

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
NÍVEL DOUTORADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO PATOLOGIA BUCAL**

**NOVAS MODALIDADES TERAPÊUTICAS PARA O CARCINOMA
MUCOEPIDERMÓIDE E SEUS EFEITOS NA POPULAÇÃO DE
CÉLULAS TRONCO TUMORAIS**

VIVIAN PETERSEN WAGNER

Porto Alegre
2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
NÍVEL DOUTORADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO PATOLOGIA BUCAL**

Linha de pesquisa: Câncer Bucal

Tese:

**Novas modalidades terapêuticas para o carcinoma
mucoepidermoide e seus efeitos na população de células tronco
tumerais**

por

VIVIAN PETERSEN WAGNER

Orientadora: Profa. Dra. Manoela Domingues Martins

Porto Alegre
2016

VIVIAN PETERSEN WAGNER

Novas modalidades terapêuticas para o carcinoma mucoepidermoide e seus efeitos na população de células tronco tumorais

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia, nível Doutorado, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré-requisito final para a obtenção do título de Doutor em Odontologia – Área de concentração em Patologia Bucal.

Orientadora: Profa. Dra. Manoela Domingues Martins

Porto Alegre
2016

CIP - Catalogação na Publicação

Wagner , Vivian Petersen

Novas modalidades terapêuticas para o carcinoma mucoepidermoide e seus efeitos na população de células tronco tumorais / Vivian Petersen Wagner . -
- 2016.
149 f.

Orientadora: Manoela Domingues Martins .

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Neoplasias malignas de glândulas salivares. 2. Resistência tumoral . 3. Carcinoma mucoepidermoide. 4. Células tronco tumorais . I. Martins , Manoela Domingues , orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a minha **família** que representa meu porto seguro e faz eu
querer ser melhor a cada dia.

Ao meu **pai**, que sempre me inspirou com a sua dedicação, ética e amor por
tudo que faz. Sou uma eterna admiradora deste grande professor e deste
maravilhoso pai. Teu exemplo me permite sonhar alto tanto para minha vida
profissional quanto pessoal. Sou muito grata por todas as oportunidades e por tu
estar ao meu lado em cada uma delas. Teu apoio é fundamental.

À minha **mãe**, que sempre me traz aconchego e amor. Ter por perto um ser com
tanta luz própria e com um coração tão puro me deixa segura de que estou
sempre bem acompanhada e abençoada. Teu jeito de ver o mundo é fascinante
e aprendo contigo a cada dia sobre “cantar a beleza de ser um eterno aprendiz”.
Tua alegria é contagiante.

Pai e mãe, saibam que toda minha dedicação é para merecer esse olhar de
orgulho e amor que recebo de vocês diariamente.

Aos meus **irmãos**, Renan e Bruno, meus grandes companheiros dessa aventura
chamada vida. Vocês deixam a vida mais colorida e mais divertida. Nossa
cumplicidade é algo que vai além dos laços de sangue. Vibro por cada
conquistas de vocês e hoje sei que vocês mesmo de longe vibram por essa
conquista minha. Me sinto protegida e completa junto a vocês.

Dedico esta tese também ao meu companheiro canino, **Whisky**, que
recentemente teve que partir mas deixou por aqui um amor que não cabe em
palavras.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à UFRGS e à Faculdade de Odontologia em especial a todos os professores e técnicos-administrativos que contribuíram de alguma forma com a minha formação durante o doutorado. Agradeço também ao Programa de Pós Graduação em Odontologia, um programa de excelência que me proporcionou oportunidades importantes durante minha trajetória acadêmica. A CAPES, agradeço pela bolsa de doutorado no Brasil e pela bolsa PDSE que permitiram que eu me dedicasse exclusivamente a este doutorado além oportunizar a realização do período sanduiche na Universidade de Michigan.

Agradeço de forma muito especial aos professores de Patologia da UFRGS que incitaram meu amor pela Patologia, pelo diagnóstico e pela docência. Cada um de vocês contribuiu muito com a minha formação, desde as disciplinas básicas na graduação até os seminários e rotinas durante toda a pós-graduação. Um agradecimento especial ao prof. Vinícius com quem pude compartilhar muitos momentos importantes ao longo dessa trajetória. Fico muito feliz em ter teu reconhecimento e saber que tu confias em mim para projetos que tu julgas importantes. Agradeço também a Chris, Ale e Pedro, com quem pude aprender muito durante este período.

Aos colegas da Patologia com quem compartilhei a rotina da pós-graduação. Os momentos de descontração e o companheirismo de vocês foram essenciais para tornar essa trajetória mais leve e proveitosa. Um agradecimento especial a Tai pela amizade e apoio nessa reta final do doutorado.

Os(as) “Manoeletes” fica meu agradecimento e admiração por fazerem a expressão “trabalho em equipe” ser justificada sempre. Durante estes anos tive a oportunidade de trabalhar junto de muitos de vocês. A aprendi muito com cada um e espero que eu tenha de alguma forma ensinado algo a vocês também. Agradeço ao Artur, pelo companheirismo no período inicial do doutorado e por ter trabalhado no levantamento dos casos do Hospital de Clínicas.

A Liana Webber, Marina Curra e Isadora Klein, toda minha gratidão e admiração. Encontrei em vocês irmãs científicas que sei que posso contar para a vida toda. Nossa cumplicidade nos faz mais fortes e sei que juntas iremos muito mais longe. Vocês foram peças fundamentais ao longo desta jornada fazendo com que todas as angústias fossem divididas e todas as alegrias somadas e multiplicadas. Vibro com cada conquista e torço pelo sucesso de vocês com todo meu coração.

Agradeço ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre e estendo meu agradecimento ao Grupo de Pesquisa e Pós-graduação, ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos, ao Centro de Pesquisa Experimental, à Unidade de Patologia Experimental, à Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas e à Unidade de Experimentação Animal. Um agradecimento especial a Luise, Flavia, Emily, Marta, Fabíola, Rosa, Michael, Jefferson, Pati, Hugo e Everaldo. Agradeço pelos ensinamentos e pelos sorrisos compartilhados.

Agradeço à Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP pela parceria em diferentes projetos. Agradeço em especial ao prof. Pablo por oportunizar essa interação que foi muito importante para o meu crescimento como pesquisadora. Agradeço também ao Felipe pelo auxílio e gentileza em diversos momentos ao longo do meu doutorado.

Agradeço a University of Michigan e a School of Dentistry. Fico extremamente feliz e honrada em ter realizado meu doutorado sanduíche em uma Universidade com tanto prestígio mundial. Agradeço aos professores e funcionários que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, em especial ao Mike e ao Aron pelo auxílio com a citometria de fluxo e ao Dave pelo auxílio com as irradiações. A alegria constante de vocês quebrou qualquer barreira cultural e fez eu me sentir acolhida em todos os momentos.

Agradeço ao Prof. Jacques Nör pela oportunidade de trabalhar com as linhagens de carcinoma mucoepidermóide desenvolvidas em seu laboratório e

estendo meu agradecimento aos pesquisadores e alunos deste laboratório pela ajuda e pelo companheirismo. Sempre foi muito bom poder contar com nossos “vizinhos” de lab. Admiro muito o trabalho de excelência realizado por este grupo.

Agradeço imensamente ao Epithelial Biology Lab e toda equipe pela acolhida e auxílio na realização deste trabalho e também por todos os momentos de descontração acompanhados de muitos *cookies* e *donuts*. Um agradecimento muito especial a Lu, por todos os ensinamentos na bancada, por toda a paciência e por compartilhar a rotina no lab. Tua ajuda foi fundamental para a realização deste trabalho. Ao John, Fernando e Carlos, sou grata pelo companheirismo.

Agradeço de forma muito especial ao Rogerio e à Cris pela oportunidade e acolhimento durante o doutorado sanduíche. A Cris, agradeço todos os ensinamentos, toda a paciência, por pegar junto e mostrar o passo-a-passo na bancada. Ao Rogerio, agradeço por todas as discussões, todos o conhecimento transmitido e compartilhado, por todas as vezes que sentou comigo e discutiu cada etapa desta tese. O período que estive com vocês foi extremamente proveitoso e me proporcionou um crescimento pessoal e profissional imensurável. Os conhecimentos que vocês me passaram vão muito além das técnicas laboratoriais aprendidas. Vocês representam exemplos de profissionais dedicados e que conquistaram uma posição de destaque em uma universidade de muito prestígio. Vocês tem toda minha admiração e gratidão. Sem vocês nada disso seria possível.

Agradeço à família Domingues-Martins por todos os momentos compartilhados aqui no Brasil em Ann Arbor. Guardo no coração e na memória todos os momentos maravilhosos que vivi com vocês ao longo destes anos. Muito obrigada por me receberem em Ann Arbor, por cuidar de mim e fazer eu me sentir em casa. Isa e Gabi, obrigada por dividirem os pais de vocês e por todos os momentos que vocês me fizeram rir (e muito). Marco, obrigada pela alegria constante, por todas as tuas gargalhadas e também por pegar junto e me ajudar na realização deste trabalho.

Agradeço do fundo do meu coração a Mano, por toda confiança e todo o apoio ao longo desta trajetória. Tenho em ti um grande exemplo de profissional e de pessoa em quem eu me espelho todos os dias. Muito obrigada pela amizade e por estimular sempre o meu crescimento. Tu me ensinaste muito sobre diagnóstico, pesquisa, docência, mas acima de tudo tu me ensinaste sobre compartilhar, somar, agregar e sonhar alto. Tua determinação e energia são admiráveis assim como o amor que tu deposita em tudo que tu te propões a fazer. Obrigada por todo o tempo investido, todo conhecimento compartilhado, todos os abraços e todo o carinho ao longo desses anos. Tua amizade e orientação fizeram esse período ser extremamente proveitoso e gratificante.

Meu agradecimento muito especial ao Eduardo, por estar ao meu lado me incentivando sempre. Te ter ao meu lado fez meus dias em Ann Arbor mais felizes e leves. Tu participaste de cada etapa da realização deste trabalho, me encorajando e também descontraindo sempre que necessário. Foi meu namorado, meu amigo e minha família. Muito obrigado pela parceria e companheirismo. Sei que tu torces pelo meu sucesso da mesma forma que eu torço pelo teu.

Agradeço às minhas amigas e amigos que fazem a vida mais alegre e prazerosa. Fico muito feliz de ver todas as amigadas maravilhosas que construí ao longo da vida, no colégio, na faculdade e em Ann Arbor. Cada um de vocês tem um lugar especial no meu coração.

Por fim, agradeço a minha família. Obrigada por traçarem junto comigo o caminho que me trouxe até aqui. O apoio de vocês foi fundamental.

*“The mind that opens up to a new idea
never returns to its original size.” –
Albert Einstein*

“Veni, vidi, vici” - Julio Cesar

RESUMO

WAGNER, Vivian Petersen. 2016. **Novas modalidades terapêuticas para o carcinoma mucoepidermoide e seus efeitos na população de células tronco tumorais.** Tese (Pós Graduação em Odontologia com ênfase em Patologia Bucal) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

O carcinoma mucoepidermoide (CME) representa a neoplasia maligna de glândula salivar mais comum. Tumores com alto grau histológico e casos avançados, com metástase regional ou a distância, apresentam taxas de sobrevida extremamente baixas em decorrência da falta de terapias eficazes. A radioterapia é usualmente aplicada como terapia adjuvante ou primeira linha de tratamento de tumores inoperáveis, entretanto o perfil de resistência do CME à radioterapia permanece não elucidado. Outra abordagem em tumores avançados é a quimioterapia, usualmente a base de cisplatina, aplicada como tratamento meramente paliativo. Um dos principais pontos chave envolvidos na resistência tumoral às terapias convencionais é a manutenção de uma população celular com alto potencial tumorigênico, chamadas de células tronco tumorais (CTT). Estas células apresentam capacidade de evadir terapias convencionais e são responsáveis pelo aparecimento de metástases e recidivas. Evidências recentes sugerem que a utilização de terapias combinadas possuem maior potencial de reduzir a resistência tumoral. Desta forma, no primeiro estudo nosso objetivo foi identificar o perfil de resistência à radioterapia de linhagens celulares de CME, vias associadas com a radio-resistência adquirida e formas de sensibilizar farmacologicamente as células de CME, incluindo as CTT, à radiação ionizante. Os resultados demonstraram que as linhagens de CME apresentam diferentes perfis de resistência à radiação ionizante, sendo a linhagem mais resistente capaz de ativar intrinsecamente o NFκB frente a baixas doses de radiação. Além disso, a resistência das linhagens mais sensíveis foi estimulada quando a via do NFκB foi excitada. A inibição farmacológica do NFκB com Emetine foi realizada com sucesso através da inibição do eixo IKK-β/IκBα/NFκB. A utilização de Emetine previamente a radiação ionizante foi capaz de aumentar a sensibilidade das células de CME assim como diminuir o percentual de CTT. No segundo estudo

nosso objetivo foi identificar a resposta tumoral, incluindo das CTT, à terapia única ou combinada utilizando dois alvos terapêuticos distintos: NFκB (tratamento com Emetine) e acetilação de histonas (tratamento com SAHA). Os resultados mostraram que uma dose de Emetine é capaz de inibir a proliferação celular em todas as linhagens de CME analisadas, enquanto que o SAHA apresentou este efeito em apenas 50% das linhagens. Por outro lado, o SAHA foi mais eficaz em reduzir a população de CTT que o Emetine. A terapia combinada foi mais eficaz do que as terapias individuais em relação a proliferação celular e a depleção de CTT. Através da análise dos resultados dos dois estudos, podemos concluir que a resistência tumoral do CME é superada com maior êxito quando mais de uma forma de tratamento é empregada. A associação de Emetine com a irradiação ou de SAHA com Emetine se mostrou eficaz no controle do tumor através da erradicação da população de CTT.

Palavras chave: neoplasias de glândulas salivares, células tronco tumorais, resistência tumoral, radioterapia, terapia sistêmica.

ABSTRACT

WAGNER, Vivian Petersen. 2016. **Novel therapeutic modalities for mucoepidermoid carcinoma and its effects on the cancer stem cell population.** Tese (Pós Graduação em Odontologia com ênfase em Patologia Bucal) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

Mucoepidermoid carcinoma (MEC) represents the most common salivary gland cancer. High-grade tumors and advanced cases, presenting regional or distant metastasis, exhibit extremely low survival rates due to a lack of effective therapies. Radiotherapy is frequently applied as adjuvant therapy or as first-line treatment in inoperable cases. Nevertheless, the resistance profile of MEC to radiotherapy remains unclear. Chemotherapy, most commonly cisplatin, used for advanced cases is considered merely palliative. A key point involved in tumor resistance to conventional therapies is the maintenance of a cell population with high tumorigenic potential, called cancer stem cells (CSC). These cells have the ability to evade conventional therapies and are responsible for metastases and recurrences. Recent evidences support that combined therapies are more effective in reducing tumor resistance. Therefore, in the first study our objective was to identify the resistance profile of MEC cell lines to ionizing radiation, pathways associated with acquired resistance and ways to sensitize pharmacologically MEC cells, including CSC, to ionizing radiation. The results demonstrated that MEC cell lines present different resistance profile to ionizing radiation and the most resistant cell line is capable to activate intrinsically NFκB after low doses of irradiation. Moreover, resistance of sensitive cell lines can be triggered by NFκB activation. Pharmacological inhibition of NFκB with Emetine was achieved through IKK-β/IκBα/NFκB axis inhibition. The use of Emetine prior to irradiation was efficient in increasing cell sensibility as well as decrease the percentage of CSC. In the second study, our aim was to identify the tumor response, including of CSC, to single or combined therapy using two distinct therapeutic targets: NFκB (treated with Emetine) and histone acetylation (treated with SAHA). The results demonstrated that a single dose of Emetine was capable

to inhibit cell proliferation in all MEC cell lines, while SAHA achieved this result in only 50% of cell lines analyzed. On the other side, SAHA was more efficient than Emetine in disrupting CSC population. The combined therapy was more effective than both single agent therapies regarding cell proliferation and CSC depletion. By analysing both studies results, we can conclude that the tumor resistance of MEC is overcome with greater success when more than one form of treatment is employed. The association of Emetine with irradiation or SAHA with Emetine is effective in tumor control by eradicating the CSC population.

Keywords: salivary gland cancer, cancer stem cells, tumor resistance, radiotherapy, systemic therapy.

LISTA DE TABELAS

Lista de tabelas da revisão de literatura

Tabela 1. Graduação histológica do CME: critérios arquiteturais e morfológicos	38
Tabela 2. Sistema de pontos para graduação histológica do CME	38
Tabela 3. Sistema qualitativo de graduação proposto por Healey	38

LISTA DE FIGURAS

Lista de figuras da revisão de literatura e justificativa do estudo

Figura 1. Imagem esquemática de uma glândula salivar indicando a região 31
do ducto que da origem às NMGS mais prevalentes. O CME tem origem
na porção terminal do ducto excretor. O CAC tem origem na porção inicial
do ducto intercalar e apresenta células mioepiteliais alteradas. O CCA tem
origem nos ácinos (Adaptado de Adams et al., 2013).

Figura 2. Ilustração esquemática do CRTC1 e MAML2 tipo selvagem (wild- 36
type) e do oncogene resultado da fusão do CRTC1-MAML2 associado
com a t(11;19). O domínio de ligação Notch do gene MAML2 é trocado
pelo domínio de ligação CREB do gene CRTC1 que se funde aos exons
2-5 do gene MAML2. Esse oncogene permanece sobre o controle do
promotor do CRTC1 (Adaptado de O'Neill 2009).

Figura 3. Fotomicroscopia representativa de um caso de CME 37
intermediário. Nesta imagem podemos ver os três tipos celulares que
compõem este tumor: células intermediárias caracterizadas por um núcleo
hipercromático e tamanho menor (seta verde), células epidermoides que
apresentam diferenciação escamosa e são mais volumosas (seta
amarela) e células mucosas caracterizadas pelo citoplasma abundante
contendo mucina (seta azul).

Figura 4. Esquema representativa do microambiente tumoral em 42
neoplasias sólidas. As diferentes células do parênquima e do estroma
tumoral participam e colaboram coletivamente para o crescimento e
progressão do tumor (Adaptado de Krishnamurthy e Nör, 2011).

Figura 5. Via canônica e não canônica de ativação do NFκB (Bradford e 47
Baldwin, 2014)

Figura 6. Representação dos genes alvos de NFκB envolvidos em diferentes aspectos da carcinogênese (Adaptado de Bassères e Baldwin, 2006). 49

Figura 7. Apresentação esquemática da associação da via de sinalização do NFκB com a radioresistência adaptativa induzida pela radiação. A radiação ionizante fracionada pode induzir diretamente quebra dupla e simples do DNA (do inglês *doublestrand breaks* -DSB e *single-strand breaks* -SSB). O dano ao DNA leva a ativação da ATM nuclear que ao se translocar para o citoplasma ativa o NFκB através da regulação da atividade de IKK. As ROS geradas nas células pela radiação ionizante também levam a quebra dupla e simples do DNA no núcleo, mas também induzem a ativação de NFκB através da via de sinalização TRAFs. A combinação destas vias nucleares e citoplasmáticas ativadas pela radiação ionizante leva a uma super-regulação de genes ativados por NFκB e envolvidos com a regulação da apoptose e do ciclo celular que por sua vez levam a uma maior resistência adaptativa à radiação ionizante (Ahmed e Li, 2008). 51

Figura 8. Organização do cromossomo. A fita de DNA é enrolada ao redor de um octâmero de histonas e empacotada em estruturas de cromatina chamadas de nucleossomos. As modificações epigenéticas são controladas predominantemente por modificações nas histonas (Adaptado de Lawlor e Thiele, 2012). 53

Figura 9. A acetilação das caudas das histonas é mediada pelas enzimas HATs que resulta em uma estrutura aberta da cromatina. Esta configuração permite que os fatores de transcrição tenham acesso ao DNA. De forma inversa, a desacetilação de histonas é mediada pelas enzimas HDACs que removem o grupo acetil das caudas das histonas levando a uma configuração fechada da cromatina (Pons et al., 2009). 54

Figura 10. Comparação entre a descoberta e desenvolvimento de uma nova droga contra o reaproveitamento de drogas. ADMET – Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (Adaptado de Ashburn e Thor 2004). 60

Figura 11. (A) Durante a terapia sistêmica com uma droga apenas, a célula que adquirir mutações que a deixem resistente a esta droga irão apresentar uma vantagem proliferativa. No momento em que se observa a falha da primeira droga e que se inicia um tratamento de segunda-linha, é extremamente provável que haja alguma célula resistente a segunda droga também, uma vez que as células resistentes proliferativas sofreram novas mutações ao longo do tratamento. (B) Iniciando a terapia com duas drogas simultaneamente poderemos eliminar as células que adquiram resistência a uma droga através da ação da outra droga (Adaptado de Kormarova e Boland, 2013). 61

Figura 12. Número de artigos publicados na última década segundo a base PubMed para trabalhos contendo nos títulos os termos “squamous cell carcinoma” (SCC) ou “mucoepidermoid carcinoma” (MEC). Note a marcada discrepância entre o número de publicações (pesquisa realizada dia 25/10/2016 através do site <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). 64

Lista de figuras do artigo 1

Figure 1. Intrinsic resistance of MEC cells to IR. (A) Clonogenic survival was measured 7 days after IR (0-8 Gy). The data are expressed as mean \pm SD (n=3) of survival fraction compared to nonirradiated cells. Colonies consisting of more than 50 cells were scored as surviving colonies. (B) Cells were stained for Ki67 24hrs after IR, scored for positive nuclear staining and presented as a percentage of the total cell number (n=3). 75

Supplementary Figure 1. IR stimulates abnormal mitotic figures in UM- 76
HMC-5. (A) There is a significant increase in mitotic figures in UM-HMC-
5 upon exposure to 2 Gy of IR ($n = 3$, mean \pm SD), as revealed by
quantification of mitotic figures per field in all MEC cell lines. (B)
Representative images of MEC cell lines after IR (0 - 8 Gy) and staining
with Hoechst 33342 for visualization of DNA content. Note the abnormal
mitotic figures in UM-HMC-5 with 2Gy and 4Gy (yellow arrows).

Figure 2. Activation of NF κ B in MEC. (A) NF κ B (p65) (yellow arrows) 80
was significantly increased in the nucleus of MEC samples compared to
normal salivary glands, which showed prevalent cytoplasmic staining
(arrowhead) (** $p < 0.001$, $n = 11$, mean \pm SD). (B) Immunofluorescence
of UM-HMC-3A, UM-HMC-3B and UM-HMC-5 tumor cell lines depict
the presence of nuclear NF κ B (yellow arrows). (C) UM-HMC-3A, UM-
HMC-3B and UM-HMC-5 show detectable NF κ B (p65) protein levels at
baseline (0Gy). NF κ B is increased in UM-HMC-5 following 2Gy of IR (*
 $p < 0.05$, mean \pm SD from experiments run in triplicate). (D) Clonogenic
assay for MEC cells with no stimuli or TNF- α stimuli revealed that NF κ B
upregulation significantly increases the resistance of UM-HMC-3A and
UM-HMC-3B (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, $n = 3$, mean \pm SD compared to
0Gy). (E) Western blot of UM-HMC-3A, UM-HMC-3B and UM-HMC-5
for phosphorylated p53 (ser15) depict high expression of p65 protein on
UM-HMC-5 cells after short exposure time. Note that short exposure
time was not sufficient to demonstrate detectable levels of p53 on UM-
HMC-3A and UM-HMC-3B.

Figure 3. Emetine induces inhibition of the IKK- β /I κ B- α /NF κ B axis and 83
induces apoptosis of UM-HMC-3B. (A) Down-regulation of NF κ B
expression in MEC cells after Emetine treatment for 24 hrs was
confirmed by Western blot analysis. Emetine inhibited I κ B- α (Ser32) and
IKK- β phosphorylation but did not affect the IKK- α subunit. (B) Emetine

treatment for 24 hrs lead to p21 inhibition, and (C) had no effect on p16. (D) Emetine disrupted the colony forming potential of MEC cells. UM-HMC-3A and UM-HMC-5 treated for 24hrs with Emetine had a significantly smaller number of colonies after 7 days in culture while UM-HMC-3B did not have colonies larger than 50 cells. (E) Emetine causes cell cycle arrest at the sub G0/G1 checkpoint in UM-HMC-3B cells (*p<0.05).

Figure 4. Pharmacological inhibition of NFκB sensitizes MEC cells to IR. 84
(A) Cells were sensitized with Emetine for 24 hrs before IR. The drug was removed before IR exposure, and the clonogenic assay was performed after 7 days. (B) Survival was significantly decreased in UM-HMC-3A and UM-HMC-5 sensitized with Emetine compared to vehicle (n = 3, mean ± S, D compared to 0 Gy).

Figure 5. A combination of NFκB inhibition and IR efficiently deplete 86
CSCs. (A) Cells were sensitized with Emetine for 24 hrs; Emetine was removed from the media before IR. Cells were collected and processed for ALDH enzymatic activity using fluorescence-activated cell sorting (FACS). (B) A combination of NFκB inhibition and IR leads to enhanced depletion of CSCs in MEC cell lines compared to radiation alone (n = 3, mean ± SD).

Lista de figuras do artigo 2

Figure 1. NFκB status in MEC cells lines. (A) Representative images of 103
NFκB immunoexpression in MEC cell lines. Note that all cell lines present NFκB nuclear expression (Immunofluorescence, stained with NFκB – TRITC and DNA content - Hoechst 33342, 400X original magnification). (B) Quantification of NFκB nuclear expression in MEC cell lines.

Figure 2. Single dose of Emetine is capable of abrogate reproductive viability of MEC cells. (A) Schedule of Emetine administration followed by clonogenic assay. A single dose of Emetine (determined by each cell line IC50) was administrated on day 0. Colony formation was assessed on day 7. (B) Representative images of colonies fixed and stained with 0.1% crystal purple. Note that Emetine treatment led to a complete disruption of colony formation in all four lineages. (C) Colony quantification (colonies having >50 cells were counted as surviving colonies) revealed that HMC-3B and HMC-5 presented higher number of colonies. After Emetine administration the number of colonies was reduced to zero in all cell lines. 105

Figure 3. Spheres formation. (A) All MEC cell lines are capable of producing spheres under low attachment conditions. All spheres present NFκB nuclear expression (Immunofluorescence, stained with NFκB – TRITC and DNA content - Hoechst 33342, 100X original magnification). (B) A single dose of Emetine reduced the number of spheres in all MEC cell lines, however this decrease was not significant for HMC-1 cell line. 106

Figure 4. Effect of a single dose of SAHA on colony formation and spheres. (A) Schedule of SAHA administration followed by clonogenic assay. A single dose of SAHA (determined by each cell line IC50) was administrated on day 0. Colony formation was assessed on day 7. (B) Representative images of colonies fixed and stained with 0.1% crystal purple. Note that SAHA treatment led to a complete disruption of colony formation only in HMC-1 and HMC-3A. (C) Colony quantification (colonies having >50 cells were counted as surviving colonies) revealed that after SAHA administration the number of colonies was reduced to zero only in HMC-1 and HMC-3A, while the reduction of HMC-3B and HMC-5 was very discreet. (D) A single dose of SAHA reduced the 108

number of spheres in all MEC cell lines, however this decrease was not significant for HMC-1 cell line.

Figure 5. Effect of Emetine or SAHA as single agents in ALDH+ cell population. (A) MEC CSC population, assessed through ALDH enzymatic activity, ranges from 1.08 to 3.25%. Note that HMC-1 and HMC-2B present the higher percentages of CSC. (B) Effect of Emetine or SAHA on ALDH+ cells. SAHA significantly reduced ALDH+ cells in all cell lines ($p < 0.001$). Emetine SAHA significantly reduced ALDH+ cells in HMC-1, 3A and 3B ($p < 0.01$). (C) Combining the results from all cell lines, we observed that only SAHA significantly reduced the CSC population of MEC cell lines. 110

Figure 6. Combined therapy is more efficient in reducing the bulk of the tumor and CSC population. (A) Representative images of colonies fixed and stained with 0.1% crystal purple. Note that combined treatment led to a complete disruption of colony formation only in all cell lines. Colony quantification (colonies having >50 cells were counted as surviving colonies) revealed that after combined therapy the number of colonies was reduced to zero in all cell lines. (B) Combined therapy significantly reduced the population of ALDH+ cells in all MEC cell lines ($p < 0.01$). (C) Comparing the reduction of ALDH+ positive cells after the different treatment modalities, we observed that Control vs SAHA+Emetine demonstrated a higher mean difference, revealing that this treatment achieved the most relevant results. 112

Figure 7. Schematic illustration of the main findings of the present study. MEC comprises a population of more differentiated cells, which account for the majority of cells in the bulk of the tumor, and a small population of highly tumorigenic and more undifferentiated cells, known as CSC. Emetine acts on the bulk of the tumor and can reduce significantly the reproductive viability of the majority of MEC cells. Nevertheless, the 113

CSC population seems to be more resistance to this drug. SAHA by the other side is more efficient in depleting MEC CSC population, however the bulk of the tumor might be resistant to this therapy. The combined therapy act synergistically to eliminate all the sub-populations of cells present within the MEC tumor mass.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Lista de abreviaturas da revisão de literatura

Neoplasias malignas de glândulas salivares	NMGS
Carcinoma mucoepidermoide	CME
Vírus da imunodeficiência humano	HIV
Carcinoma adenoide cístico	CAC
Carcinoma de células acinares	CCA
Ácido periódico-Schiff	PAS
Instituto de Patologia das Forças Armadas	AFIP
Células tronco tumorais	CTT
<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>	FACS
<i>Aldehyde dehydrogenase</i>	ALDH
Ácido desoxirribonucleico	DNA
<i>Nuclear factor kappa B</i>	NFκB
<i>Inhibitor of kappa B</i>	IκB
<i>NFκB essencial modulator</i>	NEMO
Lipopolissacarideo de bactérias gram-negativas	LPS
Fator de necrose tumoral	TNF
<i>Reactive oxygen species</i>	ROS
<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>	ATM
<i>Doublestrand breaks</i>	DSB
<i>Single-strand breaks</i>	SSB
<i>Tumor necrosis factor receptor-associated factors</i>	TRAFs
Ácido ribonucleico	RNA
Histonas acetiltransferases	HAT
Histonas desacetilases	HDACs
<i>Food and Drug Administration</i>	FDA
Centro Nacional para a Promoção da Ciência Translacional	NCATS
Concelho de Pesquisa Medica	MRC
Ácido hidroxâmico suberoilânilida	SAHA

Lista de abreviaturas do artigo 1

Mucoepidermoid carcinoma	MEC
Ionizing radiation	IR
Nuclear factor kappa B	NF κ B
Salivary gland cancer	SGC
United States	US
Deoxyribonucleic acid	DNA
Tumor necrosis factor	TNF
Inhibitor of kappa B	I κ B
Food and Drug Administration	FDA
Cancer stem cells	CSC
Gray	Gy
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	GAPDH
Aldehyde dehydrogenase	ALDH
Fluorescence Activated Cell Sorting	FACS
Survival fraction	SF
Normal salivary gland	NSG
National Center for Advancing Translational Sciences	NCATS
National Institute of Health	NIH
Reactive oxygen species	ROS
Ataxia telangiectasia mutated	ATM

Lista de abreviaturas do artigo 2

Mucoepidermoid carcinomas	MEC
Cancer stem cells	CSC
Suberoylanilide hydroxamic acid	SAHA
Aldehyde dehydrogenase	ALDH
Nuclear factor kappa B	NF κ B
Salivary gland cancer	SGC
Half maximal inhibitory concentration	IC50
Room temperature	RT

Paraformaldehyde	PFA
Deoxyribonucleic acid	DNA
Fluorescence Activated Cell Sorting	FACS
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	GAPDH
Inhibitor of kappa B	I κ B
Food and Drug Administration	FDA
Histone acetyltransferase	HAT
Histone deacetylases	HDAC

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	27
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	29
2.1	<i>Neoplasias malignas de glândulas salivares.....</i>	29
2.2	<i>Carcinoma mucoepidermoide.....</i>	35
2.4	<i>Células tronco tumorais.....</i>	41
2.3	<i>Via de sinalização do NFκB.....</i>	46
2.4	<i>Acetilação de histonas.....</i>	52
2.5	<i>Perspectivas futuras de tratamento.....</i>	56
3.	JUSTIFICATIVA DO ESTUDO.....	63
4.	OBJETIVOS.....	66
4.1	<i>Objetivos específicos do Artigo 1.....</i>	66
4.2	<i>Objetivos específicos do Artigo 2.....</i>	66
5.	ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	67
5.1	Artigo 1: Overcoming Adaptive Resistance in Mucoepidermoid Carcinoma Through Inhibition of the IKK-β/IκBα/NFκB Axis.....	67
5.2	Artigo 2: Targeting histone deacetylase and NFκB signaling as a novel therapeutic strategy to manage Mucoepidermoid Carcinomas...	96
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	122
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias malignas de glândulas salivares (NMGS) são lesões relativamente raras, com uma incidência anual de aproximadamente 0,05 a 2 casos por 100.000 indivíduos (Parkin et al., 2002). Este grupo de lesões é amplamente heterogêneo apresentando um vasto espectro de padrões morfológicos, sendo atualmente mais de 20 tipos histológicos descritos pela Organização Mundial da Saúde (Barnes et al., 2005). Diversos estudos epidemiológicos em diferentes localidades do mundo, incluindo o Brasil, demonstram que o Carcinoma Mucoepidermoide (CME) representa a NMGS mais prevalente (Jones et al., 2008; Tilakarante et al., 2009; Ochicha et al., 2009; Vargas et al., 2002; Ito et al., 2005; Fonseca et al., 2012).

O CME é reconhecido pela sua considerável heterogeneidade celular que inclui células epidermóides (com diferenciação escamosa), intermediárias (células indiferenciadas pequenas) e células produtoras de mucina. Além disso, o padrão arquitetural do CME pode variar, sendo este composto mais por espaços císticos ou então por áreas mais sólidas. Estas características apresentam alta relevância clínica. A graduação histológica dos CME, baseada em padrões celulares e arquiteturais, está intimamente relacionada com o prognóstico dos casos. Pacientes com tumores de baixo grau apresentam mais de 30% de sobrevida nos 5 anos após o diagnóstico comparados a pacientes com tumores de alto grau (McHugh et al., 2012). Outro fator muito importante para o prognóstico do CME é o estadiamento da lesão. A presença de metástases nodais ou a distância fazem com que, respectivamente, apenas 32% ou 26% dos pacientes alcancem 5 anos de vida após o diagnóstico (McHugh et al., 2012). Este fato acontece principalmente porque os tratamentos sistêmicos utilizados para casos avançados de CME são ineficazes. A quimioterapia por exemplo é considerada um tratamento meramente paliativo. Atualmente, as terapias propostas para o CME usualmente são transpostas de terapias utilizadas em carcinoma espinocelular de cabeça a pescoço. Essa limitação pode ser atribuída, em parte, à falta de ensaios pré-clínicos que apontem alvos promissores para o tratamento do CME. Recentemente, linhagens de CME foram desenvolvidas na Universidade de

Michigan permitindo que se estude vias envolvidas com a resistência tumoral e formas de superá-la. Nesse sentido, também é de extrema importância que se estude a ação de novas modalidades terapêuticas na população de células tronco tumorais (CTT). Isto porque estas células apresentam alto potencial tumorigênico e são responsáveis pela ocorrência de metástases e recidivas (Prince e Ailles, 2008), as principais causas de falha no tratamento.

Nas últimas décadas, o tratamento do câncer evoluiu de terapias convencionais não específicas, para drogas altamente seletivas baseadas no bloqueio de vias ou proteínas mutadas fundamentais para o desenvolvimento do tumor (Vanneman e Dranoff, 2012). Sabe-se que a via do NF κ B apresenta um papel importante na resistência tumoral em diversas neoplasias malignas através de sua ação anti-apoptótica (Aravindan et al., 2014; Begg et al., 2011), além de estar envolvida com a manutenção de CTT (Rajeseckhar et al., 2011; Liu et al., 2010; Kendellen et al., 2014; Schwitalla et al., 2013). A resistência tumoral ativada por NF κ B também está relacionada com seu potencial de induzir modificações na cromatina através da desacetilação de histonas (Almeida et al., 2013). Este evento está relacionado com importantes desfechos como a manutenção da indiferenciação celular (Fuks et al., 2000; Sen et al., 2010), sistema de reparo de DNA comprometido, acúmulo no dano de DNA e aumento da instabilidade genômica (Almeida et al., 2013).

Tendo em vista estes dados previamente descritos, o objetivo geral desta tese foi avaliar *in vitro* novas alternativas terapêuticas para o CME através do uso de drogas que atuam diretamente em vias possivelmente envolvidas com os processos de resistência tumoral (ativação de NF κ B e acetilação de histonas). Além disso, o efeito destas terapias sobre a população de CTT foi avaliado uma vez que estas estão diretamente relacionadas com a resistência a terapias convencionais e são as principais responsáveis pelo desenvolvimento de metástases e recidivas após o tratamento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Neste capítulo serão abordados os assuntos estudados nessa tese. Para maior compreensão do leitor dividimos a revisão de literatura nos seguintes tópicos: Neoplasias malignas de glândulas salivares; carcinoma mucoepidermoide; células tronco tumorais; via de sinalização do NFkB; acetilação de histonas e perspectivas futuras de tratamento.

2.1 Neoplasias Malignas de Glândulas Salivares

As NMGS representam um amplo e heterogêneo grupo de lesões incomuns com incidência anual que varia entre 0,05 a 2 casos por 100.000 indivíduos (Parkin et al., 2002). Estudo prévio demonstrou que nos Estados Unidos entre 1974-1976 as NMGS representaram 6,3% entre todos os tumores malignos de cabeça e pescoço, em comparação com 8,1% no período entre 1998-1999 (Carvalho et al., 2005), demonstrando um aumento na incidência destes tumores no período estudado. As NMGS podem se desenvolver em glândulas salivares maiores (parótidas, submandibulares e sublinguais) ou em glândulas salivares menores (Guzzo et al., 2010). A grande maioria dos tumores localizados na parótida são benignos, já em glândulas salivares menores a proporção de tumores malignos cresce (Allen et al., 2009). A distribuição entre os gêneros é usualmente igualitária, apresentando uma pequena tendência para predileção pelo sexo feminino (Vasconcelos et al., 2016; Fonseca et al., 2012). As lesões usualmente são diagnosticadas entre a quarta e quinta década de vida (Vasconcelos et al., 2016; Fonseca et al., 2012). Quando analisamos apenas pacientes pediátricos, vemos que há um maior percentual de NMGS em relação a neoplasia benignas quando comparados com a população adulta (Satko et al., 2000; Cesmebasi et al., 2014).

