenciação, e a quimiorresistência é atribuída às células-tronco tumorais, que sobrevivem aos tratamentos convencionais e repovoam o tumor. Nas linhagens celulares quimiorresistentes analisadas, foi observado que o tratamento isolado com Cisplatina induziu o acúmulo de células-tronco. Estudos demonstraram que a Cisplatina reduz a massa tumoral total, mas é ineficiente na dizimação das células-tronco; ainda, a administração de Cisplatina estimulou o crescimento desta população em Carcinoma adenoide cístico e em Carcinoma mucoepidermóide (Almeida et al., 2017b; Guimarães et al., 2016; Nör et al., 2014).

Para a nossa estratégia de terapia combinada foi necessário estabelecer uma dose de inibição de NFkB que atingisse as células-tronco tumorais sem diminuir muito a viabilidade celular global, prevenindo a citotoxicidade para uma possível futura aplicação clínica. Reforçando o envolvimento de NFkB no acúmulo de células-tronco tumorais, nós observamos que as doses dos inibidores necessárias para reduzir a população de células-tronco foi muito menor do que as doses necessárias para reduzir significativamente a viabilidade da população global de células tumorais. Em estudos anteriores, Emetine também foi capaz de reduzir significativamente a formação de esferas em carcinoma mucoepidermoide, glioblastoma e câncer de mama ao inibir NFkB e alvos de b-catenina (Dermawan et al., 2016; Q. Sun et al., 2019; Wagner et al., 2018). Estes dados sugerem que a via de NFkB está intimamente relacionada a propagação e manutenção das células-tronco e que ao inibir a via,

consequentemente promove-se a redução das células-tronco tumorais, consideradas responsáveis pela quimiorresistência.

NFkB é um fator de transcrição que ativa a expressão de vários genes associados ao processo de carcinogênese, como genes reguladores da proliferação (ciclina D1 e c-myc), genes envolvidos na formação de metástase, angiogênese (VEGF) e imortalidade celular pela telomerase (Tilborghs et al., 2017). É bem estabelecido que a estrutura da cromatina regula a interação de fatores de transcrição aos sítios de ligação em seus genes-alvo. O fato de que muitos sítios de ligação de fatores de transcrição são ocultados durante o empacotamento do DNA é proposto como um mecanismo comum que confere um grau superior de regulação da expressão gênica em resposta a vários estímulos.

Muitos estudos têm demonstrado que NFkB regula a acessibilidade ao DNA em torno de seus sítios de ligação (Cakouros et al., 2001; Holloway et al., 2003; Pradhan et al., 2012). A dinâmica da cromatina, que controla a acessibilidade ao DNA, é regulada por modificações epigenéticas. Uma das modificações epigenéticas mais abundantes é a acetilação de resíduos de lisina localizadas nas caudas de histonas que compõem a cromatina. A acetilação de histonas é regulada por enzimas histona acetiltransferases (HAT) e histonas deacetilases (HDAC) (Choudhary et al., 2009).

Neste trabalho nós investigamos o papel de NFkB na regulação da expressão gênica de HDAC e seu efeito na acetilação de histonas. Foi observado que a ativação de NFkB através da administração de TNF α promoveu o aumento da expressão de HDAC2, mas promoveu a diminuição da expressão das HDAC1, 9, 11 e SIRT1. Da mesma forma, as linhagens quimiorresistentes, que apresentam acúmulo de NFkB, apresentaram níveis reduzidos da expressão gênica das HDAC. Os inibidores de NFkB promoveram a ativação da expressão destes genes, que foi mais acentuada pela administração do fármaco CBL0137.

Da mesma forma, os inibidores de NFkB promoveram uma diminuição da acetilação de lisinas das proteínas histona analisadas, porém os efeitos mais acentuados foram observados após a administração de Emetine. Sob condições de estresse oxidativo, NFkB é acumulado e recruta a histona acetiltransferase CBP/p300 para formar um complexo com a subunidade p65 de NFkB e ativar a transcrição de genes pro-inflamatórios através do relaxamento da cromatina, mediado pelo aumento da acetilação de histonas, nos sítios-alvo destes genes (Rahman et al., 2004). Pouco se sabe sobre a regulação de proteínas HDAC por NFkB. Da mesma forma que o estresse oxidativo induz a acetilação de histonas em sítios-alvo

de NFkB, o estresse oxidativo promovido pela fumaça do cigarro promove a liberação de IL-8 e TNF α e reduz os níveis de HDAC1, HDAC2 e HDAC3 induzindo a resposta inflamatória (Yang et al., 2006). Curiosamente, nós observamos que TNF α e CXCL8 (gene que codifica a IL-8) foram aumentados nas linhagens quimiorresistentes e apresentaram diminuição da expressão após a administração de CBL0137, o mesmo composto que induziu fortemente a expressão das HDAC. O mecanismo pelo qual NFkB controla a acetilação de histonas, seja por interação direta com esses fatores ou por via indireta, através da indução de inflamação, ainda precisa ser investigado.

O campo de estudo das modificações epigenéticas é relativamente recente, sendo considerado chave para compreensão de eventos e comportamentos celulares. É estabelecido na literatura que o estado quiescente é um mecanismo de defesa das células tumorais frente aos tratamentos antineoplásicos. Para elucidar o mecanismo das células quimiorresistentes, é necessário entender onde e quando são realizadas essas mudanças pós transcricionais. Os resultados deste estudo demonstraram que a inibição de NFkB aumentou a expressão das HDAC, genes que codificam enzimas que causam enovelamento da cromatina e diminuiu a acetilação de lisinas nas histonas 3 e 4.

