

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

**DISRUPÇÃO DA SINALIZAÇÃO EPIGENÉTICA DA HISTONA  
ATRAVÉS DA INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DO BRD4 NA BIOLOGIA  
DOS CARCINOMAS DE CABEÇA E PESCOÇO**

**LIANA PRETO WEBBER**

Porto Alegre  
2018

**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:*

**Disrupção da sinalização epigenética da histona através da inibição farmacológica do BRD4 na biologia dos carcinomas de cabeça e pescoço**

*Por*

**LIANA PRETO WEBBER**

**Orientadora: Profa. Dra. Manoela D. Martins  
Co-orientador: Prof. Dr. Rogério M. Castilho**

Porto Alegre  
2018

**LIANA PRETO WEBBER**

**Disrupção da sinalização epigenética da histona através da inibição farmacológica do BRD4 na biologia dos carcinomas de cabeça e pescoço**

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: Patologia Bucal.

Orientadora: Profa. Dra. Manoela Domingues Martins  
Co-Orientador: Prof. Dr. Rogério Moraes Castilho

Porto Alegre  
2018

### CIP - Catalogação na Publicação

Webber, Liana Preto

Disrupção da sinalização epigenética da histona através da inibição farmacológica do BRD4 na biologia dos carcinomas de cabeça e pescoço / Liana Preto Webber. -- 2018.

65 f.

Orientadora: Manoela Domingues Martins.

Coorientador: Rogério Moraes Castilho.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Epigenética . 2. JQ1. 3. BRD4. 4. Câncer de Boca. 5. Senescência . I. Martins, Manoela Domingues, orient. II. Castilho, Rogério Moraes, coorient. III. Título.

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

*“Hoje me sinto mais forte  
Mais feliz, quem sabe  
Só levo a certeza  
De que muito pouco sei  
Ou nada sei  
Conhecer as manhas  
E as manhãs  
O sabor das massas  
E das maçãs  
É preciso amor  
Pra poder pulsar  
É preciso paz pra poder sorrir  
É preciso a chuva para florir”  
(Almir Sater – Tocando em Frente)*

*“Você nunca será completo em casa novamente,  
porque uma parte do seu coração  
vai estar sempre em outro lugar.  
Este é o preço que você paga  
pela riqueza de amar pessoas  
em mais de um lugar”  
(Miriam Adeney)*

## AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por não ter tudo que gostaria, mas tudo que necessito. “A ciência sem a religião é manca, a religião sem a ciência é cega (Albert Einstein)”.

À minha **família**, meu porto seguro. Se consegui concluir essa importante jornada, foi graças ao apoio incondicional deles. Aos meus pais, **Tailor e Terezinha**, por não medirem esforços para alcançarem a minha felicidade, mesmo que o resultado seja minha ausência. Obrigada pelo apoio, pela pessoa que me tornei hoje e por me darem a certeza que não interessa aonde vá e o que aconteça eu sempre posso voltar para casa! Isso é reconfortante e motivador, amo vocês cada dia mais. Aos meus irmãos, **Mariana e Pedro**, crescer com irmãos é a maior bênção que os pais podem dar aos seus filhos, cada dia que passa a frase “seja legal com os seus irmãos eles são a melhor ponte entre o seu passado e possivelmente quem irá mesmo te apoiar no futuro” faz mais sentido.

Ao **Trevor**, *my soulmate*, a pessoa mais doce, gentil e amável que eu conheço. *Thank you for supporting me, no matter what happens. You are my smile, my driving force, my snuggle bug : ) love you.*

À todos que passaram no *Epithelial Biology Lab* ao longo da minha jornada. Pessoas incríveis com diferentes realidades e culturas que me proporcionaram conhecer melhor o mundo e principalmente o Brasil, sob diferentes aspectos. Cresci e aprendi muito graças o convívio com todos. *Thank you, muchas gracias*, obrigada **Ana, Glaucia, Tobias, Duda, Ericka, Gabriell, Kellen, Leo, Renata, Carlos V., Thâmara, Marisol, Kellen, Verônica, Brian, Aaron, Jeff, Allan, John, Carlos G., Fernando, Habin, Peter, Mustafa e Anusha**. Um agradecimento especial e carinhoso à **Thâmara**, por ser uma nova irmã que a vida me deu a graça de dar, por chorar com as minhas tristezas e, principalmente, por vibrar a cada conquista com se fosse sua. Ao **Carlos V.** pela pessoa generosa e prestativa que é, por fazer a diferença para as pessoas a sua volta.

Aos **meus amigos de Ann Arbor** por fazerem o papel de família, muitas vezes.

Aos **amigos de toda a vida** que as vezes mesmo com a distância seguem me apoiando e torcendo por mim.

À todos os **meus colegas de pós-graduação** em Patologia por todo conhecimento construído e compartilhado. Em especial as minhas amigas do coração: **Vivi**, pessoa que sou fã número 1, que é bonita por dentro e por fora, que consegue equilibrar vida pessoal e profissional, sendo competente em ambas, **Marina**, extremamente competente e dedicada, meu exemplo e espelho e por nunca desistir de mim, mesmo eu cancelando muitos *skypes*, **Isadora**, minha sempre companheira, na patologia e na vida, **Taiane**, graça e leveza em pessoa.

Aos grandes **mestres da patologia UFRGS**. Obrigada por todo conhecimento cedido, me sinto honrada de ter sido aluna de vocês.

Aos **meus orientadores** de toda minha vida acadêmica, sou muito grata de ter tido *dream time* de orientadores de qualquer pessoa. Primeiramente, tive a sorte de ser “descoberta” pelo professor **Vinícius** que acreditou no meu potencial, mesmo quando eu não acreditava. Teve toda a paciência de me ensinar o básico, me mostrou o que significava o mundo acadêmico, mas o mais importante é que se tornou um grande amigo da vida. Depois, tive a benção de ser orientada pela professora **Manoela**, a pessoa que consegue fazer mil coisas ao mesmo tempo e todas perfeitas! É mulher, mãe, pesquisadora, professora, esposa, amiga, dona de casa e orientadora tudo ao mesmo tempo e faz tudo com uma perfeição e competência admirável. Meu exemplo e se um dia conseguir ser um décimo do que a Manô é, me sentirei completamente realizada. Obrigada pela paciência, pelos ensinamentos e principalmente pela amizade. E por último foi orientada pelos professores **Rogério e Cristiane**, pesquisadores brasileiros de renome internacional. Me mostraram um outro nível de pesquisa que nunca tinha sonhado poder fazer parte, cresci exponencialmente com o conhecimento e principalmente com a generosidade deles. Sou eterna e profundamente grata pela oportunidade e por todo tempo gasto comigo.

Ao **programa de pós-graduação em Odontologia da UFRGS** por todo apoio fundamental durante meu mestrado e doutorado. O programa proporcionou todo o suporte necessário para a minha pesquisa. Sou muito grata.

À **Universidade Federal do Rio Grande do Sul** por me proporcionar estudo gratuito e de qualidade por 10 anos.

À **University of Michigan**, melhor faculdade de Odontologia dos Estado Unidos por me acolher e por me proporcionar realizar essa tese. *It's great to be a Michigan Wolverine!*  
*Go blue!*

À Capes e ao CNPQ pelo fomento.

*“E aprendi que se depende sempre de tanta, muita, diferente gente.*

*Toda pessoa sempre é as marcas das lições diárias  
de outras tantas pessoas*

*E é tão bonito quando a gente entende*

*Que a gente é tanta gente onde quer que a gente vá*

*E é tão bonito quando a gente sente*

*Que nunca está sozinho por mais que pense estar.”*

*(Gonzaguinha - Caminhos do Coração)*



## RESUMO

A descondensação da cromatina exerce um papel central nas diversas etapas do processo de carcinogênese abrindo o genoma para a ação de fatores de transcrição, exercendo papel na progressão e resistência tumoral. Bromodomínios e proteínas com terminal extra, como o BRD4, são leitores epigenéticos que regulam a expressão gênica e, portanto, também estão envolvidos na patogênese do câncer. O objetivo do presente estudo foi estudar o efeito da inibição do BRD4 no carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECP). Para esse propósito, foi utilizado JQ1, inibidor de BRD4, em concentração de 1 $\mu$ M, nas linhagens de carcinoma de cabeça e pescoço HN6, HN12 e HN13. Foi analisado os níveis de BRD4, H4 acetilada e SIRT1 fosforilado através de reações de imunofluorescência e p16ink4 por imunohistoquímica. Foi realizado western blot para checar os níveis de p53 e p53 acetilado. Ensaio de formação de colônias e câmara de invasão foram realizados para testar o efeito do inibidor na proliferação e invasão celular. Através da citometria de fluxo foi analisado o efeito da apoptose com a marcação de caspase-3 clivada, do ciclo celular através da reação por iodeto de propídio e ainda da população de células tronco tumorais pela análise de ALDH e CD44. Por fim, foi realizado modelo xenográfico subcutâneo para analisar o efeito do JQ1. Os resultados mostraram diminuição significativa da expressão de BRD4 e H4ac após tratamento com JQ1. As linhagens celulares mostraram redução na capacidade de invasão e de formação de colônias quando submetidas ao JQ1. Não foram encontradas diferenças em relação ao número de células caspase-3 clivada positivas. Por outro lado, foi encontrado um maior número de células na fase G1 do ciclo celular após o uso do inibidor estudado. As células tratadas com JQ1 mostraram menor expressão de p-SIRT1 o que levou a uma diminuição da acetilação do p53 e um aumento na expressão de p16ink4. Paralelamente, foi encontrada uma diminuição na população de células positivas para ALDH e CD44. Houve diminuição do crescimento do tumor no modelo xenográfico tratado com JQ1 quando comparado ao veículo. Nos tecidos derivados do ensaio *in vivo*, houve uma diminuição nos marcadores p16ink4, pSIRT1 além de acúmulo de  $\gamma$ H2AX. Conclui-se que o uso de JQ1 resulta na interrupção do crescimento do CECP associado a ativação de senescência, indução de dano de DNA além de reduzir a população de células tronco tumorais. Esses novos achados indicam que o BRD4 é um importante modificador epigenético nos CECP sendo um viável alvo terapêutico.