Os fatores etiológicos das NMGS permanecem pouco elucidados. Diferentes estudos têm associado o histórico de câncer prévio ao desenvolvimento de NMGS. Foi demonstrado que pacientes com diagnóstico

prévio de doença de Hodgkin (Dong et al., 2001), meduloblastoma (Goldstein et al. 1997) e carcinoma de células basais (Milan et al., 2000) apresentam maior chance de desenvolver NMGS comparado a população geral, assim como pacientes com histórico prévio de tumor benigno de glândula salivar (Spitz et al., 1984). Além disso, outras características têm sido apontadas como possíveis fatores etiológicos, como o HIV (Serraino et al., 2000), profissões de risco na indústria (Horn-Ross et al., 1997a; Swanson et al., 1997) e a dieta (Horn-Ross et al., 1997b; Zheng et al., 1996). Embora diferentes fatores etiológicos tenham sido propostos, nenhum deles é completamente validado e altamente aceito.

Por se tratar de um grupo de lesões incomuns, não há políticas de mapeamento (*screening*) para as NMGS. O grupo de NMGS deve ser incluído no diagnóstico diferencial de qualquer massa indolor em região de glândula salivar menor ou maior. Certas características da lesão podem aumentar a suspeita de malignidade como presença de ulceração ou fístula, dor, paralisia facial, crescimento rápido e presença de linfonodos palpáveis em cadeia cervical. Entretanto, a ausência destas características não descarta a hipótese de uma NMGS, que por muitas vezes se apresenta como uma massa de crescimento lento e assintomático (Guzzo et al., 2010). O exame físico representa a principal ferramenta de diagnóstico para estas lesões. Em glândulas salivares maiores exames de imagem podem auxiliar na identificação da localização da lesão e sua relação com os tecidos adjacentes. A biópsia incisional aberta permanece a principal escolha para as lesões localizadas em glândulas salivares menores. A punção aspirativa por agulha fina e biópsia por agulha grossa representam boas alternativas para tumores em glândulas salivares maiores (Diaz et al., 2014; Eom et al., 2015; Witt e Schmidt, 2014). É importante salientar que, embora estas alternativas de diagnóstico apresentem alta sensibilidade e especificidade, o diagnóstico histopatológico final deve ser confirmado na peça cirúrgica.

O diagnóstico microscópico das NMGS é desafiador tendo em vista a ampla variedade de padrões morfológicos e o distinto comportamento biológico observado entre essas lesões (Saghravarian et al., 2013). Células progenitoras

presentes em diferentes localizações dos ductos salivares dão origem as NMGS (Figura 1). Carcinomas que se originam do principal segmento do ducto são puramente epiteliais enquanto que, os tumores que se desenvolvem a partir de células localizadas na porção inicial do ducto possuem diferenciação epitelial e mioepitelial ou acinar (Adelstein et al., 2012). Atualmente, as lesões são classificadas de acordo com os critérios propostos pela Organização Mundial da Saúde (Barnes et al., 2005). Existem mais de 20 tipos histológicos de NMGS, entretanto algumas se destacam por seu comportamento biológico e sua maior incidência como o carcinoma mucoepidermoide (CME), carcinoma adenoide cístico (CAC), carcinoma de células acinares (CCA) e adenocarcinoma. A incidência destes tumores na população é variável, enquanto que alguns autores relatam uma maior incidência de CME (Fonseca et al., 2012; Spiro, 1986; Jones et al., 2008), outros apontam o CAC como NMGS mais frequente (Vasconcelos et al., 2016; Lukšić et al., 2011; Shishegar et al., 2011).

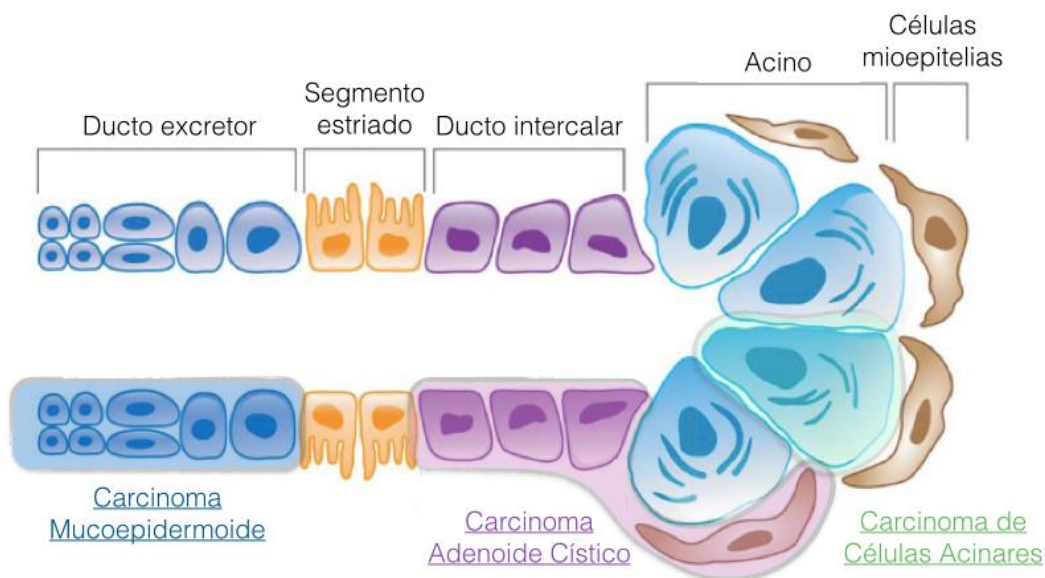


Figura 1. Imagem esquemática de uma glândula salivar indicando a região do ducto que dá origem às NMGS mais prevalentes. O CME tem origem na porção terminal do ducto excretor. O CAC tem origem na porção inicial do ducto intercalar e apresenta células mioepiteliais alteradas. O CCA tem origem nos ácinos (Adaptado de Adams et al., 2013).

O estadiamento clínico das NMGS é realizado com base no sistema TNM proposto pelo American Joint Committee on Cancer. Este sistema classifica as NMGS em 4 estádios de acordo com o tamanho da lesão (T), presença de metástases regionais em linfonodos (N) e metástase à distância (M). Apesar de apresentar limitações no seu potencial prognóstico, esse sistema permanece mundialmente reconhecido para descrever a extensão do tumor (Patel e Lydiatt, 2008). Os critérios para o estadiamento são os seguintes:

- T (tamanho):
 - TX - Tumor primário não pode ser avaliado
 - T0 - Sem evidências do tumor primário.
 - Tis – Carcinoma *in situ*
 - T1 - O tumor tem até 2 cm de diâmetro e não invade tecidos adjacentes clinicamente
 - T2 - O tumor tem mais do que 2 cm e menos do que 4 cm de diâmetro não invade tecidos adjacentes clinicamente
 - T3 - O tumor tem mais do que 4 cm de diâmetro e está invadindo tecidos moles adjacentes.
 - T4a (moderadamente avançado) - O tumor invade estruturas próximas, como o osso da mandíbula, pele, canal auditivo ou nervo facial.
 - T4b (muito avançado) – o tumor invade estruturas próximas, como a base do crânio ou outros ossos nas proximidades ou que circundam a artéria carótida.
- Linfonodo regional (N)
 - NX - Linfonodo regional não pode ser avaliado.
 - N0 - Ausência de metástase em linfonodo.
 - N1 – Metástase em apenas um linfonodo ipsilateral, medindo até 3cm na sua maior extensão
 - N2a - Metástase em apenas um linfonodo ipsilateral medindo entre 3 e 6 cm de diâmetro.

- N2b - Metástase em múltiplos linfonodos ipsilaterais nenhum medindo mais que 6 cm de diâmetro.
- N2c - Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais nenhum medindo mais que 6 cm de diâmetro.
- N3 - Metástase em linfonodo medindo mais que 6 cm de diâmetro.
- Metástase à distância
 - Ausência de metástase à distância
 - Metástase à distância

Após realizada a análise das características acima citadas (T, N, M) o tumor é classificado de acordo com os seguintes critérios:

- Estágio I - T1, N0, M0.
- Estágio II - T2, N0, M0.
- Estágio III - T3, N0, M0; T1 a T3, N1, M0.
- Estágio IVA - T4a, N0 ou N1, M0; T1 a T4a, N2, M0.
- Estágio IVB - T4b, qualquer N, M0; Qualquer T, N3, M0.
- Estágio IVC - Qualquer T, qualquer N, M1.

A principal linha de tratamento para as NMGS permanece a remoção cirúrgica com margens de segurança. Lesões localizadas em parótida usualmente exigem parotidectomia com dissecação do nervo facial. A remoção profilática dos linfonodos da cadeia cervical é reservada para casos específicos, por exemplo quando a linfadenectomia facilita de certa forma a remoção primária do tumor. A radioterapia pós-operatória é recomendada para pacientes com doença residual, presença extensiva de metástase nodal, ruptura de cápsula, casos indiferenciados ou de alto grau histológico, presença de invasão perineural, doenças avançadas com envolvimento do nervo facial, casos com margens cirúrgicas comprometidas e invasão de vasos vasculares e/ou linfáticos (Guzzo et al., 2010). Em casos em que o tumor primário seja inoperável, a radioterapia aparece como primeira alternativa de tratamento. Estima-se que mais de 80% dos pacientes com NMGS necessitam receber tratamento radioterápico em algum

estágio de seu tratamento (Delaney et al., 2005). A quimioterapia é considerada paliativa e é indicada apenas para casos avançados ou incuráveis de NMGS (Adelstein et al., 2012). O principal quimioterápico utilizado é a cisplatina de forma isolada ou associada a outras drogas. As taxas de resposta variam entre 10 e 70%, entretanto a maioria dos estudos apresenta pouco tempo de acompanhamento dos pacientes (Lagha et al., 2012), o que representa uma importante limitação uma vez que se sabe que as NMGS apresentam evolução lenta e podem apresentar metástases e recidivas após longos períodos de tempo. Esta importante característica de crescimento lento das NMGS pode justificar também as baixas taxa de resposta encontradas para as terapias convencionais que atuam contra células com alta atividade proliferativa. Além disso, frente a falta de respostas, o tratamento usualmente necessita ser prolongado limitando o uso de drogas que possuam toxicidade cumulativa (Lagha et al., 2012). Em 2012, mais de 200 ensaios clínicos envolvendo NMGS estavam em andamento, avaliando drogas como docetaxel, doxorubicina, cisplatina, gemcitabina, methotrexato, talidomida, cetuximabe, erlotinob, gefitinib, sorafenibe, entre outras (Lagha et al., 2012). Apesar destes esforços, ainda não há evidências que terapias sistêmicas possam melhorar a sobrevida de pacientes com NMGS.

Nas últimas décadas nenhuma melhora foi observada nas taxas de sobrevida dos pacientes com NMGS, um contraste crítico quando comparamos com os avanços feitos em outros tumores de origem glandular como o câncer de mama. Nas NMGS os principais fatores associados a sobrevida são: grau histopatológico do tumor, presença de metástases em linfonodos ou a distância, invasão perineural, margens cirúrgicas comprometidas e paralisia do nervo facial (Guzzo et al., 2010). Um estudo que avaliou 201 casos de CAC demonstrou que as taxas de sobrevida específicas à doença aos 5, 10 e 15 anos são respectivamente 90%, 75% e 68%, evidenciando a evolução lenta das NMGS e a importância de um acompanhamento a longo prazo (Bjørndal et al., 2015). Os sítios mais comuns de metástase a distancia das NMGS são os pulmões (80%), seguido pelo osso (15%), fígado e outros sítios (5%) (Guzzo et al., 2010).

2.2. Carcinoma Mucoepidermóide

O carcinoma mucoepidermoide (CME) tem sido apontado como a NMGS mais frequente em diferentes localidades do mundo, como no Reino Unido (Jones et al., 2008), Siri-Lanka (Tilakarante et al., 2009) e Nigéria (Ochicha et al., 2009). No Brasil, especificamente, diferentes levantamentos demonstraram a maior incidência do CME em relação as demais NMGS (Vargas et al., 2002; Ito et al., 2005; Fonseca et al., 2012). Um estudo de base populacional nos Estados Unidos identificou uma incidência de CME em parótida de 2.5 por 1 milhão de habitantes no ano de 2009 (Chen et al., 2014). Aproximadamente 60% dos casos de CME ocorrem nas glândulas salivares maiores, sendo a glândula parótida a mais acometida. Em relação as glândulas salivares menores, o palato e a mucosa jugal representam as localizações preferenciais (Spiro et al., 1978; Brandwein et al., 2001). Usualmente as mulheres são mais acometidas, e o diagnóstico ocorre entre a quarta e quinta década de vida (Brandwein et al., 2001; Chen et al., 2014). Embora mais comum em pacientes adultos, quando avaliamos o percentual de CME entre as NMGS em pacientes pediátricos observamos que este tumor representa 80% dos casos (Guzzo et al. 2006; da Cruz Perez et al., 2004). Clinicamente o CME se apresenta usualmente como uma massa de crescimento lento e assintomático. Lesões localizadas em parótida podem levar a paralisia facial e quadros de dor. Quando o CME acomete glândulas salivares menores, uma coloração azul-avermelhada pode ser observada em alguns casos (Allen et al., 2009).

A etiologia do CME, assim como das demais NMGS, permanece pouco elucidada. Recentemente, foi demonstrado que aproximadamente metade dos casos de CME apresentam uma translocação cromossômica recorrente, t(11;19) (Figura 2). Esta translocação resulta na fusão dos exons do gene CTTC1 localizado no cromossomo 19p13 com os exons 2-5 do gene MAML2 no cromossomo 11q21, gerando uma fusão nova oncogênica chamada CRTTC1-MAML2. É sugerido que o resultado desta fusão leva a desregulação de vias de ciclo celular e diferenciação (O'Neill, 2009). A presença desta translocação pode

auxiliar no diagnóstico diferencial de CME de alto grau com adenocarcinomas pouco diferenciados, por exemplo. Além disso, os casos de CME positivos para translocação t(11;19) parecem apresentar melhor prognóstico (Okabe et al., 2006; Behboudi et al., 2006). Diferentes estudos foram realizados para avaliar o percentual de CME que apresentam esta translocação e os resultados variaram de um pouco menos ou aproximadamente 50% (Okabe et al., 2006; Behboudi et al., 2006) até mais de 70% (Martins et al., 2006; Tirado et al., 2007).

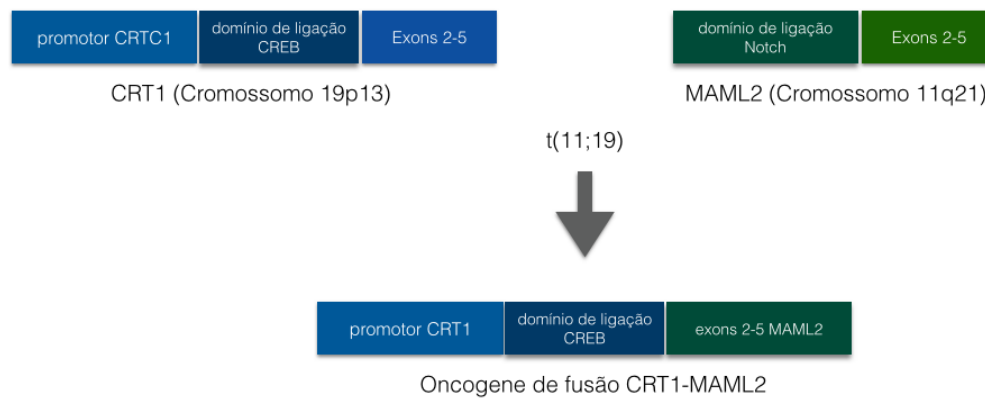


Figura 2. Ilustração esquemática do CRT1 e MAML2 tipo selvagem (wild-type) e do oncogene resultado da fusão do CRT1-MAML2 associado com a t(11;19). O domínio de ligação Notch do gene MAML2 é trocado pelo domínio de ligação CREB do gene CRT1 que se funde aos exons 2-5 do gene MAML2. Esse oncogene permanece sob o controle do promotor do CRT1 (Adaptado de O'Neill 2009).

O CME é reconhecido pela sua considerável heterogeneidade celular que inclui células epidermóides (com diferenciação escamosa), intermediárias (células indiferenciadas pequenas) e células produtoras de mucina (Figura 3). Qualquer um destes tipos celulares pode predominar no tumor, criando por muitas vezes uma dificuldade no diagnóstico. Colorações especiais como o ácido periódico-Schiff (PAS) ou a mucicarmina de Mayer podem auxiliar a detectar ou confirmar a presença de células mucosas (Schwarz et al., 2011). Diferentes sistemas de graduação histológica foram propostos para o CME. Os três sistemas mais populares e usualmente empregados são: sistema de graduação do Instituto de

Patologia das Forças Armadas (Armed Forces Institute of Pathology – AFIP) (Goode et al., 1998), o sistema modificado de Healey (Batsakis et al., 1990) e o sistema de Brandwein (Brandwein et al., 2002). Todos os sistemas avaliam critérios morfológicos e arquiteturais, porém de formas diferentes. Os sistemas AFIP e de Brandwein utilizam pontos para cada critério (Tabela 1) e gradua os tumores a partir do somatório destes pontos (Tabela 2). Já o sistema modificado de Healey é qualitativo (Tabela 3).

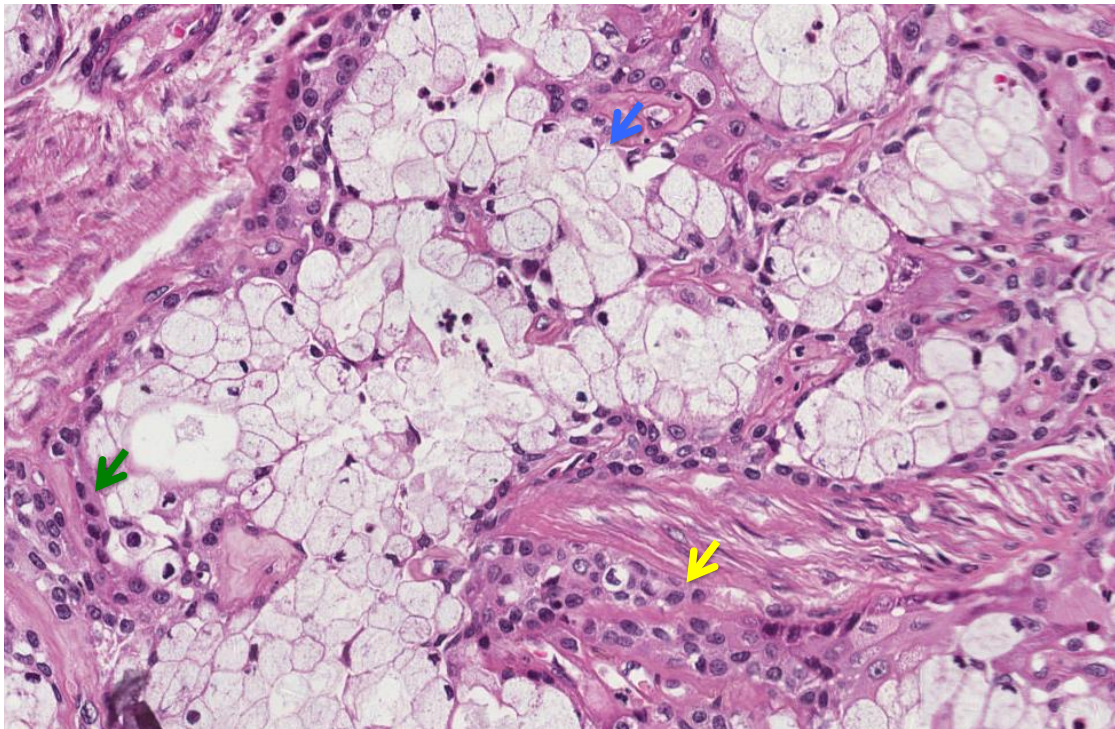


Figura 3. Fotomicroscopia representativa de um caso de CME intermediário. Nesta imagem podemos ver os três tipos celulares que compõem este tumor: células intermediárias caracterizadas por um núcleo hiper cromático e tamanho menor (seta verde), células epidermóides que apresentam diferenciação escamosa e são mais volumosas (seta amarela) e células mucosas caracterizadas pelo citoplasma abundante contendo mucina (seta azul).

Tabela 1. Graduação histológica do CME: critérios arquiteturais e morfológicos

Critério	Sistema AFIP	Sistema de Brandwein
Componente intracístico <20-25%	2 pontos	2 pontos
Invasão neural	2 pontos	3 pontos
Necrose	3 pontos	3 pontos
> 4 mitose por campo em maior aumento	3 pontos	3 pontos
Anaplasia	4 pontos	
Invasão em pequenas ilhas e ninhos		2 pontos
Atipia nuclear pronunciada		2 pontos
Invasão linfática ou vascular		3 pontos
Invasão óssea		3 pontos

Tabela 2. Sistema de pontos para graduação histológica do CME

Graduação	Sistema AFIP	Sistema de Brandwein
Baixo	0-4 pontos	0 pontos
Intermediário	5-6 pontos	2-3 pontos
Alto	7-14 pontos	>4 pontos

Tabela 3. Sistema qualitativo de graduação proposto por Healey

Graduação	Sistema Modificado de Healey
Baixo	Macroquistos, microquistos, transição com ductos excretores; Células epidermoides produtoras de mucina diferenciadas; Mínima a moderada população de células intermediárias; Proliferação de cistos filhos; Mínimo a absente pleomorfismo; Mitoses raras; Invasão bem circunscrita; Muco extravasado
Intermediário	Sem macroquistos, poucos microquistos, Ninhos sólidos de células; Pouco a moderado pleomorfismo; Poucas mitoses; Núcleos e nucléolos proeminentes; Invasão não circunscrita; Inflamação crônica na periferia; Fibrose separando ninhos e grupos de células
Alto	Sem macroquistos, predominantemente sólido; Células vão de indiferenciadas a células epidermoides reconhecíveis e intermediárias até tipo ductal adenocarcinoma; Pleomorfismo considerável; Mitoses; Invasão dos tecidos adjacentes, nervos, vasos; Desmoplasia do estroma

O sistema de AFIP atualmente é recomendado na classificação dos tumores de cabeça e pescoço da Organização Mundial da Saúde (Barnes et al., 2005). Apesar de avaliar menos critérios e em alguns casos classificar os casos com menor grau que os demais sistemas, o sistema AFIP apresenta alta reprodutibilidade (Schwarz et al., 2011; Auclair et al., 1992) e por isso é empregado com maior frequência. Diferentes estudos demonstraram que tumores de alto grau apresentam pior prognóstico e menor tempo de sobrevida que os tumores classificados com baixo grau ou intermediário (Chen et al., 2014; Liu et al., 2014a; Byrd et al., 2013; Schwarz et al., 2014; McHugh et al., 2012). A graduação histológica apresenta relação direta com a presença de metástases nodais e a distância (McHugh et al., 2012).

Outros fatores prognóstico já descritos para CME são a idade avançada (Liu et al., 2014a; Schwarz et al., 2014), ser do gênero masculino (McHugh et al., 2012) localização em glândula submandibular (Liu et al., 2014a; McHugh et al., 2012), crescimento rápido (McHugh et al., 2012), presença de metástase nodal (Liu et al., 2014a; McHugh et al., 2012), metástase a distância (McHugh et al., 2012), tumores com maior tamanho (McHugh et al., 2012), estadiamento clínico avançado (Liu et al., 2014a; Schwarz et al., 2014; McHugh et al., 2012), presença de paralisia facial (McHugh et al., 2012), margens cirúrgicas positivas (Liu et al., 2014a), invasão perineural (McHugh et al., 2012), ausência da translocação t(11;19) (Okabe et al., 2006; Behboudi et al., 2006) e maior expressão de MUC-1 (Siyi et al., 2014; Liu et al., 2014b). Os índices de sobrevida em 5 anos para o CME podem ser altos quando avaliamos tumores de baixo grau ou intermediário, chegando a 94%. Entretanto em tumores de alto grau este índice baixa para 51%. Além disso, a presença de metástases nodais ou a distância fazem com que os índices baixem a níveis extremamente baixos de 32 e 26% respectivamente (McHugh et al., 2012). O crescimento lento das NMGS, incluindo o CME, tem como consequência o aparecimento de recorrência tumoral ou metástases após longos períodos de tempo, que usualmente não são avaliados em trabalhos com tempo de acompanhamento de 5 anos.

O tratamento do CME segue o manejo proposto para as NMGS, sendo a ressecção cirúrgica com margens a primeira opção terapêutica. É importante salientar que estas cirurgias podem ser altamente mutiladoras, envolvendo parotidectomia ou maxilectomia por exemplo, levando a uma alta morbidade dos pacientes. A radioterapia adjuvante é recomendada para casos com características de agressividade como metástase nodal, alto grau histológico, presença de invasão perineural, margens cirúrgicas comprometidas entre outros. Casos inoperáveis usualmente são tratados com radioterapia como primeira linha de tratamento (Guzzo et al., 2010).

O CME é historicamente reconhecido como um tumor resistente a radiação ionizante. Devido a raridade relativa do CME e sua progressão lenta é difícil obter evidências fortes a respeito da resposta do tumor à radioterapia. Diversos estudos em diferentes localidades demonstraram que pacientes diagnosticados com CME que receberam radioterapia adjuvante apresentam pior sobrevida comparados a pacientes que foram apenas operados (Ozawa et al., 2008; Guzzo et al., 2002; Liu et al., 2014). Entretanto, é importante ressaltar que a radioterapia adjuvante é recomendada usualmente para casos de CME mais avançados, gerando assim um possível viés nestes resultados. Em pacientes pediátricos, foi observado que não há diferença entre a sobrevida de pacientes que foram apenas operados quando comparados aos pacientes que receberam radioterapia adjuvante (Thariat et al., 2013). Em 1992, Grénman e colaboradores, estabeleceram uma linhagem primária de CME e observaram que esta era resistente à radiação ionizante o que corroborou com o desfecho clínico da paciente que não apresentou resposta à radioterapia (Grénman et al., 1992).

A quimioterapia representa majoritariamente um tratamento paliativo para casos avançados de CME. Diferentes protocolos convencionais foram estudados neste tumor, como a cisplatina (Licitra et al., 1991), paclitaxel (Gilbert et al., 2006) e terapia combinada de cisplatina, doxirubicina e ciclofosfamida (Creagan et al., 1988), todos apresentando taxas de resposta objetivas inferiores a 30%. É importante ressaltar que estes estudos compreenderam amostras muito

pequenas de CME (entre 5 e 14 pacientes). Em relação a inibidores de tirosina quinase e anticorpos monoclonais, o gefitinib (Gilsson et al., 2005) e transtuzimab (Haddad et al., 2003) foram avaliados, entretanto o mesmo problema que envolve baixas taxas de resposta em amostras extremamente pequenas é observado.

Considerando que os CME avançados apresentam taxas de sobrevida extremamente baixas, observa-se a necessidade de desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas mais eficazes para estes casos. Além disso, terapias sistêmicas eficazes para estágios avançados podem ser transpostas para pacientes com tumores menores visando evitar o procedimento cirúrgico mutilador e como consequência melhorar substantivamente a qualidade de vida dos pacientes. Recentemente, diferentes linhagens celulares de CME foram estabelecidas no laboratório do prof. Jacques Nör na Universidade de Michigan, EUA, permitindo que novos trabalhos *in vitro* sejam realizados e assim o conhecimento sobre este tumor e sua resposta a diferentes terapias possam ser melhor compreendidos (Warner et al., 2013). Além do desenvolvimento de linhagens de tumores primários, foi desenvolvida uma linhagem de recorrência tumoral e de sua metástase em linfonodo. Foi observado que estas linhagens mantem sua morfologia semelhante a uma célula epitelial por pelo menos 100 passagens. Além disso, quando implantadas em camundongos imunossuprimidos as linhagens geraram tumores que se assemelham muito aos tumores iniciais dos pacientes. A partir do estabelecimento destas linhagens, foi possível realizar novos estudos avaliando importantes aspectos relativos a resposta do CME a diferentes terapias (Mochizuki et al., 2015; Guimarães et al., 2016).

2.3 Células tronco tumorais (CTT)

Atualmente, sabe-se que o tumor pode ser visto como um “órgão”, denominado de microambiente tumoral. Neste contexto, as células malignas interagem com células mesenquimais incluindo células do sistema imune do hospedeiro, fibroblastos associados ao tumor, células endoteliais e pericitos (Hanahan e Weinberg, 2011) (Figura 4). Além disso, é bem estabelecido que as

células tumorais não compõem uma população homogênea, e possuem potencial tumorigênico variável. Dentro deste contexto, emergiu a teoria hierárquica entre as células do tumor, onde apenas um pequeno percentual de células teria a capacidade de iniciar o tumor, chamadas de células iniciadoras de tumor (*tumor-initiating cells* em inglês) ou CTT (*cancer stem cell* em inglês) (Reya et al., 2001). As demais células neoplásicas presentes na massa tumoral derivam destas células durante seu processo de diferenciação e perdem sua capacidade de iniciar um novo tumor. Estas células possuem alta taxa proliferativa e são chamadas de células amplificadoras em transito ou células diferenciadas pós-mitose.

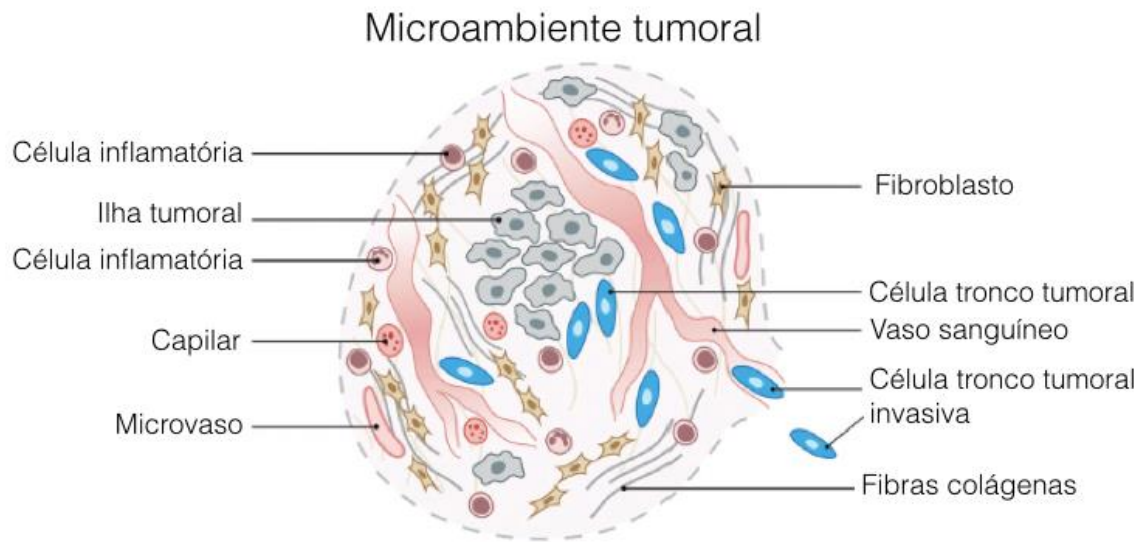


Figura 4. Esquema representativa do microambiente tumoral em neoplasias sólidas. As diferentes células do parênquima e do estroma tumoral participam e colaboram coletivamente para o crescimento e progressão do tumor (Adaptado de Krishnamurthy e Nör, 2011).

Em 1937, Furth e Kahn demonstraram que uma única célula tumoral de um camundongo com leucemia foi capaz de gerar um novo tumor em outro camundongo (Furth e Kahn, 1937). Na década de 90 o advento de tecnologias como o *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS) permitiu os pesquisadores avaliarem marcadores de superfície específicos a fim de selecionar determinadas subpopulações de células e verificar seu potencial tumorigênico. O FACS, por

exemplo, permitiu identificar que células de leucemia CD34+CD38- eram capazes de gerar novos tumores (Bonnet e Dick, 1997). Al-Hajj e colaboradores foram os primeiros a demonstrar a presença desta subpopulação com alto potencial tumorigênico em tumores sólidos. Este grupo de pesquisadores demonstrou que apenas células de câncer de mama CD44+CD24- selecionadas por FACS eram capazes de formar novos tumores em camundongos imunossuprimidos (Al-Hajj et al., 2003).

Atualmente a teoria das CTT é baseada em características fundamentais, sendo estas: (1) apenas uma pequena fração de células tumorais tem potencial tumorigênico quando transplantadas em camundongos imunodeficientes; (2) a subpopulação de CTT pode ser separada das outras células do tumor por marcadores de superfície distintos; (3) tumores resultantes de CTT apresentam uma mistura de células tumorigênicas e não tumorigênicas provenientes do tumor original; e (4) a subpopulação de CTT pode ser transplantada por várias gerações, indicando que essa população apresenta potencial de auto-renovação (Prince e Ailles, 2008).

Prince e colaboradores foram os primeiros a identificar a presença de CTT em carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço, demonstrando que células CD44+ apresentavam elevado potencial tumorigênico (Prince et al., 2007). O CD44 é uma glicoproteína de superfície celular que funciona com um receptor de ácido hialurônico e está envolvida com adesão celular e migração (Gao et al., 2011). Estudos subsequentes demonstraram que células tumorais de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço ALDH+ positivas também apresentavam alto potencial tumorigênico e de auto-renovação (Krishnamurthy et al., 2010). O aldeído desidrogenase (*aldehyde dehydrogenase* em inglês), ou ALDH, é uma enzima intracelular envolvida na conversão de retinol em ácido retinóico, um modulador da proliferação celular. Além disso, esta enzima oxida aldeídos intracelulares, conferindo resistência a agentes alquilantes. Acredita-se que a alta expressão de ALDH em células tronco tumorais está relacionada com a regulação da proliferação celular e com a proteção a agressão oxidativa que poderia conferir

a alta longevidade destas células (Huang et al., 2009). O estudo da atividade enzimática de ALDH em CTT teve como base estudos prévios que demonstraram que a atividade desta enzima poderia ser utilizada para identificar células progenitoras em medula óssea (Armstrong et al., 2004) e cordão umbilical (Hess et al., 2004), além de estar relacionada com maior resistência destas células progenitoras à quimioterapia (Lindahl, 1992). Além do câncer de cabeça e pescoço (Chen et al., 2009; Clay et al., 2010; Krishnamurthy et al., 2010), células ALDH+ com alto potencial tumorigênico foram identificadas em câncer de mama (Ginestier et al., 2007), glioblastoma (Rasper et al., 2010), colón (Huang et al., 2009), entre outros.

As células tronco e as CTT possuem semelhanças importantes como a auto-renovação e multipotência. Além disso, sabe-se que as células tronco apresentam capacidade de formar esferas e crescer sob condições de baixa aderência (Reynolds e Weiss, 1992). Esta característica foi verificada em CTT de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (Krishnamurthy e Nor, 2013). Além disso, foi demonstrado que sob estas condições, estas linhagens dão origem a diferentes subtipos de CTT, denominadas holoesferas, meroesferas, paraesferas. As holoesferas apresentaram maior percentual de células CD44+ALDH+, além de apresentar um aumento em marcadores de agressividade, como o BMI-1 (Almeida et al., 2016).

Em 2015, Adams e colaboradores avaliaram pela primeira vez a presença e o papel das CTT em CME. Este grupo avaliou três linhagens celulares e modelos de xenoenxerto de CME em relação aos marcadores ALDH, CD44, CD24 e CD10. Foi identificado que células ALDH+CD44+ apresentaram o maior potencial tumorigênico, sendo capazes de gerar tumores em camundongos imunossuprimidos ao longo de diferentes passagens. Entretanto, é importante ressaltar que mais de 90% das células de CME foram positivas para CD44, enquanto que apenas 0.7-4.4% das células foram positivas para ALDH, demonstrando a maior especificidade deste marcador. Neste estudo também foi

demonstrada a capacidade destas células de formar esferas quando cultivadas em placas de baixa adesão.

Atualmente, as CTT tem sido o foco de diversos estudos que buscam novas alternativas terapêuticas para o câncer. Isto porque foi demonstrado que, além de apresentar auto-renovação e multipotencialidade, estas células usualmente são resistentes as terapias convencionais como a radioterapia e a quimioterapia (Hambardzumyan et al., 2006; Diehn et al., 2009; Shafee et al., 2008; Almeida et al., 2013). Um estudo recente do nosso grupo demonstrou que a administração de cisplatina, quimioterápico amplamente utilizado em diferentes neoplasias, incluindo as NMGS, levou a um acúmulo de uma subpopulação de CTT de CME *in vitro* (Guimarães et al., 2016). Esta característica de resistência a terapia faz com que essas células sejam as principais responsáveis pelo desenvolvimento de metástases e recidivas após o tratamento. O alto potencial de sobrevivência das CTT pode ser atribuído a diferentes fatores. Estas células permanecem usualmente na fase G0 do ciclo celular, fazendo com que elas sejam relativamente quiescentes e possam escapar de terapias que tenham como alvo células proliferativas (Venezia et al., 2004). Além disso, estas células são capazes de ativar proteínas de reparo de DNA (Park e Gerson, 2005) e proteínas anti-apoptóticas (Wang et al., 2003). As CTT exibem cromatina compactada (hipoacetilada) não permitindo assim a transcrição gênica e acesso ao DNA devido a intensa compactação do material gênico (Almeida et al., 2013). O nicho de CTT assim como o microambiente tumoral também contribuem para a sua resistência ao tratamento, através de interações com o sistema imune que perpetuam a pluripotência destas células e também por alterações vasculares que permitem que elas recebam os nutrientes necessários para sua sobrevivência (Morrison et al., 2008; Ritchie e Nor, 2013).

2.4 Via de sinalização do NFκB

O NFκB (do inglês *nuclear factor kappa B*) corresponde a uma família de proteínas que atua como fator de transcrição regulando a expressão de uma grande variedade de genes. Sen e Baltimore foram os primeiros a descrever a presença deste fator na transcrição de cadeias leve κ (kappa) da imunoglobulina em linfócitos B, dando assim o nome a proteína de NFκB (Sen e Baltimore, 1986). Inicialmente, acreditava-se que este fator era exclusivo de linfócitos, entretanto, estudos posteriores demonstraram a presença de NFκB em células não linfóides (Baeuerle e Baltimore, 1988; Nelsen et al., 1988). A família do NFκB é composta por cinco subunidades denominadas p65 (RelA), Rel B, c-Rel, p50 e p52 (Bradford e Baldwin, 2014).

Em condições de repouso, o dímero NFκB permanece inativo no citoplasma sequestrado por uma proteína inibitória denominada κB (IκB), que impede a entrada do fator no núcleo da célula. Quando a célula é ativada por diferentes estímulos, a proteína IκB é fosforilada e degradada rapidamente. A forma livre do NFκB então é translocada para o núcleo onde atua como fator de transcrição de diferentes genes (Bradford e Baldwin, 2014). A fosforilação do IκB ocorre pela ação de proteínas quinase específicas, como o complexo IκB quinase (IKK). Este complexo é formado por duas subunidades catalíticas, IKKα e IKKβ, e uma unidade não catalítica, NEMO (*NFκB essencial modulator*) (Hoesel e Schmid, 2013). Existem dois caminhos para que ocorra a ativação de NFκB: a via clássica (canônica) e a não canônica (Figura 5).