As células-tronco tumorais são células do câncer com capacidade de autorrenovação e habilidade de se diferenciar em células com maior potencial de malignidade, além de mediar o aparecimento de metástases e a resistência à terapia. O processo inflamatório e a sinalização de NFkB estão envolvidos na geração e manutenção das células-tronco tumorais. NFkB está constitutivamente ativado em células-tronco tumorais de vários tipos de cânceres e estimula sua proliferação, sobrevivência, manutenção e expansão (Taniguchi & Karin, 2018; Vazquez-Santillan et al., 2015).

Inicialmente, nós observamos que a indução de NFkB por TNF α promoveu um acúmulo da população de células-tronco tumorais, que foi ainda mais significativo nas linhagens quimiorresistentes, as quais apresentam aumento de NFkB. A inibição farmacológica de NFkB foi capaz de reduzir expressivamente a população de células-tronco nas linhagens quimiorresistentes. As linhagens foram sensíveis aos tratamentos, principalmente aos combinados com Cisplatina, o que está em consonância a literatura que aponta que a terapia combinada aumenta a chance de sucesso do tratamento ao abordar um número maior de alvos (De et al., 2018b; Ryan et al., 2019).

Em consonância com os resultados obtidos com este projeto, há relato de efeito sinérgico entre CBL0137 e Cisplatina na redução de células-tronco em câncer de pulmão de células pequenas; ainda, CBL0137 apresentou sinergia *in vitro* e *in vivo* com outros quimioterápicos, como a gencitabina no tratamento de câncer de pâncreas (Burkhart et al., 2014; De et al., 2018b). Emetine também possui sinergia com Cisplatina, tendo sido relatado resultados semelhantes em câncer de pulmão, de ovário e em carcinoma mucoepidermoide (Q. Sun et al., 2019; Wagner et al., 2016, 2018; Wu et al., 2019).

Um estudo sobre fármacos com potencial ação antitumoral, observou que Emetine pode ser uma boa estratégia na terapia contra as células-tronco tumorais por se ligar a três diferentes proteínas-alvo: Hm, Smo e Gli, diminuindo dessa forma, a chance desta via específica de quimiorresistência (Mayank & Jaitak, 2016). Vale ressaltar que as doses de CBL0137 e Emetine estabelecidas para serem utilizadas neste estudo não tiveram muito efeito sobre a viabilidade da população heterogênea da massa tumoral, mas exerceram um forte efeito inibitório sobre as células-tronco tumorais, demonstrando um efeito específico e não-citotóxico, o que sugere que a combinação entre os inibidores de NFkB e a Cisplatina pode ser uma estratégia promissora para ser empregada na clínica.

Atualmente, existem 4 ensaios clínicos para pesquisa da ação antitumoral de CBL0137: aplicação deste fármaco em tumores sólidos metastáticos ou não ressecáveis (NCT01905228); em pacientes já tratados para diferentes tipos de linfoma (NCT02931110); em tumores resistentes ou recidivantes do sistema nervoso central, glioma, osteosarcoma e linfoma (NCT04870944) e para melanoma e sarcoma (NCT03727789), sendo estes últimos dois, ainda em fase de recrutamento de pacientes (*Clinical Trials*, n.d.). Não foram encontrados ensaios clínicos em andamento com Emetine no tratamento de tumores malignos. Em nenhum dos ensaios clínicos está sendo avaliado CEC de cabeça e pescoço. Os resultados desta pesquisa podem, futuramente, contribuir para um ensaio clínico, visto que os resultados obtidos são promissores, principalmente por terem como alvo as subunidades proteicas acumuladas em tumores quimiorresistentes e no caso do CBL0137, somente em células tronco e em células tumorais.

É muito bem estabelecido que a via de sinalização de NFkB tem um papel central na coordenação das respostas imune inata e adaptativa, porém, vêm se tornando cada vez mais evidente que a sinalização e NFkB desempenha um papel fundamental no desenvolvimento e na progressão tumoral. NFkB promove a sobrevivência das células tumorais por induzir a expressão de genes anti-apoptóticos; induz a proliferação celular por ativar ciclinas e proto-

oncogenes; promove metástase através da regulação da expressão de metaloproteinases de matriz e genes de adesão celular; estimula a angiogênese através da regulação de genes associados ao crescimento de novos vasos sanguíneos e induz inflamação crônica no microambiente tumoral (Karin, 2006; Perkins, 2012). Dessa forma, nós buscamos explorar se a inibição farmacológica de NFkB é capaz de reverter seus efeitos na progressão tumoral. A inibição de NFkB, sozinha ou combinada com Cisplatina, resultou na diminuição do potencial de proliferação, invasão e migração das células tumorais, considerados marcadores de agressividade do tumor. Estes resultados também foram observados em câncer de ovário e de pulmão de células não pequenas, onde a expressão aumentada de NFkB foi relacionada com a agressividade tumoral, e a sua inibição, no aumento de apoptose das células tumorais frente o tratamento com Cisplatina (Kan et al., 2020; Shen et al., 2021).

Os resultados desta pesquisa mostram que a inibição de NFkB resulta na diminuição da população de células-tronco do câncer, aumenta a expressão de proteínas histonas deacetilases, diminui os níveis de acetilação de histonas e reverte características de agressividade tumoral, aumentando a resposta das linhagens celulares de CEC oral ao tratamento com Cisplatina. Testes *in vivo* são necessários para compreender o comportamento biológico de NFkB em CEC oral na presença de fatores sistêmicos.