Palavras chave: Epigenética. JQ1. BRD4. Câncer de Boca. Senescência.

## ABSTRACT

Chromatin descondensation plays a central step in the various stages of the carcinogenesis process opening the genome for transcription factors playing a role in tumor progress and resistance. Bromodomains and extra terminal family, as BRD4, are epigenetics readers that regulate gene expression thus they are also involved in cancer pathogenesis. The objective of this project was studied the effect of BRD4 in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). For this purpose, JQ1, a BRD4 inhibitor, was used in 1uM concentration, in HN6, HN12 and HN13 head and neck carcinoma cell lines. The levels of BRD4, acetylates h4 and phosphorylated SIRT1 were analyzed by immunofluorescence and p16ink4 labeling by immunohistochemistry. Western blot was performed to check the levels of p53 and acetylated p53. Colony assay and invasion chamber were performed to test the inhibitory effect on cell proliferation and invasion. The effect of apoptosis with the cleaved caspase-3 labeling, the cell cycle by propidium iodide and of the population of tumor stem cells by the analysis of ALDH and CD44 was analyzed through flow cytometry. Finally, a subcutaneous xerographic model was performed to analyze the effect of JQ1. A significant decrease in the expression of BRD4 and H4ac was found after application of JQ1. The cell lines results showed a reduction in the capacity of invasion and also formation of colonies when submitted to JQ1. No differences were found in relation to the number of cells caspase-3 cleaved positives. On the other hand, a large number of cells were found in G1 arrest of cell cycle after use of the BRD4 inhibitor studied. Cells treated with JQ1 showed lower expression of p-SIRT1 which led to a decrease in p53 acetylation and an increase in p16ink4 expression. In parallel, a decrease of ALDH and CD44 positive cells population was found. A decrease in tumor growth was discovered when treated by JQ1 if compared to the vehicle. In tissues samples derived from the *in vivo* assay, there was a decrease in p16ink4, pSIRT1 markers in addition to  $\gamma$ -H<sub>2</sub>Ax accumulation. In conclusion JQ1 causes HNSCC tumor growth disruption associated a senescence activation, DNA damage and a reduce number of cancer stem cells. These new findings indicate that BRD4 is an important genetic modifier in HNSCC and is a viable therapeutic target.

Keywords: Epigenetics. JQ1. BRD4. Oral Cancer. Senescence.

## LISTA DE FIGURAS

### Lista de figuras da revisão de literatura

- Figura 1: Principais vias do câncer de cabeça e pescoço conforme a prevalência **18**  
Fonte: (Cancer Genome Atlas 2015).
- Figura 2. Ilustração esquemática do tratamento de precisão para o câncer de **19**  
cabeça e pescoço. No futuro, amostras de sangue ou saliva contendo DNA tumoral circulante ou outros produtos tumorais poderão ser empregadas para caracterizar os tumores. Usando o perfil molecular serão identificados os alvos para o tratamento, resultando na escolha de alvos terapêuticos específicos (alvo) e aumento da sobrevida dos pacientes.  
Fonte: (Polverini, D'Silva, and Lei 2018).
- Figura 3: Ilustração das modificações pós-traducionais. **24**  
Fonte: <http://blogs.shu.edu/cancer/2016/01/27/bet-bromodomain-inhibition-in-prostate-cancer-treatment/>
- Figura 4: Organização da família de proteínas BET. Na figura é esquematizado **25**  
a localização e comprimento dos dois bromodomínios (BD1 e BD2) e a quantidade total de aminoácidos compostos juntamente com os aminoácidos nos terminais extras.  
Fonte: (Baud et al. 2014).
- Figura 5. Desenho esquemático da interrupção da acetilação de histonas através **29**  
do deslocamento da ligação do sítio acetilado na cauda das histonas com um bromodomínio. A desconexão do bromodomínio com o grupo acetilado leva diminuição na transcrição de diversos genes.  
Fonte: (Perez-Salvia and Esteller 2017).

Figura 6. Filogenia baseada na estrutura dos bromodomínios humanos e seus **30**  
inibidores. Existem 61 bromodomínios em 46 proteínas contendo  
bromodomínios. Algarismos romanos indicam as oito principais classes  
estruturais. Os inibidores específicos são indicados ao lado do bromodomínio  
correspondente.

Fonte: (Filippakopoulos and Knapp 2014).

Figura 7: Estrutura molecular do JQ1. **31**

Fonte:(Filippakopoulos et al. 2010)

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

### Lista de abreviaturas da revisão de literatura

<i>Aldehyde dehydrogenase</i>	ALDH
Ácido desoxirribonucleico	DNA
Ácido ribonucleico	RNA
<i>Bromodomain and Extra Terminal</i>	BET
Câncer de boca	CB
Carcinoma espinocelular	CEC
Carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço	CECP
<i>Epidermal growth factor receptor</i>	EGFR
Histona acetiltransferase	HAT
Histona desacetilase	HDAC
<i>Human Papiloma Virus</i>	HPV
Interleucina 1 $\beta$	IL-1 $\beta$
Interleucina 6	IL-6
Interleucina 12	IL-12
<i>The Cancer Genoma Atlas</i>	TCGA
<i>Vascular endothelial growth factor</i>	VEGF

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
2.1	<i>Câncer de cabeça e pescoço</i> .....	16
2.2	<i>Epigenética e a acetilação de histonas</i> .....	20
2.3	<i>Bromodomínio e família BET</i> .....	23
2.4	<i>Família BET e as doenças</i> .....	27
2.5	<i>JQ1 e inibidores da família BET</i> .....	29
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	32
<b>4</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	33
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	56
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	58

## 1 INTRODUÇÃO

No ano 2000, Hanahan e Weinberg (Hanahan and Weinberg 2000) publicaram um artigo no qual descreveram as seis “marcas” do câncer (do inglês *hallmarks of cancer*). Esses autores sugeriram seis manifestações essenciais na fisiopatologia das células neoplásicas malignas comuns a todos os tipos de câncer. Essas características foram descritas como necessárias para o tumor maligno se desenvolver. Essas características são: autossuficiência para sinais de crescimento, evasão de sinais anti-crescimento, evasão a apoptose, potencial replicativo ilimitado (imortalização), angiogênese sustentada e capacidade de invadir tecidos e formar metástases. No ano de 2011, foram adicionados outros aspectos: a desregulação do metabolismo energético, a evasão da destruição do tumor pelo sistema imune, instabilidade genômica e inflamação como possíveis novas marcas (Hanahan and Weinberg 2011). Essas características são comuns a todas neoplasias malignas, incluindo CECP. O grande desafio da terapia anti-neoplásica é romper esses mecanismos, pois geralmente as terapias são focadas em apenas um dos processos e o seu sucesso acaba sendo limitado. Ademais, os mecanismos neoplásicos acabam por compensar o mecanismo que foi bloqueado como observado na última década com o uso de inibidores angiogênicos (Ye 2016). Para romper essa dificuldade, atualmente a nova aposta para os tratamentos oncológicos são utilizar terapias que tenham como alvo as desregulações cromossômicas de uma maneira global, como as modificações epigenéticas.

A epigenética é o nome dado para os mecanismos herdáveis e potencialmente reversíveis que provocam alterações na expressão gênica sem que ocorram modificações na sequência do DNA, como por exemplo, a acetilação de histonas (Martins and Castilho 2013). Por estarem regulando a conformação da cromatina e propiciando o silenciamento ou expressão gênica, a terapia focada na regulação do status da cromatina tem mostrado excelentes resultados e tem como alvo não apenas uma característica específica do câncer (*hallmarks*) mas sim, podem provocar alterações globais na cromatina alterando a atividade transcricional (Gillenwater, Zhong, and Lotan 2007).

As alterações na acetilação das histonas têm sido relacionadas como um alvo promissor para o tratamento de diversos tipos de câncer (Suraweera, O'Byrne, and Richard 2018; Langer et al. 2016; Groselj et al. 2013; Li and

Seto 2016) inclusive para o carcinoma de cabeça e pescoço (CECP) (Almeida et al. 2017; Giudice et al. 2013). Contudo, ainda não é tão explorado o papel dos leitores da acetilação de histonas durante a carcinogênese.

Os bromodomínios são as proteínas responsáveis por fazer a ligação com as caudas acetiladas das histonas e assim recrutar fatores de transcrição para a cromatina, sendo reguladores globais da transcrição gênica (Hsu and Blobel 2017; Zeng and Zhou 2002). O BRD4 é o bromomínio mais importante e estudado, sua atividade está relacionado a genes importantes para a carcinogênese (Kohnken et al. 2018; Hsu and Blobel 2017). Sua inibição pode gerar a diminuição da transcrição de oncogêneses além de diversos outros mecanismos importantes para o câncer, como as “marcas registradas” do câncer (da Motta et al. 2017)

Apenas dois estudos foram realizados relacionando os leitores da acetilação de histona como alvo terapêutico para o CECP (Wang, Wu, et al. 2017; Wang et al. 2016). Contudo, é escasso o conhecimento de como os inibidores de bromodomínios, e mais especificamente de BRD4, atuam frente as células de CECP e como essas novas drogas podem ser realizadas no tratamento dessa neoplasia. Portanto, é necessário o estudo da disrupção da sinalização da acetilação no CECP como nova frente de tratamento para essas lesões.



## 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: câncer de cabeça e pescoço, epigenética e a acetilação de histonas, bromodomínio e família BET, família BET e as doenças, JQ1 e inibidores da família BET.