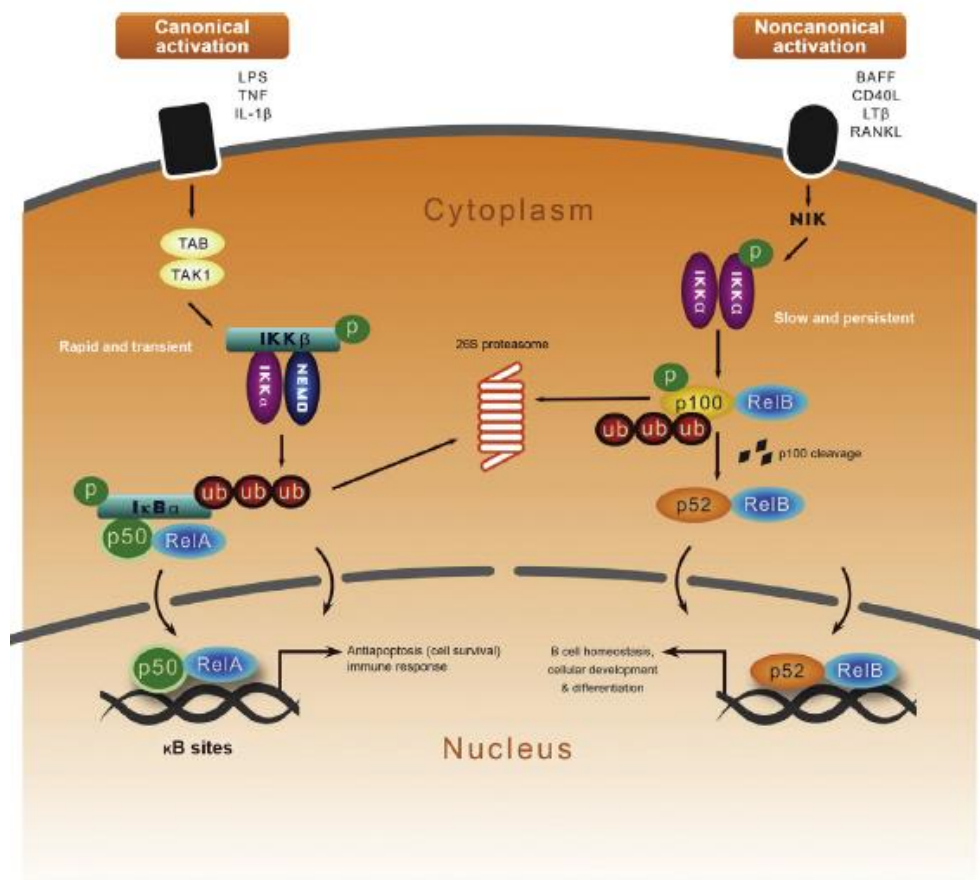


Figura 5. Via canônica e não canônica de ativação do NFκB (Bradford e Baldwin, 2014).

A via clássica ou canônica é a mais comumente ativada e está associada à expressão de genes relacionados com a inflamação, anti-apoptose, sobrevivência celular e resposta imunológica inata (Franco, 2010). Esta via pode ser ativada por diferentes estímulos, como o lipopolissacarídeo de bactérias gram-negativas (LPS), o fator de necrose tumoral (TNF) e diversas citocinas pró-inflamatórias como o IL-1β (Bradford e Baldwin, 2014). O heterodímero ativado na via clássica, o p50:p50 é o mais amplamente distribuído entre os tipos celulares e por consequência o mais estudado. Assim, o NFκB é ativado frente a certos estímulos específicos e regula positivamente a expressão de seus genes alvo. Em seguida, a proteína volta a seu estado inativo por mecanismos regulatórios. Sendo

assim, podemos considerar este processo específico e transitório. Em células tumorais, alterações moleculares podem comprometer a regulação do NFκB, gerando uma ativação contínua deste fator que leva a desregulação dos genes sob seu controle. Entre estes, podemos citar genes envolvidos com a regulação da apoptose, controle do ciclo celular, migração e adesão celular (Dolcet et al., 2005). Os principais genes alvos dependentes de NFκB envolvidos com o processo de carcinogênese estão esquematizados na Figura 6.

A ativação de NFκB ocorre em uma ampla variedade de tumores malignos, como câncer de mama (Merkhofer et al., 2010), linfoma (Rahal et al., 2014; Lenz et al., 2008), próstata (Dan et al., 2008), melanoma (Ueda e Richmond, 2006), câncer de pâncreas (Liptay et al., 2003) entre outros. Em carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, especificamente, a ativação de NFκB já foi previamente descrita (Loercher et al., 2004; Ondrey et al., 1999), além de sua associação com a progressão da doença, metástase (Dong et al., 1999), recorrência e pior sobrevida (Zhang et al., 2005). Em linhagens de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço foi demonstrado que ativação de NFκB afeta o balanço de proteínas anti e pró-apoptóticas (Lee et al., 2008).

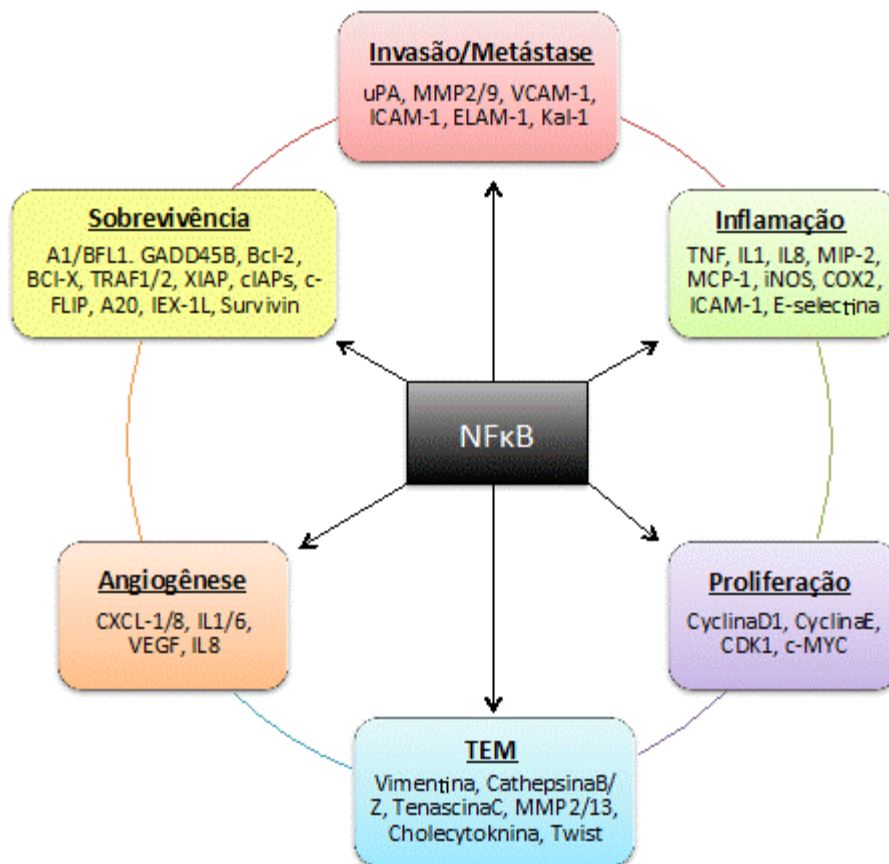


Figura 6. Representação dos genes alvos de NFκB envolvidos em diferentes aspectos da carcinogênese (Adaptado de Bassères e Baldwin, 2006).

Um importante aspecto relacionado à ativação do NFκB diz respeito a sua capacidade de ativar mecanismos de resistência à quimioterapia convencional e à radioterapia. Diferentes agentes quimioterápicos como o paclitaxel, vimblastina, vincristina, doxirubicina, daunomicina, 5-fluorouacil, cisplatina, tamoxifen e bortezomib ativam o NFκB em diferentes linhagens celulares (Cusack et al., 1999; Nakanishi e Toi, 2005; Campbell et al., 2006; Melisi et al., 2007; Baumann et al., 2008; Bednarski et al., 2008; Konstantinopoulos et al., 2008). Entre os mais de 400 genes ativados pelo NFκB, alguns tem destaque por sua participação no processo de resistência a quimioterapia, como a COX-2, ciclina-D1, Bcl-2, Bcl-x, survivin e o XIAP (Yamamoto et al., 1995; Guttridge et al., 1999; Catz e Johnson, 2001; Tamatani et al., 1999; Zhu et al., 2001; Stehlik et al., 1998). Em carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, especificamente, a ativação de NFκB está

associada a maior resistência a cisplatina (Kato et al., 2000), e esta resistência ocorre via modificações na estrutura da cromatina, através da desacetilação de histonas (Almeida et al., 2003). Em relação às NMGS pouco se conhece sobre a relação da ativação de NF κ B e possíveis mecanismos de resistência tumoral.

A radiação ionizante também é capaz de ativar esta via (Figura 7). A radiação leva a um aumento no dano ao DNA da célula juntamente com a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS – do inglês *reactive oxygen species*). Estes eventos levam a uma ativação do ATM (do inglês *ataxia telangiectasia mutated*) que induz a ativação do complexo IKK (Ahmed e Li, 2008). No início dos anos 2000, foi demonstrada que a ativação de NF κ B estava associada com a radioresistência de células de câncer de mama após exposição a radiação ionizante fracionada (Li et al., 2001; Guo et al., 2003). Tanto baixas quanto altas doses de radiação ionizante estão associadas com uma ativação de NF κ B tempo e dose-dependente em diferentes tumores sólidos (Brach et al., 1991; Madhusoodhanan et al., 2009a; Madhusoodhanan et al., 2009b; Aravindan et al., 2014). Recentemente, foi demonstrado que baixas doses de radiação ionizante induzem a ativação de NF κ B e levam a uma maior radioresistência a doses altas de radiação ionizante em linhagens celulares de sarcoma de Ewing, neuroblastoma e câncer de mama, bexiga, colo e próstata (Aravindan et al., 2014). O NF κ B quando ativado induz a inibição de vias apoptóticas após o dano de DNA causado pela radiação ionizante (Aravindan et al., 2014; Begg et al., 2011).

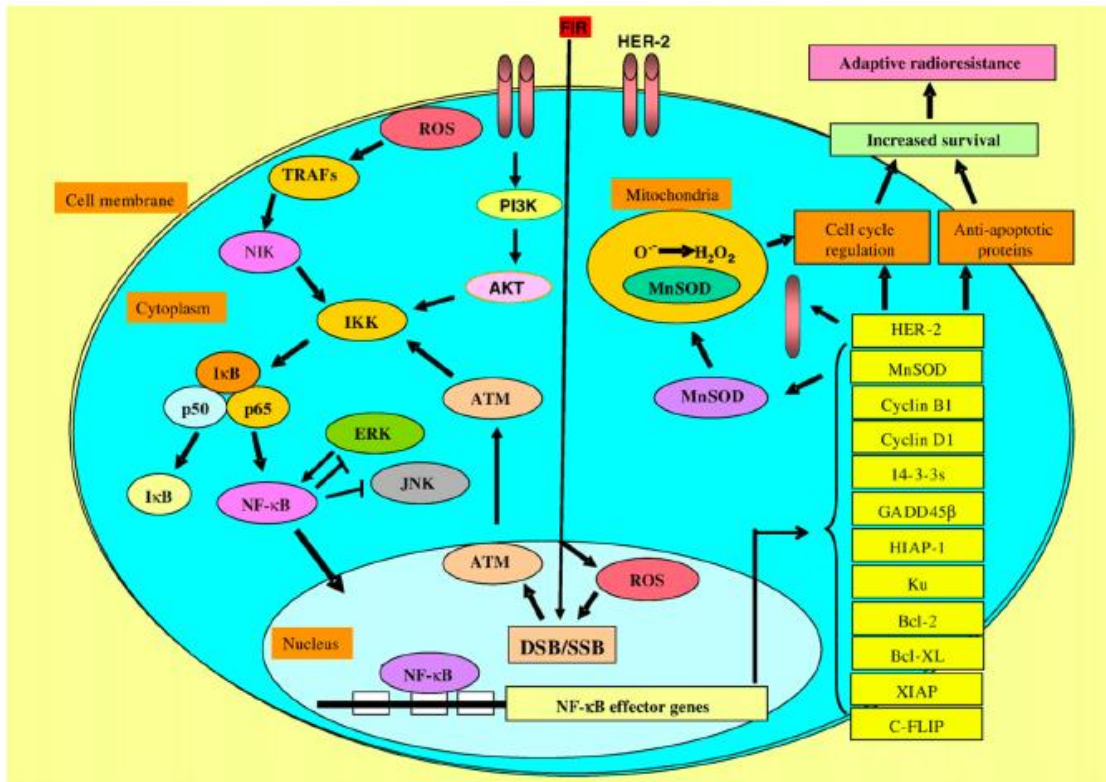


Figura 7. Apresentação esquemática da associação da via de sinalização do NFκB com a radioresistência adaptativa induzida pela radiação. A radiação ionizante fracionada pode induzir diretamente quebra da fita dupla e simples do DNA (do inglês *doublestrand breaks* -DSB e *single-strand breaks* -SSB). O dano ao DNA leva à ativação da ATM nuclear que ao se translocar para o citoplasma ativa o NFκB através da regulação da atividade de IKK. As ROS geradas nas células pela radiação ionizante também levam a quebra da fita dupla e simples do DNA no núcleo mas também induzem a ativação de NFκB através da via de sinalização TRAFs. A combinação destas vias nucleares e citoplasmáticas ativadas pela radiação ionizante leva a uma super-regulação de genes ativados por NFκB envolvidos com a regulação da apoptose e do ciclo celular que por sua vez levam a uma maior resistência adaptativa à radiação ionizante (Ahmed e Li, 2008).

Outro aspecto importante em relação a via do NFκB é sua relação íntima com a população de CTT. Células de câncer de próstata com propriedades tronco

apresentam maiores níveis de ativação de NF κ B e a inibição desta via impede a formação de esferas por estas células (Rajeseckhar et al., 2011). A inibição de NF κ B também está associada com o bloqueio na expressão de genes associados com o potencial “tronco” das células tumorais, como Nanog e Sox 2 (Liu et al., 2010). Tanto a ativação canônica quanto a não canônica de NF κ B estão relacionadas com a manutenção da população de CTT em câncer de mama (Kendellen et al., 2014). Schwitalla e colaboradores demonstraram recentemente que o aumento de expressão do NF κ B induz a ativação da via do Wnt fazendo com que as células de câncer de intestino passem a apresentar características tronco (Schwitalla et al., 2013). Assim, a ativação de NF κ B pode levar a maior resistência tumoral não apenas por ativar vias anti-apoptóticas, mas também pelo aumento na população de CTT, que possuem mecanismos próprios de evasão às terapias convencionais.

2.4 Acetilação de histonas

O campo da epigenética permite entender mecanismos moleculares envolvidos com a modulação da expressão gênica na ausência de alterações na sequência de DNA (Martins e Castilho, 2013). Entre os principais mecanismos epigenéticos podemos citar metilação de DNA, ação de RNAs não codificadores e modificação de histonas (Blancafort, Jin e Frye, 2013). As histonas funcionam como importante componente estrutural nuclear e como reguladoras do perfil de expressão gênica em vários tipos de tecidos (Kouzarides, 2007; Le et al., 2014). O nucleossomo (unidade fundamental da cromatina) é composto pela molécula de DNA enrolada ao redor de octâmeros de histonas, compostos de duas cópias de H2A, H2B, H3 e H4 (Figura 8). As histonas exibem caudas que se projetam para fora dos nucleossomos, estando sujeitas a um número grande de modificações pós-transducionais como a acetilação, metilação e fosforilação (Kouzarides, 2007; Carew et al., 2008). A habilidade da cromatina de modular o comportamento das células está associada com o quão compactado o DNA está ao redor do octâmero de histonas. O padrão de modificações nas histonas determina o status da cromatina (eucromatina ou heterocromatina), a

acessibilidade do DNA a fatores nucleares e a transcrição de genes. A eurocromatina é relativamente descondensada e possui sítios ativos de transcrição. Por outro lado, a heterocromatina é condensada e apresenta áreas do genoma silenciadas (Martins e Castilho, 2013).

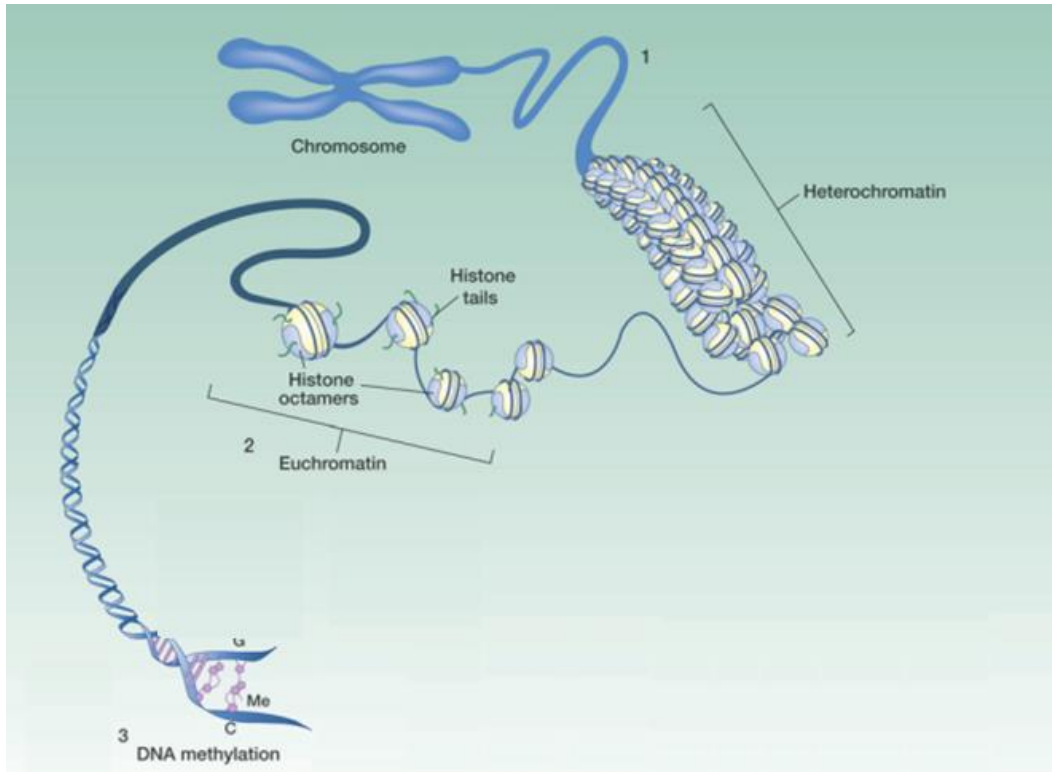


Figura 8. Organização do cromossomo. A fita de DNA é enrolada ao redor de um octâmero de histonas e empacotada em estruturas de cromatina chamadas de nucleossomos. As modificações epigenéticas são controladas predominantemente por modificações nas histonas (Adaptado de Lawlor e Thiele, 2012).

A acetilação de histonas representa um dos mecanismos epigenéticos mais estudado por estar relacionada diretamente com importantes funções da regulação da expressão gênica. Esse processo de acetilação ocorre através da adição de grupos acetil pelas enzimas histonas acetiltransferases (HATs) a resíduos de lisina localizados nas caudas das histonas fazendo com que as cargas positivas desses resíduos de lisina sejam neutralizadas e assim ocorra o

enfraquecimento (relaxamento) da interação da cauda da histona com o DNA local carregado negativamente, induzindo abertura local, descompactando as estruturas da cromatina (Zupkovitz et al., 2006). Desta forma, o DNA local é exposto, aumentando o acesso de fatores de transcrição e promovendo aumentos significativos na transcrição do DNA (Verdone et al., 2005). De forma oposta ocorre a desacetilação, onde grupos acetil são retirados pelas enzimas histonas desacetilases (HDACs). O balanço da ação das HATs e HDACs garantem os níveis estacionários da acetilação do núcleo das histonas (Wade e Kikyo, 2002) e influenciam o grau de compactação da cromatina desempenhando um papel regulatório da expressão gênica (Figura 9).

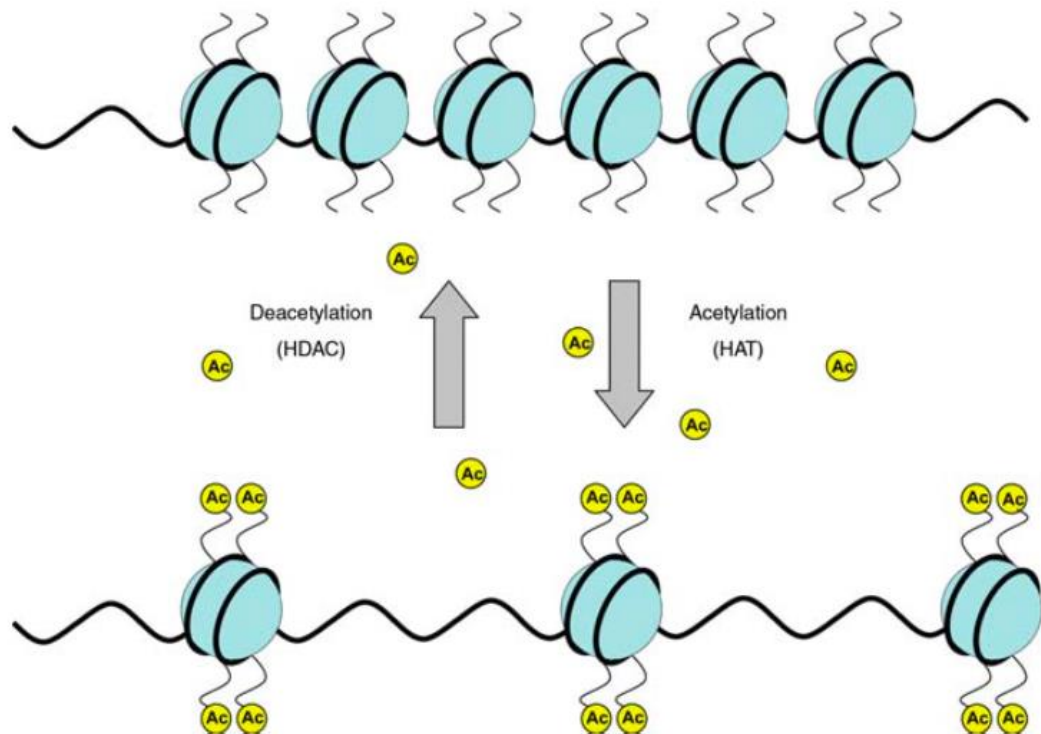


Figura 9. A acetilação das caudas das histonas é mediada pelas enzimas HATs que resulta em uma estrutura aberta da cromatina. Esta configuração permite que os fatores de transcrição tenham acesso ao DNA. De forma inversa, a desacetilação de histonas é mediada pelas enzimas HDACs que removem o grupo acetil das caudas das histonas levando a uma configuração fechada da cromatina (Pons et al., 2009).

A compactação da cromatina pela ação das HDACs está associada a progressão tumoral através do silenciamento de diferentes genes como supressores de tumor, inibidores do ciclo celular e relacionados a diferenciação celular (Halkidou et al., 2004; Hrzenjak et al., 2006; Song et al., 2005; Glozak e Seto, 2007). Além disso, a desacetilação de histonas, mediada pela ação de DNMT1 (*DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1*) por exemplo, pode inibir a diferenciação celular levando a manutenção do potencial tronco das células (Fuks et al., 2000; Sen et al., 2010). Em carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço foi observado que linhagens celulares deste tumor são hipoacetiladas em relação a mucosa bucal normal (Giudice et al., 2013). Além disso, a cisplatina induz a desacetilação de histonas em linhagens quimioresistentes. A compactação da cromatina resulta em um sistema de reparo de DNA comprometido, acúmulo no dano de DNA e aumento da instabilidade genômica (Almeida et al., 2013). Somado a isso, há evidencia que as holosferas, uma subpopulação de CTT, provenientes de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço são hipoacetiladas e associadas a um perfil mais agressivo, demonstrado pela maior expressão de BMI-1 (Almeida et al., 2016). A inibição farmacológica de HDAC no carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço induz a apoptose e a parada do ciclo celular (Chikamatsu et al., 2013), inibe a expressão de genes relacionados com um perfil tronco (Chikamatsu et al., 2013), e causa a diminuição da população de CTT (Giudice et al., 2013).

Em tumores de origem glandular foi demonstrado que inibidores de HDAC diminuem o crescimento celular e aumentam a apoptose de linhagens celulares de adenocarcinoma de pâncreas (Chien et al., 2014; García-Morales et al., 2005). Em câncer de mama, o uso de inibidores de HDAC já foram testados em ensaios clínicos em fase I e II e apresentaram resultados promissores para inibir a resistência tumoral a agentes hormonais além de apresentarem baixos efeitos adversos (Munster et al., 2009; Munster et al., 2011). Em CME, nosso grupo recentemente demonstrou que o uso de um inibidor de HDAC resultou na depleção da população de CTT, apresentando efeito superior ao da cisplatina (Guimarães et al., 2016).

2.5 Perspectivas futuras de tratamento

A resistência tumoral às terapias convencionais está diretamente relacionada com os baixos índices de sobrevida observados para diversos tumores, incluindo CME de alto grau ou em estágio avançado. Neste sentido é importante que mais esforços sejam feitos para otimizar as terapias atualmente disponíveis como a radioterapia e a quimioterapia convencional.

Estima-se que 50% de todos os pacientes com câncer irão receber radioterapia em algum momento de seu tratamento. Em alguns tipos de câncer, a radioterapia está associada a uma melhora significativa na sobrevida dos pacientes, como no câncer de laringe ou câncer de pulmão de não pequenas células. Entretanto, em diversos tipos de câncer é comum observar recidiva da lesão após o tratamento radioterápico. Atualmente, sabe-se que fatores biológicos e moleculares do tumor tem uma relação direta com o sucesso do tratamento radioterápico (Begg et al., 2011). A modulação de vias de sinalização envolvidas com a resistência tumoral previamente a radioterapia representa uma alternativa promissora para aumentar a eficácia deste tratamento. Sabe-se que um aumento de 10% na dose de radiação ionizante eficiente pode levar a uma melhora de até 30% nas taxas de controle do tumor (revisado em Begg et al., 2011). Entre as principais vias associadas com a radioresistência adquirida podemos citar a via do NFkB. A inibição deste fator apresentou resultados promissores na diminuição da resistência tumoral à radioterapia em gliomas malignos (Tsuboi et al., 2009), câncer colorretal (Sandur et al., 2009), carcinoma espinocelular (Kim et al., 2004), câncer de mama (Ahmed et al., 2013), entre outros.

Diferentes fármacos têm sido empregados para inibição do NFkB, como o Bortezomib e Velcade. Entretanto, diversos efeitos adversos, como náuseas, diarreia, fadiga, sangramentos, entre outros, têm sido associados ao uso destas drogas. Os efeitos secundários (*off target*) são resultado da falta de especificidade destes fármacos. Tendo em vista a importância desta via em diferentes situações

patológicas, incluindo eventos relacionados a inflamação e ao desenvolvimento e progressão do câncer, Miller e colaboradores recentemente realizaram um *screening* de drogas com o objetivo de identificar drogas capazes de inibir esta via (Miller et al., 2009). Foram avaliadas 2800 drogas aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA). Entre as 19 drogas capazes de inibir o NFκB, a droga Emetina ganha destaque por sua especificidade em inibir a fosforilação de IκBα com a menor concentração entre todas as drogas.

Apenas em 2009 a Emetina foi identificada como uma droga capaz de inibir o NFκB, entretanto esta droga vem sendo utilizada há décadas sem o conhecimento desta importante característica. A Emetina é um alcalóide cristalino natural encontrada no xarope de ipecacuanha, que deriva da *Psychotria ipecacuanha*, planta da família Rubiaceae, muito comum nos solos das florestas dos estados da Bahia e do Mato Grosso, no Brasil. Esta droga é continuamente empregada desde o início dos anos 1900s no tratamento de infecções por protozoários e amebíase (Lambert, 1918). O primeiro relato sobre suas propriedades antineoplásicas também datam do início do século XX (Lewisohn, 1918), entretanto foi somente nos anos 70 que ensaios clínicos de fase I e II avaliando o uso de Emetina no tratamento do câncer foram realizados (Panettiere e Coltman, 1971; Mastrangelo et al., 1973; Siddiqui et al., 1973). Os resultados destes estudos variaram desde a nenhum efeito clínico, estabilidade da doença até regressão do tumor. Esta disparidade entre os resultados levou a um período quiescente em relação ao estudo da Emetina como droga antineoplásica. No início do século XXI, entretanto, o efeito de Emetina em células neoplásicas voltou a ser abordado na literatura em linhagens de leucemia, carcinoma hepatocelular, cervical, de ovário, adenocarcinoma de pulmão, câncer de próstata, pâncreas e bexiga (Möller et al., 2006; Möller e Wink, 2007; Boon-Unge et al., 2007; Foreman et al., 2013; Myhren et al., 2014; Han et al., 2014; Sun et al., 2015). Estes estudos demonstraram que a Emetina é capaz de inibir a proliferação celular (Foreman et al., 2014) e induzir a apoptose destas linhagens através de diferentes mecanismos como a inibição de Mcl-1 (Han et al., 2014) e bcl-xL (Boon-Unge et al., 2007; Sun et al., 2015). É importante ressaltar que apesar de alguns estudos terem sido

desenvolvidos posteriormente ao estudo de Miller e colaboradores (2009) que identificou o potencial da Emetina em inibir a via do NFκB, nenhum destes autores abordou este aspecto da droga em seus trabalhos.

A Emetina, utilizada como droga antineoplásica, se enquadra na teoria de reaproveitamento de drogas (em inglês *drug repurposing*). Atualmente, há um forte estímulo por parte de diversas agências para que drogas já aprovadas para outros fins sejam testadas e reaproveitadas para outras doenças, como o câncer. Por exemplo, o Centro Nacional para a Promoção da Ciência Translacional (*National Centre for Advancing Translational Sciences - NCATS*) nos EUA lançou o programa “Descoberta de novos usos terapêuticos para moléculas existentes”. O objetivo deste programa é melhorar o complexo e longo processo de desenvolvimento de novos tratamentos para diferentes doenças por encontrar novas utilizações para drogas que já tenham passado pelos diversos passos deste longo percurso (*National Center for Advancing Translational Sciences Repurposing Drugs*). No Reino Unido, os pesquisadores podem solicitar financiamento para estudos clínicos com reaproveitamento de drogas pelo “Esquema de financiamento de vias de desenvolvimento” oferecido pelo Conselho de Pesquisa Médica (*Medical Research Council – MRC*) (*Medical Research Council Biomedical Catalyst: Developmental Pathway Funding Scheme*).

O primeiro ponto importante que justifica esta tendência é que usualmente menos de 10% das drogas que entram em ensaios clínicos são aprovadas para uso. Além disso, o tempo médio para que uma nova molécula promissora seja traduzida em uma nova droga aprovada pela FDA é usualmente de 10 a 14 anos. O reaproveitamento de drogas faz com que este processo seja mais rápido e seguro. Na maioria dos casos estas drogas já passaram por testes *in vitro* e *in vivo*, otimização química, testes toxicológicos, processo de fabricação, entre outros pontos importantes (Ashburn e Thor, 2004). Embora as drogas necessitem ser aprovadas para seu novo uso, o tempo do processo é reduzido significativamente, além de ser mais seguro e ter maior chance de sucesso (Figura 10).

Outro ponto importante a ser considerado no tratamento sistêmico do câncer é que as células malignas usualmente apresentam mais de um mecanismo de resistência tumoral. Diferentes estudos apontam que em tumores sólidos avançados há sempre uma pequena parcela de células que será resistente à terapia quando apenas uma droga com um alvo específico é utilizada. Estas células resistentes irão se dividir durante o tratamento levando a progressão tumoral e recidivas (Diaz et al., 2012; Bozic et al., 2013; Komarova e Wodarz, 2005). Um estudo por Bozic e colaboradores utilizou um modelo matemático para prever a chance de controlar o tumor de um paciente com melanoma apresentando 8 lesões metastática com diferentes terapias. Estes autores estimaram que utilizando apenas uma droga há 0% de chance de controlar a doença. Entretanto, combinando duas drogas com alvos diferentes esta chance pode aumentar para 88% (Bozic et al., 2013). Atualmente a prática mais comum no tratamento do câncer é iniciar a terapia com uma droga de “primeira-linha” e trocar para uma outra droga de “segunda-linha” se há falha no primeiro tratamento. Essa estratégia sequencial, entretanto, impossibilita a cura do câncer pois da chance de novas mutações ocorrerem durante o tratamento de primeira linha (Figura 11). Terapias que combinam duas drogas simultaneamente são mais promissoras e podem despertar maiores esperanças nos pacientes com tumores avançados (Komarova e Boland, 2013).

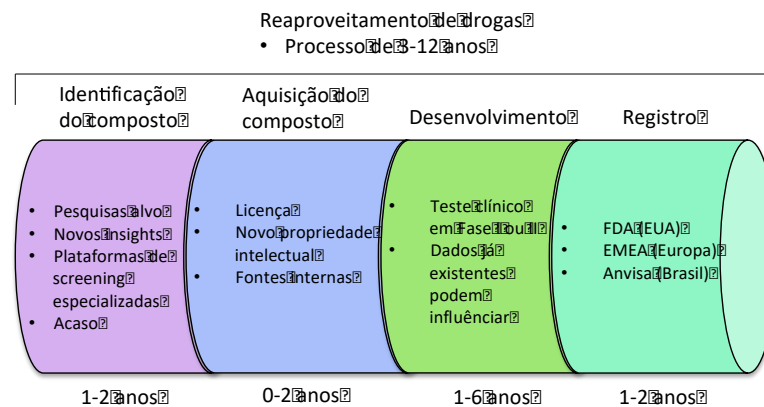
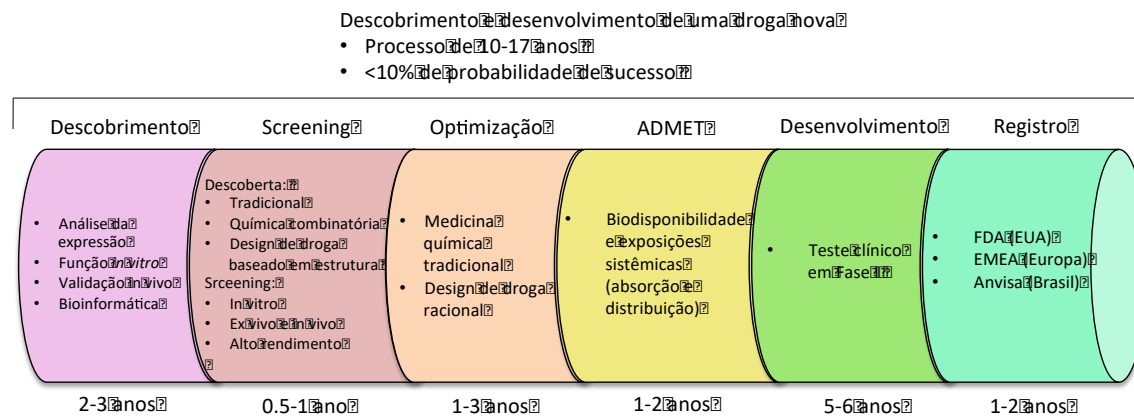


Figura 10. Comparação entre a descoberta e desenvolvimento de uma nova droga contra o reaproveitamento de drogas. ADMET – Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (Adaptado de Ashburn e Thor 2004).

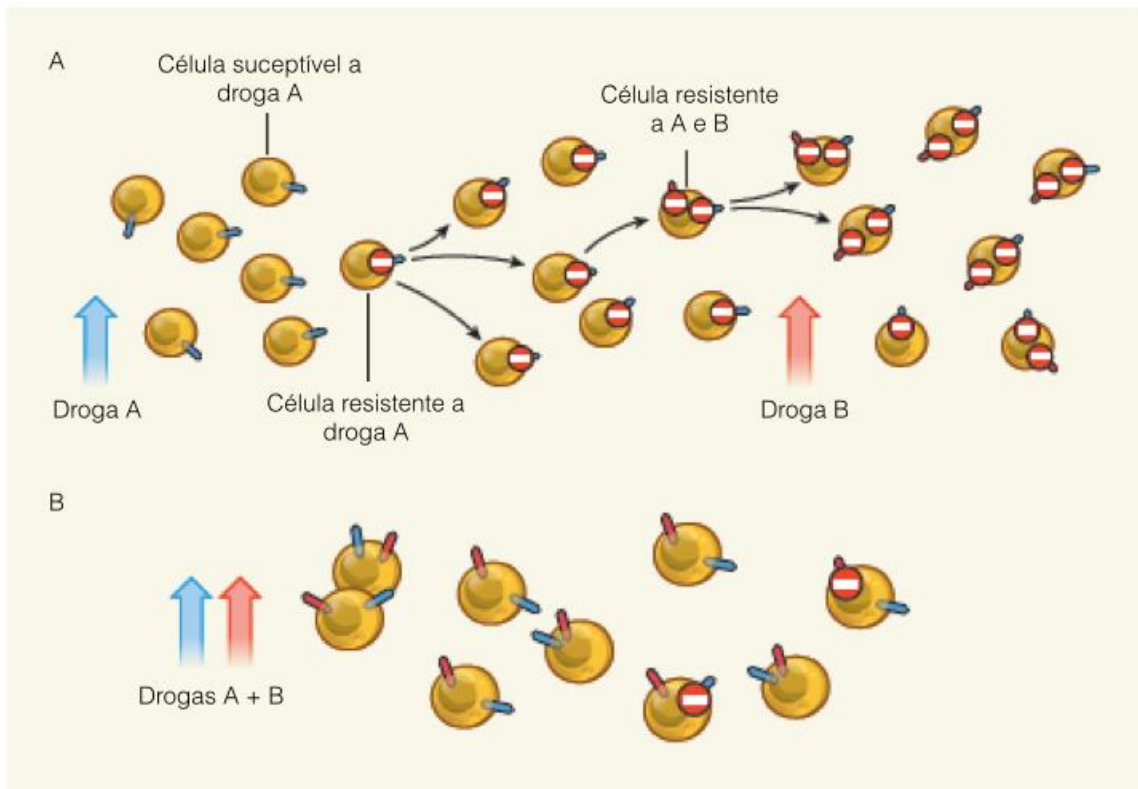


Figura 11. (A) Durante a terapia sistêmica com uma droga apenas, a célula que adquirir mutações que a deixem resistente a esta droga irão apresentar uma vantagem proliferativa. No momento em que se observa a falha da primeira droga e que se inicia um tratamento de segunda-linha, é extremamente provável que haja alguma célula resistente a segunda droga também, uma vez que as células resistentes proliferativas sofreram novas mutações ao longo do tratamento. (B) Iniciando a terapia com duas drogas simultaneamente poderemos eliminar as células que adquiram resistência a uma droga através da ação da outra droga (Adaptado de Kormarova e Boland, 2013).