A população de células-tronco tumorais e as vias de sinalização relacionadas a sua sobrevivência vem sendo muito exploradas, pois são apontadas como elemento promotor da tumorigênese e fator desencadeante de resistência aos tratamentos antineoplásicos atualmente empregados na clínica (Gopalan et al., 2013). Com base em trabalhos já publicados na literatura e nos resultados deste projeto, é sugerido que a inibição farmacológica de NFkB pode constituir uma abordagem terapêutica promissora ao melhorar a resposta tumoral frente ao tratamento com Cisplatina via redução da população das células-tronco tumorais quimiorresistentes.

6. CONCLUSÃO

É urgente o estabelecimento de novos alvos terapêuticos para o tratamento de tumores de cabeça e pescoço, visto que os tratamentos atuais apresentam altas taxas de recidiva e metástase. Os resultados deste projeto demonstraram acúmulo de NFkB e de células-tronco tumorais nas linhagens celulares de CEC oral com fenótipo de quimiorresistência a Cisplatina. A inibição de NFkB resultou em redução da expressão de NFkB, diminuição da população de células-tronco, aumento da resposta das linhagens celulares ao tratamento com Cisplatina e redução do potencial de proliferação, invasão e migração celular, evidenciando que NFkB está relacionado ao processo de resistência a Cisplatina. Continuar estudando por qual processo NFkB está envolvido no aumento das células-tronco tumorais e na quimiorresistência, pode contribuir para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos a fim de aumentar o sucesso dos tratamentos antineoplásicos em tumores resistentes. Com estes resultados prévios, pode-se concluir que NFkB está intimamente relacionado com a manutenção das células-tronco tumorais, sendo um alvo elegível para sensibilização das células resistentes ao tratamento com Cisplatina.

REFERÊNCIAS

- Almeida, L. O., Abrahao, A. C., Rosselli-Murai, L. K., Giudice, F. S., Zagni, C., Leopoldino, A. M., Squarize, C. H., & Castilho, R. M. (2014). NFκB mediates cisplatin resistance through histone modifications in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *FEBS Open Bio*, *4*, 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.fob.2013.12.003>
- Almeida, L. O., Guimarães, D. M., Martins, M. D., Martins, M. A. T., Warner, K. A., Nör, J. E., Castilho, R. M., & Squarize, C. H. (2017a). Unlocking the chromatin of adenoid cystic carcinomas using HDAC inhibitors sensitize cancer stem cells to cisplatin and induces tumor senescence. *Stem Cell Research*, *21*, 94–105. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2017.04.003>
- Almeida, L. O., Guimarães, D. M., Squarize, C. H., & Castilho, R. M. (2016). Profiling the behavior of distinct populations of head and neck cancer stem cells. *Cancers*, *8*(1), 1–14. <https://doi.org/10.3390/cancers8010007>
- Antoniou, A., Hébrant, A., Dom, G., Dumont, J. E., & Maenhaut, C. (2013). Cancer stem cells, a fuzzy evolving concept: A cell population or a cell property? In *Cell Cycle* (Vol. 12, Issue 24, pp. 3743–3748). <https://doi.org/10.4161/cc.27305>
- Aoki, T., Shimada, K., Sakamoto, A., Sugimoto, K., Morishita, T., Kojima, Y., Shimada, S., Kato, S., Iriyama, C., Kuno, S., Harada, Y., Tomita, A., Hayakawa, F., & Kiyoi, H. (2017). Emetine elicits apoptosis of intractable B-cell lymphoma cells with MYC rearrangement through inhibition of glycolytic metabolism. *Oncotarget*, *8*(8), 13085–13098. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14393>
- Ausoni, S., Boscolo-Rizzo, P., Singh, B., Da Mosto, M. C., Spinato, G., Tirelli, G., Spinato, R., & Azzarello, G. (2016). Targeting cellular and molecular drivers of head and neck squamous cell carcinoma: current options and emerging perspectives. *Cancer and Metastasis Reviews*, *35*(3), 413–426. <https://doi.org/10.1007/s10555-016-9625-1>
- Barone, T. A., Burkhart, C. A., Safina, A., Haderski, G., Gurova, K. V., Purmal, A. A., Gudkov, A. V., & Plunkett, R. J. (2017). Anticancer drug candidate CBL0137, which inhibits histone chaperone FACT, is efficacious in preclinical orthotopic models of temozolomide-responsive and -resistant glioblastoma. *Neuro-Oncology*, *19*(2), 186–196. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now141>
- Baud, V., & Karin, M. (2009). Is NF-κB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nature Reviews Drug Discovery*, *8*(1), 33–40. <https://doi.org/10.1038/nrd2781>
- Bi, L., Xie, C., Yao, M., Thae Hnit, S. S., Vignarajan, S., Wang, Y., Wang, Q., Xi, Z., Xu, H., Li, Z., de Souza, P., Tee, A., Wong, M., Liu, T., Zhao, X., Zhou, J., Xu, L., & Dong, Q. (2019). The histone chaperone complex FACT promotes proliferative switch of G0 cancer cells. *International Journal of Cancer*, *145*(1), 164–178. <https://doi.org/10.1002/ijc.32065>
- Burkhart, C., Fleyshman, D., Kohn, R., Commane, M., Garrigan, J., Kurbatov, V., Toshkov, I., Ramachandran, R., Martello, L., & Gurova, K. v. (2014). Curaxin CBL0137 eradicates drug resistant cancer stem cells and potentiates efficacy of gemcitabine in preclinical models of pancreatic cancer. *Oncotarget*, *5*(22), 11038–11053. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2701>