### 2.1 Câncer de cabeça e pescoço

A denominação câncer de cabeça e pescoço compreende um grupo heterogêneo de neoplasias malignas localizadas no trato aero-digestivo superior, podendo ser classificada como de origem na orofaringe ou não-orofaringe, ou seja, em regiões como laringe, faringe, nasofaringe, cavidade nasal e cavidade bucal. Contudo, mesmo sendo uma denominação ampla e abrangendo muitas lesões, a vasta maioria é histopatologicamente classificada como CEC, isto é, mesmo sendo localizadas em regiões anatômicas diferentes compartilham da mesma origem celular: as células da camada espinhosa do epitélio. (Rettig and D'Souza 2015; Licitra et al. 2004)

O CEC é considerado o sétimo mais frequente no mundo (Ferlay et al. 2010) e o nono mais comum nos Estados Unidos (Howlander et al. 2014).

Já o carcinoma de boca (CB) compreende um grupo de lesões que acometem a cavidade oral. Esse tipo de neoplasia maligna representa cerca de 3% de todos os novos cânceres diagnosticados. Nos Estados Unidos, apenas no ano de 2017 foram registrados 10.000 casos de morte associadas a este tipo de câncer. (<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/oralcav.html> acessado em 21/03/18). Essa neoplasia é mais frequente em homens acima de 60 anos, contudo, um aumento no número de mulheres e jovens tem sido relatado. (Fakhry et al. 2018; Chen et al. 2017; Hussein et al. 2017; Andisheh-Tadbir, Mehrabani, and Heydari 2010; Warnakulasuriya 2010).

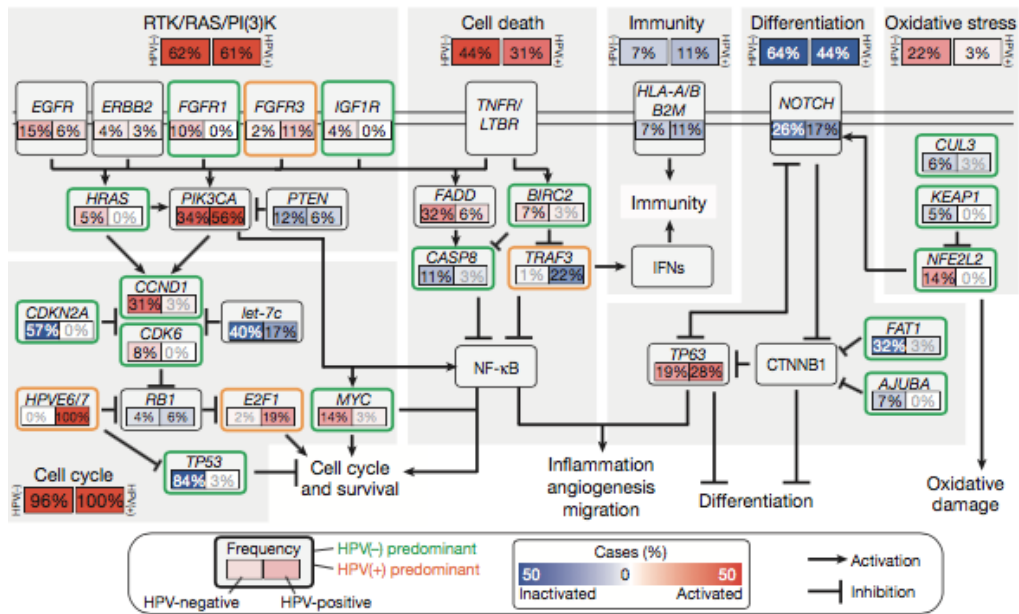
A etiologia do CB é multifatorial e nenhum fator isolado é considerado como o agente causal, ou seja, uma combinação de diversos fatores de risco tem sido descritos agindo em conjunto. Os principais fatores de risco para essa lesão são (1) o uso de tabaco e álcool e, mais precisamente nas últimas décadas, em subsítios específicos tem sido relacionado a (2) infecção pelo Papiloma Vírus Humano (HPV, do inglês *Human Papiloma Virus*) (Gillison et al. 2008).

O diagnóstico do CB é realizado através do exame clínico do paciente em combinação com biópsia seguida de exame histopatológico da peça. Mesmo sendo essa uma região de fácil visualização, ainda cerca de 60% dos pacientes são diagnosticados em estágios mais avançados da doença (Brandizzi et al. 2008; Seoane-Romero et al. 2012).

As alternativas de tratamento para o CB ainda são a ressecção cirúrgica, radioterapia e a quimioterapia sozinha ou em combinação com a radioterapia. A escolha de qual ou quais terapias serão utilizadas para cada caso é feita através de uma avaliação do grau de disseminação da doença de acordo com estadiamento clínico. Apesar dos avanços observados através da pesquisa básica e clínica, o percentual de sobrevivência em 5 anos pouco mudou nos últimos 30 anos, passando de 52.7% em 1975 para 67.2% em 2013 (<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/oralcav.html> acessado em 21/03/2018). Ou seja, mesmo com a grande quantidade de pesquisa o tratamento do CEC, ainda é algo desafiador.

Um dos pontos-chaves para tamanha complexidade na forma de tratar as neoplasias são as numerosas mutações gênicas dentro de uma mesma doença. Por exemplo, dois pacientes com o mesmo diagnóstico de CB, com laudo histopatológico semelhante, podem ter comportamento totalmente diferente. Contudo, muitos avanços foram alcançados devido ao projeto Atlas Genômico do Câncer (do inglês *The Cancer Genome Atlas -TCGA*) que catalogou mutações genéticas responsáveis pelo câncer através de sequenciamento genético e bioinformática (Figura 1). Esse projeto foi supervisionado pelo *National Cancer Institute* e *National Human Genome Research Institute* nos Estados Unidos e caracterizou 33 tipos de cânceres através de dados de onze mil pacientes gerando 2.5 *pentabytes* de dados (<https://cancergenome.nih.gov> acessado 23 de março de 2018). Foram analisados nesse projeto dados de 279 pacientes com câncer de cabeça e pescoço. Os pesquisadores envolvidos encontraram que os tumores associados ao vírus do papiloma humano são em sua maioria caracterizados por mutações do domínio helicoidal do oncogene PIK3CA, além de novas alterações envolvendo a perda de TRAF3 e amplificação do gene do ciclo celular E2F1. Os carcinomas de cabeça e pescoço relacionados ao tabagismo demonstram mutações de perda de função do TP53 quase universais e inativação do CDKN2A com alterações frequentes no número de cópias, incluindo amplificação de 3q26 / 28 e 11q13 / 22 (Cancer Genome Atlas 2015).

Figura 1: Principais vias do câncer de cabeça e pescoço conforme a prevalência



Fonte: (Cancer Genome Atlas 2015)

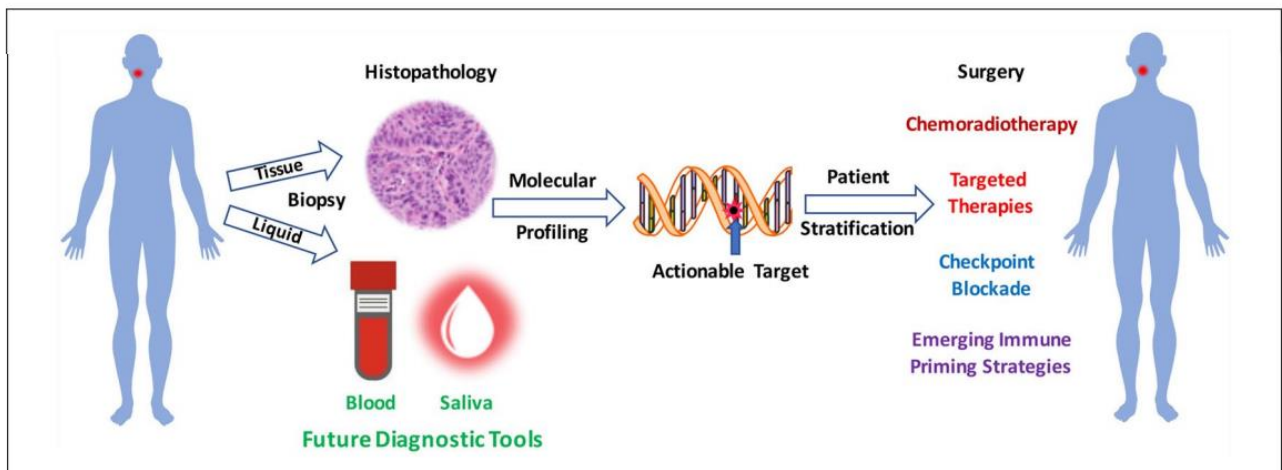
Ainda podemos citar como outra dificuldade encontrada no tratamento das neoplasias malignas o fato dos tumores serem compostos por populações de células heterogênicas e que apresentam diferentes papéis no ambiente tumoral. Dentre esses grupos de células as denominadas células tronco-tumorais, do inglês *cancer stem cells* tem disso amplamente discutidas. Essas células exibem características semelhantes as das células tronco incluindo grande potencial proliferativo, capacidade de recidiva e de ativação de quiescência celular entre outras características (Zhang, Filho, and Nor 2012). As células tronco tumorais mostram-se menos sensíveis as terapias convencionais e se mantém viáveis após o tratamento, permitindo a recidiva do tumor e as metástases. Portanto, para o real tratamento do câncer são necessárias terapias alvo para esta população de células tronco tumorais com o intuito de controlar a doença e obter resultados mais satisfatórios quanto ao prognóstico (Kumar et al. 2015; Qiu et al. 2015; Wei and Lewis 2015).

Por outro lado, um novo tipo de abordagem focada nas particularidades do individuo tem sido utilizado. Essa estratégia é chamada de medicina personalizada ou precisa que tem como premissa determinar o tratamento, práticas e intervenções de uma determinada doença baseado no código genético do paciente, sendo assim, cada

paciente ou grupo de pacientes recebe a terapia necessária para suas particularidades e necessidades (Garraway, Verweij, and Ballman 2013). Mais precisamente sobre o câncer, a oncologia de precisão tem auxiliado no tratamento de diversos pacientes em que as terapias convencionais não mostraram resultados satisfatórios (Figura 2). Com os avanços na pesquisa sobre o câncer e do atlas genômico do câncer é possível um paciente que não responde a terapia convencional receber uma verificação de seus dados genômicos e com isso receber uma terapia que seja alvo para os genes e proteínas que estão mutados segundo o seu código genético. Além de prologar a sobrevida dos pacientes, esse tipo de tratamento também gera menores custos (Haslem et al. 2018).