Atualmente, há uma grande tendência de buscar drogas que atuem nas CTT, uma vez que estas células mais indiferenciadas seriam as principais responsáveis pelas falhas ao tratamento. Entretanto, é importante ressaltar que a eliminação das demais células neoplásicas mais diferenciadas e aberrantes que compõe a massa tumoral também representa um parte fundamental da terapia anti-câncer. Em tumores de próstata por exemplo, é sugerido que terapias que

visam a massa tumoral como um todo (como a terapia de privação de andrógenos) sejam associadas drogas específicas para as CTT. Estas terapias complementares agem de forma sinérgica, aumentando assim as chances de eliminar por completo o tumor (Rane et al., 2012).

Entre as drogas que apresentaram resultados promissores na redução da população de CTT podemos citar o ácido hidroxâmico suberoilânida (SAHA ou Vorinostat). Esta droga representa uma molécula de baixo peso molecular (aproximadamente 260mg) derivada do ácido hidroxâmico que foi aprovada pelo FDA em 2006 para o uso em pacientes com linfoma cutâneo de células T (Mann et al., 2007). O SAHA inibe a atividade enzimática de HDACs de classe I (HDAC1, HDAC2, HDAC3) e classe II (HDAC6). Além de possuírem atividade sobre a acetilação de histonas, os HDACs classe I e II apresentam diversas proteínas não-histonas como alvo. Os inibidores de HDAC apresentam um papel importante na regulação do ciclo celular, apoptose e proliferação (Lee e R, 2013).

O tratamento de células de neuroblastoma com SAHA resultou na diminuição no potencial de formação de esferas assim como, redução da expressão de genes associados com o potencial tronco das células, como ABCB1, ABCC4, LMO2, SOX2, ERCC5, S100A10, IGFBP3, TCF3, e VIM (Zheng et al., 2013). Em carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, foi demonstrado que esta droga também impacta a capacidade de formação de esferas e reduz o percentual de células ALDH positivas (Giudice et al., 2013). Em CME, um estudo recente de Guimarães e colaboradores demonstrou que o SAHA é mais efetivo na redução de CTT do que a cisplatina (Guimarães et al., 2016), sendo este o quimioterápico mais utilizado nestes pacientes.

3. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Atualmente os estudos que buscam terapias mais eficazes para o CME são extremamente escassos. A relativa raridade do CME é muitas vezes apontada como uma justificativa para a falta de evidências científicas relacionadas a este tumor. Apesar do CME representar a NMGS mais comum, sua incidência é de aproximadamente 2.5 por 1 milhão de habitantes (Chen et al., 2014), o que pode ser considerada baixa principalmente quando comparada com o carcinoma espinocelular da cavidade oral, no qual estas taxas podem chegar mais de 100 casos por 1 milhão de habitantes do sexo masculino no Brasil (Simard et al., 2014). Neste contexto, pode-se levantar a questão de: porque então estudar o CME? O primeiro ponto importante que deve ser abordado é que não podemos simplesmente negligenciar a pesquisa relacionada a tumores raros. Estima-se que anualmente 22% de todas as neoplasias malignas diagnosticadas na Europa são neoplasias consideradas raras (fonte: <http://www.rarecancerseurope.org>). Desta forma, quando somadas estas neoplasias representam uma proporção significativa dos tumores que atingem uma grande parcela da população. Além disso, tumores mais raros representam um desafio muito maior para os clínicos, tanto do ponto de vista de diagnóstico quanto de tratamento, uma vez que há uma experiência clínica expressivamente menor associada com a falta de embasamento científico. Sendo assim, acreditamos na importância de se pesquisar o CME para que os profissionais da área de oncologia clínica possam oferecer tratamento mais eficazes baseados em evidências científicas sólidas e voltadas especificamente para este tumor. O centro de pesquisa do câncer (*Center for Cancer Research*) dos Estados Unidos, vinculado ao Instituto Nacional de Saúde (*National Institute of Health*) e Instituto Nacional do Câncer (*National Cancer Institute*), reconhecendo a importância e as dificuldades relacionadas a pesquisa de tumores raros, lançou em 2013 um programa chamado de *NCI Rare Tumor Initiative*. Este programa visa fomentar colaborações mais estreitas entre pesquisa básica e clínica, grupos representantes de pacientes e parceiros da

indústria com o objetivo de facilitar o desenvolvimento de abordagens terapêuticas para tumores raros.

Um segundo ponto importante em relação a nossa escolha no assunto desta tese é em relação ao número de publicações disponíveis abordando o CME. Em uma busca na base PubMed podemos observar a discrepância brusca em relação aos esforços feitos na pesquisa para o carcinoma espinocelular e o CME, por exemplo. Realizando uma busca com os termos “squamous cell carcinoma” ou “mucoepidermoid carcinoma” restritos ao título do periódico obtemos 29,435 resultados para o carcinoma espinocelular em comparação com apenas 1,111 para o CME (Figura 10). Apenas em 2015 foram 2,424 publicações em relação ao carcinoma espinocelular comparados com 70 publicações sobre o CME (pesquisa realizada dia 25/10/2016 através do site <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). Além disso, analisando o grau de evidência dos estudos vemos que muitos trabalhos publicados em relação ao CME representam relatos ou series de caso. Consideramos que estas diferenças devem ser mencionadas pois ressaltam a importância desta tese por atingir uma área extremamente carente na literatura.

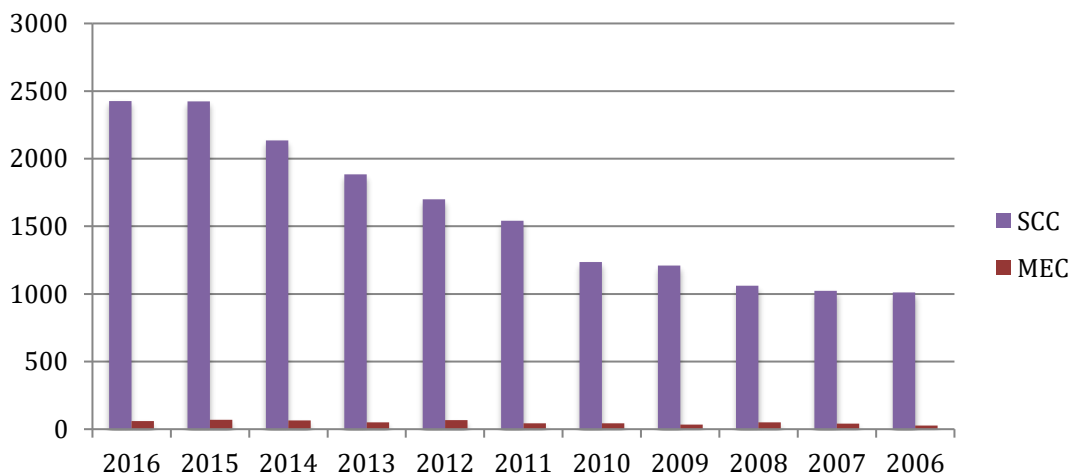


Figura 12. Número de artigos publicados na última década segundo a base PubMed para trabalhos contendo nos títulos os termos “squamous cell carcinoma” (SCC) ou “mucoepidermoid carcinoma” (MEC). Note a marcada discrepância entre o numero de publicações (pesquisa realizada dia 25/10/2016 através do site <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

Outro ponto importante que esta associado à escassez de evidências científicas relacionadas ao CME é a falta de disponibilidade de linhagens celulares deste tumor. Estudos com cultura de células são essenciais para que se aprofunde o conhecimento em relação aos mecanismos envolvidos com a progressão tumoral e resistência à terapia e representam a primeira fase no estabelecimento de novas alternativas de tratamento. Poucas linhagens de CME podem ser observadas em trabalhos científicos publicados, mostrando a limitação da pesquisa na compreensão de mecanismos básicos associados ao crescimento dos CME bem como sua resposta a diferentes terapias. Assim sendo, fica evidente que os escassos ensaios clínicos que envolvem CME não foram baseados em estudos *in vitro* que justificassem a ação dessas terapias nestas células tumorais. Neste sentido, o estabelecimento de linhagens de CME pelo grupo do prof. Jacques Nör foi fundamental para que este trabalho pudesse ser realizado. O desenvolvimento das linhagens utilizadas nesta tese envolveu diferentes etapas extremamente importantes e desafiadoras como a identificação de um meio de cultura adequado, a manutenção das características celulares/tumorais por diversas passagens (*in vitro* e *in vivo*) e do perfil gênico das linhagens em relação ao tumor obtido do paciente (Warner et al., 2013). Todos estes desafios foram superados pelo grupo do prof. Jacques Nör, abrindo significativamente os horizontes em relação a pesquisa com CME e possibilitando uma maior esperança para os pacientes diagnosticados com este tumor.

4. OBJETIVOS

4.1. *Objetivo geral*

Avaliar *in vitro* novas alternativas terapêuticas para o Carcinoma Mucoepidermoide (CME)

4.2 *Objetivos específicos do Artigo 1*

Avaliar o perfil de resistência à radioterapia de linhagens celulares de CME
Avaliar o efeito da ativação de NFkB na resistência à radioterapia em linhagens celulares de CME

Avaliar o efeito da inibição de NFkB na resistência à radioterapia em linhagens celulares de CME

4.3 *Objetivos específicos do Artigo 2*

Avaliar o efeito da terapia isolada com inibidor de NFkB em linhagens celulares de CME

Avaliar o efeito da terapia isolada com inibidor de HDAC em linhagens celulares de CME

Avaliar o efeito da terapia combinada com inibidor de NFkB e inibidor de HDAC em linhagens celulares de CME

5 ARTIGOS CIENTÍFICOS

5.1 Artigo 1

Artigo científico publicado no periódico Oncotarget (Qualis Capes 2016 – A1, ISSN 1949-2553, Fator de Impacto: 6.36, DOI: 10.18632/oncotarget.12195).

Overcoming Adaptive Resistance in Mucoepidermoid Carcinoma through Inhibition of the IKK- β /I κ B α /NF κ B Axis

Vivian P. Wagner^{1,2,3}, Marco A.T. Martins^{1,2}, Manoela D. Martins^{1,2,3}, Kristy A. Warner⁴, Liana P. Webber^{1, 2, 3}, Cristiane H. Squarize^{1,5}, Jacques E. Nör^{4,5,6,7}, and Rogerio M. Castilho^{1,5*}

¹ Laboratory of Epithelial Biology, Department of Periodontics and Oral Medicine, University of Michigan School of Dentistry, Ann Arbor, MI, 48109-1078, USA

² Experimental Pathology Unit, Clinics Hospital of Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 90035-003-Brazil

³ Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 90035-003-Brazil

⁴ Department of Restorative Sciences, University of Michigan School of Dentistry, Ann Arbor, MI 48109, USA

⁵ Comprehensive Cancer Center, University of Michigan Ann Arbor, MI, 48109-USA

⁶ Department of Otolaryngology, Medical School, University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA

⁷ Department of Biomedical Engineering, University of Michigan College of Engineering, Ann Arbor, Michigan

Keywords: Salivary cancer, irradiation, IKK α , cancer stem cells, radio-adaptive, emetine, drug repurposing

Abstract:

Patients with mucoepidermoid carcinoma (MEC) experience low survival rates and high morbidity following treatment, yet the intrinsic resistance of MEC cells to ionizing radiation (IR) and the mechanisms underlying acquired resistance remain unexplored. Herein, we demonstrated that low doses of IR intrinsically activated NF κ B in resistant MEC cell lines. Moreover, resistance was significantly enhanced in IR-sensitive cell lines when NF κ B was stimulated. Pharmacological inhibition of the IKK- β /I κ B α /NF κ B axis, using a single dose of FDA-approved Emetine, led to a striking sensitization of MEC cells to IR and a reduction in cancer stem cells. We achieved a major step towards better understanding the basic mechanisms involved in IR-adaptive resistance in MEC cell lines and how to efficiently overcome this critical problem.

Introduction

Salivary gland cancer (SGC) is a relatively rare group of tumors, with annual incidence rates between 0.05 to 2 new cases per 100,000 [1]. In the US, the incidence of SGC significantly increased from 1974-1976 to 1998-1999 and accounted for 6.3% compared to 8.1% of all head and neck cancers, respectively [2]. The 5-year survival rate for SGC is 60-80%; however, this rate drops to 50% by 10 years [3]. Distant metastasis, more frequently in the lungs, is the primary cause of death and occurs slowly, with patients surviving up to 20 years [1]. Mucoepidermoid carcinoma (MEC) is the most common malignant SGC, followed by adenoid cystic carcinoma [4-6]. Treatment for MEC derives from therapeutic protocols optimized for head and neck squamous cell carcinomas [7]. Surgical excision and ionizing radiation (IR) are the first-line treatment options for resectable and unresectable tumors, respectively. Postoperative IR is recommended for patients with residual disease with extensive nodal metastasis or capsular rupture. Postoperative radiotherapy is also suitable for patients with high-grade tumors and advanced disease, positive margins and perineural or vascular invasion [1]. In general, more than 80% of all SGC patients receive radiotherapy [8]. Although IR therapy used broadly to treat SGC, including MEC, little is known about how resistance to radiation develops in SGC cells. Moreover, the low survival rates that occur in the long-term underscore the urgent need to identify molecular targets that sensitize SGC cells to radiotherapy.

Nearly 50% of all cancer patients will be treated with IR alone or in combination with surgery or chemotherapy [8]. IR activates the DNA damage response pathway and cell cycle arrest, leading to senescence or apoptosis [9]. The responsiveness of the tumor to IR is substantially mediated by the intrinsic radiosensitivity of tumor cells [10]. Fractionated radiotherapy enables normal tissues to recover, but it also allows the surviving fraction of tumor cells to proliferate, promoting long-term resistance [11]. Distinct pathways, such as the NF κ B pathway, are triggered during radiotherapy. Activation NF κ B leads to increased cellular tolerance to subsequent IR doses in various cell lineages, such as breast, prostate and lung cancer cells [12, 13]. The NF κ B canonical or classical,

pathway is activated by a pro-inflammatory stimulus, such as TNF- α , that triggers the activation of the IKK complex. Activated IKK- α and IKK- β phosphorylate I κ B- α at S-32 and S-36, allowing NF κ B to translocate to the nucleus where it acts as a nuclear transcription factor [14, 15]. Cancer cells normally have high NF κ B activity, [16] leading to increased cell survival via antagonism of apoptotic pathways [17]. Indeed, the NF κ B subunit RelA (p65) can promote resistance to programmed cell death by suppressing p53 function [18]. We have also show that NF κ B signaling drives chemoresistance in head and neck squamous cell carcinoma by modulating chromatin modifications [19].

Previous studies showed that both low and high doses of IR upregulate NF κ B binding activity in several types of solid tumors in a dose- and time-dependent manner [13, 20, 21]. The level of NF κ B in tumor cells is an important determinant of responsiveness to IR because NF κ B induces resistance in several tumor models by inhibiting apoptosis after DNA damage [13, 22]. Activated NF κ B regulates the transcription of over 400 genes, including Bcl-2, Bcl-xL, XIAP, survivin and AKT, which are associated with NF κ B-driven radioresistance [23]. Recently, it was shown that IKK- β regulates the repair of DNA double-strand breaks induced by IR in breast cancer cells [15]. This evidence supports the use of NF κ B inhibitors as adjuvant treatment to sensitize cancer cells to IR. In fact, promising pre-clinical results have been achieved in colorectal cancer [24], melanoma [25] and neuroblastoma [26]. Current therapeutic strategies focused on inhibiting NF κ B signaling rely on proteasome inhibition, resulting in off-target effects. Identifying new drugs that induce selective inhibition of NF κ B, by interfering with IKKs or by inhibiting phosphorylation and promoting loss of function of the I κ B- α super-repressor, are expected to efficiently reduce tumor resistance.

In our study, we explored the response of MEC cells to IR. We found that high intrinsic radioresistance of MEC cells is associated with NF κ B activation. Furthermore, inhibition of NF κ B using FDA-approved Emetine resulted in targeted

inhibition the NF κ B super-repressor I κ B alpha. Emetine also disrupted cancer stem cells (CSC) by inhibiting the I κ k- β subunit and inducing apoptosis.

Methods

Human Tissue Specimens

Cases of MEC diagnosed between January 1995 and December 2010 were retrieved from archives of the Pathology Service of Clinic Hospital in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil (Human Research Ethics Committee approval: 11739012.1.0000.5327). The original hematoxylin-eosin stained slides were reviewed to confirm the diagnosis.

Immunohistochemistry

MEC samples were sectioned into 3- μ m sections, deparaffinized in xylene and hydrated in descending grades of ethanol. Endogenous peroxidase activity was blocked using 5% hydrogen peroxide in two 15-minute baths. The avidin-biotin blocking kit was used to block nonspecific binding (Kit Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Slides were incubated overnight with anti- NF κ B p65 (BD Biosciences, Mountain View, CA, USA) and then incubated with diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and counterstained with Mayer's hematoxylin.

Cell lines

MEC cell lines UM-HMC-3A, UM-HMC-3B and UM-HMC-5, were initially described by Warner et al. (2013). Cells were maintained in a 5% CO₂ humidified incubator at 37°C and cultured in RPMI 1640 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) supplement with 10% Fetal Bovine Serum (Thermo Scientific), 1% antibiotic (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1% L-glutamine (Invitrogen), 20 ng/ml epidermal growth factor (Sigma–Aldrich), 400 ng/ml hydrocortisone (Sigma–Aldrich) and 5 μ g/ml insulin (Sigma–Aldrich). UM-HMC-3A, UM-HMC-3B, and UM-HMC-5 were

treated with 0.10 μ M, 0.26 μ M, and 0.08 μ M of Emetine dihydrochloride hydrate (Sigma–Aldrich), respectively, and 10 ng/ml of TNF- α (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA).

Ionizing radiation (IR)

Ionizing radiation (IR) was performed at a dose of approximately 2 Gy/min using a Philips RT250 (Kimtron Medical, Oxford, CT, USA) in the University of Michigan Comprehensive Cancer Center Experimental Irradiation Core (Ann Arbor, MI). Dosimetry was performed using an ionization chamber connected to an electrometer system that is directly traceable to a National Institute of Standards and Technology calibration.

Clonogenic survival assay

For the clonogenic assay, cells were plated into 6-well cell culture plates at a concentration previously determined by plating efficiency. After overnight incubation, cells were exposed to a range of IR doses with or without pretreatment, as indicated in individual experiments. The cells were allowed to grow for an additional 7 days to form colonies and then stained with 0.1% crystal violet. Colonies with more than 50 cells were counted as surviving colonies and normalized with the colony number observed in nonirradiated cells.

Immunofluorescence

Cells were placed on glass coverslips in 6-well plates. After the indicated treatment, cells were fixed with absolute methanol at -20 °C for 5 min. Cells were blocked in 0.5% (v/v) Triton X-100 in PBS and 3% (w/v) bovine serum albumin (BSA) and then incubated with anti-Ki67 (MIB-1) (Dako, Glostrup, Denmark) or anti-p65 (ser15, Cell Signaling Technology). Cells were then washed three times, incubated with FITC-conjugated secondary antibody and stained with Hoechst 33342 for visualization of DNA content and mitotic figures. Images were taken using a QImaging ExiAqua monochrome digital camera attached to a Nikon Eclipse 80i Microscope (Nikon, Melville, NY, USA) and visualized with

QCapturePro software.

Immunoblotting

Cells were harvested in RIPA buffer and briefly sonicated. Protein lysates were separated by 10% to 15% SDS–PAGE and transferred to a polyvinyl difluoride membrane (Immobilon) (Millipore, Billerica, MA, USA). Membranes were blocked in 0.1 M Tris (pH 7.5), 0.9% NaCl and 0.05% Tween-20 (TBS-T) with 5% nonfat dry milk. Membranes were incubated with anti-phospho-NF κ B p65 (Ser536) or (ser15)(Cell Signaling), anti-phospho-I κ B- α (Ser32) (Cell Signaling), anti-IKK- α (p45) (Millipore), anti-IKK- β (Millipore), anti-p16 (BD Biosciences), anti-p21 (BD Biosciences), anti-p53 (Ser15) (Cell Signaling), and anti-p53 (Cell Signaling, clone 7F5). GAPDH (Millipore) served as a loading control. The reaction was visualized using ECL SuperSignal West Pico Substrate (Pierce Biotechnology, Waltham, MA, USA).

Flow Cytometry

Cell cycle distribution was accessed by propidium iodide staining. After treatment with Emetine, cells were harvested and fixed with 70% ethanol on ice for 2 hours. The cell pellet was resuspended in 0.5 mL PBS containing 0.25% Triton X-100 for permeabilization and incubated for 15 minutes on ice. Cells were then incubated with PBS containing propidium iodide (Sigma-Aldrich; 20 μ g/mL) and RNase solution (Sigma-Aldrich; 10 μ g/mL) for 30 minutes at room temperature. The relative number of cells in different phases of the cell cycle were assessed by flow cytometry, and the percentages of cells in subG0/G1, G1, S and G2 were calculated.

MEC cancer stem cell-like cells were identified by aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity using flow cytometry. The Aldefluor kit (StemCell Technologies, Durham, NC, USA) was used according to the manufacturer's instructions to identify cells with high ALDH enzymatic activity. Cells with or without pretreatment, as indicated in individual experiments, were suspended with activated Aldefluor substrate (BODIPY amino acetate) or negative control (dimethylamino

benzaldehyde, a specific ALDH inhibitor) for 45 minutes at 37°C. All samples were analyzed using a FACS Canto IV (BD Biosciences) at the University of Michigan Flow Cytometry Core.

Statistical analysis

All statistical analysis was performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Statistical analysis of the mitosis assay, Ki67 staining, and flow cytometry were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison tests. Asterisks denote statistical significance (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; and NS $p > 0.05$).

Results

Ionizing radiation differentially affects mucoepidermoid carcinoma cell lines

SGC are historically recognized to be radioresistant. Nevertheless, IR is widely used for the treatment of advanced and high-grade tumors. This historical concept is based on cross-sectional studies of lung cancer that observed poor local control rates of tumors receiving conventional doses of radiotherapy [27]. Little is known about the radiosensitivity of SGC given the small number of available tumor cell lines. For the first time, we evaluated the response of three different MEC cell lines, recently established at the University of Michigan School of Dentistry, [28, 29] using a wide range of IR doses (0, 2, 4, 6 and 8 Gy). Radiosensitivity differed among the cell lines (Fig 1A). The most sensitive MEC cell lines (UM-HMC-3A and UM-HMC-3B) had a survival fraction at 2 Gy (SF_2) of 0.81 while UM-HMC-5 had an SF_2 of 0.97. Previous studies have shown that other carcinomas cells, such as cervical squamous cell carcinoma, have a much lower SF_2 (0.27 to 0.75) compared to our MEC cell lines [30]. Despite UM-HMC-3A and UM-HMC-3B cells having similar SF_2 values, the metastatic lymph node UM-HMC-3B cells had increased resistance to IR at intermediate levels of radiation (4 and 6 Gy, *** $p < 0.001$)(Fig. 1A).

To further characterize the resistance phenotype observed in MEC cells, we examined their proliferation in response to various doses of radiation. To our

surprise, UM-HMC5 radioresistance phenotype was directly associated with the maintenance of basal levels of cellular proliferation, as measured by Ki67 (Fig. 1B). Reduced proliferation was only observed in response to high doses of IR (8Gy, * $p < 0.05$). We observed a statistically significant reduction in proliferation at smaller doses of IR (4Gy and 6Gy) in UM-HMC-3A and UM-HMC-3B cells, respectively. Interestingly, a low dose of IR (2Gy) induced an increase in the number of abnormal mitotic figures in UM-HMC-5 cells that is defined by the presence of multipolar, ring, dispersed, asymmetrical and lag-type mitoses (Suppl. Fig. 1)

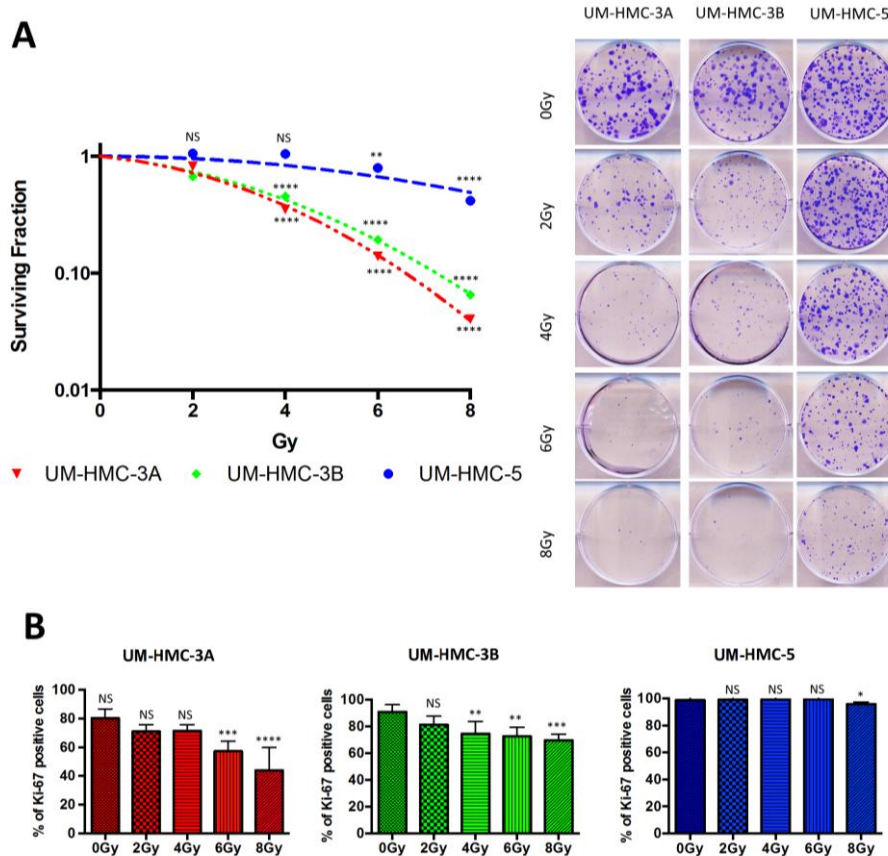
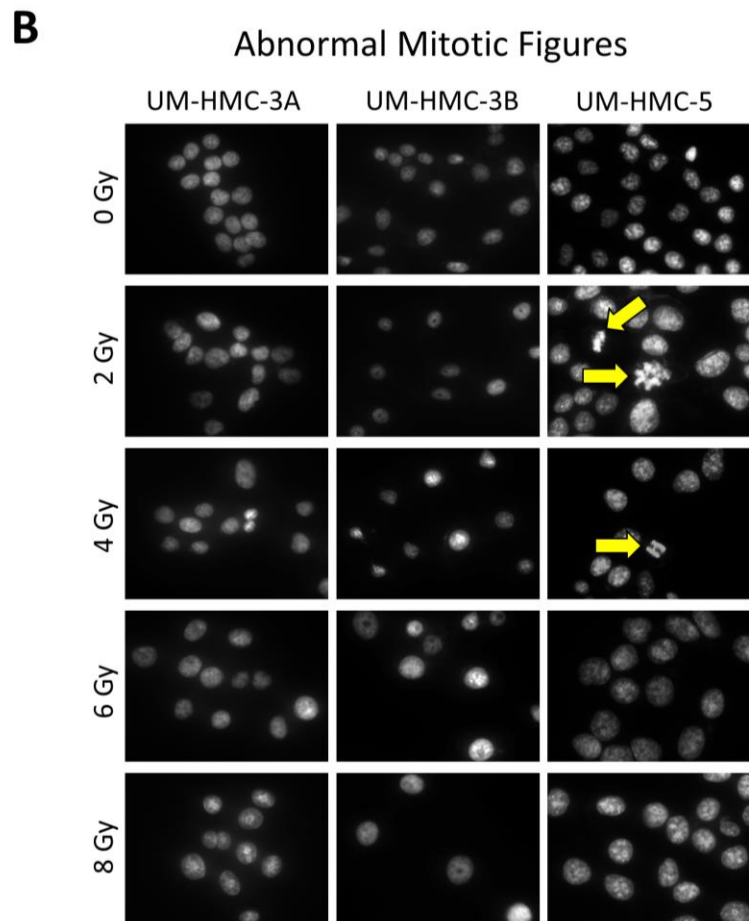
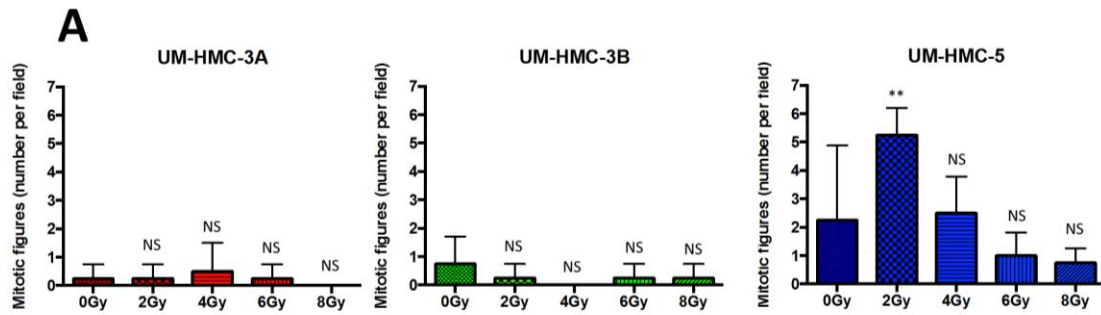


Figure 1. Intrinsic resistance of MEC cells to IR. (A) Clonogenic survival was measured 7 days after IR (0-8 Gy). The data are expressed as mean \pm SD (n=3) of survival fraction compared to nonirradiated cells. Colonies consisting of more than 50 cells were scored as surviving colonies. (B) Cells were stained for Ki67 24hrs after IR, scored for positive nuclear staining and presented as a percentage of the total cell number (n=3).



Supplementary Figure 1. IR stimulates abnormal mitotic figures in UM-HMC-5. There is a significant increase in mitotic figures in UM-HMC-5 upon exposure to 2 Gy of IR ($n = 3$, mean \pm SD), as revealed by quantification of mitotic figures per field in all MEC cell lines. Representative images of MEC cell lines after IR (0 - 8 Gy) and staining with Hoechst 33342 for visualization of DNA content. Note the abnormal mitotic figures in UM-HMC-5 with 2Gy and 4Gy (yellow arrows).

Mucoepidermoid carcinomas express high basal levels of NF κ B

NF κ B is a crucial player in several steps of cancer initiation and progression, primarily due to its strong anti-apoptotic effect in cancer cells [31]. In most cell types, NF κ B dimers are predominantly inactive in the cytoplasm; however, cancer cells typically have high NF κ B activity [16]. We analyzed the protein expression of nuclear NF κ B (active form) in human samples of MEC and normal salivary gland (NSG). Interestingly, although NF κ B is predominantly cytoplasmic in NSG samples (Fig. 2A arrowhead; mean 0.5% of nuclear staining/sample), all MEC samples were positive for nuclear NF κ B (10.1% - 20.5% of nuclear staining/sample) (Fig. 2A arrow). Further, we have explored the presence and localization of NF κ B in our MEC cell lines. Similar to the observed in paraffin sections of human MEC tumors, all cell lines expressed nuclear NF κ B (Fig. 2B). Nuclear NF κ B is associated with poor prognosis in several cancers, including rectal [32], esophageal [33] and head and neck cancers [34]. In adenoid cystic carcinomas, NF κ B expression is considered an independent prognostic factor associated with poor overall survival [35]. Although no clinical association could be established in our samples, the increase in active NF κ B suggests that this pathway plays a role in MEC behavior. However, it is unknown whether high basal levels of NF κ B are associated with resistance to radiotherapy in MEC.

IR induces accumulation of NF κ B and activation of the NF κ B signaling pathway induces IR resistance

To better understand the correlation between NF κ B expression and tumor resistance to radiotherapy, we examined the effects of IR on NF κ B activity in MEC. We exposed our three MEC cell lines to 2Gy of radiation, which is the daily fraction dose recommended for MEC patients receiving radiotherapy [1]. As revealed by Western Blotting, all MEC cell lines had detectable levels of NF κ B at baseline (0Gy), corroborating to our findings from patient samples that showed detectable levels of NF κ B. Interestingly, 2Gy IR-induced the accumulation of NF κ B in UM-HMC-5, but had no effect on NF κ B in UM-HMC-3A and UM-HMC-3B (Fig. 2C, *p<0.05), corroborating to our previous finding that UM-HMC-5 have a higher

resistance profile. Notably, our findings suggest that certain MEC patients may not benefit from fractionated radiotherapy; in contrast, 2Gy IR may stimulate radio-adaptive resistance through NF κ B signaling. In addition, administration of the clinically relevant 2Gy dose resulted in a substantial increase in mitosis, including the presence of aberrant mitotic figures (Suppl. Fig. 1, arrows ** $p < 0.01$).

We next explored whether upregulation of NF κ B directly influences MEC resistance to IR. Active NF κ B signaling induces anti-apoptotic proteins, resulting in tumor cells evading radiotherapy [12]. Using a clonogenic assay, we found that stimulation of the NF κ B pathway using TNF- α led to increased resistance of UM-HMC-3A and UM-HMC-3B tumor cells to IR (Fig. 2D). Interestingly, UM-HMC-5, which previously showed elevated radioresistance (Fig. 1A) and NF κ B levels (Fig. 2C NS $p > 0.05$, * $p < 0.05$) in response to IR, did not benefit from TNF- α (Fig. 2D). We observed that NF κ B activation markedly increased the resistance of MEC cell lines to IR. In response to all IR doses, UM-HMC-3A and UM-HMC-3B cells stimulated with TNF- α were more resistant than the control (Figure 2D, NS $p > 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Our findings suggest that UM-HMC-5 cell respond to low doses of radiation by inducing the activation of the NF κ B signaling pathway, and that administration of TNF- α does little to further activate the NF κ B signaling on UM-HMC-5 when compared to the UM-HMC-3A and 3B cell lines. Although we have established a correlation between the NF κ B pathway and MEC resistance to radiotherapy, the clinical relevance of inhibiting this pathway in MEC is unknown.

In search for a potential mechanism associated with increased resistance to chemotherapy of UM-HMC-5 cell line, we explored the p53 status of our MEC cell lines. We used a phospho-p53 antibody phosphorylated at the serine 15 that is associated with p53 gain of function (active). Indeed, we found that p53 is highly expressed in UM-HMC-5 cell line compared to UM-HMC-3A and 3B cells in which the p53 levels could not be detected (Fig. 2E). Similar to the accumulation of phosphorylated p53 protein, the total amount of p53 protein (not phosphorylated) was also very high compared to UM-HMC-3A and 3B. It has been demonstrated that p53 gain of function is often associated with mutations and constitutive expression of mutant p53 interferes with the process of apoptosis, a major and

essential event for the success of any anticancer treatment. While p53 wild type cell lines are more sensitive to DNA damaging agents, mutant p53 confers resistance to DNA-damage related apoptosis [36]. Besides, p53 protein is responsible for prolonged arrest following IR exposure, thereby facilitating the DNA repair in the absence of apoptosis [37]. The absence of p53 observed in UM-HMC-3A and 3B cell lines support the notion that tumors presenting inactivate p53 lack the ability to repair the DNA. Lack of p53, and increased sensitive to DNA-damage result in mitotic catastrophe, the main antitumor mechanism associated to irradiation [37].

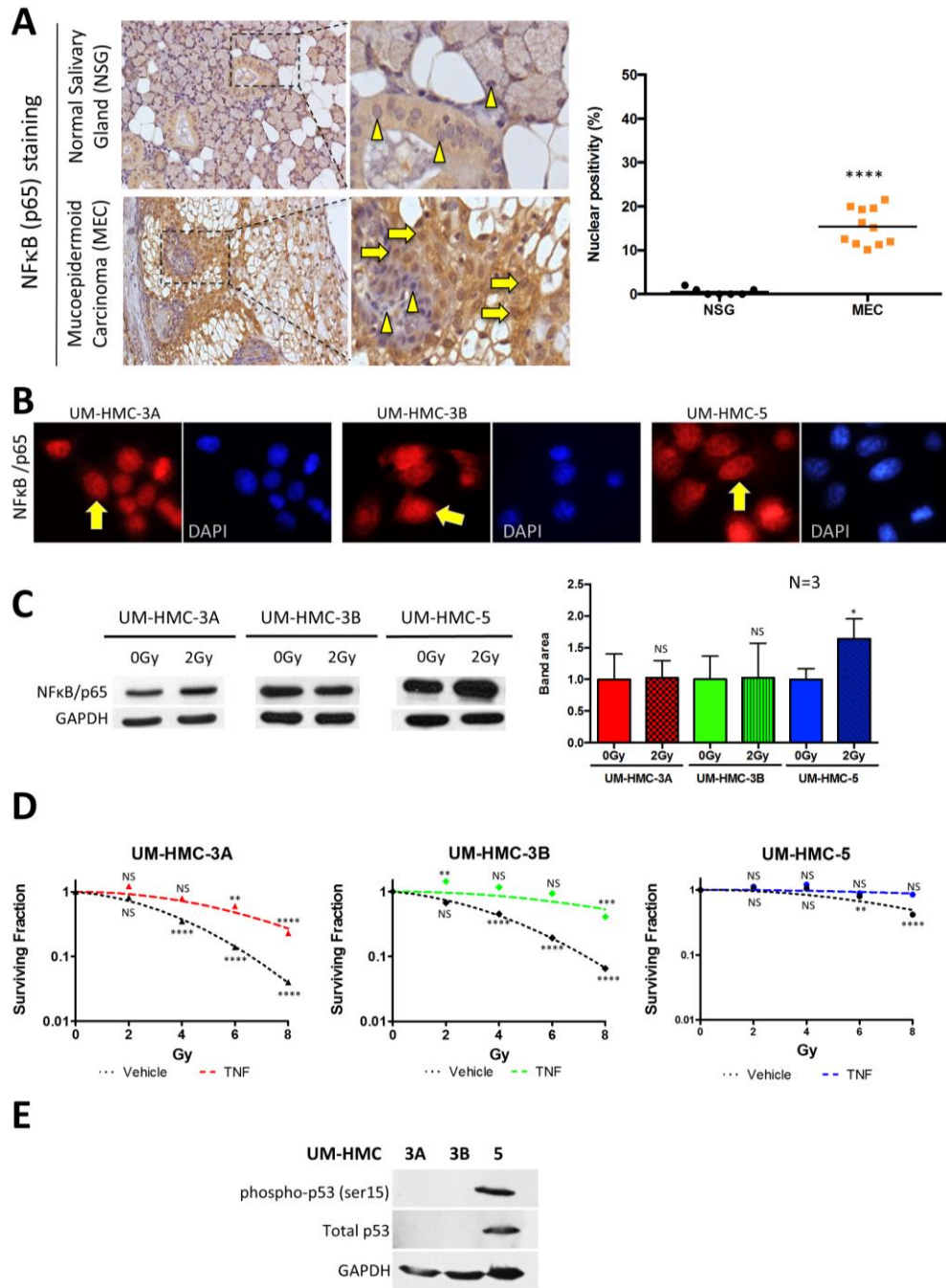


Figure 2. Activation of NFκB in MEC. (A) NFκB (p65) (yellow arrows) was significantly increased in the nucleus of MEC samples compared to normal salivary glands, which showed prevalent cytoplasmic staining (arrowhead) (** $p < 0.001$, $n = 11$, mean \pm SD). (B) Immunofluorescence of UM-HMC-3A, UM-HMC-3B, and UM-HMC-5 tumor cell lines depict the presence of nuclear NFκB (yellow arrows). (C) UM-HMC-3A, UM-HMC-3B, and UM-HMC-5 show detectable NFκB (p65) protein levels at baseline (0Gy). NFκB is increased in UM-HMC-5 following 2Gy of IR (* $p < 0.05$, mean \pm SD from experiments run in triplicate). (D) Clonogenic assay for MEC cells with no stimuli or TNF- α stimuli revealed that NFκB upregulation significantly increases the resistance of UM-HMC-3A and UM-HMC-3B (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, $n = 3$, mean \pm SD compared to 0Gy). (E) Western blot of UM-HMC-3A, UM-HMC-3B, and UM-HMC-5 for phosphorylated p53 (ser15) depict high expression of the p53 protein on UM-HMC-5 cells. UM-HMC-3A and 3B are absent of p53 protein levels.