- Cakouros, D., Cockerill, P. N., Bert, A. G., Mital, R., Roberts, D. C., & Shannon, M. F. (2001). A NF- κ B/Sp1 Region Is Essential for Chromatin Remodeling and Correct Transcription of a Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Transgene. *The Journal of Immunology*, *167*(1), 302–310. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.1.302>
- Canino, C., Luo, Y. Y., Marcato, P., Blandino, G., Pass, H. I., & Cioce, M. (2015). A STAT3-NF κ B/DDIT3/CEBP β axis modulates ALDH1A3 expression in chemoresistant cell subpopulations. *Oncotarget*, *6*(14), 12637–12653. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3703>
- Chang, H. W., Valieva, M. E., Safina, A., Chereji, R. V., Wang, J., Kulaeva, O. I., Morozov, A. V., Kirpichnikov, M. P., Feofanov, A. V., Gurova, K. V., & Studitsky, V. M. (2018). Mechanism of FACT removal from transcribed genes by anticancer drugs curaxins. *Science Advances*, *4*(11), eaav2131. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav2131>
- Chang, I., & Wang, C. Y. (2016). Inhibition of HDAC6 protein enhances bortezomib-induced apoptosis in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) by reducing autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(35), 18199–18209. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.717793>
- Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M. L., Rehman, M., Walther, T. C., Olsen, J. v., & Mann, M. (2009). Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science*, *325*(5942), 834–840. <https://doi.org/10.1126/science.1175371>
- Clinical trials*. (n.d.). Retrieved June 18, 2021, from https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Cancer&term=CBL0137&type=&rslt=&age_v=&gndr=&intr=&titles=&outc=&spons=&lead=&id=&cntry=&state=&city=&dist=&locn=&rsub=&strd_s=&strd_e=&prcd_s=&prcd_e=&sfpd_s=&sfpd_e=&rfpd_s=&rfpd_e=&lupd_s=&lupd_e=&sort=
- Colak, S., & Medema, J. P. (2014). Cancer stem cells - Important players in tumor therapy resistance. *FEBS Journal*, *281*(21), 4779–4791. <https://doi.org/10.1111/febs.13023>
- Dalerba, P., & Clarke, M. F. (2007). Cancer Stem Cells and Tumor Metastasis: First Steps into Uncharted Territory. In *Cell Stem Cell* (Vol. 1, Issue 3, pp. 241–242). Cell Stem Cell. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.08.012>
- Datta, J., Islam, M., Dutta, S., Roy, S., Pan, Q., & Teknos, T. N. (2016). Suberoylanilide hydroxamic acid inhibits growth of head and neck cancer cell lines by reactivation of tumor suppressor microRNAs. *Oral Oncology*, *56*, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2016.02.015>
- De, S., Lindner, D. J., Coleman, C. J., Wildey, G., Dowlati, A., & Stark, G. R. (2018a). The fact inhibitor cbl0137 synergizes with cisplatin in small-cell lung cancer by increasing notch1 expression and targeting tumor-initiating cells. *Cancer Research*, *78*(9), 2396–2406. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1920>
- Dermawan, J. K. T., Hitomi, M., Silver, D. J., Wu, Q., Sandlesh, P., Sloan, A. E., Purmal, A. A., Gurova, K. v., Rich, J. N., Lathia, J. D., Stark, G. R., & Venere, M. (2016). Pharmacological targeting of the histone chaperone complex FACT preferentially eliminates glioblastoma stem cells and prolongs survival in preclinical models. *Cancer Research*, *76*(8), 2432–2442. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2162>

- Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil.* (2019). INCA - Instituto Nacional de Câncer/ Ministério da Saúde. <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil>
- Farley, A., Aveyard, P., Kerr, A., Naidu, B., & Dowswell, G. (2016). Surgical lung cancer patients' views about smoking and support to quit after diagnosis: a qualitative study. *Journal of Cancer Survivorship*, *10*(2), 312–319. <https://doi.org/10.1007/s11764-015-0477-4>
- Gasparian, A. V., Burkhart, C. A., Purmal, A. A., Brodsky, L., Pal, M., Saranadasa, M., Bosykh, D. A., Commane, M., Guryanova, O. A., Pal, S., Safina, A., Sviridov, S., Koman, I. E., Veith, J., Komar, A. A., Gudkov, A. V., & Gurova, K. V. (2011). Curaxins: Anticancer compounds that simultaneously suppress NF- κ B and activate p53 by targeting FACT. *Science Translational Medicine*, *3*(95). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002530>
- Germani, A., Matrone, A., Grossi, V., Peserico, A., Sanese, P., Liuzzi, M., Palermo, R., Murzilli, S., Campese, A. F., Ingravallo, G., Canettieri, G., Tezil, T., & Simone, C. (2014). Targeted therapy against chemoresistant colorectal cancers: Inhibition of p38 α modulates the effect of cisplatin in vitro and in vivo through the tumor suppressor FoxO3A. *Cancer Letters*, *344*(1), 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.10.035>
- Ghosh, R. D., Ghuwalewala, S., Das, P., Mandloi, S., Alam, S. K., Chakraborty, J., Sarkar, S., Chakrabarti, S., Panda, C. K., & Roychoudhury, S. (2016). MicroRNA profiling of cisplatin-resistant oral squamous cell carcinoma cell lines enriched with cancer-stem-cell-like and epithelial-mesenchymal transition-type features. *Scientific Reports*, *6*. <https://doi.org/10.1038/srep23932>
- Ghosh, S., & Karin, M. (2002). Missing pieces in the NF- κ B puzzle. In *Cell* (Vol. 109, Issue 2 SUPPL. 1). Cell Press. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00703-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00703-1)
- Gopalan, A., Yu, W., Sanders, B. G., & Kline, K. (2013). Eliminating drug resistant breast cancer stem-like cells with combination of simvastatin and gamma-tocotrienol. *Cancer Letters*, *328*(2), 285–296. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.10.003>
- Guimarães, D. M., Almeida, L. O., Martins, M. D., Warner, K. A., Silva, A. R. S., Vargas, P. A., Nunes, F. D., Squarize, C. H., Nör, J. E., & Castilho, R. M. (2016). Sensitizing mucoepidermoid carcinomas to chemotherapy by targeted disruption of cancer stem cells. *Oncotarget*, *7*(27), 42447–42460. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9884>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. In *Cell* (Vol. 144, Issue 5, pp. 646–674). Cell. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hoesel, B., & Schmid, J. A. (2013). The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. In *Molecular Cancer* (Vol. 12, Issue 1). Mol Cancer. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-86>
- Holloway, A. F., Rao, S., Chen, X., & Shannon, M. F. (2003). Changes in chromatin accessibility across the GM-CSF promoter upon T cell activation are dependent on nuclear factor κ B proteins. *Journal of Experimental Medicine*, *197*(4), 413–423. <https://doi.org/10.1084/jem.20021039>
- Kaiser, J. (2015). The cancer stem cell gamble. *Science*, *347*(6219), 226–229. <https://doi.org/10.1126/science.347.6219.226>