Atualmente, já tem sido realizado terapias-alvo para recorrentes mutações em algumas neoplasias específicas. Por exemplo: pacientes com câncer de estômago recebem terapia direcionada ao fator de crescimento endotelial anti-vascular (VEGF) e anti-receptor do fator de crescimento epidérmico humano (HER2). Já para pacientes com câncer colorretal é recomendada a investigação do estado de

Figura 2. Ilustração esquemática do tratamento de precisão para o câncer de cabeça e pescoço. No futuro, amostras de sangue ou saliva contendo DNA tumoral circulante ou outros produtos tumorais poderão ser empregadas para caracterizar os tumores. Usando o perfil molecular serão identificados os alvos para o tratamento, resultando na escolha de alvos terapêuticos específicos (alvo) e aumento da sobrevida dos pacientes.



Fonte: (Polverini, D'Silva, and Lei 2018)

mutação do RAS, e se confirmada, o uso de inibidores de mutações no receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) é recomendada. (Saito, Momma, and Kono 2018).

## 2.2 Epigenética e a acetilação de histonas

A epigenética é o termo usado para descrever mecanismos potencialmente reversíveis que provocam alterações na expressão gênica sem que ocorram modificações na sequência do DNA. A regulação epigenética da expressão do gene é controlada principalmente por metilação do DNA, ação de RNAs não codificadores e modificação de histonas (Blancafort, Jin, and Frye 2013; Martins and Castilho 2013).

Aproximadamente todas as células de um organismo possuem o mesmo material genético. Contudo, sabemos que em um mesmo indivíduo existem diferentes células com diferentes funções. Por exemplo, um queratinócito e um fibroblasto mesmo tendo o mesmo material genético são especializados em funções distintas, além de serem diferentes tanto morfológica quanto fisiologicamente. Essa diversidade só é possível devido à expressão diferencial dos genes, isto é, a capacidade das células de ativar a expressão de determinados genes enquanto reprime a de outros dados através da epigenética. A expressão dos genes é dirigida primariamente pela ligação de fatores de transcrição a promotores e potencializadores (*enhancers*) relacionados. Contudo, a conformação física da cromatina tem papel crucial para determinar quais genes serão transcritos ou não, tornando as sequências do DNA mais ou menos acessíveis a ação desses fatores (Thomas and Marcato 2018; Paksa and Rajagopal 2017).

A cromatina é formada, basicamente, por complexos de DNA e proteínas, o que possibilita a acomodação de quase dois metros de DNA dentro do núcleo de cada célula humana. Ela pode ser mais condensada, chamada heterocromatina, ou menos condensada, a eucromatina. As histonas são proteínas que auxiliam o empacotamento do DNA, funcionando como uma matriz na qual o DNA se enrola e que estão associadas a funções importantes, incluindo a regulação da expressão de genes em vários tipos de tecidos. Ao compactarem o DNA, permitem que os genomas eucarióticos de grandes dimensões caibam dentro do núcleo das células. O DNA, mais o conjunto de oito histonas, formam o nucleossomo (unidade fundamental da cromatina). Um nucleossomo é composto por cerca de 147 pares de bases de DNA que se enovelam em 1,7 voltas através de um octâmero de histonas (Thomas and Marcato 2018; Martins and Castilho 2013).

As histonas são divididas em 5 famílias, a H1 que auxilia a ligação entre os nucleossomos e a fita de DNA, e as histonas H2A, H2B, H3 e H4 que formam um octâmero de histonas onde o DNA se enrola. O octâmero é formado por duas cópias de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4. As histonas H2A e H2B apresentam-se na forma de dois heterodímeros e H3 e H4 formam um tetrâmero. Com a associação desses dois complexos forma-se o octâmero de histonas. As histonas exibem caudas, agrupamentos amino-terminal (n- terminal), contendo diversos resíduos de aminoácidos, principalmente de lisina (lis), serina (ser) e arginina (arg). Essas caudas se projetam para fora dos nucleossomos e, portanto, estão sujeitas a um número grande de modificações pós- transducionais (Lawlor and Thiele 2012; Martins and Castilho 2013; Tan et al. 2011). As mudanças dinâmicas na organização da estrutura da cromatina são movidas principalmente pela sua acetilação e desacetilação que determinam o status da cromatina (eucromatina ou heterocromatina) (Lund and van Lohuizen 2004; Martins and Castilho 2013; Yun et al. 2011) que por sua vez, influencia a acessibilidade e o recrutamento de fatores nucleares para o DNA afetando a transcrição.

O processo de acetilação representa a 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, Caserta, and Di Mauro 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 and Kikyo 2002) e influenciam o grau de compactação da cromatina desempenhando um papel regulatório da expressão gênica (Figura 2 e 3). Contudo, pode haver a acetilação em regiões específicas promotoras da transcrição gênica. Quando há o desequilíbrio na acetilação e desacetilação das histonas, por alterações nas HATs e HDACs, em regiões promotoras há uma contribuição para a desregulação da expressão gênica que pode estar relacionada à carcinogênese e a progressão do tumor (Lehrmann,

Pritchard, and Harel-Bellan 2002; Villar-Garea and Esteller 2004; Seligson et al. 2005; Gallinari et al. 2007; Ropero and Esteller 2007; Yuan et al. 2015).

A iniciação e progressão do câncer é controlada por eventos genéticos e epigenéticos. A complexidade da carcinogênese não pode ser explicada apenas por alterações genéticas, mas também envolve mudanças epigenéticas. No desenvolvimento de neoplasias humanas, sabe-se que as aberrações epigenômicas contribuem para várias fases do desenvolvimento neoplásico, incluindo iniciação, promoção, invasão, metástases e resistência à quimioterapia. Recentemente, foi proposto que mais de 300 genes e produtos gênicos são alterados epigeneticamente em vários tumores (Kanwal and Gupta 2012). Por exemplo, o silenciamento de alguns genes, através da compactação da cromatina pelas HDACs, está relacionado com a iniciação tumoral diminuindo a função de genes como os inibidores do ciclo celular e da diferenciação e aumentando fatores promotores da carcinogênese como os responsáveis pela angiogênese, invasão, adesão e progressão. Além disso, as células tumorais malignas utilizam mecanismos de regulação epigenética para aumento da sobrevivência e resistência à apoptose (Halkidou et al. 2004; Song et al. 2005; Hrzenjak et al. 2006; Chang et al. 2009).

Contudo, para que a acetilação aconteça e ocorra o relaxamento do DNA, além da adição dos grupos acetil nos resíduos de lisina na cauda n-terminal das histonas, é importante a ação de proteínas ligantes para realizar a leitura desse fenômeno e com isso se caracterizar o estado de acetilação da lisina (Yun et al. 2011).