Emetine-induced inhibition of NF κ B is mediated by downregulation of I κ B- α /IKK- β and p21

Targeted inhibition of NF κ B is a promising novel adjuvant treatment for sensitizing cancer cells to radiotherapy. Encouraging results have been reported in different solid tumors, such as colorectal [24] and prostate [38] cancer. However, FDA-approved NF κ B inhibitors, such as Bortezomib, are proteasome inhibitors that target the multi-catalytic proteinase complex involved in protein degradation. Inhibitors like Bortezomib downregulate NF κ B but also increase targeted activity of cell cycle proteins and apoptosis-associated pathways [39]. Recently, Emetine, a drug purified from the ipecac root, was shown to be a novel selective inhibitor of NF κ B [40]. FDA-approved Emetine has emetic properties and has been used for decades to treat protozoan infections. Emetine selectively inhibits I κ B α phosphorylation at Ser32, thereby preventing NF κ B from translocating to the nucleus and altering gene expression [40]. We assessed the ability of Emetine to inhibit the NF κ B pathway in MEC tumor cells. We found that Emetine efficiently reduced phosphorylated I κ B- α and NF κ B protein (Fig. 3A). Surprisingly, Emetine downregulated IKK- β , but not IKK- α , subunit protein (Figure 3A). IKK- β activation triggers the canonical NF κ B pathway [41] and regulates several pro-survival and anti-apoptotic genes, including Bcl2, Bcl-XL, and XIAP [42]. Interestingly, the effect of Emetine on IKK- β has not been observed in other systems. Our results also demonstrated that Emetine downregulated p21 expression. Although earlier studies suggested that p21 suppresses cancer through promotion of cell cycle arrest, cellular differentiation, and senescence, recent studies suggest that p21 induces proliferation and cellular transformation and is associated with poor prognosis in the prostate, ovarian, cervical, breast, brain, and esophageal squamous cell carcinomas [43-50]. Indeed, MEC tumor cell lines expressing p21 (Fig. 3B) failed to activate senescence (Fig. 3C), as measured by p16^{ink4} levels, in basal conditions and following administration of Emetine, suggesting that p21 acts as an oncogene in MEC, as it does in other cancers. Supporting our findings, Emetine downregulated p65 and IKK- β and further suppressed p21, leading to

reduced colony formation in all analyzed MEC cell lines (Fig. 3D, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). Although we have not assessed if p53 is mutated in our cell lines, the data show an interesting pattern previously demonstrated by the group of Manuel Serrano in head and neck cancers, in which high levels of p21 do not correlate to p53 levels but does correlate with better survival rates [51], and in our case, more sensitize tumor cells to radiation (UM-HMC3A and 3B). In Ovarian cancer, the group of Berchuck has shown that the presence of mutated p53 is usually associated with decreased p21 expression [52]. Our findings suggest a potential p53 dependent mechanism associated to UM-HMC-5 resistance to radiotherapy. Notably, MEC cells are sensitive to NF κ B inhibition, suggesting tumor progression is dependent on this pathway. Indeed, as compared to UM-HMC3A and UM-HMC5 cells, the metastatic UM-HMC3B cells were so sensitive to Emetine that we could not identify the formation of tumor colonies (Fig 3D). Impaired colony formation was due, in part, to the activation of apoptosis in UM-HMC3B cells, as shown by the SubG0/G1 peak during cell cycle analysis (Fig. 3E).

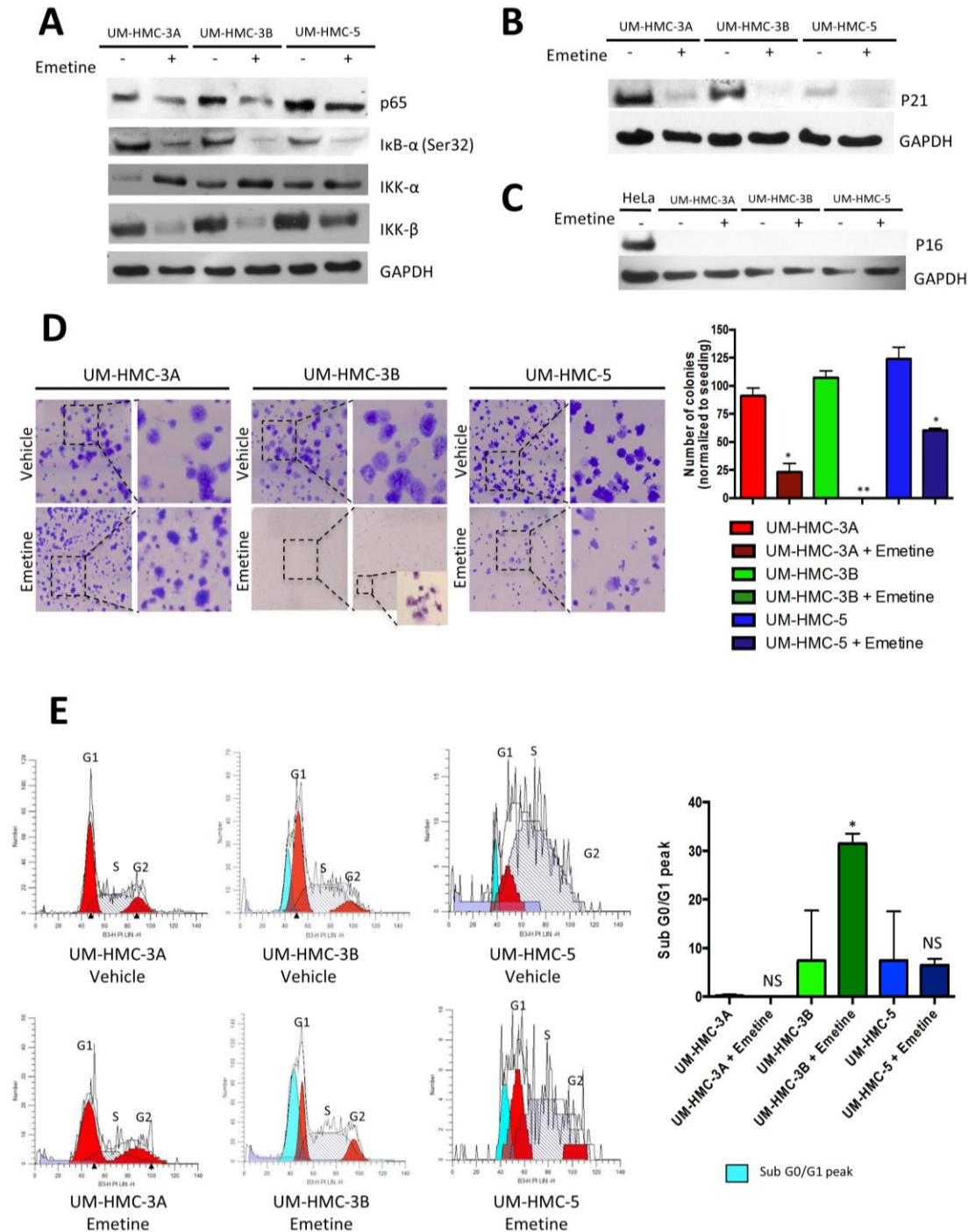


Figure 3. Emetine induces inhibition of the IKK- β /I κ B- α /NF κ B axis and induces apoptosis of UM-HMC-3B. (A) Down-regulation of NF κ B expression in MEC cells after Emetine treatment for 24 hrs was confirmed by Western blot analysis. Emetine inhibited I κ B- α (Ser32) and IKK- β phosphorylation but did not affect the IKK- α subunit. (B) Emetine treatment for 24 hrs lead to p21 inhibition, and (C) had no effect on p16. (D) Emetine disrupted the colony forming potential of MEC cells. UM-HMC-3A and UM-HMC-5 treated for 24hrs with Emetine had a significantly smaller number of colonies after 7 days in culture while UM-HMC-3B did not have colonies larger than 50 cells. (E) Emetine causes cell cycle arrest at the sub G0/G1 checkpoint in UM-HMC-3B cells (* p <0.05).

Inhibition of the IKK- β /I κ B- α /NF κ B signaling axis sensitizes MEC cells to IR

Following our previous finding that activation of the NF κ B pathway increases MEC resistance to IR, we hypothesized that inactivation of the pathway by Emetine would sensitize cells to IR. To test this hypothesis, we treated all cell lines with Emetine 24 hours before irradiation. To properly understand the therapeutic efficacy of Emetine as a sensitizing agent, we removed Emetine from the culture media prior to irradiation (Fig. 4A). Tumor cells were allowed to grow for 7 days before we assessed colony formation. Control tumor cells received radiation alone. We observed major declines in the surviving fraction at all IR doses when NF κ B was inhibited prior to irradiation (Figure 4B). When UM-HMC-3A and UM-HMC-5 were sensitized with Emetine, we achieved a mean improvement in the SF₂ of 24.8%. UM-HMC5 cells, originally very resistant, were sensitized to irradiation following NF κ B inhibition (Fig. 4B). Collectively, our data suggests that NF κ B activation promotes IR resistance, and that pharmacological inhibition of NF κ B sensitizes MEC cells to IR.

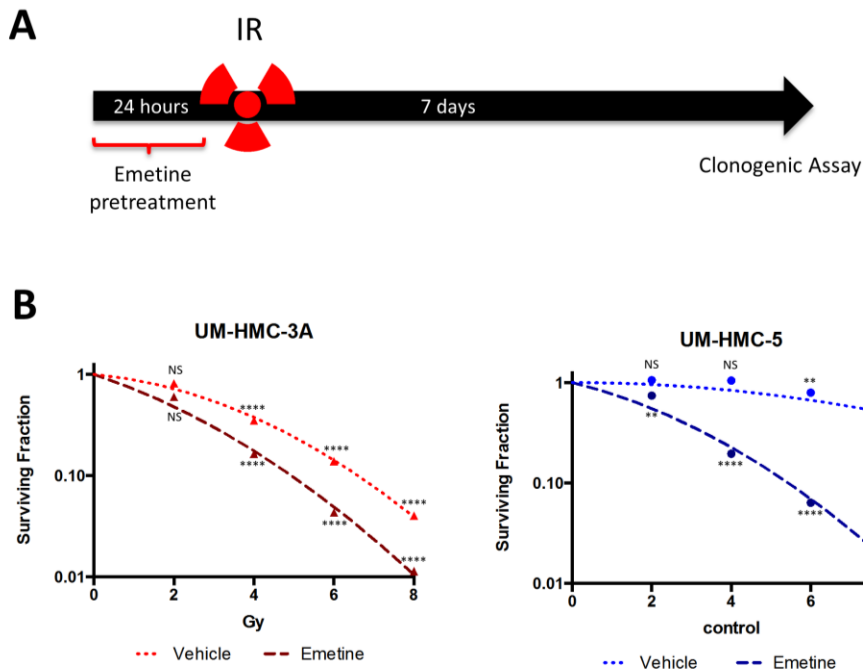


Figure 4. Pharmacological inhibition of NF κ B sensitizes MEC cells to IR. (A) Cells were sensitized with Emetine for 24 hrs before IR. The drug was removed before IR exposure, and the clonogenic assay was performed after 7 days. (B) Survival was significantly decreased in UM-HMC-3A and UM-HMC-5 sensitized with Emetine compared to vehicle ($n = 3$, mean \pm S, D compared to 0 Gy).

Emetine-induced inhibition of the IKK- β /I κ B- α /NF κ B signaling axis potentialize the ability of IR to deplete MEC cancer stem cells (CSCs)

Among the mechanisms involved in the acquisition of resistance in cancer cells are the activation of NF κ B signaling and the presence of CSCs [53-55]. CSCs represent a subset of tumor cells that have stem cell-like properties, such as self-renewal and multipotency. Recently, Adams et al. demonstrated that MEC contains a small population of CSCs with enhanced tumorigenic potential [29]. Both NF κ B and CSCs are closely interrelated and inhibition of the NF κ B pathway blocks the expression of genes associated with stem cells, including Nanog and Sox2 in mammary cells [56]. Furthermore, canonical and noncanonical NF κ B signaling drives CSC maintenance in breast cancer cells [57]. We found that targeted inhibition of NF κ B resulted in sensitization of MEC tumor cells to IR (Fig. 4B), but we did not know whether Emetine would affect CSCs. Using a similar approach described earlier, we administered Emetine 24 hours before IR (Fig. 5A). Seven days after IR, tumor cells were collected and processed for ALDH enzymatic activity using fluorescence-activated cell sorting (FACS). Interestingly, combined administration of Emetine and IR resulted in further depletion of CSCs in all MEC tumor cells compared to radiation alone (Fig. 5B). Radiation alone failed to reduce CSCs in UM-HMC3B cells (ns $p > 0.05$) and only slightly, but significantly, reduced CSCs in UM-HMC3A cells ($*p < 0.05$). However, sensitizing the cells with Emetine resulted in a significant reduction in CSCs in UM-HMC3A and UM-HMC3B MEC cells compared to controls (0Gy) ($**p < 0.01$). CSCs were significantly reduced in UM-HMC5 cells in response to radiation alone compared to controls (0Gy) ($***p < 0.001$); nonetheless, Emetine further reduced CSCs in UM-HMC5 cells (Fig. 5B $***p < 0.001$). Our findings demonstrate that inhibition of the NF κ B signaling pathway in MEC tumors is an effective therapeutic strategy to sensitize tumor cells to radiation independent of the initial resistance of each cell line to radiation.

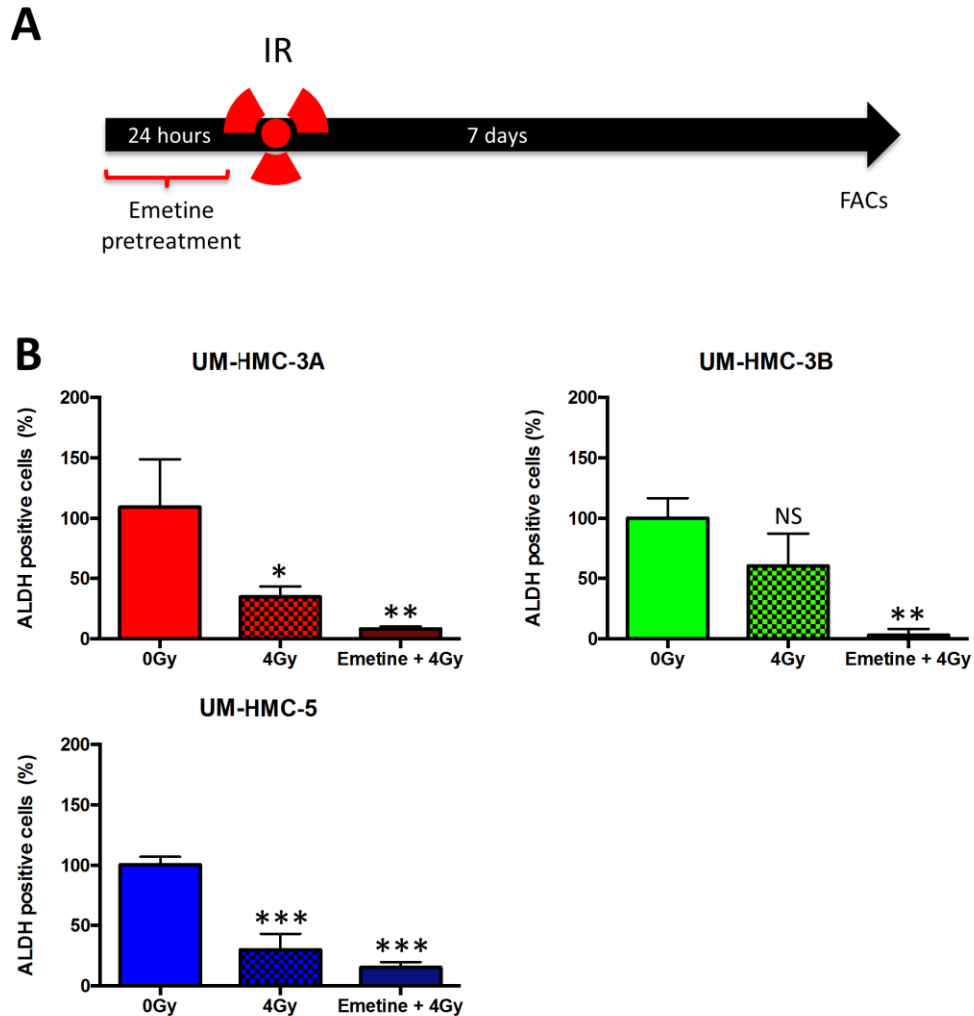


Figure 5. A combination of NF κ B inhibition and IR efficiently deplete CSCs. (A) Cells were sensitized with Emetine for 24 hrs; Emetine was removed from the media before IR. Cells were collected and processed for ALDH enzymatic activity using fluorescence-activated cell sorting (FACS). (B) A combination of NF κ B inhibition and IR leads to enhanced depletion of CSCs in MEC cell lines compared to radiation alone (n = 3, mean \pm SD).

Discussion

MEC represents the most common malignant SGC [4-6]. In contrast to other glandular tumors, significant advances in treatment and overall survival for SGC patients have not improved in the last three decades. Surgery remains the first-line therapy option for MEC. Tumors located in the parotid gland usually require superficial or radical parotidectomy for infiltrative cases, compromising the maintenance of the facial nerve [1]. For minor SGC, commonly located in the palate, maxillectomy is typically required [58]. The amount of sequels and high

morbidity, which is associated with low survival rates over long-term periods, underscore the need to identify therapies that improve survival and quality of life. It is estimated that more than 80% of SGC patients will need radiotherapy as first-line or adjuvant therapy [8]. However, both intrinsic resistance of MEC cells to IR and the basic mechanisms underlying acquired resistance remain unexplored. We have provided initial evidence regarding the molecular response of MEC cells to IR. We showed that radioresistance of MEC is NF κ B-dependent and that targeting this pathway with Emetine improves the efficiency of IR *in vitro*. Administering a single dose of Emetine before IR sensitizes the majority of the tumor cells, including CSCs.

Emetine is a natural crystalline alkaloid found in ipecac syrup, which is derived from *Psychotria ipecacuanha*. Emetine has been widely used to treat amoebiasis since the early 1900s [59]. The earliest report describing the use of Emetine as an anti-neoplastic drug dates to 1918; however, Phase I/II clinical trials using emetine were not performed by the NCI until the mid-1970s [60-62]. Due to disparate results with Emetine, ranging from no clinical benefit to disease stabilization/tumor regression, it was not widely studied for its anti-neoplastic properties for many years. It was not until the 2000s that new reports examining the effect of Emetine on neoplastic cells emerged [63-69]. The identification of new therapeutic applications of already approved drugs is referred to as drug repurposing. Given that 80% of new drugs that enter human clinical testing are never approved for use, repurposing has the advantages of reduced safety risks, faster access to treatment and decreased cost [70, 71]. Because more than \$90 billion is spent on the development of oncology drugs, and it takes more than 14 years for a promising new molecule to be translated to an approved drug, the National Center for Advancing Translational Sciences (NCATS) at NIH is funding projects that can provide Phase I/II proof-of-principle data using repurposed drugs [72]. Previous studies demonstrated that Emetine induces apoptosis in ovarian carcinoma [66], leukemic [64] and pancreatic cells [69] and arrests growth of bladder cancer cells [67]. Moreover, the daily subcutaneous dose of 1 mg/kg Emetine does not cause toxicity in patients [61], highlighting its safety in humans.

A recent study by Miller et al. showed that Emetine inhibits I κ B- α phosphorylation [40] but, to our knowledge, we are the first to examine this effect in cancer treatment.

Reactive oxygen species (ROS) and increased DNA damage triggered by IR activates nuclear ataxia telangiectasia mutated (ATM) signaling, resulting in activation of the IKK complex [12]. An active IKK complex induces I κ B degradation and translocation of NF κ B to the nucleus [16]. In the early 2000s, it was found that NF κ B activation is associated with radioresistance in breast cancer cells following fractionated IR treatment [73, 74]. A recent study showed that NF κ B activation protects from radiation in human Ewing sarcoma, neuroblastoma, breast, bladder, colon, prostate and lung cancer cells. In this study, high doses of IR (4 Gy) induced cell death; nevertheless, a previous study showed that sub-lethal doses of IR (2, 10, 50 or 100 cGy) induced NF κ B activation and prevented cell death compared to higher doses of IR [13]. We demonstrated that a low-dose of IR (2 Gy) activated NF κ B in the most resistant MEC cell line. Further, when the NF κ B pathway was activated in MEC cells through a TNF- α stimulus, resistance was enhanced in the most IR-sensitive cell lines. These findings significantly advance our understanding of IR-adaptive resistance in MEC cells, a field not previously explored. Also, our findings suggest that radioresistant MEC tumors are likely to respond to radiation by overexpressing NF κ B signaling to levels that confer radioresistance, similar to the achieved upon administration of TNF- α (Fig. 2D). Inhibition of NF κ B signaling in combination with IR may be a novel treatment for MEC. We showed that disrupting the NF κ B pathway using Emetine before IR significantly increased the sensitivity of MECs to IR and that Emetine combined with IR decreased CSCs.

CSCs are a subset of tumor cells that self-renew and are multipotent with the ability to generate heterogeneous lineages of neoplastic cells that comprise the tumor. Thus, treatment will only be successful if it destroys CSCs, and this needs to be considered when optimizing anti-neoplastic drugs so as not to underestimate curative potential. Numerous findings suggest that intrinsic tumor

radioresistance is associated with a higher proportion of CSCs [75-77]. Kurth et al. found that ALDH+ head and neck cancer cells maintain their tumorigenic properties after irradiation, increasing the chances of recurrence [54]. Failure to eradicate CSCs after IR may result in tumor recurrence and neoplastic cell dissemination, leading to local or distant metastasis. IR alone had no effect on CSCs in our metastatic cell line (UM-HMC-3B), which is alarming given that one of the main indications for IR treatment in MEC patients is the presence of advanced disease [1]. Targeting NF κ B to disrupt CSCs is based on evidence that inhibition of NF κ B downregulates genes associated with stemness properties, such as Nanog and Sox2 [56]. By sensitizing MEC cells to IR using Emetine, we were able to eradicate CSCs. Our findings strongly support the combination of NF κ B inhibition and IR as a promising treatment option for MEC patients because it targets the bulk of the tumor in addition to CSCs.

To establish new strategies that improve the efficacy of IR, we must understand the biological factors involved in radiotherapy outcomes. While various pathways have been associated with radioresistance in different types of tumors, we must consider tumor specificity. Certain tumor types may benefit from a specifically targeted inhibition that is not successful in other types of tumors. Until now, the mechanisms underlying MEC radioresistance were unknown. We showed that sensitizing MEC cells with Emetine improved the SF₂, the most relevant IR dose in the clinic, by 24.8%. Tumor control rates can be improved by 5-30% by increasing the effective dose IR by just 10% (reviewed in [22]). Our study highlights the importance of Emetine as a sensitizer agent to radiation. Although these results bring an encouraging and promising therapeutic strategy to manage MEC patients, it's important to emphasize that *in vivo* studies are necessary to confirm our preliminary data.

Acknowledgments: This work was conducted during a visiting scholar period at University of Michigan, sponsored by the Capes Foundation within the Ministry of Education, Brazil (grant n. BEX / 99999.007990/2014-06). This grant was funded by the University of Michigan School of Dentistry faculty grant, and the Cancer

Center Support Grant (P30 CA046592). The authors are grateful to David Karnak for technical support. The funders had no role in study design, data collection, and analysis, decision to publish, or preparation of the paper.

References

1. Guzzo M, Locati LD, Prott FJ, Gatta G, McGurk M and Licitra L. Major and minor salivary gland tumors. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2010; 74(2):134-148.
2. Carvalho AL, Nishimoto IN, Califano JA and Kowalski LP. Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: a site-specific analysis of the SEER database. *Int J Cancer*. 2005; 114(5):806-816.
3. Terhaard CH, Lubsen H, Van der Tweel I, Hilgers FJ, Eijkenboom WM, Marres HA, Tjho-Heslinga RE, de Jong JM, Roodenburg JL, Dutch H and Neck Oncology Cooperative G. Salivary gland carcinoma: independent prognostic factors for locoregional control, distant metastases, and overall survival: results of the Dutch head and neck oncology cooperative group. *Head Neck*. 2004; 26(8):681-692; discussion 692-683.
4. Fonseca FP, Carvalho Mde V, de Almeida OP, Rangel AL, Takizawa MC, Bueno AG and Vargas PA. Clinicopathologic analysis of 493 cases of salivary gland tumors in a Southern Brazilian population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012; 114(2):230-239.
5. Spiro RH. Salivary neoplasms: overview of a 35-year experience with 2,807 patients. *Head Neck Surg*. 1986; 8(3):177-184.
6. Jones AV, Craig GT, Speight PM and Franklin CD. The range and demographics of salivary gland tumours diagnosed in a UK population. *Oral Oncol*. 2008; 44(4):407-417.
7. Cerda T, Sun XS, Vignot S, Marcy PY, Baujat B, Baglin AC, Ali AM, Testelin S, Reyt E, Janot F and Thariat J. A rationale for chemoradiation (vs radiotherapy) in salivary gland cancers? On behalf of the REFCOR (French rare head and neck cancer network). *Crit Rev Oncol Hematol*. 2014; 91(2):142-158.
8. Delaney G, Jacob S, Featherstone C and Barton M. The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. *Cancer*. 2005; 104(6):1129-1137.
9. Eriksson D and Stigbrand T. Radiation-induced cell death mechanisms. *Tumour Biol*. 2010; 31(4):363-372.
10. Gerweck LE, Vijayappa S, Kurimasa A, Ogawa K and Chen DJ. Tumor cell radiosensitivity is a major determinant of tumor response to radiation. *Cancer Res*. 2006; 66(17):8352-8355.
11. Kim JJ and Tannock IF. Repopulation of cancer cells during therapy: an important cause of treatment failure. *Nat Rev Cancer*. 2005; 5(7):516-525.
12. Ahmed KM and Li JJ. NF-kappa B-mediated adaptive resistance to ionizing radiation. *Free Radic Biol Med*. 2008; 44(1):1-13.
13. Aravindan N, Aravindan S, Pandian V, Khan FH, Ramraj SK, Natt P and Natarajan M. Acquired tumor cell radiation resistance at the treatment site is

mediated through radiation-orchestrated intercellular communication. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2014; 88(3):677-685.

14. Dolcet X, Llobet D, Pallares J and Matias-Guiu X. NF- κ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch.* 2005; 446(5):475-482.

15. Wu L, Shao L, An N, Wang J, Pazhanisamy S, Feng W, Hauer-Jensen M, Miyamoto S and Zhou D. IKK β regulates the repair of DNA double-strand breaks induced by ionizing radiation in MCF-7 breast cancer cells. *PLoS One.* 2011; 6(4):e18447.

16. Karin M. Nuclear factor- κ B in cancer development and progression. *Nature.* 2006; 441(7092):431-436.

17. Wang CY, Mayo MW and Baldwin AS, Jr. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF- κ B. *Science.* 1996; 274(5288):784-787.

18. Webster GA and Perkins ND. Transcriptional cross talk between NF- κ B and p53. *Mol Cell Biol.* 1999; 19(5):3485-3495.

19. Almeida LO, Abrahao AC, Rosselli-Murai LK, Giudice FS, Zagni C, Leopoldino AM, Squarize CH and Castilho RM. NF κ B mediates cisplatin resistance through histone modifications in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *FEBS Open Bio.* 2014; 4:96-104.

20. Madhusoodhanan R, Natarajan M, Veeraraghavan J, Herman TS and Aravindan N. NF κ B activity and transcriptional responses in human breast adenocarcinoma cells after single and fractionated irradiation. *Cancer Biol Ther.* 2009; 8(9):765-773.

21. Brach MA, Hass R, Sherman ML, Gunji H, Weichselbaum R and Kufe D. Ionizing radiation induces expression and binding activity of the nuclear factor κ B. *J Clin Invest.* 1991; 88(2):691-695.

22. Begg AC, Stewart FA and Vens C. Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. *Nat Rev Cancer.* 2011; 11(4):239-253.

23. Li F and Sethi G. Targeting transcription factor NF- κ B to overcome chemoresistance and radioresistance in cancer therapy. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1805(2):167-180.

24. Russo SM, Tepper JE, Baldwin AS, Jr., Liu R, Adams J, Elliott P and Cusack JC, Jr. Enhancement of radiosensitivity by proteasome inhibition: implications for a role of NF- κ B. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001; 50(1):183-193.

25. Munshi A, Kurland JF, Nishikawa T, Chiao PJ, Andreeff M and Meyn RE. Inhibition of constitutively activated nuclear factor- κ B radiosensitizes human melanoma cells. *Mol Cancer Ther.* 2004; 3(8):985-992.

26. Aravindan N, Madhusoodhanan R, Ahmad S, Johnson D and Herman TS. Curcumin inhibits NF κ B mediated radioprotection and modulate apoptosis related genes in human neuroblastoma cells. *Cancer Biol Ther.* 2008; 7(4):569-576.

27. Battermann JJ, Breur K, Hart GA and van Peperzeel HA. Observations on pulmonary metastases in patients after single doses and multiple fractions of fast neutrons and cobalt-60 gamma rays. *Eur J Cancer.* 1981; 17(5):539-548.

28. Warner KA, Adams A, Bernardi L, Nor C, Finkel KA, Zhang Z, McLean SA, Helman J, Wolf GT, Divi V, Queimado L, Kaye FJ, Castilho RM and Nor JE. Characterization of tumorigenic cell lines from the recurrence and lymph node

metastasis of a human salivary mucoepidermoid carcinoma. *Oral Oncol.* 2013; 49(11):1059-1066.

29. Adams A, Warner K, Pearson AT, Zhang Z, Kim HS, Mochizuki D, Basura G, Helman J, Mantesso A, Castilho RM, Wicha MS and Nor JE. ALDH/CD44 identifies uniquely tumorigenic cancer stem cells in salivary gland mucoepidermoid carcinomas. *Oncotarget.* 2015; 6(29):26633-26650.

30. Hall JS, Iype R, Senra J, Taylor J, Armenoult L, Oguejiofor K, Li Y, Stratford I, Stern PL, O'Connor MJ, Miller CJ and West CM. Investigation of radiosensitivity gene signatures in cancer cell lines. *PLoS One.* 2014; 9(1):e86329.

31. Hoesel B and Schmid JA. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer.* 2013; 12:86.

32. Berardi R, Maccaroni E, Mandolesi A, Mantello G, Onofri A, Biscotti T, Pierantoni C, Siquini W, Marmorale C, Guerrieri M, Bearzi I and Cascinu S. Nuclear factor-kappaB predicts outcome in locally advanced rectal cancer patients receiving neoadjuvant radio-chemotherapy. *Dig Liver Dis.* 2012; 44(7):617-622.

33. Izzo JG, Malhotra U, Wu TT, Ensor J, Luthra R, Lee JH, Swisher SG, Liao Z, Chao KS, Hittelman WN, Aggarwal BB and Ajani JA. Association of activated transcription factor nuclear factor kappaB with chemoradiation resistance and poor outcome in esophageal carcinoma. *J Clin Oncol.* 2006; 24(5):748-754.

34. Balermipas P, Michel Y, Wagenblast J, Seitz O, Sipek F, Rodel F, Rodel C and Fokas E. Nuclear NF-kappaB expression correlates with outcome among patients with head and neck squamous cell carcinoma treated with primary chemoradiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2013; 86(4):785-790.

35. Zhang J, Peng B and Chen X. Expressions of nuclear factor kappaB, inducible nitric oxide synthase, and vascular endothelial growth factor in adenoid cystic carcinoma of salivary glands: correlations with the angiogenesis and clinical outcome. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(20):7334-7343.

36. Li R, Sutphin PD, Schwartz D, Matas D, Almog N, Wolkowicz R, Goldfinger N, Pei H, Prokocimer M and Rotter V. Mutant p53 protein expression interferes with p53-independent apoptotic pathways. *Oncogene.* 1998; 16(25):3269-3277.

37. Gudkov AV and Komarova EA. The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3(2):117-129.

38. Kim BY, Kim KA, Kwon O, Kim SO, Kim MS, Kim BS, Oh WK, Kim GD, Jung M and Ahn JS. NF-kappaB inhibition radiosensitizes Ki-Ras-transformed cells to ionizing radiation. *Carcinogenesis.* 2005; 26(8):1395-1403.

39. Voorhees PM, Dees EC, O'Neil B and Orłowski RZ. The proteasome as a target for cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2003; 9(17):6316-6325.

40. Miller SC, Huang R, Sakamuru S, Shukla SJ, Attene-Ramos MS, Shinn P, Van Leer D, Leister W, Austin CP and Xia M. Identification of known drugs that act as inhibitors of NF-kappaB signaling and their mechanism of action. *Biochem Pharmacol.* 2010; 79(9):1272-1280.

41. Israel A. The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010; 2(3):a000158.

42. Solt LA and May MJ. The I kappa B kinase complex: master regulator of NF-kappaB signaling. *Immunol Res.* 2008; 42(1-3):3-18.

43. Baretton GB, Klenk U, Diebold J, Schmeller N and Lohrs U. Proliferation- and apoptosis-associated factors in advanced prostatic carcinomas before and after androgen deprivation therapy: prognostic significance of p21/WAF1/CIP1 expression. *Br J Cancer*. 1999; 80(3-4):546-555.
44. Aaltomaa S, Lipponen P, Eskelinen M, Ala-Opas M and Kosma VM. Prognostic value and expression of p21(waf1/cip1) protein in prostate cancer. *Prostate*. 1999; 39(1):8-15.
45. Ferrandina G, Stoler A, Fagotti A, Fanfani F, Sacco R, De Pasqua A, Mancuso S and Scambia G. p21WAF1/CIP1 protein expression in primary ovarian cancer. *Int J Oncol*. 2000; 17(6):1231-1235.
46. Cheung TH, Lo KW, Yu MM, Yim SF, Poon CS, Chung TK and Wong YF. Aberrant expression of p21(WAF1/CIP1) and p27(KIP1) in cervical carcinoma. *Cancer Lett*. 2001; 172(1):93-98.
47. Bae DS, Cho SB, Kim YJ, Whang JD, Song SY, Park CS, Kim DS and Lee JH. Aberrant expression of cyclin D1 is associated with poor prognosis in early stage cervical cancer of the uterus. *Gynecol Oncol*. 2001; 81(3):341-347.
48. Ceccarelli C, Santini D, Chieco P, Lanciotti C, Taffurelli M, Paladini G and Marrano D. Quantitative p21(waf-1)/p53 immunohistochemical analysis defines groups of primary invasive breast carcinomas with different prognostic indicators. *Int J Cancer*. 2001; 95(2):128-134.
49. Sarbia M and Gabbert HE. Modern pathology: prognostic parameters in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Recent Results Cancer Res*. 2000; 155:15-27.
50. Jung JM, Bruner JM, Ruan S, Langford LA, Kyritsis AP, Kobayashi T, Levin VA and Zhang W. Increased levels of p21WAF1/Cip1 in human brain tumors. *Oncogene*. 1995; 11(10):2021-2028.
51. Llanos S, Garcia-Pedrero JM, Morgado-Palacin L, Rodrigo JP and Serrano M. Stabilization of p21 by mTORC1/4E-BP1 predicts clinical outcome of head and neck cancers. *Nat Commun*. 2016; 7:10438.
52. Elbendary AA, Cirisano FD, Evans AC, Jr., Davis PL, Iglehart JD, Marks JR and Berchuck A. Relationship between p21 expression and mutation of the p53 tumor suppressor gene in normal and malignant ovarian epithelial cells. *Clin Cancer Res*. 1996; 2(9):1571-1575.
53. Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, Qian D, Lam JS, Ailles LE, Wong M, Joshua B, Kaplan MJ, Wapnir I, Dirbas FM, Somlo G, Garberoglio C, et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature*. 2009; 458(7239):780-783.
54. Kurth I, Hein L, Mabert K, Peitzsch C, Koi L, Cojoc M, Kunz-Schughart L, Baumann M and Dubrovskaya A. Cancer stem cell related markers of radioresistance in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2015; 6(33):34494-34509.
55. Baumann M, Krause M and Hill R. Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8(7):545-554.
56. Liu M, Sakamaki T, Casimiro MC, Willmarth NE, Quong AA, Ju X, Ojeifo J, Jiao X, Yeow WS, Katiyar S, Shirley LA, Joyce D, Lisanti MP, Albanese C and Pestell RG. The canonical NF-kappaB pathway governs mammary tumorigenesis in transgenic mice and tumor stem cell expansion. *Cancer Res*. 2010; 70(24):10464-10473.