- Kan, Y., Liu, J., & Li, F. (2020). High expression of nuclear transcription factor κ B is associated with cisplatin resistance and prognosis for ovarian cancer. *Cancer Management and Research*, *12*, 8241–8252. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S265531>
- Karin, M. (2006). Nuclear factor- κ B in cancer development and progression. In *Nature* (Vol. 441, Issue 7092, pp. 431–436). Nature. <https://doi.org/10.1038/nature04870>
- Kuang, C. M., Fu, X., Hua, Y. J., Shuai, W. di, Ye, Z. H., Li, Y., Peng, Q. H., Li, Y. Z., Chen, S., Qian, C. N., Huang, W., & Liu, R. Y. (2017). BST2 confers cisplatin resistance via NF- κ B signaling in nasopharyngeal cancer. *Cell Death and Disease*, *8*(6), e2874–e2874. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.271>
- Kumar, B., Yadav, A., Lang, J. C., Teknos, T. N., & Kumar, P. (2015). Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) reverses chemoresistance in head and neck cancer cells by targeting cancer stem cells via the downregulation of nanog. *Genes and Cancer*, *6*(3–4), 169–181. <https://doi.org/10.18632/genesandcancer.54>
- Lagunas, V. M., & Meléndez-Zajgla, J. (2008). Nuclear factor- κ B as a resistance factor to platinum-based antineoplastic drugs. In *Metal-Based Drugs* (Vol. 2008). <https://doi.org/10.1155/2008/576104>
- Lawrence, M. S., Sougnez, C., Lichtenstein, L., Cibulskis, K., Lander, E., Gabriel, S. B., Getz, G., Ally, A., Balasundaram, M., Birol, I., Bowlby, R., Brooks, D., Butterfield, Y. S. N., Carlsen, R., Cheng, D., Chu, A., Dhalla, N., Guin, R., Holt, R. A., ... Pham, M. (2015). Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*, *517*(7536), 576–582. <https://doi.org/10.1038/nature14129>
- Le, J. (2014). Histone modifications: Targeting head and neck cancer stem cells. *World Journal of Stem Cells*, *6*(5), 511. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i5.511>
- Liu, M., Sakamaki, T., Casimiro, M. C., Willmarth, N. E., Quong, A. A., Ju, X., Ojeifo, J., Jiao, X., Yeow, W. S., Katiyar, S., Shirley, L. A., Joyce, D., Lisanti, M. P., Albanese, C., & Pestell, R. G. (2010). The canonical NF- κ B pathway governs mammary tumorigenesis in transgenic mice and tumor stem cell expansion. *Cancer Research*, *70*(24), 10464–10473. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0732>
- Loidl, P. (1994). Histone acetylation: facts and questions. *Chromosoma*, *103*(7), 441–449. <https://doi.org/10.1007/BF00337382>
- Lou, H., & Dean, M. (2007). Targeted therapy for cancer stem cells: The patched pathway and ABC transporters. In *Oncogene* (Vol. 26, Issue 9, pp. 1357–1360). Oncogene. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210200>
- Maluchenko, N. V., Chang, H. W., Kozinova, M. T., Valieva, M. E., Gerasimova, N. S., Kitashov, A. V., Kirpichnikov, M. P., Georgiev, P. G., & Studitsky, V. M. (2016). Inhibiting the pro-tumor and transcription factor FACT: Mechanisms. In *Molecular Biology* (Vol. 50, Issue 4, pp. 532–541). Maik Nauka Publishing / Springer SBM. <https://doi.org/10.1134/S0026893316040087>
- Mayank, & Jaitak, V. (2016). Molecular docking study of natural alkaloids as multi-targeted hedgehog pathway inhibitors in cancer stem cell therapy. *Computational Biology and Chemistry*, *62*, 145–154. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2015.08.001>
- Méry, B., Guy, J. B., Espenel, S., Wozny, A. S., Simonet, S., Vallard, A., Alphonse, G., Ardail, D., Rodriguez-Lafrasse, C., & Magné, N. (2016). Targeting head and neck

tumoral stem cells: From biological aspects to therapeutic perspectives. In *World Journal of Stem Cells* (Vol. 8, Issue 1, pp. 13–21). Baishideng Publishing Group Co. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v8.i1.13>