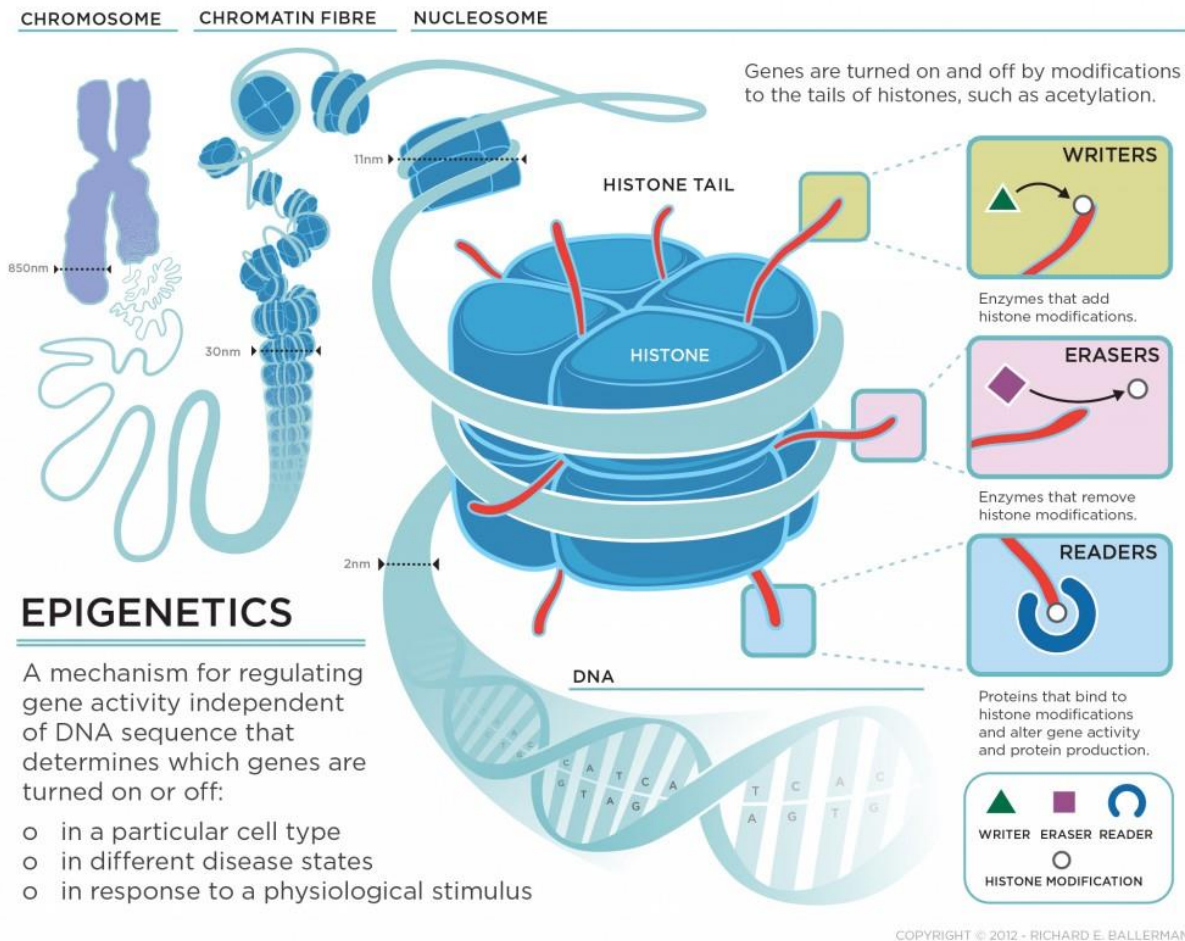
### 2.3 Bromodomínios e família BET

Os bromodomínios são o grupo de proteínas responsáveis pelo reconhecimento da acetilação de histonas. Se fizermos uma analogia é como se a cromatina fosse uma história que necessita de um escritor para poder ser divulgada. Esse papel de escritor é feito pelas HATs que adicionam grupos acetil nas caudas relaxando a interação com o DNA, ou seja, “mostrando” uma história que está escondida. Contudo, nem sempre todos os fatos de uma história funcionam bem em um livro e as vezes é necessário apagar algumas partes. Relacionando essa analogia com as modificações pós-traducionais, quem realiza esse papel de borracha são as enzimas HDACs, que retiram os grupos acetil promovendo a compactação do DNA e “escondendo” algumas de suas partes do processo de transição. Por fim, todo livro só alcança seu objetivo se tiver algum leitor para ler sua história da mesma forma, a acetilação necessita de proteínas leitoras para conformar o seu estado, atividade realizada pelos bromodomínios (Hsu and Blobel 2017) (Figura 3).

Essas proteínas leitoras são conhecidas como bromodomínio. Um bromodomínio é um domínio protéico evolutivamente conservado de aproximadamente 110 aminoácidos que se ligam a lisinas acetiladas nas caudas das histonas e essa ligação é decisiva para o recrutamento de fatores de transcrição (Zeng and Zhou 2002; Perez-Salvia and Esteller 2017). Esses domínios foram primeiramente reportados no estudo Tamkun et al em 1992 que estudavam o gene *Brahma* em *Drosophila* (Tamkun et al. 1992). Os pesquisadores relataram nesse estudo a similaridade da sequência do Bromodomínio com a sequência de proteínas envolvidas na ativação transcrional. Desde então, já foram descritos 61 diferentes bromodomínios (Shi and Vakoc 2014).



Figura 3: Ilustração das modificações pós-transdacionais.



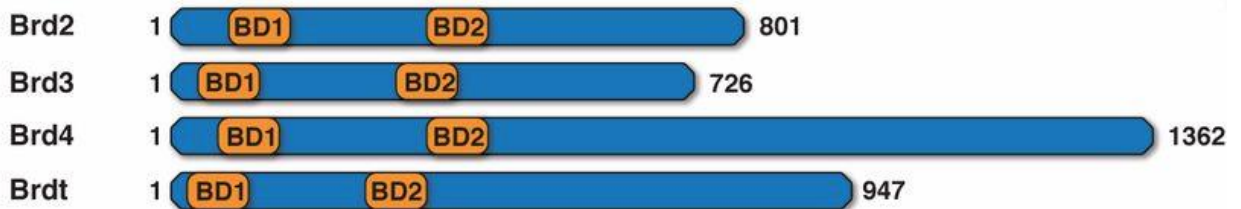
Fonte: <http://blogs.shu.edu/cancer/2016/01/27/bet-bromodomain-inhibition-in-prostate-cancer-treatment/>

A estrutura de um bromodómio é altamente conservada. Esse domínio proteico consiste em um conjunto de quatro  $\alpha$ -hélices ( $\alpha Z$ ,  $\alpha A$ ,  $\alpha B$ ,  $\alpha C$ ), ligadas por regiões de alça flexíveis conhecidas como alças ZA e BC que são variáveis em sequência e carga e formam uma bolsa hidrofóbica capaz de reconhecer as lisinas acetiladas. (Shi and Vakoc 2014; Perez-Salvia and Esteller 2017).

Os bromodomínios já foram identificados em 46 diferentes proteínas humanas como HATs, metiltransferases, remodeladores de cromatina, mediadores/coativadores de transcrição (Marmorstein and Zhou 2014; Jung et al. 2015). Entretanto, o mais famoso exemplo desse grupo é a família bromodómio e terminal extra (do inglês *Bromodomain and Extra Terminal Family*- BET). Essa família é caracterizada pela presença de dois bromodomínios altamente conservados e arrançados (BD1 e BD2) - bromodomínios esses que se ligam as lisinas acetiladas em histonas ou outras proteínas - e uma região terminal extra. O domínio terminal extra é uma região de aproximadamente 80

aminoácidos que cumpre sua função reguladora recrutando proteínas efetoras específicas e mediando interações proteína-proteína (Hsu and Blobel 2017).

Figura 4: Organização da família de proteínas BET. Na figura é esquematizado a localização e comprimento dos dois bromodomínios (BD1 e BD2) e a quantidade total de aminoácidos compostos juntamente com os aminoácidos extra terminais



Fonte: (Baud et al. 2014).

A família BET é composta pelas proteínas BRD2, BRD3 e BRD4 além de BRDT, essa encontrada apenas nos testículos (Taniguchi 2016; Jung et al. 2015). O BRDT tem um papel central na remodelação da cromatina durante a espermatogênese, principalmente mantendo a arquitetura da cromatina da cabeça do espermatozoide. Essa proteína está relacionada como um fator essencial para a diferenciação de células germinativas masculinas. Além disso, esse bromodomínio tem papel na regulação das divisões meióticas e no reempacotamento do genoma pós-meiótico. Interessantemente, o BRDT tem sido sugerida como alvo para a contracepção masculina (Wang and Filippakopoulos 2015).

A proteína BRD2 em humanos é codificada pelo gene BRD2 e tem sido mostrada sua relação com o câncer. Além disso, esse bromodomínio desempenha um papel fundamental controlando a diferenciação neuronal. Em estudo com embriões de camundongos *Brd2null* foi encontrada formação deficiente do tubo neural e essa condição ocasionou a não sobrevivência à gestação, à progressão do ciclo celular e à saída do ciclo celular em células neuroepiteliais. Também já foi demonstrada obesidade em animais com esse gene nocauteado, contudo suas funções e interações necessitam de mais estudo (Belkina and Denis 2012; Wang and Filippakopoulos 2015). Já a proteína BRD3 é codificada pelo gene de mesmo nome e também é conhecida como *RING3-like protein* e tem algumas funções sobrepostas com BRD2 (Stonestrom et al. 2015). Além disso, BRD3 interage com o fator de transcrição GATA1, fator esse que induz os genes

específicos de eritrócitos enquanto reprime os genes associados ao estado proliferativo e imaturo (Wang and Filippakopoulos 2015).

BRD4 é codificada pelo gene de mesmo nome e é a mais estudada dentre as proteínas da família BET. Essa proteína é crucial para a iniciação da transcrição e expressão de genes que controlam a proliferação celular como os requeridos na fase M para a transição para a fase G1 como RAN e TGIF1 que são programadas para serem expressos no final da mitose e início do G1 fornecendo a memória celular de identidade (Yang et al. 2005). Outra função importante do BRD4 é regular os genes dependentes de NF-KB. Essa função previne a degradação do REL A, que mantém o NF-KB ativo desempenhando um importante papel nos tumores desenvolvidos pelo NF-KB assim como nas lesões em que esse fator de transição leva a resistência à quimioterapia (Zou et al. 2014). BRD4 foi estabelecido como regulador central do alongamento transcricional por meio do recrutamento do complexo P-TEFb para a cromatina. A BRD4 facilita a dissociação do fator inibitório HEXIM1 resultando em uma forma ativa de P-TEFb, que por sua vez fosforila e ativa RNA Pol II (Yang et al. 2005). Também, o BRD4 assim como o BRD2 é crucial para o desenvolvimento embrionário além de manter a capacidade de auto-renovação das células estaminais. Foi demonstrado que BRD4 estimula a expressão de genes envolvidos na pluripotência como NANOG, OCT4, SOX2 E PRDM14 e as proteínas se ligam a ele nas células troncoembrionárias (Liu et al. 2014; Wu et al. 2015; Sahni and Keri 2018).

Os bromodomínios BRD4 não se ligam apenas a histonas acetiladas, mas também com resíduos de lisina acetilada de outras proteínas, incluindo fatores de transcrição. Recentemente foi demonstrado que o BRD4 se liga a locos genômicos definidos pelos fatores de transcrição. Por exemplo, p300 acetila fatores de transcrição o que leva a ligação do BRD4 a loci específicos nesses fatores de transcrição. As descobertas explicam um mecanismo pelo qual a BRD4 pode ser recrutada para locais específicos da sequência de DNA, e pode ajudar a explicar como os inibidores da BET podem ter efeitos inibitórios precisos no câncer (Roe et al. 2015).

Ademais, o BRD4 é um regulador global da transcrição gênica, portanto, seria esperado que sua inibição causasse uma diminuição geral da atividade gênica. No entanto, quando é utilizado os inibidores para o BRD4 é encontrado apenas mudança na atividade de algumas centenas de genes, principalmente aqueles importantes na carcinogênese. Acredita-se que isso se deva pelo fato de o BRD4, além de ocupar promotores de genes, tem uma forte preferência por intensificadores e super-

potenciadores (*super-enhancers*), estes últimos frequentemente presentes em genes chave de tumores hematológicos e sólidos (Loven et al. 2013).