57. Kendellen MF, Bradford JW, Lawrence CL, Clark KS and Baldwin AS. Canonical and non-canonical NF-kappaB signaling promotes breast cancer tumor-initiating cells. *Oncogene*. 2014; 33(10):1297-1305.
58. Dalgic A, Karakoc O, Aydin U, Hidir Y, Gamsizkan M, Karahatay S and Gerek M. Minor salivary gland neoplasms. *J Craniofac Surg*. 2014; 25(3):e289-291.
59. Lambert AC. The Treatment of Amoebic Dysentery with Emetine and Bismuth Iodide. *Br Med J*. 1918; 1(2978):116-118.
60. Panettiere F and Coltman CA, Jr. Experience with emetine hydrochloride (NSC 33669) as an antitumor agent. *Cancer*. 1971; 27(4):835-841.
61. Mastrangelo MJ, Grage TB, Bellet RE and Weiss AJ. A phase I study of emetine hydrochloride (NSC 33669) in solid tumors. *Cancer*. 1973; 31(5):1170-1175.
62. Siddiqui S, Firat D and Olshin S. Phase II study of emetine (NSC-33669) in the treatment of solid tumors. *Cancer Chemother Rep*. 1973; 57(4):423-428.
63. Moller M, Weiss J and Wink M. Reduction of cytotoxicity of the alkaloid emetine through P-glycoprotein (MDR1/ABCB1) in human Caco-2 cells and leukemia cell lines. *Planta Med*. 2006; 72(12):1121-1126.
64. Moller M and Wink M. Characteristics of apoptosis induction by the alkaloid emetine in human tumour cell lines. *Planta Med*. 2007; 73(13):1389-1396.
65. Boon-Unge K, Yu Q, Zou T, Zhou A, Govitrapong P and Zhou J. Emetine regulates the alternative splicing of Bcl-x through a protein phosphatase 1-dependent mechanism. *Chem Biol*. 2007; 14(12):1386-1392.
66. Sun Q, Yogosawa S, Iizumi Y, Sakai T and Sowa Y. The alkaloid emetine sensitizes ovarian carcinoma cells to cisplatin through downregulation of bcl-xL. *Int J Oncol*. 2015; 46(1):389-394.
67. Foreman KE, Jesse JN, 3rd, Kuo PC and Gupta GN. Emetine dihydrochloride: a novel therapy for bladder cancer. *J Urol*. 2014; 191(2):502-509.
68. Myhren L, Nilssen IM, Nicolas V, Doskeland SO, Barratt G and Herfindal L. Efficacy of multi-functional liposomes containing daunorubicin and emetine for treatment of acute myeloid leukaemia. *Eur J Pharm Biopharm*. 2014; 88(1):186-193.
69. Han Y, Park S, Kinyua AW, Andera L, Kim KW and Kim I. Emetine enhances the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of pancreatic cancer cells by downregulation of myeloid cell leukemia sequence-1 protein. *Oncol Rep*. 2014; 31(1):456-462.
70. Bertolini F, Sukhatme VP and Bouche G. Drug repurposing in oncology--patient and health systems opportunities. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015; 12(12):732-742.
71. Wurth R, Thellung S, Bajetto A, Mazzanti M, Florio T and Barbieri F. Drug-repositioning opportunities for cancer therapy: novel molecular targets for known compounds. *Drug Discov Today*. 2016; 21(1):190-199.
72. Mullard A. Drug repurposing programmes get lift off. *Nat Rev Drug Discov*. 2012; 11(7):505-506.
73. Li Z, Xia L, Lee LM, Khaletskiy A, Wang J, Wong JY and Li JJ. Effector genes altered in MCF-7 human breast cancer cells after exposure to fractionated ionizing radiation. *Radiat Res*. 2001; 155(4):543-553.
74. Guo G, Yan-Sanders Y, Lyn-Cook BD, Wang T, Tamae D, Ogi J, Khaletskiy A, Li Z, Weydert C, Longmate JA, Huang TT, Spitz DR, Oberley LW and Li JJ. Manganese

superoxide dismutase-mediated gene expression in radiation-induced adaptive responses. *Mol Cell Biol.* 2003; 23(7):2362-2378.

75. Baumann M, Dubois W and Suit HD. Response of human squamous cell carcinoma xenografts of different sizes to irradiation: relationship of clonogenic cells, cellular radiation sensitivity in vivo, and tumor rescuing units. *Radiat Res.* 1990; 123(3):325-330.

76. Hill RP and Milas L. The proportion of stem cells in murine tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1989; 16(2):513-518.

77. Yaromina A, Krause M, Thames H, Rosner A, Krause M, Hessel F, Grenman R, Zips D and Baumann M. Pre-treatment number of clonogenic cells and their radiosensitivity are major determinants of local tumour control after fractionated irradiation. *Radiother Oncol.* 2007; 83(3):304-310.

5.2 Artigo 2

Artigo científico apresentado de acordo com as normas do periódico Cancer (Qualis Capes 2016 – A1, ISSN 1097-0142, Fator de Impacto: 5.64).

Targeting histone deacetylase and NFκB signaling as a novel therapeutic strategy to manage Mucoepidermoid Carcinomas

Running title: Novel therapy to treat Mucoepidermoid Carcinoma

Vivian Petersen Wagner, PhD Candidate^{1,2,3}; Manoela Domingues Martins, PhD^{1,2,3}; Marco Antonio Trevizani Martins, PhD^{1,2}; Luciana Oliveira Almeida, PhD¹; Kristy A. Warner, PhD⁴; Cristiane Helena Squarize, PhD^{1,5}; Jacques E. Nor, PhD^{4,5,6,7}; Rogerio Moraes Castilho, PhD¹

¹ Laboratory of Epithelial Biology, Department of Periodontics and Oral Medicine, University of Michigan School of Dentistry, Ann Arbor, MI, 48109-1078, USA

² Experimental Pathology Unit, Clinics Hospital of Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 90035-003-Brazil

³ Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 90035-003-Brazil

⁴ Department of Restorative Sciences, University of Michigan School of Dentistry, Ann Arbor, MI 48109, USA

⁵ Comprehensive Cancer Center, University of Michigan Ann Arbor, MI, 48109-USA

⁶ Department of Otolaryngology, Medical School, University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA

⁷ Department of Biomedical Engineering, University of Michigan College of Engineering, Ann Arbor, Michigan

Keywords: Salivary gland cancer, epigenetics, targeted therapy, cancer stem cells, Emetine, Saha.

This work was conducted during a visiting scholar period at University of Michigan, sponsored by the Capes Foundation within the Ministry of Education, Brazil (grant n. BEX / 99999.007990/2014-06, grant n. BEX /10900/13-6; grant n. BEX/

10714/13-8). This grant was funded by the University of Michigan School of Dentistry faculty grant, and the Cancer Center Support Grant (P30 CA046592). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the paper.

Conflicts of interest: None.

Abstract:

BACKGROUND: High-grade and metastatic cases of Mucoepidermoid Carcinomas (MEC) present extremely low survival rates due to the inefficiency of current therapies and the presence of cancer stem cells (CSC) as key players in tumor resistance. Emerging evidences underline the importance of targeting multiple pathways associated with tumor resistance in order to obtain complete tumor eradication. **METHODS:** Four MEC cell lineages were treated with a NF κ B inhibitor (Emetine) or a HDAC inhibitor (SAHA) individually and combined. Outcomes regarding the reproductive viability of cells (clonogenic assay) and the presence of CSC (spheres assay and flow cytometry to ALDH) were assessed. **RESULTS:** We demonstrate that NF κ B signaling is active in all MEC tumor cell lines and Emetine have a inhibitory effect over the population of tumor cells. SAHA is efficient in disrupting the population of CSC from MEC tumors. The combined administration of Emetine and SAHA resulted in a more efficient reduction of tumor colony and depletion of CSC. **CONCLUSIONS:** Herein, we provided a novel and promising evidences regarding MEC systemic therapy. Emetine acts more specifically in the differentiated bulk of the tumor while SAHA attack the subset of highly tumorigenic cells. The association of drugs acts synergistically to eliminate all the sub-populations of cells present within a tumor mass.

Introduction:

Salivary gland cancer (SGC) presents annual incidence rates that vary between 0.05 to 2 new cases per 100,000.¹ The relative small incidence of SGC allied with an expressive clinical and biological heterogeneity poses important challenges on the study of these diseases. These tumors can present slow progression¹ leading to significant low survival rates on long-term analysis.² Mucoepidermoid carcinoma (MEC) represents the most common SGC.³⁻⁵ This tumor is graded histologically according to its architectural and morphological features.⁶ The prognosis for low-grade MEC is considerably good, with 5-year survival rates reaching rates above 90%. The real problem relies on high-grade tumors and advanced cases. In these conditions the 5-year survival rates considerably drops to 51% for high-grade tumors and, more alarmingly, to 32% or 26% in the presence of nodal or distant metastasis, respectively.⁷ Currently, all systemic approaches to MEC are considered merely palliative being cisplatin and cisplatin-based regimens the most frequently employed. Other systemic approaches have also been evaluated in clinical trials such as Methotrexate, Paclitaxel, Doxorubicin, among others (reviewed in ⁸). Response rates vary between 10% and 70%, however in most trials only few patients are enrolled and the follow-up time is short. Therefore, there is no evidence that any systemic therapy proposed can significantly improve survival of MEC patients.

The therapeutic approach of MEC patients is usually tuned from strategies used in head and neck squamous cell carcinoma.⁹ This limitation involves the lack of pre-clinical models that validate promising targets to treat MEC. Recently, MEC cell lines were established at the University of Michigan School of Dentistry^{10,11} enabling better characterization on the biological response of MEC cells to new therapeutic approaches. An important issue associated with tumor resistance in several types of solid tumors is the presence of cancer stem cell (CSC). This sub-population of highly tumorigenic neoplastic cells was recently described in MEC.¹¹ These cells are recognized by their potential to initiate and maintain tumor growth and progression in several cancers. It has been demonstrated that CSC have the capacity to remain on G0 phase of cell cycle, which provide them a quiescent

profile that allows these cells to evade conventional treatments that target proliferative cells.¹² Other factors contribute to their resistant profile, such as the perivascular niche¹³, capacity to modulate DNA repair systems¹⁴ and chromatin status.¹⁵ Our group observed alarming results regarding the effect of conventional therapies in MEC CSC population. We detected that cisplatin induces accumulation of a sub-population of CSC,¹⁶ while ionizing radiation doesn't significantly impact the CSC population metastatic MEC cell line.¹⁷

In order to find new and highly efficient treatments for MEC, it's of paramount importance to identify molecular signatures and signaling pathways associated with tumor resistance. We recently demonstrated that intrinsic NF κ B activation triggers MEC resistance to ionizing radiation.¹⁷ Moreover, our group has previously demonstrated that NF κ B activation also mediates cisplatin resistance through histone modifications.¹⁸ We had promising results associating the sensitization of MEC tumor cells by targeting NF κ B or histone acetylation with conventional therapies. We demonstrated that Emetine, a NF κ B inhibitor, and SAHA, a histone deacetylase (HDAC) inhibitor, increased the efficiency of ionizing radiation¹⁷ and cisplatin,¹⁶ respectively. Emerging evidences highlight the importance of targeting multiple pathways involved with tumor resistance to obtain complete tumor eradication. These studies suggest that advanced solid tumors will always present a small sub-population of cells resistant to one specific target.¹⁹⁻²¹ Bozic et al., (2013) used a mathematical approach to predict tumor control in an example of a skin melanoma presenting 8 metastatic lesions. According to these authors, there is a 0% chance of disease control using a single drug. Remarkably, the likelihood of treatment success can rise to 88% when two drugs with different targets are combined.²¹

Taking this in consideration, we decided to explore the individual effects of Emetine and SAHA over MEC tumor cell lines and compare with a combined therapy using both inhibitors. We observed that Emetine alone is efficient in reducing tumor cells, but not CSC, whereas SAHA efficiently disrupted the population of CSC, but failed in significantly reducing total number of tumor cells.

When combined, however, Emetine plus SAHA efficiently reduced CSC and colony forming tumor cells.

Methods:

Cell lines

MEC cells lines UM-HMC-1, UM-HMC-3A, UM-HMC-3B and UM-HMC-5 were originally described by Warner et al (2013). Cells lines were maintained in a 5%CO₂ humidified incubator at 37°C and cultured in RPMI 1640 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) supplement with 10% of Fetal Bovine Serum (Thermo Scientific), 1% antibiotic (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1% L-glutamine (Invitrogen) 20 ng/ml epidermal growth factor (Sigma–Aldrich), 400 ng/ml hydrocortisone (Sigma–Aldrich), 5 µg/ml insulin (Sigma–Aldrich). Cells were treated with SAHA (Cayman Chemical Company Ann Arbor, MI, USA) and Emetine dihydrochloride hydrate (Sigma–Aldrich). IC₅₀ of SAHA and Emetine were previously established for each cell lineage using MTT assay in monolayer adhered cells^{16,17}).

Tumor sphere formation assay

MEC cells lines were plated on ultra-low attachment 6 well plate. Sphere formation was observed daily. To evaluate the ability of sphere formation under histone H3 acetylation conditions and/or NFκB inhibition, SAHA or Emetine were administered on the first day of culture for the monotherapy groups or on the first and second day respectively in the combined group. Spheres growing in suspension were collected at day 5, and transferred to a glass slide by centrifugation at 1500 rpm, 4°C for 10 minutes using a cytospin system, following by fixation with PFA for 15 minutes at RT.

Immunofluorescence

Cells were placed on glass coverslips in 6-well plates. Cells were fixed with absolute methanol at -20 °C for 5 min. Blockage was performed with 0.5% (v/v) Triton X-100 in PBS and 3% (w/v) bovine serum albumin (BSA). Cells were then

incubated with anti-p65/NF κ B (BD Bioscience, Mountain View, CA, USA). Cells were then washed three times and incubated with TRITC-conjugated secondary antibody and stained with Hoechst 33342 for visualization of DNA content. Images were taken using a QImaging ExiAqua monochrome digital camera attached to a Nikon Eclipse 80i Microscope (Nikon, Melville, NY, USA) and visualized with QCapturePro software.

Clonogenic survival assay

For clonogenic assay, cells were plated into 6-well cell culture plates in a concentration previously determined by the plating efficiency. After overnight incubation, cells were treated with Saha or Emetine. Cells were allowed to grow for additional 7 days to form colonies before stained with 0.1% crystal purple. Colonies having >50 cells were counted as surviving colonies.

Flow Cytometry

MEC CSC cells were identified by flow cytometry for ALDH (aldehyde dehydrogenase) activity. The Aldefluor kit (StemCell Technologies, Durham, NC, USA) was used according to the manufacturer's instructions to identify cells with high ALDH enzymatic activity. Cells with or without pretreatment as indicated in individual experiments were suspended with activated Aldefluor substrate (BODIPY-aminoacetate) or negative control (diethylaminobenzaldehyde, a specific ALDH inhibitor) for 45 minutes at 37°C. All samples were analyzed in a FACS Canto IV (BD Biosciences) at the University of Michigan Flow Cytometry Core.

Immunoblotting

Cells were harvested in RIPA buffer, and briefly sonicated. Protein lysates were separated by 15% SDS-PAGE and transferred to a polyvinyl difluoride membrane (Immobilon) (Millipore, Billerica, MA, USA). Membranes were blocked in 0.1 M Tris (pH 7.5), 0.9% NaCl and 0.05% Tween-20 (TBS-T) with 5% nonfat dry milk. Membranes were incubated with anti-phospho- NF κ B p65 (Ser536) (Cell

Signaling). GAPDH (Millipore) served as a loading control. The reaction was visualized using ECL SuperSignal West Pico Substrate (Pierce Biotechnology, Waltham, MA, USA).

Statistical analysis

All statistical analysis was performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Statistical analysis of the mitosis assay, Ki67 staining and flow cytometry were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison tests. Asterisks denote statistical significance (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; and NS $p > 0.05$).

Results

MEC cell lines present high levels of NF κ B

Malignant cells usually present elevated NF κ B activity²² leading to increased cell survival through deactivation of apoptotic pathways.²³ The NF κ B pathway is activated upon a pro-inflammatory stimulus, which triggers IKK complex activation, followed by I κ B- α phosphorylation. These events allow NF κ B to translocate to the nucleus where it becomes active and acts as a transcription factor.^{24,25} Recently, we demonstrated that human samples of MEC present higher nuclear expression of NF κ B compared to normal salivary gland tissues.¹⁷ Herein, we evaluated the NF κ B expression in four lineages of human MEC recently established.^{10,11} In the present study, all lineages expressed nuclear expression of NF κ B (Figure 1), corroborating with our previous results in human samples.¹⁷ We quantified NF κ B nuclear expression and found that UM-HMC-5 was the cell lineage with lower expression of NF κ B in the nucleus ($p < 0.05$).

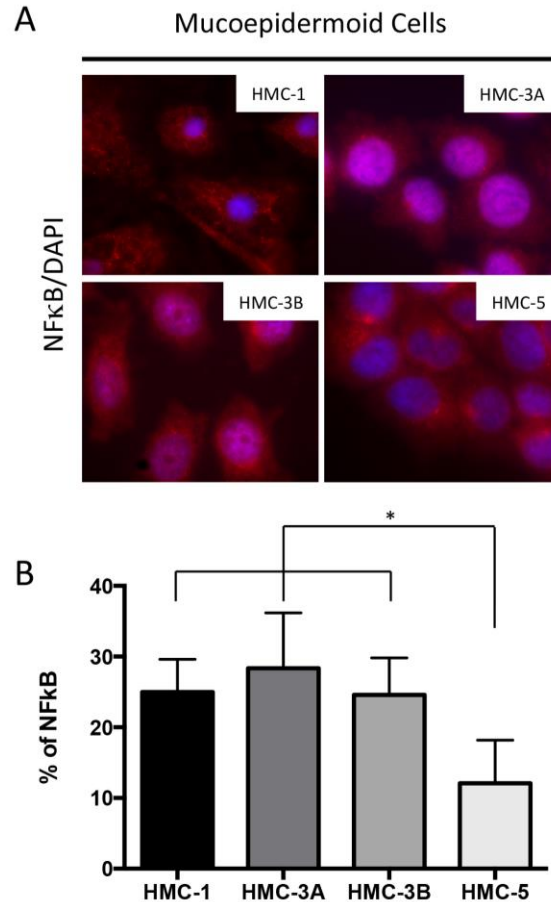


Figure 1. NFκB status in MEC cells lines. (A) Representative images of NFκB immunoexpression in MEC cell lines. Note that all cell lines present NFκB nuclear expression (Immunofluorescence, stained with NFκB – TRITC and DNA content - Hoechst 33342, 400X original magnification). (B) Quantification of NFκB nuclear expression in MEC cell lines.

Single dose of Emetine disrupts MEC colony formation

Currently, chemotherapy for SGC is based in therapeutic protocols used in head and neck squamous cell carcinoma⁹ due to a lack in solid evidences. Platinum-based regimens are the most frequently employed (reviewed in⁹), however patients that respond to chemotherapy present no increase in overall survival compared to those with no response,²⁶ demonstrating the urge to identify new and successful systemic treatments. Emetine is a FDA approved drug used for decades to other purposes. Recently, it has been demonstrated that Emetine specifically inhibits the NFκB pathway by specifically inhibiting IκB-α phosphorylation.²⁷ Our group confirmed this in MEC cell lines and further observed that NFκB inhibition is actually a result of IKK-β inhibition.¹⁷

The anti-neoplastic potential of Emetine is being increasingly explored in the literature. Recent studies verified that this drug is capable to stimulate apoptosis of pancreatic,²⁸ leukemic²⁹ and ovarian carcinoma cells³⁰ and induce cell growth arrest in bladder cancer cells.³¹ Our group demonstrated that Emetine sensitize MEC cells to ionizing radiation and also has an impact on CSC population.¹⁷ However, the effects of Emetine as a single-agent drug in MEC have never been explored until now. We started by analyzing the reproductive viability of MEC cells after a single dose of Emetine through a clonogenic assay. We observed that inhibition of NF κ B led to a complete disruption of colony formation in all four lineages (Figure 2). Our group has previously demonstrated that inhibition of NF κ B in MEC cell lines triggers p21 downregulation.¹⁷ Previous studies demonstrated that p21 can induce cell proliferation and malignization, besides being associated with poor prognosis in cervical, breast, prostate, brain, ovarian, and esophageal squamous cell carcinomas.³²⁻³⁸ Our results support that MEC cells proliferation is extremely sensitive to NF κ B inhibition.

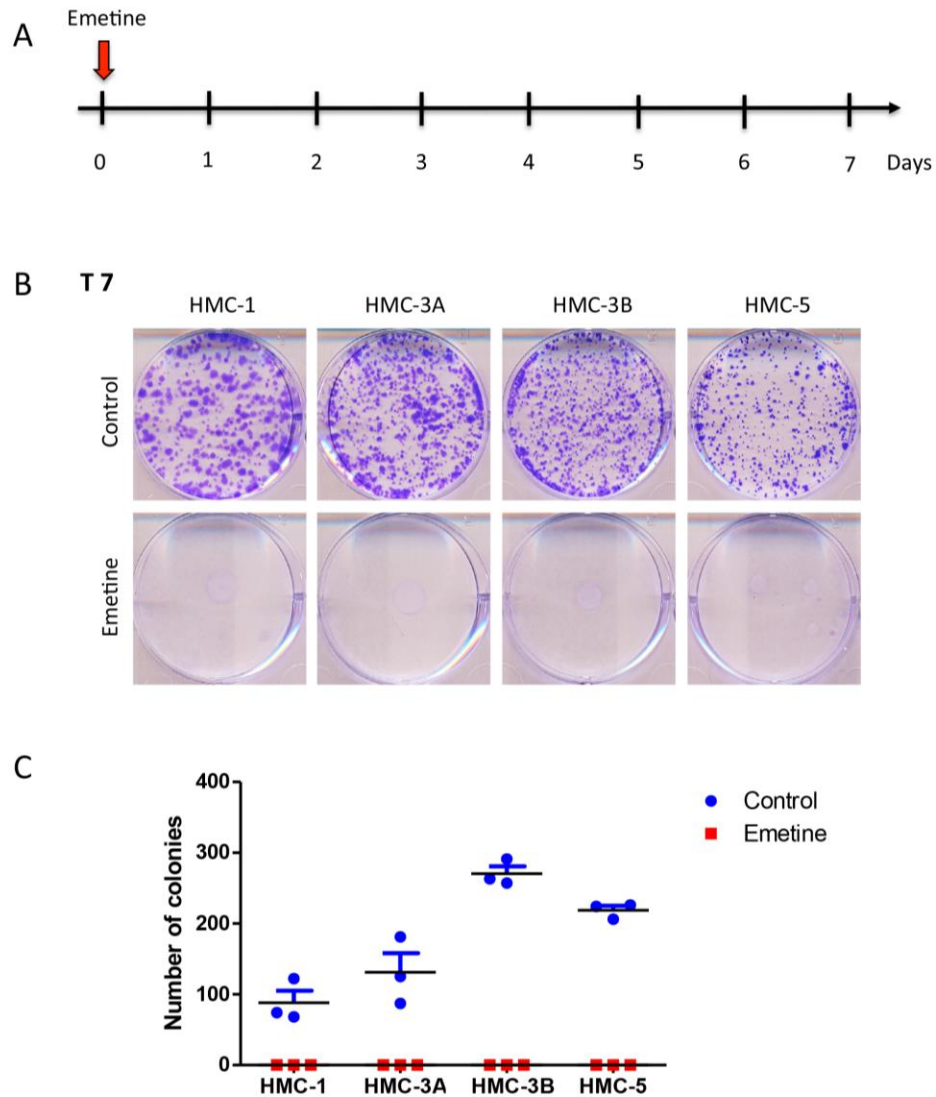


Figure 2. Single dose of Emetine is capable of abrogate reproductive viability of MEC cells. (A) Schedule of Emetine administration followed by clonogenic assay. A single dose of Emetine (determined by each cell line IC50) was administrated on day 0. Colony formation was assessed on day 7. (B) Representative images of colonies fixed and stained with 0.1% crystal purple. Note that Emetine treatment led to a complete disruption of colony formation in all four lineages. (C) Colony quantification (colonies having >50 cells were counted as surviving colonies) revealed that HMC-3B and HMC-5 presented higher number of colonies. After Emetine administration the number of colonies was reduced to zero in all cell lines.

Emetine induces a decrease in MEC spheres

Emerging evidences suggest that cancer stem cells (CSC) are implicated in poorer response to therapy leading to recurrence and short overall survival,^{39,40} therefore chemotherapeutic agents need to be optimized considering its effect on CSC once the perpetuation of this cell population is directly associated with

treatment failure. CSC when plated in low adhesion are able to grow in colonies, thus presenting a spheroid morphology.⁴¹ Our group demonstrated previously that MEC cell lines are able to generate spheres upon growth under low attachment conditions.¹⁶ In the present study, we observed that MEC spheres present detectable levels of nuclear NF κ B, suggesting that this pathway might be implicated in the formation of these structures (Figure 3A). Next, we treated MEC spheres with a single dose of Emetine to verify the impact of NF κ B inhibition on CSC population. We observed that Emetine significantly reduced the number of spheres in HMC-3A, 3B and 5 and had no effect on HMC-1 (Figure 3B). It has been previously demonstrated that NF κ B inhibition leads to downregulation of important stemness associated genes, such as Nanog and Sox 2.⁴² Moreover, we also observed in a previous study that by inhibiting NF κ B prior to irradiation, we have a greater *in vitro* impact of radiotherapy in depleting MEC CSC, especially in the metastatic cell line.¹⁷

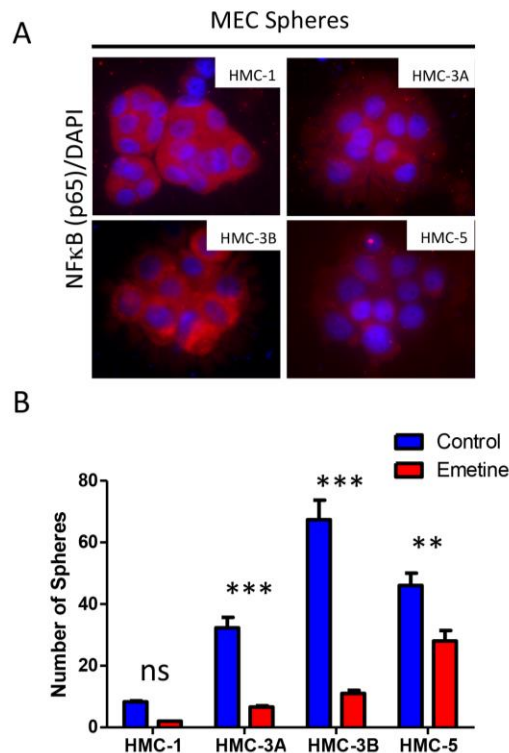


Figure 3. Spheres formation. (A) All MEC cell lines are capable of producing spheres under low attachment conditions. All spheres present NF κ B nuclear expression (Immunofluorescence, stained with NF κ B – TRITC and DNA content - Hoechst 33342, 100X original magnification). (B) A single dose of Emetine reduced the number of spheres in all MEC cell lines, however this decrease was not significant for HMC-1 cell line.

SAHA is highly efficient in depleting MEC spheres

The FDA has approved the HDAC inhibitor, SAHA, in October 2006 to treat T-cell lymphoma.⁴³ SAHA inhibits the enzymatic activity of class I and II HDACs, enzymes responsible for histone deacetylation. Histone acetylation is controlled by the balance of HDACs (histone deacetylases) and HATs (histone acetyltransferase) activity. SAHA induces histone acetylation and impact cancer cells by triggering growth arrest, differentiation and/ or apoptosis.^{44,45} We had promising results using SAHA to sensitize MEC and head and neck squamous cell carcinoma to cisplatin.^{16,18} Herein, we decided to explore the effect of SAHA as a single-agent for MEC treatment. Initially we evaluated the effects of histone acetylation on MEC colony formation. We observed that SAHA was effective in completely depleting colony formation in UM-HMC-1 and UM-HMC-3A cell lines (Figure 4B and C). Interestingly, in the metastatic cell line, UM-HMC-3B, SAHA had no impact in the number of colonies. Moreover, UM-HMC-5 was also resistant to SAHA regarding colony formation. We have recently demonstrated that p53 is highly active in UM-HMC-5 compared to others MEC cell lines.¹⁷ This distinct profile of UM-HMC-5 might justify its increased resistance to SAHA once p53 gain of function has been previously associated with mutations that can interfere with the process of apoptosis.⁴⁶ Discrepancy in the number of colonies after SAHA treatment suggest that MEC cell lines can respond differently to HDAC inhibition. Our group has demonstrated that MEC human samples present distinct stages of cellular differentiation and acetylation of histone H3 (lys9),¹⁶ which could justify the differences found regarding HDAC inhibition. Therefore, we can state that Emetine was more efficient than SAHA in reducing the survival fraction of MEC cell lines.

Next, we thought to investigate the effects of histone acetylation on MEC CSC population. Our group has achieved promising results with SAHA in depleting CSC population on head and neck malignancies.^{15,16} Herein, we observed that following a single dose of SAHA a reduction in spheres number was observed in all cell lines analyzed, however in HMC-1 this decrease was not significant (Figure 4D).

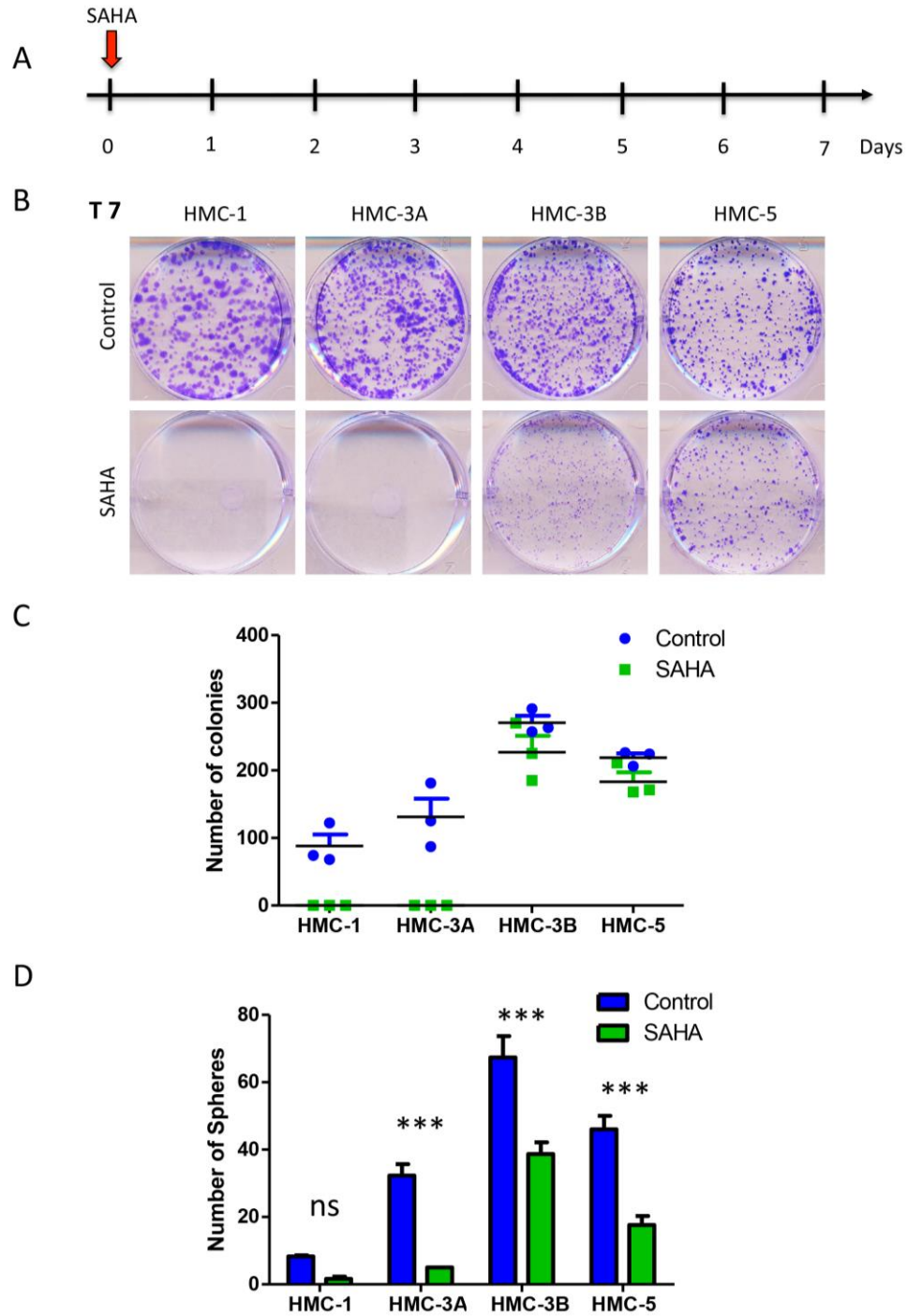


Figure 4. Effect of a single dose of SAHA on colony formation and spheres. (A) Schedule of SAHA administration followed by clonogenic assay. A single dose of SAHA (determined by each cell line IC50) was administered on day 0. Colony formation was assessed on day 7. (B) Representative images of colonies fixed and stained with 0.1% crystal purple. Note that SAHA treatment led to a complete disruption of colony formation only in HMC-1 and HMC-3A. (C) Colony quantification (colonies having >50 cells were counted as surviving colonies) revealed that after SAHA administration the number of colonies was reduced to zero only in HMC-1 and HMC-3A, while the reduction of HMC-3B and HMC-5 was very discreet. (D) A single dose of SAHA reduced the number of spheres in all MEC cell lines, however this decrease was not significant for HMC-1 cell line.

SAHA is more effective in reducing ALDH⁺ MEC cells compared to Emetine

Aldehyde dehydrogenase (ALDH) families of enzymes are cytosolic isoenzymes responsible for converting retinol to retinoic acid and also for oxidizing intracellular aldehydes, thereby conferring resistance to alkylating agents.⁴⁷ A previous study of Adams et al., 2015 demonstrated that enhanced tumorigenic potential of MEC cells, characteristic of CSC, can be assessed through ALDH activity,¹¹ corroborating with previous studies that demonstrate this same profile in several malignant tumors such as head and neck squamous cell carcinoma,⁴¹ breast cancer⁴⁸ and colon cancer.⁴⁷ Recent studies from our group demonstrated that head and neck squamous cell carcinoma and MEC cell lines when growing in ultra-low adhesion conditions are able to generate three morphological distinct spheres populations (holospheres, merospheres and paraspheres).¹⁶ An interesting finding from our research was that the levels of ALDH⁺ cells differed among these spheres populations,⁴⁹ therefore we believe that accessing CSC population through ALDH enzymatic activity represent an additional assay that might bring different and perhaps more accurate responses regarding CSC population. We started by accessing the basal levels of ALDH⁺ cells through flow cytometry in our four MEC cell lines. We observed distinct percentage of CSC among the cell lines, varying from 1.08 to 3.25% (Figure 5A). UM-HMC-1 and UM-HMC-3B presented higher percentage of ALDH positive cells, above 3%. Interestingly, UM-HMC-3B derived from a nodal metastasis, and the elevated percentage of CSCs found in this cell line could be associated with increased aggressiveness of a metastatic cell line.

Next, we aimed to evaluate the effects of Emetine and SAHA as single agents in the population of ALDH⁺ cells. Analyzing each cell line separately, we observed that both drugs were capable to decrease ALDH⁺ cells population (Figure 5B). Individually, SAHA significantly reduced ALDH⁺ cells in all cell lines ($p < 0.001$) while this result was achieved by Emetine only in HMC-1, 3A and 3B ($p < 0.01$). When combining the results from all cell lines, the effect of Emetine compared to control lost its significance. The effect of SAHA, however, remained significant,

demonstrating that SAHA is more efficient than Emetine in depleting MEC CSC population (Figure 5C).

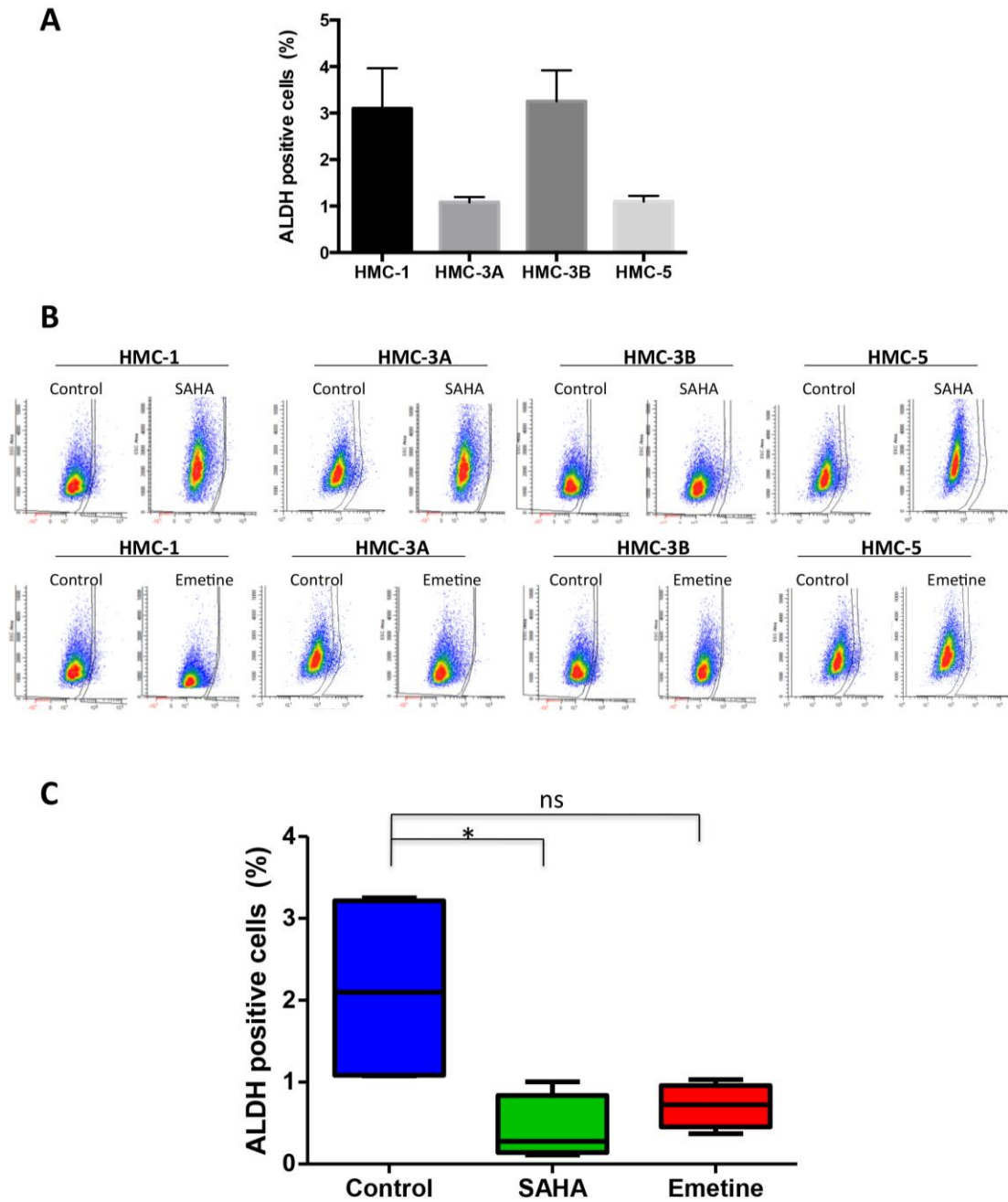


Figure 5. Effect of Emetine or SAHA as single agents in ALDH⁺ cell population. (A) MEC CSC population, assessed through ALDH enzymatic activity, ranges from 1.08 to 3.25%. Note that HMC-1 and HMC-2B present the higher percentages of CSC. (B) Effect of Emetine or SAHA on ALDH⁺ cells. SAHA significantly reduced ALDH⁺ cells in all cell lines ($p < 0.001$). Emetine SAHA significantly reduced ALDH⁺ cells in HMC-1, 3A and 3B ($p < 0.01$). (C) Combining the results from all cell lines, we observed that only SAHA significantly reduced the CSC population of MEC cell lines.