- Monisha, J., Kishor Roy, N., Bordoloi, D., Kumar, A., Golla, R., Kotoky, J., Padmavathi, G., & B. Kunnumakkara, A. (2016). Nuclear Factor Kappa B: A Potential Target to Persecute Head and Neck Cancer. *Current Drug Targets*, 18(2), 232–253. <https://doi.org/10.2174/1389450117666160201112330>
- Nakanishi, C., & Toi, M. (2005). Nuclear factor-kB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 5, Issue 4, pp. 297–309). Nat Rev Cancer. <https://doi.org/10.1038/nrc1588>
- Nör, C., Zhang, Z., Warner, K. A., Bernardi, L., Visioli, F., Helman, J. I., Roesler, R., & Nör, J. E. (2014). Cisplatin induces Bmi-1 and enhances the stem cell fraction in head and neck cancer. *Neoplasia (United States)*, 16(2), 137–146. <https://doi.org/10.1593/neo.131744>
- Paldino, E., Tesori, V., Casalbore, P., Gasbarrini, A., & Puglisi, M. A. (2014). Tumor initiating cells and chemoresistance: Which is the best strategy to target colon cancer stem cells? In *BioMed Research International* (Vol. 2014). <https://doi.org/10.1155/2014/859871>
- Pazin, M. J., & Kadonaga, J. T. (1997). What's up and down with histone deacetylation and transcription? In *Cell* (Vol. 89, Issue 3, pp. 325–328). Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80211-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80211-1)
- Perkins, N. D. (2012). The diverse and complex roles of NF-kB subunits in cancer. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 12, Issue 2, pp. 121–132). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrc3204>
- Plaks, V., Kong, N., & Werb, Z. (2015). The cancer stem cell niche: How essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? In *Cell Stem Cell* (Vol. 16, Issue 3, pp. 225–238). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.02.015>
- Pradhan, M., Baumgarten, S. C., Bembinster, L. A., & Frasor, J. (2012). CBP Mediates NF-kB-Dependent Histone Acetylation and Estrogen Receptor Recruitment to an Estrogen Response Element in the BIRC3 Promoter. *Molecular and Cellular Biology*, 32(2), 569–575. <https://doi.org/10.1128/mcb.05869-11>
- Rahman, I., Marwick, J., & Kirkham, P. (2004). Redox modulation of chromatin remodeling: Impact on histone acetylation and deacetylation, NF-kB and pro-inflammatory gene expression. *Biochemical Pharmacology*, 68(6), 1255–1267. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.05.042>
- Ran, S. (2015). The role of TLR4 in chemotherapy-driven metastasis. In *Cancer Research* (Vol. 75, Issue 12, pp. 2405–2410). American Association for Cancer Research Inc. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3525>
- Rayet, B., & Gélinas, C. (1999). Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. In *Oncogene* (Vol. 18, Issue 49, pp. 6938–6947). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203221>
- Rushworth, S. A., Bowles, K. M., Barrera, L. N., Murray, M. Y., Zaitseva, L., & MacEwan, D. J. (2013). BTK inhibitor ibrutinib is cytotoxic to myeloma and potently enhances

- bortezomib and lenalidomide activities through NF-kB. *Cellular Signalling*, 25(1), 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.09.008>
- Ryan, S. L., Beard, S., Barr, M. P., Umezawa, K., Heavey, S., Godwin, P., Gray, S. G., Cormican, D., Finn, S. P., Gately, K. A., Davies, A. M., Thompson, E. W., Richard, D. J., O’Byrne, K. J., Adams, M. N., & Baird, A. M. (2019). Targeting NF-kB-mediated inflammatory pathways in cisplatin-resistant NSCLC. *Lung Cancer*, 135, 217–227. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2019.07.006>
- Shen, H., Liao, B., Wan, Z., Zhao, Y., You, Z., Liu, J., Lan, J., & He, S. (2021). *PTOVI promotes cisplatin-induced chemotherapy resistance by activating the nuclear factor kappa B pathway in ovarian cancer*. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2021.02.008>
- Skvortsov, S., Debbage, P., Lukas, P., & Skvortsova, I. (2015). Crosstalk between DNA repair and cancer stem cell (CSC) associated intracellular pathways. *Seminars in Cancer Biology*, 31, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.06.002>
- Squarize, C. H., Castilho, R. M., Sriuranpong, V., Pinto, D. S., & Gutkind, J. S. (2006). Molecular cross-talk between the NFkB and STAT3 signaling pathways in head and neck squamous cell carcinoma. *Neoplasia*, 8(9), 733–746. <https://doi.org/10.1593/neo.06274>
- Sterner, D. E., & Berger, S. L. (2000). Acetylation of Histones and Transcription-Related Factors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(2), 435–459. <https://doi.org/10.1128/membr.64.2.435-459.2000>
- Stoeckli, S. J., & Broglie, M. A. (2013). Recent innovations in head and neck oncology: A report from the ICHNO. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 13(5), 535–539. <https://doi.org/10.1586/era.13.36>
- Sun, Q., Fu, Q., Li, S., Li, J., Liu, S., Wang, Z., Su, Z., Song, J., & Lu, D. (2019). Emetine exhibits anticancer activity in breast cancer cells as an antagonist of Wnt/b-catenin signaling. *Oncology Reports*, 42(5), 1735–1744. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7290>
- Sun, S. C. (2011). Non-canonical NF-kB signaling pathway. In *Cell Research* (Vol. 21, Issue 1, pp. 71–85). Cell Res. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.177>
- Taniguchi, K., & Karin, M. (2018). NF-B, inflammation, immunity and cancer: Coming of age. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 18, Issue 5, pp. 309–324). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.142>
- Tilborghs, S., Corthouts, J., Verhoeven, Y., Arias, D., Rolfo, C., Trinh, X. B., & van Dam, P. A. (2017). The role of Nuclear Factor-kappa B signaling in human cervical cancer. In *Critical Reviews in Oncology/Hematology* (Vol. 120, pp. 141–150). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.11.001>
- Vazquez-Santillan, K., Melendez-Zajgla, J., Jimenez-Hernandez, L., Martínez-Ruiz, G., & Maldonado, V. (2015). NF-kB signaling in cancer stem cells: a promising therapeutic target? In *Cellular Oncology* (Vol. 38, Issue 5, pp. 327–339). Kluwer Academic Publishers. <https://doi.org/10.1007/s13402-015-0236-6>
- Wagner, V. P., Martins, M. A. T., Martins, M. D., Warner, K. A., Webber, L. P., Squarize, C. H., Nör, J. E., & Castilho, R. M. (2016). Overcoming adaptive resistance in mucoepidermoid carcinoma through inhibition of the IKK- α /I κ B α /NFkB axis. *Oncotarget*, 7(45), 73032–73044. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12195>