#### 2.4 Família BET e as doenças

Os bromodomínios e mais especificamente a família BET, por desempenharem importantes funções na transcrição gênica e regulação da cromatina, também podem desempenhar papéis-chave no desenvolvimento de várias doenças principalmente nas doenças inflamatórias e o câncer. Por exemplo, essas proteínas atuam como importantes ativadores transcricionais pró-inflamatórios de genes induzidos por lipopolissacarídeos (LPS), em macrófagos, incluindo IL-1B, IL-6, IL-12 $\alpha$ , CXCL9 e CCL12 e o uso de seus inibidores pode prevenir o choque séptico (Nicodeme et al. 2010).

As proteínas BET são conhecidas como estimuladoras do câncer humano, pois podem atuar na mutação de genes ou serem responsáveis pela sua super expressão. Essas proteínas estão altamente envolvidas no câncer, regulando diretamente a expressão de certos genes relacionados ao câncer, como o c-MYC. Essa super ativação de c-MYC está altamente relacionada ao desenvolvimento de diversos cânceres como leucemia, linfoma, mieloma múltiplo (Jung et al. 2015) e tumores sólidos como carcinoma de tireoide (Xu et al. 2018), próstata (Welti et al. 2018), mama (Perez-Salvia et al. 2017), rim (Wu et al. 2017) entre outros.

O BRD4 demonstrou ser um regulador-chave do controle do ciclo celular e transcrição de genes promotores de crescimento. Em particular, o papel fundamental do BRD4 no recrutamento de P-TEFb (CDK9 / cyclinT) para sítios iniciais da transcrição fornece uma estratégia alternativa para atingir o CDK9, alvo validado em leucemia (Tong et al. 2010). BRD4 juntamente com BRD2 tem um papel fundamental para a transmissão de vírus tumorigênicos durante a mitose, fornecendo uma cromatina âncora para epissomas virais. Por exemplo, durante infecção viral latente de vírus herpes associado com o desenvolvimento do sarcoma de Kaposi, a transmissão de genomas virais para células filhas durante a mitose é mediada pelo epissoma antígeno nuclear associado à latência 1, que é ligado à cromatina através da sua interação com BRD4 (You et al. 2006). Além disso, alguns vírus HPV e Epstein-Barr também realizam esse mecanismo de associação ao BRD4 para ancorar seus genomas virais a cromossomos mitóticos (Weidner-Glunde, Ottinger, and Schulz 2010;

Lin et al. 2008). Outra função importante do BRD4 em relação aos genes virais é que essa proteína BET pode regular a transcrição do HIV induzindo a fosforilação de CDK9 no resíduo Thr29 no complexo de iniciação da transcrição do HIV (Zhou et al. 2009). Os bromodomínios BRD4 também tem um papel importante na inflamação reconhecendo o RelA acetilado, ajudando assim a estabilizar o NF- $\kappa$ B e a modular a sua atividade transcricional. Efeito esse também que pode auxiliar nos tratamentos de câncer dependentes de NF $\kappa$ B ou em que esse fator de transcrição leva a resistência tumoral (Huang et al. 2009).

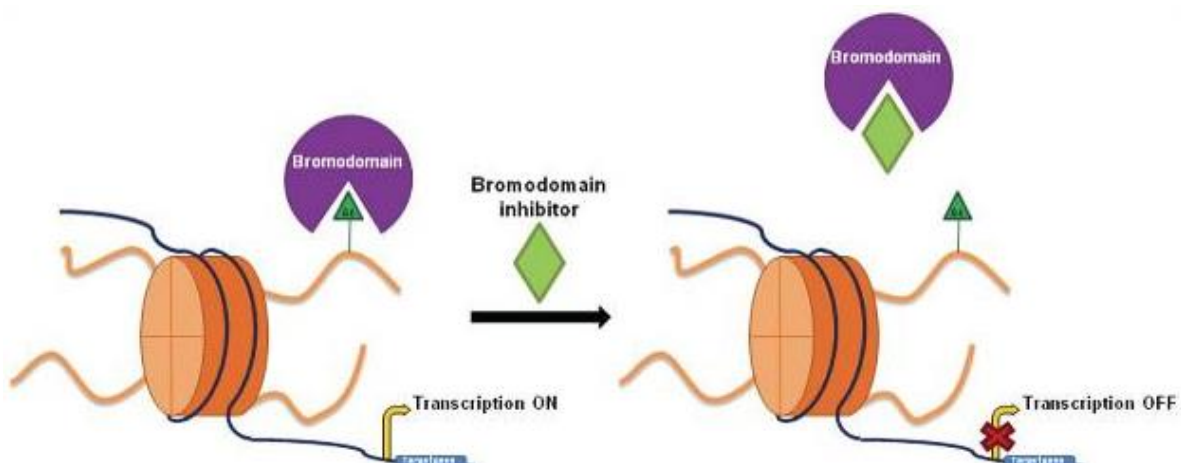
O carcinoma NUT da linha média é um tumor raro, agressivo e de causa genética definido por rearranjos do gene NUT. Na maioria dos casos, a maior parte da sequência de codificação de NUT no cromossomo 15q14 é fundida com BRD4 ou BRD3, criando genes quiméricos que codificam proteínas de fusão BRD-NUT. Esse gene funciona bloqueando a diferenciação celular e promover o crescimento descontrolado de células escamosas mimetizando um carcinoma espinocelular ou basalóide comum (French 2010).

Relacionado especificamente a lesões da cavidade bucal, no estudo de Wang et al. 2017 (Wang, Wu, et al. 2017) foi relatado que BRD4 é altamente expresso em células da linhagem de câncer bucal Cal27 e o uso de inibidores desse bromodomínio leva a diminuição da proliferação celular, indução de apoptose e inibe a invasão celular. Em outro estudo do mesmo grupo, esses mesmos achados foram encontrados, contudo relacionado ao carcinoma adenóide cístico (Wang, Wu, et al. 2017). No trabalho de Meng et al 2014 foi estudado o efeito de inibidor de BRD4 na resposta inflamatória e na destruição óssea em modelo de periodontite experimental. Os autores encontraram que houve diminuição da transcrição de citocinas inflamatórias estimuladas por lipopolissacarídeos (LPS), incluindo interleucina (IL) -1 $\beta$ , IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), bem como ativador de receptores do fator nuclear kappa-B e marcadores de osteoclastos (Meng et al. 2014).

### 2.5 JQ1 e inibidores da família BET

A família BET é responsável pelo reconhecimento das histonas acetiladas encontradas em regiões transcricionalmente ativas da cromatina e promove o recrutamento de fatores de transcrição, desta forma, essas proteínas podem estar auxiliando na transcrição de genes responsáveis por diversas doenças, incluindo câncer. A partir desse conceito foram desenvolvidas algumas drogas com alvo no bloqueio dos sítios de ligação dessas proteínas provocando o seu deslocamento e por consequência não havendo o reconhecimento da acetilação das histonas. Há estudos utilizando esses inibidores em diversos tipos de tratamento como para doenças cardíacas, imunossupressão, AIDS, doenças renais, câncer e contracepção masculina (Kulikowski et al. 2018; Fontecha-Barriuso et al. 2018; Abner et al. 2018; Segatto et al. 2017; Nicholls et al. 2018; Filippakopoulos et al. 2010; Zdrojewicz et al. 2015)

Figura 5. Desenho esquemático da disrupção da acetilação de histonas através do deslocamento da ligação do sítio acetilado na cauda das histonas com um bromodomínio. A desconexão do bromodomínio com o grupo acetilado leva diminuição na transcrição de diversos genes.

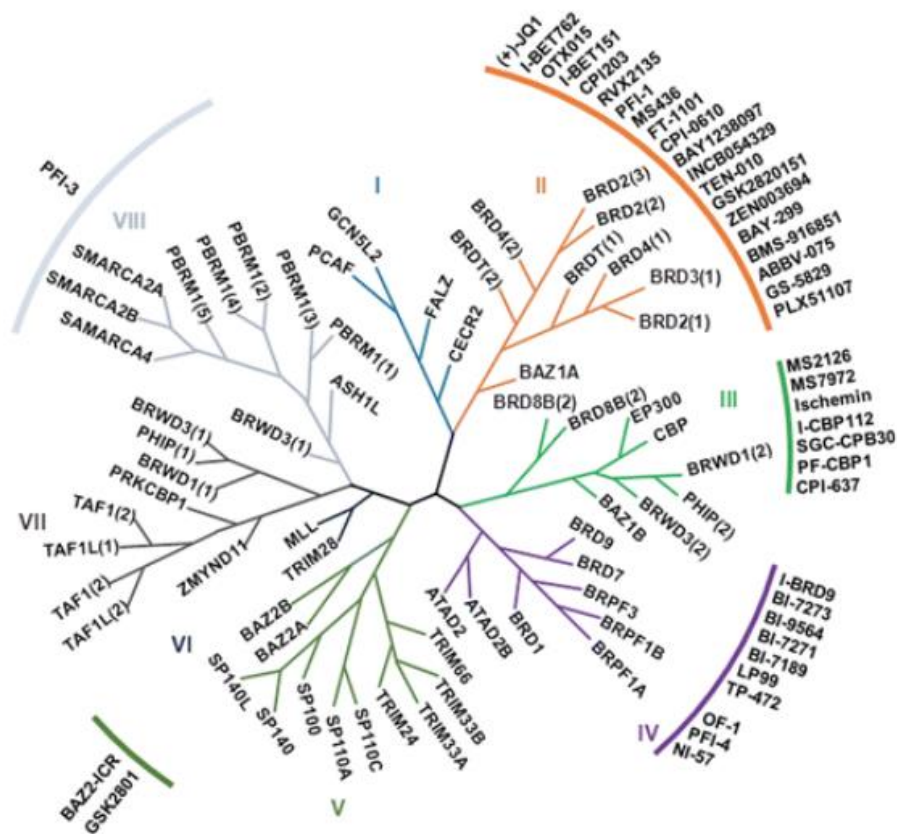


Fonte: (Perez-Salvia and Esteller 2017)

Inibidores de BET foram primeiramente descritos e patenteados por cientistas da *Mitsubishi Tanabe Pharma* na década de 90 ([https://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?CC=JP&NR=2008156311&KC=&FT=E&locale=en\\_EP](https://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?CC=JP&NR=2008156311&KC=&FT=E&locale=en_EP) acessado 04/04/2018, (Nakamura et al. 2007), contudo, somente em 2010 com o artigo

publicado por Filippakopoulos e colaboradores que maiores pesquisas foram desenvolvidas nessa área (Filippakopoulos et al. 2010) e novos inibidores BET foram desenvolvidos. Os inibidores mais estudados são i-BET 151, i-BET 762, OTX-015, CPI-203, CPI-0610 e JQ1 utilizado nesse estudo.