Combined therapy is efficient in eradicating MEC

One promising way to treat cancer is combined therapy. Earlier to systemic treatment, only a low percentage of cells are expected to be drug-resistance. Treatment with a single agent provides a competitive advantage to these resistant cells that will thrive during therapy and might have a high chance of gaining a double resistant phenotype by the time a second-line therapy.¹⁹ The strategy of combined therapy can minimize drug resistance by eliminating cells that are singly resistant to either drug thus enhancing treatment efficacy and reducing toxicity. An important aspect that must be considered is that concurrent use of two chemotherapeutic drugs will be more effective if each drug present different mechanisms of action and lead to a blocking of unrelated pathways crucial for cancer survival. Therefore, we aimed to analyze the effects of SAHA and Emetine combined. Chromatin structure can influence cellular response to external factor⁵⁰ and also the ability of cellular DNA repair.⁵¹ We believe that chromatin architecture of MEC CSC plays an important role in drug response. For this reason we decided to treat MEC cells with a single dose of SAHA followed by a single dose of Emetine, thus inducing cell acetylation and changes in chromatin structure prior to NF κ B inhibition. Firstly, we analyzed the effect of combined therapy in the reproductive viability of MEC cells through a clonogenic assay. No colonies were observed in all MEC cell lines following combined therapy administration (Figure 6A). Concerning CSC, we decided to evaluate the effect of combined therapy in the population of ALDH⁺ cells. We observed a significant reduction of CSC population in all four MEC cell lineages (Figure 6B). To verify if the combined therapy was more effective in depleting CSC than the single agent treatments tested; we compared the results from flow cytometry analysis of SAHA, Emetine and SAHA+Emetine. We observed that comparing to the control group the combined therapy achieved most relevant results, demonstrated by a higher mean difference, than Emetine and SAHA alone (Figure 6C). Moreover, the combined therapy was significantly more efficient than Emetine alone ($p < 0.05$). We believe that chromatin relaxation induced by the HDAC inhibitor might prompt an increase Emetine efficiency in depleting CSC population.

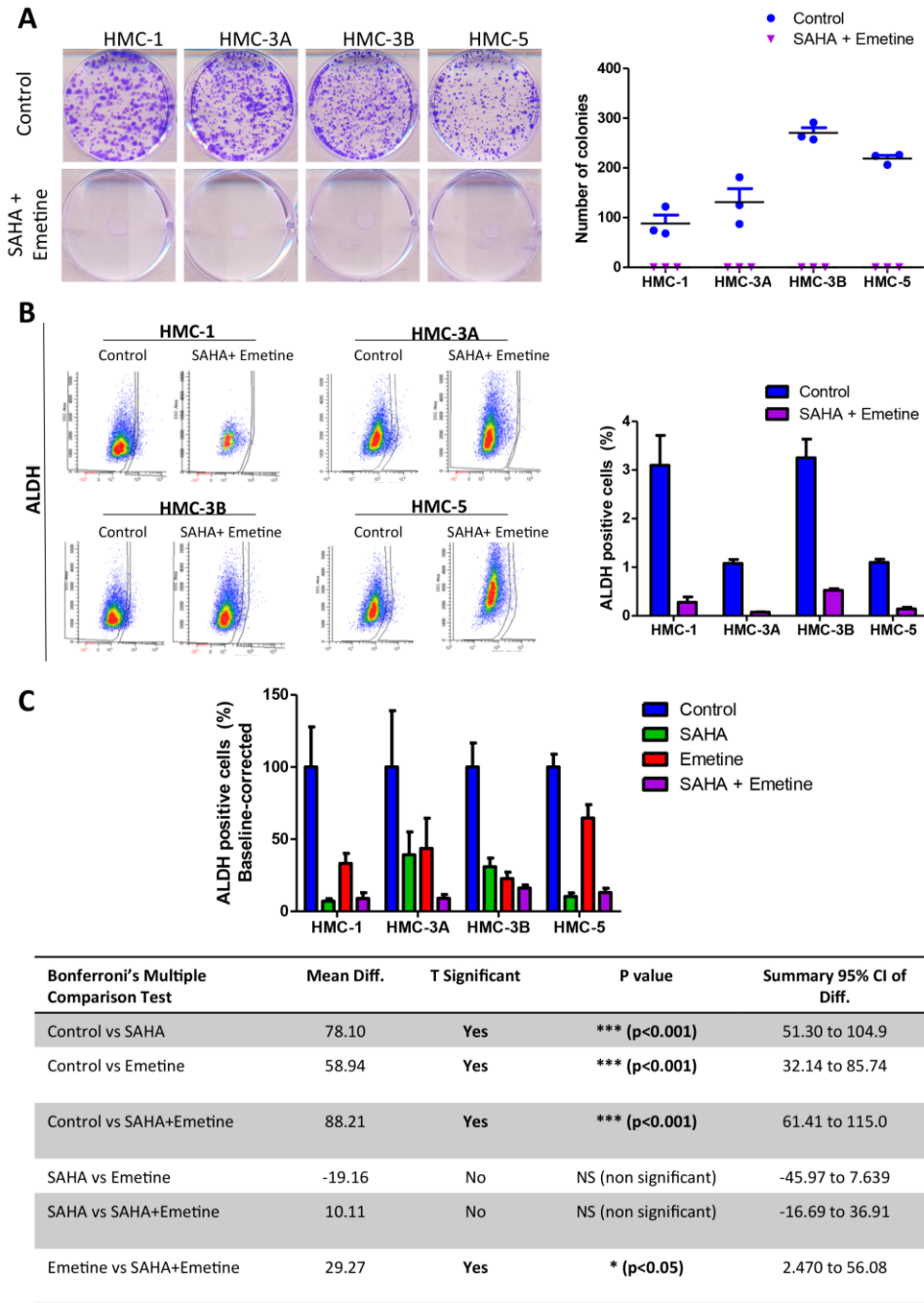


Figure 6. Combined therapy is more efficient in reducing the bulk of the tumor and CSC population. (A) Representative images of colonies fixed and stained with 0.1% crystal purple. Note that combined treatment led to a complete disruption of colony formation only in all cell lines. Colony quantification (colonies having >50 cells were counted as surviving colonies) revealed that after combined therapy the number of colonies was reduced to zero in all cell lines. (B) Combined therapy significantly reduced the population of ALDH⁺ cells in all MEC cell lines (p<0.01). (C) Comparing the reduction of ALDH⁺ positive cells after the different treatment modalities, we observed that Control vs SAHA+Emetine demonstrated a higher mean difference, revealing that this treatment achieved the most relevant results.

Figure 7 presents a schematic illustration of our main results, which demonstrated that SAHA and Emetine act synergistically and are more efficient in eliminating all the sub-populations of MEC cells.

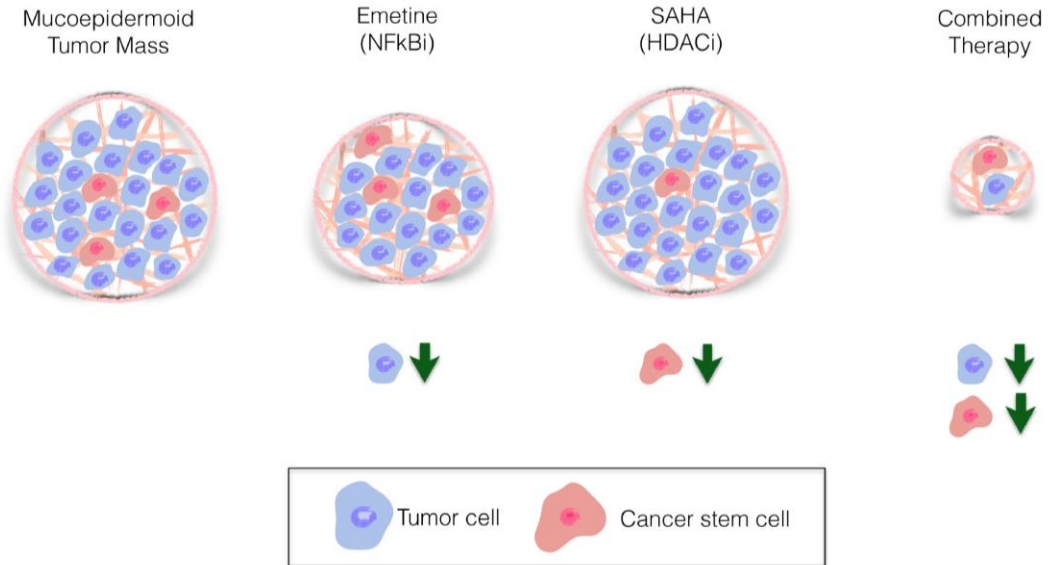


Figure 7. Schematic illustration of the main findings of the present study. MEC comprises a population of more differentiated cells, which account for the majority of cells in the bulk of the tumor, and a small population of highly tumorigenic and more undifferentiated cells, known as CSC. Emetine acts on the bulk of the tumor and can reduce significantly the reproductive viability of the majority of MEC cells. Nevertheless, the CSC population seems to be more resistance to this drug. SAHA by the other side is more efficient in depleting MEC CSC population, however the bulk of the tumor might be resistant to this therapy. The combined therapy act synergistically to eliminate all the sub-populations of cells present within the MEC tumor mass.

Discussion:

Currently, advanced cases of MEC, such as inoperable and metastatic tumors, are associated with extremely poor prognosis. This major problem is mainly associated with the lack of effective systemic treatments capable to eradicate MEC tumor cells. In fact most of anticancer drugs act on rapidly dividing cells, therefore the indolent growth of most SGC, including MEC, could explain the poor results.⁸ In the past two decades, the paradigm for cancer treatment evolved from conventional and nonspecific drugs to highly selective, mechanism-based therapies.⁵² This new and promising approach is based on blocking essential biochemical pathways or mutant proteins required for tumor development and progression. Outstanding progress has been achieved in this field in several

malignancies such as leukemia,⁵³ breast cancer⁵⁴ and non-small-cell lung cancer.⁵⁵ Unfortunately, this is not the reality for SGC, where we observe that cisplatin or cisplatin-based regimens remain the most common systemic therapies employed.⁸ Yet, a significant limitation of targeted therapy is that at the beginning of treatment it is highly probable that a small sub-population of neoplastic cells will be resistant to one specific target.¹⁹⁻²¹ Treating advanced tumors with a single agent can offer an important advantage for resistant cells to proliferate. During proliferation, mutations might occur, increasing the chances for these cells to gain a double resistant phenotype.¹⁹ These issues can be overcome by associating two drugs with different targets, thus eradicating from the beginning cells that are singly resistant to either drug. In the present study we demonstrated that double-targeted therapy with Emetine and SAHA achieved promising results in disrupting both the bulk of the tumor as the CSC population in MEC cell lines.

Combined therapy represents in most cases the association of a conventional therapy (that acts on the rapidly proliferating cells) with a differentiation therapy (that triggers differentiation of undifferentiated cells, such as CSC).⁵⁶ By using this strategy it's possible to eliminate both the differentiated and undifferentiated tumor component, leading to treatment success. In SGC we believe that conventional therapy is not the most appropriate to eliminate the bulk of the tumor once these malignancies are characterized by slow progression. Instead, it's more efficient to target specific molecular targets that are deregulated and associated with tumor development. We demonstrated in the present study that all MEC cell lines present high basal levels of NF κ B, which corroborates with our previous results in MEC tumor samples.¹⁷ Apparently, this pathway is very active and necessary for tumor progression and cell proliferation in MEC, as we demonstrated by its direct correlation with p21 activation.¹⁷ Therefore, we propose that NF κ B pathway represents a promising target to disrupt MEC progression. In fact, a single dose of Emetine was capable of abrogate reproductive viability of MEC cells. For cancer therapy to be effective it's essential that all cell populations within the tumor to be reached, including the more differentiated cells. We

understand that these cells represent the majority of cells within the tumor mass and are primordial for tumor progression and therefore must be eliminated.

The CSC population represents sub-population of cancer cells with high tumorigenic potential. In MEC, specifically, we observed that these cells represent around 1-3% of all neoplastic cells. However, despite their lower proportion within the tumor, this cell population is a major challenge due to its resistant profile and ability to initiate new tumors. Therefore, the survival of CSC after therapy may imply in treatment failure caused by recurrences or metastatic lesions. An important characteristic of CSC is its chromatin status. The chromatin configuration is modulated by how tightly DNA is spooled around histones and the dynamic changes that occur in this structure are mainly driven by histone acetylation and histone deacetylation.⁵⁰ DNMT-1 triggers histone deacetylase activity⁵⁷ and suppress cell differentiation,⁵⁸ leading to a stem-cell phenotype. Moreover, compacted chromatin is associated with poor DNA accessibility to drugs. We have previously demonstrated that chemoresistant head and neck cancer cells present more compacted chromatin.¹⁸ Based on these facts, we believe that sensitizing MEC with a HDAC inhibitor, such as SAHA, can induce CSC differentiation and chromatin accessibility. We observed that SAHA as a single agent is capable of depleting CSC population (ALDH⁺ cells) in all MEC cell lines. Additionally, when SAHA as associated with a subsequent dose of Emetine, this effect was enhanced. We believe that the prior influence of SAHA in chromatin accessibility allowed Emetine to accomplish its pro-apoptotic functions in these more compacted cells.

In the present study we provided a novel and promising evidences regarding MEC systemic therapy. We demonstrated that two FDA-approved drugs, SAHA and Emetine, can act synergistically to eliminate all the sub-populations of cells present within a tumor mass. Emetine acts more specifically in the differentiated bulk of the tumor. Meanwhile, SAHA attack the subset of highly tumorigenic cells inducing both differentiation and drug accessibility, which can triggers an increase in Emetine's effect during the next round of therapy. This combination allows extracting the best effect of each individual drug, enabling doses to be kept low and thereby avoiding possible adverse effects. Based on the

extremely poor prognosis observed in advanced cases, we believe that the identification of effective systemic therapies for MEC must be among the chief priorities of head and neck oncology.

References:

1. Guzzo M, Locati LD, Prott FJ, Gatta G, McGurk M and Licitra L. Major and minor salivary gland tumors. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2010; 74(2):134-148.
2. Terhaard CH, Lubsen H, Van der Tweel I, Hilgers FJ, Eijkenboom WM, Marres HA, Tjho-Heslinga RE, de Jong JM, Roodenburg JL, Dutch H and Neck Oncology Cooperative G. Salivary gland carcinoma: independent prognostic factors for locoregional control, distant metastases, and overall survival: results of the Dutch head and neck oncology cooperative group. *Head & neck*. 2004; 26(8):681-692; discussion 692-683.
3. Fonseca FP, Carvalho Mde V, de Almeida OP, Rangel AL, Takizawa MC, Bueno AG and Vargas PA. Clinicopathologic analysis of 493 cases of salivary gland tumors in a Southern Brazilian population. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*. 2012; 114(2):230-239.
4. Spiro RH. Salivary neoplasms: overview of a 35-year experience with 2,807 patients. *Head & neck surgery*. 1986; 8(3):177-184.
5. Jones AV, Craig GT, Speight PM and Franklin CD. The range and demographics of salivary gland tumours diagnosed in a UK population. *Oral oncology*. 2008; 44(4):407-417.
6. Goode RK, Auclair PL and Ellis GL. Mucoepidermoid carcinoma of the major salivary glands: clinical and histopathologic analysis of 234 cases with evaluation of grading criteria. *Cancer*. 1998; 82(7):1217-1224.
7. McHugh CH, Roberts DB, El-Naggar AK, Hanna EY, Garden AS, Kies MS, Weber RS and Kupferman ME. Prognostic factors in mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands. *Cancer*. 2012; 118(16):3928-3936.
8. Lagha A, Chraiet N, Ayadi M, Krimi S, Allani B, Rifi H, Raies H and Mezlini A. Systemic therapy in the management of metastatic or advanced salivary gland cancers. *Oral oncology*. 2012; 48(10):948-957.
9. Cerda T, Sun XS, Vignot S, Marcy PY, Baujat B, Baglin AC, Ali AM, Testelin S, Reyt E, Janot F and Thariat J. A rationale for chemoradiation (vs radiotherapy) in salivary gland cancers? On behalf of the REFCOR (French rare head and neck cancer network). *Critical reviews in oncology/hematology*. 2014; 91(2):142-158.
10. Warner KA, Adams A, Bernardi L, Nor C, Finkel KA, Zhang Z, McLean SA, Helman J, Wolf GT, Divi V, Queimado L, Kaye FJ, Castilho RM and Nor JE. Characterization of tumorigenic cell lines from the recurrence and lymph node metastasis of a human salivary mucoepidermoid carcinoma. *Oral oncology*. 2013; 49(11):1059-1066.
11. Adams A, Warner K, Pearson AT, Zhang Z, Kim HS, Mochizuki D, Basura G, Helman J, Mantesso A, Castilho RM, Wicha MS and Nor JE. ALDH/CD44 identifies uniquely tumorigenic cancer stem cells in salivary gland mucoepidermoid carcinomas. *Oncotarget*. 2015; 6(29):26633-26650.
12. Venezia TA, Merchant AA, Ramos CA, Whitehouse NL, Young AS, Shaw CA and Goodell MA. Molecular signatures of proliferation and quiescence in hematopoietic stem cells. *PLoS biology*. 2004; 2(10):e301.

13. Ritchie KE and Nor JE. Perivascular stem cell niche in head and neck cancer. *Cancer letters*. 2013; 338(1):41-46.
14. Park Y and Gerson SL. DNA repair defects in stem cell function and aging. *Annual review of medicine*. 2005; 56:495-508.
15. Giudice FS, Pinto DS, Jr., Nor JE, Squarize CH and Castilho RM. Inhibition of histone deacetylase impacts cancer stem cells and induces epithelial-mesenchyme transition of head and neck cancer. *PloS one*. 2013; 8(3):e58672.
16. Guimaraes DM, Almeida LO, Martins MD, Warner KA, Silva AR, Vargas PA, Nunes FD, Squarize CH, Nor JE and Castilho RM. Sensitizing mucoepidermoid carcinomas to chemotherapy by targeted disruption of cancer stem cells. *Oncotarget*. 2016.
17. Wagner VP, Martins MA, Martins MD, Warner KA, Webber LP, Squarize CH, Nor JE, Castilho RM. Overcoming adaptive resistance in mucoepidermoid carcinoma through inhibition of the IKK- β /I κ B α /NF κ B axis. *Oncotarget*. 2016
18. Almeida LO, Abrahao AC, Rosselli-Murai LK, Giudice FS, Zagni C, Leopoldino AM, Squarize CH and Castilho RM. NF κ B mediates cisplatin resistance through histone modifications in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *FEBS open bio*. 2014; 4:96-104.
19. Komarova NL and Boland CR. Cancer: calculated treatment. *Nature*. 2013; 499(7458):291-292.
20. Diaz LA, Jr., Williams RT, Wu J, Kinde I, Hecht JR, Berlin J, Allen B, Bozic I, Reiter JG, Nowak MA, Kinzler KW, Oliner KS and Vogelstein B. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature*. 2012; 486(7404):537-540.
21. Bozic I, Reiter JG, Allen B, Antal T, Chatterjee K, Shah P, Moon YS, Yaqubie A, Kelly N, Le DT, Lipson EJ, Chapman PB, Diaz LA, Jr., Vogelstein B and Nowak MA. Evolutionary dynamics of cancer in response to targeted combination therapy. *eLife*. 2013; 2:e00747.
22. Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*. 2006; 441(7092):431-436.
23. Wang CY, Mayo MW and Baldwin AS, Jr. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science*. 1996; 274(5288):784-787.
24. Dolcet X, Llobet D, Pallares J and Matias-Guiu X. NF-kB in development and progression of human cancer. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2005; 446(5):475-482.
25. Wu L, Shao L, An N, Wang J, Pazhanisamy S, Feng W, Hauer-Jensen M, Miyamoto S and Zhou D. IKKbeta regulates the repair of DNA double-strand breaks induced by ionizing radiation in MCF-7 breast cancer cells. *PloS one*. 2011; 6(4):e18447.
26. Carlson J, Licitra L, Locati L, Raben D, Persson F and Stenman G. Salivary gland cancer: an update on present and emerging therapies. *American Society of Clinical Oncology educational book / ASCO American Society of Clinical Oncology Meeting*. 2013:257-263.
27. Miller SC, Huang R, Sakamuru S, Shukla SJ, Attene-Ramos MS, Shinn P, Van Leer D, Leister W, Austin CP and Xia M. Identification of known drugs that act as

- inhibitors of NF-kappaB signaling and their mechanism of action. *Biochemical pharmacology*. 2010; 79(9):1272-1280.
28. Han Y, Park S, Kinyua AW, Andera L, Kim KW and Kim I. Emetine enhances the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of pancreatic cancer cells by downregulation of myeloid cell leukemia sequence-1 protein. *Oncology reports*. 2014; 31(1):456-462.
 29. Moller M and Wink M. Characteristics of apoptosis induction by the alkaloid emetine in human tumour cell lines. *Planta medica*. 2007; 73(13):1389-1396.
 30. Sun Q, Yogosawa S, Iizumi Y, Sakai T and Sowa Y. The alkaloid emetine sensitizes ovarian carcinoma cells to cisplatin through downregulation of bcl-xL. *International journal of oncology*. 2015; 46(1):389-394.
 31. Foreman KE, Jesse JN, 3rd, Kuo PC and Gupta GN. Emetine dihydrochloride: a novel therapy for bladder cancer. *The Journal of urology*. 2014; 191(2):502-509.
 32. Baretton GB, Klenk U, Diebold J, Schmeller N and Lohrs U. Proliferation- and apoptosis-associated factors in advanced prostatic carcinomas before and after androgen deprivation therapy: prognostic significance of p21/WAF1/CIP1 expression. *British journal of cancer*. 1999; 80(3-4):546-555.
 33. Aaltomaa S, Lipponen P, Eskelinen M, Ala-Opas M and Kosma VM. Prognostic value and expression of p21(waf1/cip1) protein in prostate cancer. *The Prostate*. 1999; 39(1):8-15.
 34. Ferrandina G, Stoler A, Fagotti A, Fanfani F, Sacco R, De Pasqua A, Mancuso S and Scambia G. p21WAF1/CIP1 protein expression in primary ovarian cancer. *International journal of oncology*. 2000; 17(6):1231-1235.
 35. Cheung TH, Lo KW, Yu MM, Yim SF, Poon CS, Chung TK and Wong YF. Aberrant expression of p21(WAF1/CIP1) and p27(KIP1) in cervical carcinoma. *Cancer letters*. 2001; 172(1):93-98.
 36. Bae DS, Cho SB, Kim YJ, Whang JD, Song SY, Park CS, Kim DS and Lee JH. Aberrant expression of cyclin D1 is associated with poor prognosis in early stage cervical cancer of the uterus. *Gynecologic oncology*. 2001; 81(3):341-347.
 37. Ceccarelli C, Santini D, Chieco P, Lanciotti C, Taffurelli M, Paladini G and Marrano D. Quantitative p21(waf-1)/p53 immunohistochemical analysis defines groups of primary invasive breast carcinomas with different prognostic indicators. *International journal of cancer*. 2001; 95(2):128-134.
 38. Sarbia M and Gabbert HE. Modern pathology: prognostic parameters in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Recent results in cancer research Fortschritte der Krebsforschung Progres dans les recherches sur le cancer*. 2000; 155:15-27.
 39. Sonnenberg VS and Sonnenberg AD. Stem cell state and the epithelial-to-mesenchymal transition: Implications for cancer therapy. *Journal of clinical pharmacology*. 2015; 55(6):603-619.
 40. Singh A and Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*. 2010; 29(34):4741-4751.
 41. Krishnamurthy S and Nor JE. Orosphere assay: a method for propagation of head and neck cancer stem cells. *Head & neck*. 2013; 35(7):1015-1021.

42. Liu M, Sakamaki T, Casimiro MC, Willmarth NE, Quong AA, Ju X, Ojeifo J, Jiao X, Yeow WS, Katiyar S, Shirley LA, Joyce D, Lisanti MP, Albanese C and Pestell RG. The canonical NF-kappaB pathway governs mammary tumorigenesis in transgenic mice and tumor stem cell expansion. *Cancer research*. 2010; 70(24):10464-10473.
43. Mann BS, Johnson JR, Cohen MH, Justice R and Pazdur R. FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma. *The oncologist*. 2007; 12(10):1247-1252.
44. Butler LM, Zhou X, Xu WS, Scher HI, Rifkind RA, Marks PA and Richon VM. The histone deacetylase inhibitor SAHA arrests cancer cell growth, up-regulates thioredoxin-binding protein-2, and down-regulates thioredoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002; 99(18):11700-11705.
45. Lee J and R SH. Cancer Epigenetics: Mechanisms and Crosstalk of a HDAC Inhibitor, Vorinostat. *Chemotherapy*. 2013; 2(111).
46. Li R, Sutphin PD, Schwartz D, Matas D, Almog N, Wolkowicz R, Goldfinger N, Pei H, Prokocimer M, Rotter V. Mutant p53 protein expression interferes with p53-independent apoptotic pathways. *Oncogene*. 1998 Jun 25;16(25):3269-77.
47. Huang EH, Hynes MJ, Zhang T, Ginestier C, Dontu G, Appelman H, Fields JZ, Wicha MS and Boman BM. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer research*. 2009; 69(8):3382-3389.
48. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS and Dontu G. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell stem cell*. 2007; 1(5):555-567.
49. Almeida LO, Guimaraes DM, Squarize CH and Castilho RM. Profiling the Behavior of Distinct Populations of Head and Neck Cancer Stem Cells. *Cancers*. 2016; 8(1).
50. Martins MD and Castilho RM. Histones: Controlling Tumor Signaling Circuitry. *Journal of carcinogenesis & mutagenesis*. 2013; 1(Suppl 5):1-12.
51. Gong F and Miller KM. Mammalian DNA repair: HATs and HDACs make their mark through histone acetylation. *Mutation research*. 2013; 750(1-2):23-30.
52. Vanneman M and Dranoff G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nature reviews Cancer*. 2012; 12(4):237-251.
53. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, Cornelissen JJ, Fischer T, Hochhaus A, Hughes T, Lechner K, Nielsen JL, Rousselot P, Reiffers J, Saglio G, Shepherd J, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*. 2003; 348(11):994-1004.
54. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J and Norton L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that

- overexpresses HER2. *The New England journal of medicine*. 2001; 344(11):783-792.
55. Gridelli C, Maione P, Bareschino MA, Schettino C, Sacco PC, Ambrosio R, Barbato V, Falanga M and Rossi A. Erlotinib in the treatment of non-small cell lung cancer: current status and future developments. *Anticancer Res*. 2010; 30(4):1301-1310.
 56. Rane JK, Pellacani D and Maitland NJ. Advanced prostate cancer--a case for adjuvant differentiation therapy. *Nature reviews Urology*. 2012; 9(10):595-602.
 57. Fuks F, Burgers WA, Brehm A, Hughes-Davies L and Kouzarides T. DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nature genetics*. 2000; 24(1):88-91.
 58. Sen GL, Reuter JA, Webster DE, Zhu L and Khavari PA. DNMT1 maintains progenitor function in self-renewing somatic tissue. *Nature*. 2010; 463(7280):563-567.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O carcinoma mucoepidermoide (CME) apresenta baixas taxas de resposta às terapias atualmente disponíveis devido a diferentes mecanismos que levam à resistência tumoral. Desta forma, o principal objetivo desta tese foi identificar novas modalidades terapêuticas capazes de superar estes mecanismos tendo como foco principal as células tronco tumorais (CTT).

Inicialmente optamos por estudar o papel da irradiação sobre as linhagens de CME. Sabe-se que aproximadamente 80% dos pacientes com neoplasias malignas de glândulas salivares (NMGS) necessitam de radioterapia em algum estágio do seu tratamento. Entretanto a resposta de linhagens celulares de CME à irradiação permanecia desconhecida. O primeiro objetivo desta tese visou preencher esta importante lacuna na literatura científica atual. Nós identificamos uma fração de sobrevivência em 2Gy (dose utilizada na prática clínica) extremamente alta para todas as linhagens de CME. Quando comparada aos valores identificados para linhagens de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, por exemplo, vemos que o CME é consideravelmente mais resistente à radioterapia. Este primeiro achado foi de extrema importância para embasar a necessidade da busca de alternativas para superar esta resistência tumoral. Desta forma, nós identificamos que o a via do NFkB desempenha um papel importante na resistência de CME à radioterapia. Para avaliar o papel da inibição desta via optamos por utilizar a Emetina, uma droga previamente aprovada pelo FDA e que possui alta especificidade na inibição das proteínas associadas com o NFkB. A utilização de uma droga já aprovada aumenta significativamente as chances desta poder seguir as demais fases necessárias para sua aprovação para o novo uso específico além de reduzir drasticamente o tempo que este processo pode levar. Nossos resultados em relação ao uso da Emetina associada à irradiação foram extremamente promissores. Observamos que a droga foi capaz de sensibilizar as linhagens celulares, reduzindo a fração de sobrevivência em 2Gy em aproximadamente 25%. Além disto, a Emetina impactou de forma importante a população de CTT. Esta subpopulação de células altamente tumorigênicas é reconhecida como responsável pelo surgimento de metástases e recidivas após

o tratamento devida sua capacidade de evadir terapias convencionais. De fato, em nosso estudo identificamos que a radioterapia sozinha não teve nenhum impacto sobre a população de CTT na linhagem metastática de CME. Desta forma, acreditamos no potencial desta nova modalidade terapêutica proposta no primeiro estudo para reduzir a resistência tumoral à radioterapia e impactar de forma positiva a sobrevida dos pacientes com CME.

Nosso segundo estudo teve como foco terapias medicamentosas utilizadas de forma isolada ou associada. Acreditamos que o uso de terapias sistêmicas representam uma forma de tratamento importante para pacientes que apresentam doença em estágio avançado, com metástases nodais e a distancia por exemplo. Sabemos que as NMGS, incluindo o CME, apresentam crescimento lento, ou seja, as células apresentam baixas taxas de proliferação. Este fato pode justificar a falta de resposta deste tumor às terapias sistêmicas convencionais, como por exemplo a cisplatina que atua em células com taxa proliferativa elevada. Neste sentido, o tratamento sistêmico do CME deve ser direcionado para alvos terapêuticos específicos que atuem em vias envolvidas com a progressão tumoral. Entretanto, um ponto importante a ser considerado quando visamos erradicar tumores sólidos avançados é que nestes casos há sempre uma pequena subpopulação de células que é resistente a um alvo terapêutico. Este conhecimento prévio embasou nossa decisão de avaliar o efeito de duas terapias com alvos distintos utilizadas de forma combinada. Inicialmente avaliamos cada droga de maneira isolada, a fim de identificar seu principal mecanismo de ação nas linhagens de CME. Identificamos que a Emetina age majoritariamente na porção de células mais diferenciadas, inibindo de forma efetiva o potencial proliferativo da massa tumoral. O SAHA, por outro lado, apresentou maior efetividade que a Emetina em reduzir a população de CTT, que apesar de representar apenas 1-3% de toda a massa tumoral, são células com capacidade de iniciar um novo tumor e desta forma necessitam ser eliminadas. A combinação das duas drogas apresentou os melhores resultados demonstrando uma efetividade na redução da massa tumoral além de aumentar o efeito sobre a população de CTT.

Avaliando nossos resultados em conjunto podemos concluir que a associação de diferentes terapias (Emetina associada a irradiação e SAHA associada a Emetina) foi eficaz em superar a resistência tumoral do CME, através da ação na população de CTT, e representam alternativas terapêuticas promissoras para tratar casos inoperáveis e metastáticos de CME. As diferentes técnicas de biologia celular utilizadas nesta tese em linhagens recentemente estabelecidas de CME trouxeram evidências científicas que suportam a continuidade da avaliação destas terapias no contexto da pesquisa translacional em câncer. A próxima etapa neste contexto envolve o estudo destas drogas em modelo animal, o qual pretendemos realizar. O efeito destas terapias será avaliado em modelos de xenoenxerto derivados de paciente (PDX- sigla do inglês *patient-derived xenograft*). Nesta técnica fragmentos de tumor fresco de humanos são implantados cirurgicamente em camundongos imunodeficientes, permitindo desta forma que o tumor a ser tratado no animal reflita biologicamente o tumor do paciente em relação a histopatologia, expressão de genes, mutações genéticas e resposta terapêutica (Hidalgo et al., 2014; Pearson et al., 2016). Acreditamos que é importante dar sequência neste projeto pois nosso principal objetivo é que os resultados desta tese atinjam os pacientes com CME e possam impactar de maneira positiva a qualidade e expectativa de vida dos mesmos oferecendo terapias mais eficazes e com menos efeitos colaterais comparada às terapias convencionais atualmente utilizadas. O estudo de novas drogas em linhagens celulares, realizado nesta tese, representa um primeiro passo importante na pesquisa translacional em câncer. Atualmente o embasamento para o uso de diversas drogas no tratamento de NMGS vem de estudos pré-clínicos e clínicos desenvolvidos no carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. Assim, os resultados oriundos desta tese são de extrema relevância e preenchem uma lacuna importante na busca por novas alternativas terapêuticas para o CME.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Adelstein DJ, Koyfman SA, El-Naggar AK, Hanna EY. Biology and management of salivary gland cancers. *Semin Radiat Oncol*. 2012 Jul;22(3):245-53.

Ahmed KM, Li JJ. NF-kappa B-mediated adaptive resistance to ionizing radiation. *Free Radic Biol Med*. 2008 Jan 1;44(1):1-13.

Ahmed KM, Zhang H, Park CC. NF- κ B regulates radioresistance mediated by β 1-integrin in three-dimensional culture of breast cancer cells. *Cancer Res*. 2013 Jun 15;73(12):3737-48.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:3983–3988.

Allen CM, Damm DD, Chi AC, Neville BW. *Oral and maxillofacial pathology (Third edition.)*. 2009 St. Louis, MO: Elsevier.

Almeida LO, Abrahao AC, Rosselli-Murai LK, Giudice FS, Zagni C, Leopoldino AM, Squarize CH, Castilho RM. NF κ B mediates cisplatin resistance through histone modifications in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *FEBS Open Bio*. 2013 Dec 30;4:96-104.

Almeida LO, Guimarães DM, Squarize CH, Castilho RM. Profiling the Behavior of Distinct Populations of Head and Neck Cancer Stem Cells. *Cancers (Basel)*. 2016 Jan 4;8(1).

Aravindan N, Aravindan S, Pandian V, Khan FH, Ramraj SK, Natt P, Natarajan M. Acquired tumor cell radiation resistance at the treatment site is mediated through radiation-orchestrated intercellular communication. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2014 Mar 1;88(3):677-85.

Armstrong L, Stojkovic M, Dimmick I, Ahmad S, Stojkovic P, Hole N, Lako M. Phenotypic characterization of murine primitive hematopoietic progenitor cells

isolated on basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Stem Cells*. 2004;22(7):1142-51.

Ashburn TT, Thor KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2004 Aug;3(8):673-83.

Auclair PL, Goode RK, Ellis GL. Mucoepidermoid carcinoma of intraoral salivary glands. Evaluation and application of grading criteria in 143 cases. *Cancer* 1992;69:2021–2030.

Baeuerle PA, Baltimore D. Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-kappa B transcription factor. *Cell*. 1988 Apr 22;53(2):211-7.

Barnes L, Everson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumors: Pathology and Genetics: Head and Neck Tumors, WHO Press, 2005, Switzerland.

Bassères DS, Baldwin AS. Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene*. 2006 Oct 30;25(51):6817-30.

Batsakis JG, Luna MA. Histopathologic grading of salivary gland neoplasms: I mucoepidermoid carcinomas. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1990;99(10 Pt 1):835–838.

Baumann P, Mandl-Weber S, Oduncu F, Schmidmaier R. Alkylating agents induce activation of NFkappaB in multiple myeloma cells. *Leuk Res*. 2008 Jul;32(7):1144-7.

Bednarski BK, Ding X, Coombe K, Baldwin AS, Kim HJ. Active roles for inhibitory kappaB kinases alpha and beta in nuclear factor-kappaB-mediated chemoresistance to doxorubicin. *Mol Cancer Ther*. 2008 Jul;7(7):1827-35.

Begg AC, Stewart FA, Vens C. Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. *Nat Rev Cancer*. 2011 Apr;11(4):239-53.

Behboudi A, Enlund F, Winnes M, Andrén Y, Nordkvist A, Leivo I, Flaberg E, Szekeley L, Mäkitie A, Grenman R, Mark J, Stenman G. Molecular classification of mucoepidermoid carcinomas-prognostic significance of the MECT1-MAML2 fusion oncogene. *Genes Chromosomes Cancer*. 2006 May;45(5):470-81.

Berrino F, De AR, Sant M, et al. Survival for eight major cancers and all cancers combined for European adults diagnosed in 1995–1999: results of the EURO CARE-4 study. *Lancet Oncol* 2007;8:773–83.

Bjørndal K, Krogdahl A, Therkildsen MH, Charabi B, Kristensen CA, Andersen E, Schytte S, Primdahl H, Johansen J, Pedersen HB, Andersen LJ, Godballe C. Salivary adenoid cystic carcinoma in Denmark 1990-2005: Outcome and independent prognostic factors including the benefit of radiotherapy. Results of the Danish Head and Neck Cancer Group (DAHANCA). *Oral Oncol*. 2015 Dec;51(12):1138-42.

Blancafort P, Jin J, Frye S. Writing and rewriting the epigenetic code of cancer cells: from engineered proteins to small molecules. *Mol Pharmacol*. 2013 Mar;83(3):563-76.

Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997 Jul;3(7):730-7.

Boon-Unge K, Yu Q, Zou T, Zhou A, Govitrapong P, Zhou J. Emetine regulates the alternative splicing of Bcl-x through a protein phosphatase 1-dependent mechanism. *Chem Biol*. 2007 Dec;14(12):1386-92.