- Wagner, V. P., Martins, M. D., Martins, M. A. T., Almeida, L. O., Warner, K. A., Nör, J. E., Squarize, C. H., & Castilho, R. M. (2018). Targeting histone deacetylase and NFkB signaling as a novel therapy for Mucoepidermoid Carcinomas. *Scientific Reports*, *8*(1), 2065. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20345-w>
- Wilson, C., Purcell, C., Seaton, A., Oladipo, O., Maxwell, P. J., O'Sullivan, J. M., Wilson, R. H., Johnston, P. G., & Waugh, D. J. J. (2008). Chemotherapy-induced CXC-chemokine/CXC-chemokine receptor signaling in metastatic prostate cancer cells confers resistance to oxaliplatin through potentiation of nuclear factor-kB transcription and evasion of apoptosis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *327*(3), 746–759. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.143826>
- Wilting, R. H., & Dannenberg, J. H. (2012). Epigenetic mechanisms in tumorigenesis, tumor cell heterogeneity and drug resistance. *Drug Resistance Updates*, *15*(1–2), 21–38. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2012.01.008>
- Wu, T. H., Chang, S. Y., Shih, Y. L., Huang, T. W., Chang, H., & Lin, Y. W. (2019). Emetine synergizes with cisplatin to enhance anti-cancer efficacy against lung cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(23). <https://doi.org/10.3390/ijms20235914>
- Xu, Q., Ma, H., Chang, H., Feng, Z., Zhang, C., & Yang, X. (2020). The interaction of interleukin-8 and PTEN inactivation promotes the malignant progression of head and neck squamous cell carcinoma via the STAT3 pathway. *Cell Death & Disease*, *11*(5), 405. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2627-5>
- Yang, S. R., Chida, A. S., Bauter, M. R., Shafiq, N., Seweryniak, K., Maggirwar, S. B., Kilty, I., & Rahman, I. (2006). Cigarette smoke induces proinflammatory cytokine release by activation of NF-kB and posttranslational modifications of histone deacetylase in macrophages. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, *291*(1). <https://doi.org/10.1152/ajplung.00241.2005>
- Yeang, C.-H., McCormick, F., & Levine, A. (2008). Combinatorial patterns of somatic gene mutations in cancer. *The FASEB Journal*, *22*(8), 2605–2622. <https://doi.org/10.1096/fj.08-108985>
- Yeung, F., Hoberg, J. E., Ramsey, C. S., Keller, M. D., Jones, D. R., Frye, R. A., & Mayo, M. W. (2004). Modulation of NF-kB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO Journal*, *23*(12), 2369–2380. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600244>
- Zhang, Z., Filho, M. S. A., & Nör, J. E. (2012). The biology of head and neck cancer stem cells. *Oral Oncology*, *48*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2011.10.004>
- Zhu, R., Xue, X., Shen, M., Tsai, Y., Keng, P. C., Chen, Y., Lee, S. O., & Chen, Y. (2019). NFkB and TNF α as individual key molecules associated with the cisplatin-resistance and radioresistance of lung cancer. *Experimental Cell Research*, *374*(1), 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.11.022>

ANEXOS

Verifique o código de autenticidade 3623988.3654349.509646.6.80934498269633138688 em <https://www.even3.com.br/documentos>

42 JORNADA ODONTOLÓGICA DE RIBEIRÃO PRETO 2020

CERTIFICADO

— 42ª Jornada Odontológica de Ribeirão Preto —

Certificamos que **Leticia Rodrigues de Castro** apresentou o trabalho **Identificação de NFκB em linhagens celulares de carcinoma oral resistentes a Cisplatina e seu papel no acúmulo de células-tronco tumorais**, da autoria de **Leticia Rodrigues de Castro, Thaís Moré Milan e Luciana Oliveira de Almeida** na **42ª Jornada Odontológica de Ribeirão Preto**, na Modalidade **Apresentação Oral - Pesquisa Científica** e Área Temática **Área Básica** durante os dias 21, 22 e 23 de outubro de 2020.

Ribeirão Preto, 02 de novembro de 2020.