Figura 6: Filogenia baseada na estrutura dos bromodomínios humanos e seus inibidores. Existem 61 bromodomínios em 46 proteínas contendo bromodomínios. Algarismos romanos indicam as oito principais classes estruturais. Os inibidores específicos são indicados ao lado do bromodomínio correspondente.



FONTE: (Filippakopoulos and Knapp 2014)

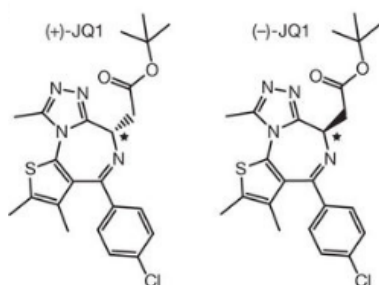


Embora existam em humanos 46 proteínas contendo bromodomínios, os inibidores de BET inibem seletivamente a família BET. A maioria dos inibidores bloqueia todos os quatro membros desta família, BRDT, BRD2, BRD3 e BRD4 embora a maioria dos estudos se aprofundam na inibição do BRD4. Esses fármacos agem inibindo as proteínas BET competindo com lisinas acetiladas pela ligação em ambas as regiões de BRD, impedindo que as proteínas BET se liguem às histonas e, assim, se localizem na cromatina (Leal et al. 2017).

JQ1 foi desenvolvido no laboratório do professor Dr. Bradner, no Instituto do Câncer Dana-Farber na *Harvard Medical School* e recebeu esse nome “em homenagem” a um dos seus desenvolvedores, o Dr. Jun Qi. Esse inibidor é descrito como uma molécula pequena e permeável a células que se liga competitivamente aos bromodomínios com alta potência e especificidade devido a estruturas co-cristalinas encontrados no BRD4 revelando excelente complementaridade da forma com a cavidade de ligação acetil-lisina (Filippakopoulos et al. 2010). Uma das formas de validar a especificidade dessa droga para o BRD4 foi utilizando-a para o tratamento de linhagens derivadas de pacientes com o carcinoma NUT da linha média. Após 7 dias em cultura com exposições nanomolares ao JQ1, observa-se diferenciação terminal das células em células epiteliais e parada de proliferação desenfreada pelo silenciamento de BRD4-NUT (Filippakopoulos et al. 2010; Qi 2014) .

Essa pequena molécula é a mais amplamente estudada dos inibidores de bromodomínios e possivelmente devido ao acesso aberto de sua descoberta. Portanto, o inicial não-patenteamento da droga contribuiu por uma maior aceitação da comunidade científica contribuindo para uma pesquisa mais extensa e mais impactante sobre a molécula e seu alvo terapêutico além de acelerar a translação dos resultados para a clínica (Arshad et al. 2016).

Figura 7: Estrutura molecular do JQ1.



Fonte:(Filippakopoulos et al. 2010)



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente estudo foi estudar o efeito da inibição do BRD4 nos CECP.

#### 3.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS

Avaliar a expressão do BRD4 e H4ac após o uso do inibidor JQ1 nas linhagens celulares de CECP.

Avaliar *in vitro* através de ensaios mecanísticos o efeito do inibidor JQ1 sob a invasão, proliferação, apoptose, ciclo celular e células tronco tumorais de CECP.

Avaliar a ativação senescência e p53 após o uso do inibidor JQ1 em CECP.

Avaliar a efetividade do tratamento com JQ1 em modelo de xenoenxerto de células de CECP.

#### 4 ARTIGO CIENTÍFICO

## Pharmacological disruption of BRD4 inhibits tumor growth through downregulation of Sirt1 and activation of cellular senescence in HNSCC

Liana P. Webber<sup>1,2</sup>, Manoela D. Martins<sup>1,2,3</sup>, Cristiane H. Squarize<sup>1,4</sup>, and Rogerio M. Castilho<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Epithelial Biology, Department of Periodontics and Oral Medicine, University of Michigan, School of Dentistry, Ann Arbor, Michigan, USA.

<sup>2</sup> Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Federal University of the Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>3</sup> Department of Experimental Pathology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil;

<sup>4</sup> University of Michigan Comprehensive Cancer Center, Ann Arbor, Michigan, USA.

\*Corresponding author:

Rogerio M. Castilho  
Laboratory of Epithelial Biology  
Department of Periodontics and Oral Medicine  
University of Michigan  
1011 N University Ave, Room 3210  
Ann Arbor, MI  
48109-1078  
Phone: (734) 615-3406  
e-mail: [rcastilh@umich.edu](mailto:rcastilh@umich.edu)

**Keywords:** G1 arrest, tumor suppression, p16ink4, xenograft, cancer stem cell, head and neck cancer, JQ1

**Abstract**

Head and neck cancers (HNSCC) are one of the most common solid malignancies of the world, being responsible for over 350,000 deaths every year. In the US, an estimate of 64,000 people will be diagnosed with HNSCC this year and more than 13,000 patients will succumb to the disease. Much of the complication in managing and treating HNSCC advent from the genetic landscape of the disease proven to be far more complex than anticipated. Emerging information has shown that targeting the epigenetic regulator bromodomain and extra-terminal (BET) family containing protein 4 (BRD4) has shown positive results in several malignancies. BRD4 is a chromatin binding protein that functions as a scaffold for transcription factors at promoters and super-enhancers. Here we show that by disrupting the interaction between BRD4 and histones, the bromodomain inhibitor JQ1 induced tumor growth arrest followed by the activation of cellular senescence. JQ1 further reduced the phosphorylation levels of SIRT1, a nicotinamide adenosine dinucleotide (NAD)-dependent deacetylase and consequently reduced the population of ALDH<sup>Bright</sup> cancer stem cells. As observed in vitro, in vivo administration of JQ1 resulted in disruption of HNSCC growth along with the activation of cellular senescence, induction of DNA damage as judged by the accumulation of  $\gamma$ H2AX positive foci, and depletion of Sirt1 positive cells. Furthermore, we also demonstrate that JQ1 was efficient in depleting cancer stem cells from HNSCC xenografts.

## Introduction

The genetic landscape of HNSCC is complex and represent a real challenge in the development and validation of new therapeutic approaches. With the technological advances in whole-exome sequencing, several studies have demonstrated a of deregulated molecular pathways involved in key biological functions of cancer. In 2011, two research groups showed that TP53, NOTCH1, CDKN2A, PIK3CA, HRAS, and PTEN constitute the most commonly mutated genes in HNSCC (Agrawal et al., 2011; Stransky et al., 2011). The complexity of gene mutations, however, suggests that mutations may account for part of the biological complexity of HNSCC. In fact, along p53 that was found mutated in 62% of all 74 human samples, the second most common mutated gene is the CDKN2A found mutated in only 12% of the cases (Stransky et al., 2011). Indeed, the low penetrance of mutations found within human tumors strongly corroborates to the existence of other deregulated factors in HNSCC.

The epigenome is the combination of chemicals and proteins capable of directly attaching to the DNA (genome) and modify gene expression. Locally, cells can differentially use the information from the genome by activating and deactivating gene expression accordingly to the given needs of a tissue. The modifications to the DNA resulting in changes of gene expression are called “mark” that can have a transitory nature or can be persistent and thereby transmitted through generations. Histone acetylation and DNA methylation are marks that modulate gene expression. The epigenome is constantly changing during the lifespan of an organism as a response to changes of the extrinsic factors like the environment.

Our focus is on epigenetic modifications driven by histone modifications. These modifications are transient and fast-occurring events as we have shown during HNSCC chemoresistance to cisplatin (Almeida et al., 2014). We have also shown that histone modifications have a direct impact on the fate of cancer stem cells (CSCs)(Almeida et al., 2017; Castilho et al., 2017; Guimaraes et al., 2016; Wagner et al., 2018) and that HDAC inhibitors can sensitize tumor cells to chemotherapy. However, the mechanism by which histone modifications can modify cancer stem cell fate is not fully understood. Here, we decided to explore the role of the bromodomain and extra-terminal (BET) family containing protein 4 (BRD4) in the biology of HNSCC. BRD4 function as chaperons to facilitate transcription through histone H4. Also, BRD4 play an essential role on the colony formation of embryonic stem cells (ESC), along with the self-renewal ability of ESC and expression of associated pluripotency genes (Di Micco et al., 2014; Horne et al., 2015;

Liu et al., 2014). Indeed, expression levels of BRD4 are found reduced during cellular differentiation of embryonic stem cells (Gonzales-Cope et al., 2016). By inhibiting the binding of BRD4 to histone H4 using a specific inhibitor for the BRD family of bromodomains, we showed that head and neck tumor cells cannot form colonies and present reduced ability to invade substrate. Remarkably, BRD4 inhibition resulted in the activation of tumor senescence along with downregulation of Sirt1, a NAD-dependent deacetylase known to be associated with longevity and enhanced survival of human stem cells (Jang et al., 2017). Most exciting, we found that disruption of BRD4/histone H4 binding result in reduced number of cancer stem cells, a subpopulation of tumor cells capable of evading chemo and radiotherapy and involved in tumor regrowth. All in all, we observed that by inhibition of the BRD4/histone H4 binding result in a promising therapy to manage HNSCC.