Bozic I, Reiter JG, Allen B, Antal T, Chatterjee K, Shah P, Moon YS, Yaquibie A, Kelly N, Le DT, Lipson EJ, Chapman PB, Diaz LA Jr, Vogelstein B, Nowak MA. Evolutionary dynamics of cancer in response to targeted combination therapy. *Elife*. 2013 Jun 25;2:e00747.

Brach MA, Hass R, Sherman ML, Gunji H, Weichselbaum R, Kufe D. Ionizing radiation induces expression and binding activity of the nuclear factor kappa B. *J Clin Invest*. 1991 Aug;88(2):691-5.

Bradford JW, Baldwin AS. IKK/nuclear factor-kappaB and oncogenesis: roles in tumor-initiating cells and in the tumor microenvironment. *Adv Cancer Res*. 2014;121:125-45.

Brandwein MS, Ferlito A, Bradley PJ, et al. Diagnosis and classification of salivary neoplasms: pathologic challenges and relevance to clinical outcomes. *Acta Otolaryngol*. 2002;122(7):758–764.

Brandwein MS, Ivanov K, Wallace DI, Hille JJ, Wang B, Fahmy A, Bodian C, Urken ML, Gnepp DR, Huvos A, Lumerman H, Mills SE. Mucoepidermoid carcinoma: a clinicopathologic study of 80 patients with special reference to histological grading. *Am J Surg Pathol*. 2001 Jul;25(7):835-45.

Byrd SA, Spector ME, Carey TE, Bradford CR, McHugh JB. Predictors of recurrence and survival for head and neck mucoepidermoid carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2013 Sep;149(3):402-8.

Campbell KJ, O'Shea JM, Perkins ND. Differential regulation of NF-kappaB activation and function by topoisomerase II inhibitors. *BMC Cancer*. 2006 Apr 21;6:101.

Carew JS, Giles FJ, Nawrocki ST. Histone deacetylase inhibitors: mechanisms of cell death and promise in combination cancer therapy. *Cancer Lett*. 2008 Sep 28;269(1):7-17.

Carvalho AL, Nishimoto IN, Califano JA, Kowalski LP. Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: a site-specific analysis of the SEER database. *Int J Cancer* 2005;114:806–16.

Catz SD, Johnson JL. Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer. *Oncogene*. 2001 Nov 1;20(50):7342-51.

Cesmebasi A, Gabriel A, Niku D, Bukala K, Donnelly J, Fields PJ, Tubbs RS, Loukas M. Pediatric head and neck tumors: an intra-demographic analysis using the SEER* database. *Med Sci Monit*. 2014 Dec 4;20:2536-42.

Chen MM, Roman SA, Sosa JA, Judson BL. Histologic grade as prognostic indicator for mucoepidermoid carcinoma: a population-level analysis of 2400 patients. *Head Neck*. 2014 Feb;36(2):158-63.

Chen YC, Chen YW, Hsu HS, Tseng LM, Huang PI, Lu KH, Chen DT, Tai LK, Yung MC, Chang SC, Ku HH, Chiou SH, Lo WL. Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Jul 31;385(3):307-13.

Chien W, Lee DH, Zheng Y, Wuensche P, Alvarez R, Wen DL, Aribi AM, Thean SM, Doan NB, Said JW, Koeffler HP. Growth inhibition of pancreatic cancer cells by histone deacetylase inhibitor belinostat through suppression of multiple pathways including HIF, NFkB, and mTOR signaling in vitro and in vivo. *Mol Carcinog*. 2014 Sep;53(9):722-35.

Chikamatsu K, Ishii H, Murata T, Sakakura K, Shino M, Toyoda M, Takahashi K, Masuyama K. Alteration of cancer stem cell-like phenotype by histone deacetylase inhibitors in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Sci*. 2013 Nov;104(11):1468-75.

Clay MR, Tabor M, Owen JH, Carey TE, Bradford CR, Wolf GT, et al. (2010). Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase. *Head Neck* 32:1195-1201.

Creagan ET1, Woods JE, Rubin J, Schaid DJ. Cisplatin-based chemotherapy for neoplasms arising from salivary glands and contiguous structures in the head and neck. *Cancer*. 1988 Dec 1;62(11):2313-9.

Cusack JC, Liu R, Baldwin AS. NF- κ B and chemoresistance: potentiation of cancer drugs via inhibition of NF- κ B. *Drug Resist Updat*. 1999 Aug;2(4):271-273.

da Cruz Perez DE, Pires FR, Alves FA, Almeida OP, Kowalski LP. Salivary gland tumors in children and adolescents: a clinicopathologic and immunohistochemical study of fifty-three cases. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2004 Jul;68(7):895-902.

Dan HC, Cooper MJ, Cogswell PC, Duncan JA, Ting JP, Baldwin AS. Akt-dependent regulation of NF- κ B is controlled by mTOR and Raptor in association with IKK. *Genes Dev*. 2008 Jun 1;22(11):1490-500.

Delaney G, Jacob S, Featherstone C, Barton M. The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. *Cancer*. 2005 Sep 15;104(6):1129-37.

Díaz KP, Gerhard R, Domingues RB, Martins LL, Prado Ribeiro AC, Lopes MA, Carneiro PC, Vargas PA. High diagnostic accuracy and reproducibility of fine-needle aspiration cytology for diagnosing salivary gland tumors: cytohistologic correlation in 182 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2014 Aug;118(2):226-35

Diaz LA Jr, Williams RT, Wu J, Kinde I, Hecht JR, Berlin J, Allen B, Bozic I, Reiter JG, Nowak MA, Kinzler KW, Oliner KS, Vogelstein B. The molecular evolution of

acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature*. 2012 Jun 28;486(7404):537-40

Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, Qian D, Lam JS, Ailles LE, Wong M, Joshua B, Kaplan MJ, Wapnir I, et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature* 2009; 458: 780-783

Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X. NF- κ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch*. 2005 May;446(5):475-82. Epub 2005 Apr 27.

Dong C, Hemminki K. Second primary neoplasms among 53159 haematolymphoproliferative malignancy patients in Sweden, 1958–1996: a search for common mechanisms. *Br J Cancer* 2001;85:997–1005.

Dong G, Chen Z, Kato T, Van Waes C. The host environment promotes the constitutive activation of nuclear factor-kappaB and proinflammatory cytokine expression during metastatic tumor progression of murine squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 1999 Jul 15;59(14):3495-504.

Eom HJ, Lee JH, Ko MS, Choi YJ, Yoon RG, Cho KJ, Nam SY, Baek JH. Comparison of fine-needle aspiration and core needle biopsy under ultrasonographic guidance for detecting malignancy and for the tissue-specific diagnosis of salivary gland tumors. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2015 Jun;36(6):1188-93.

Fonseca FP, Carvalho Mde V, de Almeida OP, Rangel AL, Takizawa MC, Bueno AG, Vargas PA. Clinicopathologic analysis of 493 cases of salivary gland tumors in a Southern Brazilian population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012 Aug;114(2):230-9.

Foreman KE, Jesse JN 3rd, Kuo PC, Gupta GN. Emetine dihydrochloride: a novel therapy for bladder cancer. *J Urol*. 2014 Feb;191(2):502-9.

Fuks F, Burgers WA, Brehm A, Hughes-Davies L, Kouzarides T. DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nat Genet*. 2000 Jan;24(1):88-91.

Furth J, Kahn M. The transmission of leukemia of mice with a single cell. *Am J Cancer*. 1937; 31:276-282.

Gao L, Yan L, Lin B, Gao J, Liang X, Wang Y, Liu J, Zhang S, Iwamori M. Enhancive effects of Lewis y antigen on CD44-mediated adhesion and spreading of human ovarian cancer cell line RMG-I. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011 Feb 7;30:15.

García-Morales P, Gómez-Martínez A, Carrato A, Martínez-Lacaci I, Barberá VM, Soto JL, Carrasco-García E, Menéndez-Gutierrez MP, Castro-Galache MD, Ferragut JA, Saceda M. Histone deacetylase inhibitors induced caspase-independent apoptosis in human pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Mol Cancer Ther*. 2005 Aug;4(8):1222-30.

Gilbert J, Li Y, Pinto HA, Jennings T, Kies MS, Silverman P, Forastiere AA. Phase II trial of taxol in salivary gland malignancies (E1394): a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Head Neck*. 2006 Mar;28(3):197-204.

Ginestier C1, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*. 2007 Nov;1(5):555-67.

Giudice FS, Pinto DS Jr, Nör JE, Squarize CH, Castilho RM. Inhibition of histone deacetylase impacts cancer stem cells and induces epithelial-mesenchyme transition of head and neck cancer. *PLoS One*. 2013;8(3):e58672.

Glisson BS, Blumenschein G, Francisco M, Erasmus J, Zinner R, Kies M. Phase II trial of gefitinib in patients with incurable salivary gland cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol*. 2005, 23(16S):abstr5532

Glozak MA, Seto E. Histone deacetylases and cancer. *Oncogene*. 2007 Aug 13;26(37):5420-32.

Goldstein AM, Yuen J, Tucker MA. Second cancers after medulloblastoma: population-based results from the United States and Sweden. *Cancer Causes Control* 1997;8:865–71.

Goode RK, Auclair PL, Ellis GL. Mucoepidermoid carcinoma of the major salivary glands: clinical and histopathologic analysis of 234 cases with evaluation of grading criteria. *Cancer*. 1998;82(7):1217–1224.

Grénman R1, Pekkola-Heino K, Joensuu H, Aitasalo K, Klemi P, Lakkala T. UT-MUC-1, a new mucoepidermoid carcinoma cell line, and its radiosensitivity. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1992 May;118(5):542-7.

Guimarães DM, Almeida LO, Martins MD, Warner KA, Silva AR, Vargas PA, Nunes FD, Squarize CH1, Nör JE, Castilho RM. Sensitizing mucoepidermoid carcinomas to chemotherapy by targeted disruption of cancer stem cells. *Oncotarget*. 2016 Jun 7. [Epub ahead of print]

Guo G, Yan-Sanders Y, Lyn-Cook BD, Wang T, Tamae D, Ogi J, Khaletskiy A, Li Z, Weydert C, Longmate JA, Huang TT, Spitz DR, Oberley LW, Li JJ. Manganese superoxide dismutase-mediated gene expression in radiation-induced adaptive responses. *Mol Cell Biol*. 2003 Apr;23(7):2362-78.

Guttridge DC, Albanese C, Reuther JY, Pestell RG, Baldwin AS Jr. NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol.* 1999 Aug;19(8):5785-99.

Guzzo M, Andreola S, Sirizzotti G, Cantu G. Mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands: clinicopathologic review of 108 patients treated at the National Cancer Institute of Milan. *Ann Surg Oncol.* 2002 Aug;9(7):688-95.

Guzzo M, Ferrari A, Marcon I, Collini P, Gandola L, Pizzi N, Casanova M, Mattavelli F, Scaramellini G. Salivary gland neoplasms in children: the experience of the Istituto Nazionale Tumori of Milan. *Pediatr Blood Cancer.* 2006 Nov;47(6):806-10.

Haddad R, Colevas AD, Krane JF, Cooper D, Glisson B, Amrein PC, Weeks L, Costello R, Posner M. Herceptin in patients with advanced or metastatic salivary gland carcinomas. A phase II study. *Oral Oncol.* 2003 Oct;39(7):724-7.

Halkidou K, Gaughan L, Cook S, Leung HY, Neal DE, Robson CN. Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *Prostate.* 2004 May 1;59(2):177-89.

Hambardzumyan D, Squatrito M, Holland EC. Radiation resistance and stem- like cells in brain tumors. *Cancer Cell* 2006; 10: 454-6.

Hamper K, Lazar F, Dietel M, Caselitz J, Berger J, Arps H, Falkmer U, Auer G, Seifert G. Prognostic factors for adenoid cystic carcinoma of the head and neck: a retrospective evaluation of 96 cases. *J Oral Pathol Med.* 1990 Mar;19(3):101-7.

Han Y, Park S, Kinyua AW, Andera L, Kim KW, Kim I. Emetine enhances the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of pancreatic cancer cells by downregulation of myeloid cell leukemia sequence-1 protein. *Oncol Rep.* 2014 Jan;31(1):456-62.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646-74.

Hess DA, Meyerrose TE, Wirthlin L, Craft TP, Herrbrich PE, Creer MH, Nolte JA. Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity. *Blood*. 2004 Sep 15;104(6):1648-55.

Hidalgo M, Amant F, Biankin AV, Budinská E, Byrne AT, Caldas C, et al. Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. *Cancer Discov*. 2014 Sep;4(9):998-1013.

Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer*. 2013 Aug 2;12:86.

Horn-Ross PL, Ljung BM, Morrow M. Environmental factors and the risk of salivary gland cancer. *Epidemiology* 1997;8:414–9. (a)

Horn-Ross PL, Morrow M, Ljung BM. Diet and the risk of salivary gland cancer. *Am J Epidemiol* 1997;146:171–6. (b)

Hrzenjak A, Moinfar F, Kremser ML, Strohmeier B, Staber PB, Zatloukal K, Denk H. Valproate inhibition of histone deacetylase 2 affects differentiation and decreases proliferation of endometrial stromal sarcoma cells. *Mol Cancer Ther*. 2006 Sep;5(9):2203-10.

Huang EH, Hynes MJ, Zhang T, Ginestier C, Dontu G, Appelman H, Fields JZ, Wicha MS, Boman BM. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res*. 2009 Apr 15;69(8):3382-9.

Ito FA, Ito K, Vargas PA, de Almeida OP, Lopes MA. Salivary gland tumors in a Brazilian population: a retrospective study of 496 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2005 Jul;34(5):533-6.

Jones AV, Craig GT, Speight PM, Franklin CD. The range and demographics of salivary gland tumours diagnosed in a UK population. *Oral Oncol.* 2008 Apr;44(4):407-17.

Kato T, Duffey DC, Ondrey FG, Dong G, Chen Z, Cook JA, Mitchell JB, Van Waes C. Cisplatin and radiation sensitivity in human head and neck squamous carcinomas are independently modulated by glutathione and transcription factor NF-kappaB. *Head Neck.* 2000 Dec;22(8):748-59.

Kendellen MF, Bradford JW, Lawrence CL, Clark KS, Baldwin AS. Canonical and non-canonical NF- κ B signaling promotes breast cancer tumor-initiating cells. *Oncogene.* 2014 Mar 6;33(10):1297-305.

Kim KM, Zhang Y, Kim BY, Jeong SJ, Lee SA, Kim GD, Dritschilo A, Jung M. The p65 subunit of nuclear factor-kappaB is a molecular target for radiation sensitization of human squamous carcinoma cells. *Mol Cancer Ther.* 2004 Jun;3(6):693-8.

Komarova NL, Boland CR. Cancer: calculated treatment. *Nature.* 2013 Jul 18;499(7458):291-2.

Komarova NL, Wodarz D. Drug resistance in cancer: principles of emergence and prevention. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jul 5;102(27):9714-9.

Konstantinopoulos PA, Fountzilas E, Pillay K, Zerbini LF, Libermann TA, Cannistra SA, Spentzos D. Carboplatin-induced gene expression changes in vitro are prognostic of survival in epithelial ovarian cancer. *BMC Med Genomics.* 2008 Nov 28;1:59.

Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell.* 2007 Feb 23;128(4):693-705.

Krishnamurthy S, Dong Z, Vodopyanov D, Imai A, Helman JI, Prince ME, Wicha MS, Nör JE. Endothelial cell-initiated signaling promotes the survival and self-renewal of cancer stem cells. *Cancer Res.* 2010 Dec 1;70(23):9969-78.

Krishnamurthy S, Nör JE. Orosphere assay: a method for propagation of head and neck cancer stem cells. *Head Neck.* 2013 Jul;35(7):1015-21.

Lagha A, Chraiet N, Ayadi M, Krimi S, Allani B, Rifi H, Raies H, Mezlini A. Systemic therapy in the management of metastatic or advanced salivary gland cancers. *Oral Oncol.* 2012 Oct;48(10):948-57.

Lambert AC. The treatment of amoebic dysentery with emetine and bismuth iodide. *Br Med J.* 1918 Jan 26;1(2978):116-8.

Lawlor ER, Thiele CJ. Epigenetic changes in pediatric solid tumors: promising new targets. *Clin Cancer Res.* 2012 May 15;18(10):2768-79.

Le JM, Squarize CH, Castilho RM. Histone modifications: Targeting head and neck cancer stem cells. *World J Stem Cells.* 2014 Nov 26;6(5):511-25.

Lee J, R SH. Cancer Epigenetics: Mechanisms and Crosstalk of a HDAC Inhibitor, Vorinostat. *Chemotherapy (Los Angel).* 2013 Jun 5;2(111). pii: 14934.

Lee TL, Yeh J, Friedman J, Yan B, Yang X, Yeh NT, Van Waes C, Chen Z. A signal network involving coactivated NF-kappaB and STAT3 and altered p53 modulates BAX/BCL-XL expression and promotes cell survival of head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Cancer.* 2008 May 1;122(9):1987-98.

Lenz G, Davis RE, Ngo VN, Lam L, George TC, Wright GW, Dave SS, Zhao H, Xu W, Rosenwald A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Gascoyne RD, Connors JM, Rimsza LM, Campo E, Jaffe ES, Delabie J, Smeland EB, Fisher RI, Chan WC, Staudt LM. Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science.* 2008 Mar 21;319(5870):1676-9.

Lewisohn, R. Action of emetine on malignant tumors. *J. Am. Med. Assoc.*, 1918, 70, 9-10

Li Z, Xia L, Lee LM, Khaletskiy A, Wang J, Wong JY, Li JJ. Effector genes altered in MCF-7 human breast cancer cells after exposure to fractionated ionizing radiation. *Radiat Res.* 2001 Apr;155(4):543-53.

Licitra L, Marchini S, Spinazzè S, Rossi A, Rocca A, Grandi C, Molinari R. Cisplatin in advanced salivary gland carcinoma. A phase II study of 25 patients. *Cancer.* 1991 Nov 1;68(9):1874-7.

Lindahl R. Aldehyde dehydrogenases and their role in carcinogenesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1992;27(4-5):283-335. Review.

Liu M, Sakamaki T, Casimiro MC, Willmarth NE, Quong AA, Ju X, Ojeifo J, Jiao X, Yeow WS, Katiyar S, Shirley LA, Joyce D, Lisanti MP, Albanese C, Pestell RG. The canonical NF-kappaB pathway governs mammary tumorigenesis in transgenic mice and tumor stem cell expansion. *Cancer Res.* 2010 Dec 15;70(24):10464-73.

Liu S, Ow A, Ruan M, Yang W, Zhang C, Wang L, Zhang C. Prognostic factors in primary salivary gland mucoepidermoid carcinoma: an analysis of 376 cases in an Eastern Chinese population. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2014 Jun;43(6):667-73. (a)

Liu S, Ruan M, Li S, Wang L, Yang W. Increased expression of MUC1 predicts poor survival in salivary gland mucoepidermoid carcinoma. *J Craniomaxillofac Surg.* 2014 Dec;42(8):1891-6. (b)

Loercher A, Lee TL, Ricker JL, Howard A, Geoghegan J, Chen Z, Sunwoo JB, Sitcheran R, Chuang EY, Mitchell JB, Baldwin AS Jr, Van Waes C. Nuclear factor-kappaB is an important modulator of the altered gene expression profile and malignant phenotype in squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2004 Sep 15;64(18):6511-23.

Lukšić I, Virag M, Manojlović S, Macan D. Salivary gland tumours: 25 years of experience from a single institution in Croatia. *J Craniomaxillofac Surg.* 2012 Apr;40(3):e75-81.

Madhusoodhanan R, Natarajan M, Veeraraghavan J, Herman TS, Aravindan N. NFkappaB activity and transcriptional responses in human breast adenocarcinoma cells after single and fractionated irradiation. *Cancer Biol Ther.* 2009 May;8(9):765-73. (a)

Madhusoodhanan R, Natarajan M, Veeraraghavan J, Herman TS, Jamgade A, Singh N, Aravindan N. NFkappaB signaling related molecular alterations in human neuroblastoma cells after fractionated irradiation. *J Radiat Res.* 2009 Jul;50(4):311-24. (b)

Mann BS, Johnson JR, Cohen MH, Justice R, Pazdur R. FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma. *Oncologist.* 2007 Oct;12(10):1247-52.

Martins C, Cavaco B, Tonon G, Kaye FJ, Soares J, Fonseca I. A study of MECT1-MAML2 in mucoepidermoid carcinoma and Warthin's tumor of salivary glands. *J Mol Diagn* 2004;6(3):205–10.

Martins MD, Castilho RM. Histones: Controlling Tumor Signaling Circuitry. *J Carcinog Mutagen.* 2013 Jul 29;1(Suppl 5):1-12.

Mastrangelo MJ, Grage TB, Bellet RE, Weiss AJ. A phase I study of emetine hydrochloride (NSC 33669) in solid tumors. *Cancer.* 1973 May;31(5):1170-5.

McHugh CH, Roberts DB, El-Naggar AK, Hanna EY, Garden AS, Kies MS, Weber RS, Kupferman ME. Prognostic factors in mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands. *Cancer.* 2012 Aug 15;118(16):3928-36.

Medical Research Council Biomedical Catalyst: Developmental Pathway Funding Scheme. Disponível em: <http://www.mrc.ac.uk/funding/browse/developmental-pathway-funding-scheme/>

Melisi D, Chiao PJ. NF-kappa B as a target for cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2007 Feb;11(2):133-44.

Merkhofer EC, Cogswell P, Baldwin AS. Her2 activates NF-kappaB and induces invasion through the canonical pathway involving IKKalpha. *Oncogene*. 2010 Feb 25;29(8):1238-48.

Milán T, Pukkala E, Verkasalo PK, Kaprio J, Jansén CT, Koskenvuo M, Teppo L. Subsequent primary cancers after basal-cell carcinoma: A nationwide study in Finland from 1953 to 1995. *Int J Cancer*. 2000 Jul 15;87(2):283-8.

Miller SC, Huang R, Sakamuru S, Shukla SJ, Attene-Ramos MS, Shinn P, Van Leer D, Leister W, Austin CP, Xia M. Identification of known drugs that act as inhibitors of NF-kappaB signaling and their mechanism of action. *Biochem Pharmacol*. 2010 May 1;79(9):1272-80.

Mochizuki D, Adams A, Warner KA, Zhang Z, Pearson AT, Misawa K, McLean SA, Wolf GT, Nör JE. Anti-tumor effect of inhibition of IL-6 signaling in mucoepidermoid carcinoma. *Oncotarget*. 2015 Sep 8;6(26):22822-35.

Möller M, Weiss J, Wink M. Reduction of cytotoxicity of the alkaloid emetine through P-glycoprotein (MDR1/ABCB1) in human Caco-2 cells and leukemia cell lines. *Planta Med*. 2006 Oct;72(12):1121-6.

Möller M, Wink M. Characteristics of apoptosis induction by the alkaloid emetine in human tumour cell lines. *Planta Med*. 2007 Oct;73(13):1389-96.

Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*. 2008; 132(4):598–611.

Munster PN, Marchion D, Thomas S, Egorin M, Minton S, Springett G, Lee JH, Simon G, Chiappori A, Sullivan D, Daud A. Phase I trial of vorinostat and doxorubicin in solid tumours: histone deacetylase 2 expression as a predictive marker. *Br J Cancer*. 2009 Oct 6;101(7):1044-50.

Munster PN, Thurn KT, Thomas S, Raha P, Lacevic M, Miller A, Melisko M, Ismail-Khan R, Rugo H, Moasser M, Minton SE. A phase II study of the histone deacetylase inhibitor vorinostat combined with tamoxifen for the treatment of patients with hormone therapy-resistant breast cancer. *Br J Cancer*. 2011 Jun 7;104(12):1828-35.

Myhren L, Nilssen IM, Nicolas V, Døskeland SO, Barratt G, Herfindal L. Efficacy of multi-functional liposomes containing daunorubicin and emetine for treatment of acute myeloid leukaemia. *Eur J Pharm Biopharm*. 2014 Sep;88(1):186-93.

Nakanishi C, Toi M. Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nat Rev Cancer*. 2005 Apr;5(4):297-309.

National Center for Advancing Translational Sciences Repurposing Drugs. Disponível em: <http://www.ncats.nih.gov/research/reengineering/rescue-repurpose/rescue-repurpose.html>

Nelsen B, Hellman L, Sen R. The NF-kappa B-binding site mediates phorbol ester-inducible transcription in nonlymphoid cells. *Mol Cell Biol*. 1988 Aug;8(8):3526-31.

O'Neill ID. t(11;19) translocation and CRTC1-MAML2 fusion oncogene in mucoepidermoid carcinoma. *Oral Oncol*. 2009 Jan;45(1):2-9.

Ochicha O, Malami S, Mohammed A, Atanda A. A histopathologic study of salivary gland tumors in Kano, northern Nigeria. *Indian J Pathol Microbiol*. 2009 Oct-Dec;52(4):473-6.

Okabe M, Miyabe S, Nagatsuka H, Terada A, Hanai N, Yokoi M, Shimoizato K, Eimoto T, Nakamura S, Nagai N, Hasegawa Y, Inagaki H. MECT1-MAML2 fusion

transcript defines a favorable subset of mucoepidermoid carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2006 Jul 1;12(13):3902-7.

Ondrey FG, Dong G, Sunwoo J, Chen Z, Wolf JS, Crowl-Bancroft CV, Mukaida N, Van Waes C. Constitutive activation of transcription factors NF-(kappa)B, AP-1, and NF-IL6 in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines that express pro-inflammatory and pro-angiogenic cytokines. *Mol Carcinog.* 1999 Oct;26(2):119-29.

Ozawa H, Tomita T, Sakamoto K, Tagawa T, Fujii R, Kanzaki S, Ogawa K, Kameyama K, Fujii M. Mucoepidermoid carcinoma of the head and neck: clinical analysis of 43 patients. *Jpn J Clin Oncol.* 2008 Jun;38(6):414-8.

Panetti F, Coltman CA Jr. Experience with emetine hydrochloride (NSC 33669) as an antitumor agent. *Cancer.* 1971 Apr;27(4):835-41.

Park Y, Gerson SL. DNA repair defects in stem cell function and aging. *Annu Rev Med.* 2005;56:495–508.

Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB. Cancer incidence in five continents, vol. VIII. IARC Scientific Publications No. 155. Lyon: IARC Press; 2002.

Patel SG, Lydiatt WM. Staging of head and neck cancers: is it time to change the balance between the ideal and the practical? *J Surg Oncol.* 2008 Jun 15;97(8):653-7.

Pearson AT, Finkel KA, Warner KA, Nör F, Tice D, Martins MD, Jackson TL, Nör JE. Patient-derived xenograft (PDX) tumors increase growth rate with time. *Oncotarget.* 2016 Jan 14.

Perzin KH, Gullane P, Clairmont AC. Adenoid cystic carcinomas arising in salivary glands: a correlation of histologic features and clinical course. *Cancer.* 1978 Jul;42(1):265-82.

Pons D, de Vries FR, van den Elsen PJ, Heijmans BT, Quax PH, Jukema JW. Epigenetic histone acetylation modifiers in vascular remodelling: new targets for therapy in cardiovascular disease. *Eur Heart J*. 2009 Feb;30(3):266-77.

Prince ME, Ailles LE. Cancer stem cells in head and neck squamous cell cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Jun 10;26(17):2871-5.

Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, Weissman IL, Clarke MF, Ailles LE. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jan 16;104(3):973-8.

Rahal R, Frick M, Romero R, Korn JM, Kridel R, Chan FC, Meissner B, Bhang HE, Ruddy D, Kauffmann A, Farsidjani A, Derti A, Rakiec D, Naylor T, Pfister E, Kovats S, Kim S, Dietze K, Dörken B, Steidl C, Tzankov A, Hummel M, Monahan J, Morrissey MP, Fritsch C, Sellers WR, Cooke VG, Gascoyne RD, Lenz G, Stegmeier F. Pharmacological and genomic profiling identifies NF- κ B-targeted treatment strategies for mantle cell lymphoma. *Nat Med*. 2014 Jan;20(1):87-92.

Rajasekhar VK, Studer L, Gerald W, Socci ND, Scher HI. Tumour-initiating stem-like cells in human prostate cancer exhibit increased NF- κ B signalling. *Nat Commun*. 2011 Jan 18;2:162. Rane JK1, Pellacani D, Maitland NJ. Advanced prostate cancer--a case for adjuvant differentiation therapy. *Nat Rev Urol*. 2012 Oct;9(10):595-602.

Rasper M, Schäfer A, Piontek G, Teufel J, Brockhoff G, Ringel F, Heindl S, Zimmer C, Schlegel J. Aldehyde dehydrogenase 1 positive glioblastoma cells show brain tumor stem cell capacity. *Neuro Oncol*. 2010 Oct;12(10):1024-33.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001 Nov 1;414(6859):105-11.

Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 1992;255:1707–1710.

Ritchie KE, Nör JE. Perivascular stem cell niche in head and neck cancer. *Cancer Lett*. 2013 Sep 10;338(1):41-6.

Sandur SK, Deorukhkar A, Pandey MK, Pabón AM, Shentu S, Guha S, Aggarwal BB, Krishnan S. Curcumin modulates the radiosensitivity of colorectal cancer cells by suppressing constitutive and inducible NF-kappaB activity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2009 Oct 1;75(2):534-42.

Satko I, Stanko P, Longauerova I. Salivary gland tumours treated in the stomatological clinics in Bratislava. *J Craniomaxillofac Sur*. 2000;28(1):56-61

Schwarz S, Stiegler C, Müller M, Ettl T, Brockhoff G, Zenk J, Agaimy A. Salivary gland mucoepidermoid carcinoma is a clinically, morphologically and genetically heterogeneous entity: a clinicopathological study of 40 cases with emphasis on grading, histological variants and presence of the t(11;19) translocation. *Histopathology*. 2011 Mar;58(4):557-70.

Schwitalla S, Fingerle AA, Cammareri P, Nebelsiek T, Göktuna SI, Ziegler PK, Canli O, Heijmans J, Huels DJ, Moreaux G, Rupec RA, Gerhard M, Schmid R, Barker N, Clevers H, Lang R, Neumann J, Kirchner T, Taketo MM, van den Brink GR, Sansom OJ, Arkan MC, Greten FR. Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell*. 2013 Jan 17;152(1-2):25-38.

Sen GL, Reuter JA, Webster DE, Zhu L, Khavari PA. DNMT1 maintains progenitor function in self-renewing somatic tissue. *Nature*. 2010 Jan 28;463(7280):563-7.

Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell*. 1986 Dec 26;47(6):921-8.

Serraino D, Boschini A, Carrieri P, et al. Cancer risk among men with, or at risk of HIV infection in southern Europe. *AIDS* 2000;14:553–9.

Shishegar M, Ashraf MJ, Azarpira N, Khademi B, Hashemi B, Ashrafi A. Salivary gland tumors in maxillofacial region: a retrospective study of 130 cases in a southern Iranian population. *Patholog Res Int.* 2011;2011:934350.

Siddiqui S, Firat D, Olshin S. Phase II study of emetine (NSC-33669) in the treatment of solid tumors. *Cancer Chemother Rep.* 1973 Nov-Dec;57(4):423-8.

Simard EP, Torre LA, Jemal A. International trends in head and neck cancer incidence rates: differences by country, sex and anatomic site. *Oral Oncol.* 2014 May;50(5):387-403.

Siyi L, Shengwen L, Min R, Wenjun Y, Lizheng W, Chenping Z. Increased expression of MUC-1 has close relation with patient survivor in high-grade salivary gland mucoepidermoid carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2014 Sep;43(8):579-84.

Sobreira TJ, Marlétaz F, Simões-Costa M, Schechtman D, Pereira AC, Brunet F, Sweeney S, Pani A, Aronowicz J, Lowe CJ, Davidson B, Laudet V, Bronner M, de Oliveira PS, Schubert M, Xavier-Neto J. Structural shifts of aldehyde dehydrogenase enzymes were instrumental for the early evolution of retinoid-dependent axial patterning in metazoans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Jan 4;108(1):226-31.

Song J, Noh JH, Lee JH, Eun JW, Ahn YM, Kim SY, Lee SH, Park WS, Yoo NJ, Lee JY, Nam SW. Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer. *APMIS.* 2005 Apr;113(4):264-8.

Spiro RH, Huvos AG, Berk R, et al. Mucoepidermoid carcinoma of salivary gland origin. A clinicopathologic study of 367 cases. *Am J Surg.* 1978;136:461–468.

Spiro RH. Salivary neoplasms: overview of a 35-year experience with 2,807 patients. *Head Neck Surg.* 1986 Jan-Feb;8(3):177-84.

Spitz MR, Tilley BC, Batsakis JG, Gibeau JM, Newell GR. Risk factors for major salivary gland carcinoma. A case-comparison study. *Cancer* 1984;54:1854-9.

Stehlik C, de Martin R, Kumabashiri I, Schmid JA, Binder BR, Lipp J. Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *J Exp Med*. 1998 Jul 6;188(1):211-6.

Sun Q, Yogosawa S, Iizumi Y, Sakai T, Sowa Y. The alkaloid emetine sensitizes ovarian carcinoma cells to cisplatin through downregulation of bcl-xL. *Int J Oncol*. 2015 Jan;46(1):389-94.

Swanson GM, Burns PB. Cancers of the salivary gland: workplace risks among women and men. *Ann Epidemiol* 1997;7:369-74.

Tamatani M, Che YH, Matsuzaki H, Ogawa S, Okado H, Miyake S, Mizuno T, Tohyama M. Tumor necrosis factor induces Bcl-2 and Bcl-x expression through NFkappaB activation in primary hippocampal neurons. *J Biol Chem*. 1999 Mar 26;274(13):8531-8.

Thariat J, Vedrine PO, Temam S, Ali AM, Orbach D, Odin G, Makeieff M, Nicollas R, Penicaud M, Toussaint B, Vergez S, Laprie A, Rives M, Montagne K, Teissier N, Castillo L. The role of radiation therapy in pediatric mucoepidermoid carcinomas of the salivary glands. *J Pediatr*. 2013 Apr;162(4):839-43.

Tilakaratne WM, Jayasooriya PR, Tennakoon TM, Saku T. Epithelial salivary tumors in Sri Lanka: a retrospective study of 713 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009 Jul;108(1):90-8.

Tirado Y, Williams MD, Hanna EY, Kaye FJ, Batsakis JG, El- Naggat AK. CRTC1/MAML2 fusion transcript in high grade mucoepidermoid carcinomas of salivary and thyroid glands and Warthin's tumors: implications for histogenesis and biologic behavior. *Genes Chromosomes Cancer* 2007;46(7): 708–15.

Tsuboi Y, Kurimoto M, Nagai S, Hayakawa Y, Kamiyama H, Hayashi N, Kitajima I, Endo S. Induction of autophagic cell death and radiosensitization by the pharmacological inhibition of nuclear factor-kappa B activation in human glioma cell lines. *J Neurosurg.* 2009 Mar;110(3):594-604.

Ueda Y, Richmond A. NF-kappaB activation in melanoma. *Pigment Cell Res.* 2006 Apr;19(2):112-24.

Vanneman M, Dranoff G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nat Rev Cancer.* 2012 Mar 22;12(4):237-51.

Vargas PA, Gerhard R, Araújo Filho VJ, de Castro IV. Salivary gland tumors in a Brazilian population: a retrospective study of 124 cases. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo.* 2002 Nov-Dec;57(6):271-6.

Vasconcelos AC, Nör F, Meurer L, Salvadori G, Souza LB, Vargas PA, Martins MD. Clinicopathological analysis of salivary gland tumors over a 15-year period. *Braz Oral Res.* 2016;30.

Venezia TA, Merchant AA, Ramos CA, Whitehouse NL, Young AS, Shaw CA, et al. Molecular signatures of proliferation and quiescence in hematopoietic stem cells. *PLoS Biol.* 2004; 2(10):e301.

Verdone L, Caserta M, Di Mauro E. Role of histone acetylation in the control of gene expression. *Biochem Cell Biol.* 2005 Jun;83(3):344-53.

Wade PA, Kikyo N. Chromatin remodeling in nuclear cloning. *Eur J Biochem.* 2002 May;269(9):2284-7.

Wang S, Yang D, Lippman ME. Targeting Bcl-2 and Bcl-XL with nonpeptidic small-molecule antagonists. *Semin Oncol*. 2003; 30(5 Suppl 16):133–142

Warner KA, Adams A, Bernardi L, Nor C, Finkel KA, Zhang Z, McLean SA, Helman J, Wolf GT, Divi V, Queimado L, Kaye FJ, Castilho RM, Nör JE. Characterization of tumorigenic cell lines from the recurrence and lymph node metastasis of a human salivary mucoepidermoid carcinoma. *Oral Oncol*. 2013 Nov;49(11):1059-66.

Witt BL, Schmidt RL. Ultrasound-guided core needle biopsy of salivary gland lesions: a systematic review and meta-analysis. *Laryngoscope*. 2014 Mar;124(3):695-700.

Yamamoto K, Arakawa T, Ueda N, Yamamoto S. Transcriptional roles of nuclear factor kappa B and nuclear factor-interleukin-6 in the tumor necrosis factor alpha-dependent induction of cyclooxygenase-2 in MC3T3-E1 cells. *J Biol Chem*. 1995 Dec 29;270(52):31315-20.

Zhang PL, Pellitteri PK, Law A, Gilroy PA, Wood GC, Kennedy TL, Blasick TM, Lun M, Schuerch C 3rd, Brown RE. Overexpression of phosphorylated nuclear factor-kappa B in tonsillar squamous cell carcinoma and high-grade dysplasia is associated with poor prognosis. *Mod Pathol*. 2005 Jul;18(7):924-32.

Zheng W, Shu XO, Ji BT, Gao YT. Diet and other risk factors for cancer of the salivary glands: a population-based case-control study. *Int J Cancer* 1996;67:194–8.

Zheng X, Naiditch J, Czurylo M, Jie C, Lautz T, Clark S, Jafari N, Qiu Y, Chu F, Madonna MB. Differential effect of long-term drug selection with doxorubicin and vorinostat on neuroblastoma cells with cancer stem cell characteristics. *Cell Death Dis*. 2013 Jul 25;4:e740.

Zhu L, Fukuda S, Cordis G, Das DK, Maulik N. Anti-apoptotic protein survivin plays a significant role in tubular morphogenesis of human coronary arteriolar endothelial cells by hypoxic preconditioning. *FEBS Lett.* 2001 Nov 23;508(3):369-74.

Zupkovitz G, Tischler J, Posch M, Sadzak I, Ramsauer K, Egger G, Grausenburger R, Schweifer N, Chiocca S, Decker T, Seiser C. Negative and positive regulation of gene expression by mouse histone deacetylase 1. *Mol Cell Biol.* 2006 Nov;26(21):7913-28.