<p><i>Gabrielli Collasanto Ceverino</i> Gabrielli Collasanto Ceverino PRESIDENTE DA 42ª JORP</p>	<p><i>Mariah Carboni Mendes</i> Mariah Carboni Mendes VICE-PRESIDENTE DA 42ª JORP</p>
<p><i>Paula C. G. de Oliveira</i> Paula C. Gomes de Oliveira DIRETORA CIENTÍFICA</p>	<p><i>Sayuri Poli Sugimoto</i> Sayuri Poli Sugimoto DIRETORA CIENTÍFICA</p>



42 JORNADA ODONTOLÓGICA DE RIBEIRÃO PRETO 2020

CERTIFICADO

— 42ª Jornada Odontológica de Ribeirão Preto —

CERTIFICAMOS QUE O TRABALHO INTITULADO “IDENTIFICAÇÃO DE NFκB EM LINHAGENS CELULARES DE CARCINOMA ORAL RESISTENTES A CISPLATINA E SEU PAPEL NO ACÚMULO DE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS” DE AUTORIA DE LETÍCIA RODRIGUES DE CASTRO, THAÍS MORÉ MILAN E LUCIANA OLIVEIRA DE ALMEIDA RECEBEU PREMIAÇÃO DE **MENÇÃO HONROSA** NA CATEGORIA “ÁREA BÁSICA” NA 42ª JORNADA ODONTOLÓGICA DE RIBEIRÃO PRETO REALIZADA NOS DIAS 21, 22 E 23 DE OUTUBRO DE 2020.

RIBEIRÃO PRETO, 04 DE NOVEMBRO DE 2020



MENÇÃO HONROSA

<p><i>Gabrielli Collasanto Ceverino</i> Gabrielli Collasanto Ceverino PRESIDENTE DA 42ª JORP</p>	<p><i>Mariah Carboni Mendes</i> Mariah Carboni Mendes VICE-PRESIDENTE DA 42ª JORP</p>
<p><i>Paula C. G. de Oliveira</i> Paula C. Gomes de Oliveira DIRETORA CIENTÍFICA</p>	<p><i>Sayuri Poli Sugimoto</i> Sayuri Poli Sugimoto DIRETORA CIENTÍFICA</p>





Certificamos que o trabalho **AO0055 - EXPLORANDO O PAPEL DE NFKB NA REGULAÇÃO EPIGENÉTICA E ACÚMULO DE CÉLULAS-TRONCO EM LINHAGEM DE CARCINOMA ORAL RESISTENTE À CISPLATINA** de Castro LR*, Milan TM, Almeida LO foi apresentado na modalidade **Apresentação Oral**

na 37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica
no período de 09 a 12 de Setembro de 2020

Isabela Almeida Pordeus
Presidente

Paulo Francisco César
Vice-Presidente

APÊNDICE

Descrição do estabelecimento das linhagens resistentes à Cisplatina utilizadas neste trabalho.

GENÉTICA 2019

17 a 20 de setembro de 2019

Hotel Monte Real Resort - Águas de Lindóia - SP



UNDERSTANDING THE EVOLUTION OF ACQUIRED RESISTANCE TO CISPLATIN IN ORAL CANCER

Julia L Oliveira^{1*}; Thaís M Milan¹; Rayana L Bighetti¹; Roger R Fernandes¹,
Luciana O Almeida¹

¹Laboratório de Cultura de Células. Departamento de Biologia Básica e Oral. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo. *juc_lima.oliveira@hotmail.com

Acquired resistance is a serious issue in cancer treatment. Over 7.5 million people die every year because of failures in the therapy due chemoresistance. Cisplatin is the one of the most used therapeutic drug in cancer treatment, including oral cancer, and several patients develop resistance, responding well in the beginning (over 70% of tumor volume reduction), however, tumor reduction diminishes to 15-20% with the treatment course. Regarding oral cancers, few improvements in the treatment have been observed in the last 3 decades and the 5 years survival rates are below 50%. Here we established cell lines resistant to cisplatin aiming to better understanding biological differences driving the progression of oral cancers after treatment. Two oral cancer cell lines, CAL27 and SCC9 were assessed to establish cisplatin-resistant cell lines through the exposure to different concentrations and time courses of cisplatin. IC25 and IC50 (Inhibitory Concentrations of 25% and 50%) doses of cisplatin were defined using MTS assay. Cellular proliferation was determined through immunofluorescence using KI67 antibody and MTS assay. Potential of migration was investigated using scratch assay and the clonogenic potential by colony formation assay. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) was assessed by immunofluorescence using E-cadherin, Vimentin and Pan-keratin antibodies and the accumulation of cancer stem cells (CSC) was analyzed by flow cytometry. CAL27 and SCC9 cell lines were treated with IC25 and IC50 doses of cisplatin for 72 hours and left to recover for 45 days to establish CAL27-IC25, CAL27-IC50, SCC9-IC25 and SCC9-IC50. To establish CAL27-CisR and SCC9-CisR, IC50 cell lines were submitted to a new exposure to cisplatin for additional 45 days. We demonstrated that cellular proliferation, migration and clonogenic capability significantly increased with the levels of resistance, wherein the most significant increases were observed in CAL27-CisR and SCC9-CisR, suggesting that prolonged exposure to cisplatin increases tumor aggressiveness. In addition, cisplatin administration had not effect over the viability of any of the resistant cell lines. EMT phenotype was observed by loss of E-cadherin, gain of Vimentin and by the conversion from a cuboidal epithelial structure into an elongated mesenchymal shape as evidenced by pan-keratin staining. Surprisingly, increasing of Vimentin was more evident in IC25 and IC50 than CisR cell lines suggesting the activation of EMT is an early event during the resistance process. CSC accumulation was more evident in CAL27-CisR and SCC9-CisR than IC25 and IC50 cell lines. Recent studies have highlighted a link between EMT and CSC