## **Results**

### **JQ1 efficiently reduced the levels of BRD4 and histone H4 acetylated in HNSCC cell lines**

BRD4 is a member of BET family which is associated with acetylated chromatin and facilitate transcriptional activation. JQ1 is small molecule whose function is connect to the amino-terminal twin bromodomains of BRD4 and displace histone bind. As a histone acetylation recognition, the inhibitor JQ1 shown an important role in oncogenes regulation mainly because loss of BRD4 bind can disrupt oncogenes enhancers (Loven et al., 2013).

Here, we sought to explore if administration of JQ1 was effective in reducing the protein levels of BRD4 and histone H4 (Lys 5,8,12 and 16). Tumor cells where exposed to JQ1 at a concentration of 1ug/ml for 24hrs. Both, drug concentration and treatment time was determined by time course assay and a dose inhibition assay using immunostaining of BRD4 as a readout to identify the optimal conditions of JQ1 administration to cancer cells. We found that JQ1 can efficiently reduce the levels of BRD4 from all analyzed tumor cell lines (Figure 1A,1 B, 1C). Using the same pharmacological conditions applied to BDR4, we also observed that binding of JQ1 to the amino-terminal of BRD4 also resulted in reduced levels of histone H4 (Lys 5,8,12 and 16) in all analyzed HNSCC cells (Figure 1D, 1E, 1F).

Our results indicate that JQ1 is an efficient inhibitor of BRD4-Histone H4 interaction in HNSCC tumors, however we did not know if displacement of BRD4-histone H4 binding have any effects on the biology of HNSCC.

### **JQ1 impacts the ability of head and neck cancer cells in generate colonies, halts tumor invasion, and induced cell cycle arrest.**

Following our initial findings on the ability of JQ1 to disrupt BRD4-histone H4 binding, we decided to explore the effects of bromodomain inhibitors in the growth of tumor colonies. Our clonogenic assay shown that JQ1 completely disrupted the tumor cell ability to form colonies in all HNSCC cells (Figure 2A, \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). Notably, further examination of tumors cells growing in the presence of JQ1 demonstrate that inhibition of BRD4-histone binding at the working concentrations of 1  $\mu\text{g/ml}$  is not toxic to the cells. Rather, JQ1 maintained tumors cells in a quiescent stage as depicted in figure 2B. Indeed, the only agglomerate of tumor cells contain fewer than 50 cells what it does not constitute in a colony (Figure 2B\_lower panel).

Following our findings, we decided to explore if administration of JQ1 would impact the invasive ability of HNSCC cells. Interestingly, we found that tumor cells receiving JQ1 presented a reduce ability to invade the substrate (fibronectin) using a Boyden chamber assays. Interestingly, the observed effects of JQ1 are not associated to the activation of apoptosis as we have not observed accumulation of caspase 3 using flow cytometry (Figure 2D,  $ns > 0.05$ ). Following our findings on the ability of JQ1 in halt tumor invasion and colony forming, we used Propidium Iodine to explore the effects of JQ1 on the cell cycle of tumor cells. We also observed that JQ1 can induce strong cell cycle arrest in G1 phase in all tumor cell lines we have evaluated (Figure 3A and 3B). Interestingly, although we have not detected apoptotic cells when assessing caspase 3 levels (Figure 2D), we observed that incorporation of Propidium Iodine revealed a slight accumulation of apoptotic cells exclusively in HN13 cell line upon administration of JQ1 (Figure 3).

### **JQ1 induces cellular senescence along with downregulation of SIRT1 and acetylated p53 in HNSCC cells**

In search for a mechanism that could explain the effects of JQ1 on HNSCC cells and the quiescent-like phenotype and G1 arrest observed in Figures 2B and 3, we found that tumors cells receiving JQ1 underwent cellular senescence within 24hrs of treatment. Cellular senescence can be identified by the accumulation of p16ink4, an essential

mechanism epigenetically controlled by the Polycomb group (PcG)(Simboeck et al., 2011). Two out of the 3 tumor cell lines (HN6 and HN13) did express low levels of p16ink4 expression at basal levels (vehicle), while one tumor cell line (HN12) presented high levels of p16ink4 in the control group (Figure 4A). Administration of JQ1, however, resulted in activation of cellular senescence in all HNSCC cells independent of the basal levels of p16ink4 (Figure 4B \*\*  $p < 0.01$ ).

In cancer, activation of the protective mechanism of cellular senescence is often antagonized by the NAD<sup>+</sup>-dependent Class III histone deacetylase SIRT1. SIRT1-mediated deacetylation of p53 (lys382) resulting in loss of p53 function and resistance to cellular senescence. Here we show that disruption of BRD4/histone interaction mediated by JQ1 dramatically reduced the expression levels of phospho-SIRT1 in all tumor cell lines (Fig. 4C, \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ). Surprisingly, administration of JQ1 also reduces total p53 levels in HN6 and HN13 cells whereas HN12 does not express p53 due to point mutation in exon 7 splice donor motif (Yeudall et al., 1997). While reduced phosphorylation levels of SIRT1 mediated by JQ1 should result in the accumulation of p53, the observation of reduced levels of total p53 upon disruption of BRD4/histone interaction was further validated by detecting reduced levels of Acetyl-p53 (lys382) (Fig. 4D). It is interesting to note that HN6 and HN13 also present mutations on TP53 (missense) (Yeudall et al., 1997), and that point and missense mutations observed in our cell lines have been shown to induce a dominant negative effect over wild-type p53 as previously described (Yeudall et al., 1997). Interestingly, we found an increase of p21 levels in the same cell lines we found a reduction of p53 (HN6 and HN13) and we also did not find p53 expression in HN12 cell line (Figure 4D). p21 is controlled by p53 and is a major mediator of p53-dependent cell-cycle G1 phase arrest and senescence (Terzi et al., 2016). These results corroborate with our previous findings on G1 Cell cycle arrest results (Figure 3A and 3B) and activation of cellular senescence.

### **Disruption of the BRD4-Histone H4 interaction using JQ1 reduces the population of cancer stem cells and halt tumor growth.**

Cancer stem cells are known to confer resistance to chemo and radiotherapy to solid tumors. We have previously shown that HDAC inhibitors such as Vorinostat, and TSA are capable of disrupting tumor spheres and reduce the population of ALDH<sup>Bright</sup> CD44<sup>+</sup> cells *in vitro* and *in vivo* (Almeida et al., 2017; Guimaraes et al., 2016; Wagner et al., 2018). Here we sought to explore if inhibition of BRD4-Histone H4 interaction would

impact the population of cancer stem cells. We found that administration of JQ1 to HNSCC cells reduced the enzymatic activity of ALDH in CD44<sup>+</sup> tumor cells in all analyzed cell lines (Fig. 5A and 5B, \*  $p < 0.05$ ).

Following our promising results on JQ1 and cancer stem cells, we decided to evaluate in vivo the effects of JQ1 in tumor growth. Xenografts were generated using HN12 tumor cells ( $5 \times 10^6$ ) injected in the flanks of nude mice (nu/j) (n=6 mice/group). After tumors growth to 100 mm<sup>3</sup>, mice received IP injections of JQ1 (50 mg/kg per day) for 30 days. Control mice received vehicle alone (DMSO diluted in 1x PBS + 5% Tween 80). After 30 days of JQ1 we observed a reduction in growth compared to the vehicle group (Fig. 5C and D). Tissue samples from xenografts were analyzed for cellular senescence (p16ink4), DNA Double Strand Breaks (DSB), levels of phosphorylated SIRT1 and aldehyde dehydrogenase (ALDH). Similar to our in vitro findings, administration of JQ1 resulted in a strong activation of cellular senescence in tumor cells (Fig. 5C\_p16ink4, and 5E, \*\*  $p < 0.01$ ). The accumulation of  $\gamma$ -H2AX is associated with telomere shortening of aging cells/organisms, and with the activation of cellular senescence through different mechanisms including oncogene-induced-senescence (OIS) (Castilho et al., 2009; Hovest et al., 2006; Liu et al., 2007; Sedelnikova et al., 2004). Similar to our p16ink4 results, tumor cells receiving JQ1 presented high levels of  $\gamma$ -H2AX compared to controls (Fig. 5F \*  $p < 0.05$ ). In vivo administration of JQ1 also resulted in a reduction of ALDH positive cells (Fig. 5G \*  $p < 0.05$ ) along with the downregulation of phosphorylated SIRT1 (Fig. 5H \*\*\*  $p < 0.001$ ).

## Discussion

The epigenome constitutes a powerful molecular modulator of our genome responsible for constant adaptation of our body to changes on the environment. However, during carcinogenesis, the epigenome is also modified and to a certain extent reprogramed thereby facilitating cancer initiation and progression. An evidence on the epigenome deviations during carcinogenesis are represented by the increased methylation of tumor suppressor genes observed in premalignant and malignant lesions (Nephew and Huang, 2003). Similar to modifications to the methylation landscape, histone modifications are also observed during carcinogenesis with a particular tendency for hypoacetylation and trimethylation modifications of histones resulting in overall gene



repression (Fraga et al., 2005). What remains poorly understood however, is the new signaling balance between the epigenome and mutated genes.

Perhaps one of the most notorious deregulated tumor suppressor genes in cancer history is the TP53. Under normal conditions, p53 present short half-life and is rapidly degraded, however under genotoxic stress, p53 undergo phosphorylation, acetylation, and other post translation modifications that stabilized p53 protein and increased transcriptional activity of genes associated with cell cycle arrest, senescence and apoptosis among others (Pant and Lozano, 2014). Of interest to this study, acetylation of p53 at lysine's k373 and k382 resulting in prolonged protein half-life due to reduce ubiquitination (Zhao et al., 2006). Acetylation at K382 and K320 plays an important role on the recruitment of p53 co-activators, p300/CBP and TRRAP in response to DNA damage (Barlev et al., 2001). Like gain of function through acetylation, deacetylation p53 by HDAC1 and SIRT1 result in downregulation of its activity (Barlev et al., 2001; Luo et al., 2001). Here we used tumor cells containing common p53 point and missense mutations and presenting a dominant negative effect over wild-type p53 protein (Yeudall et al., 1997; Zhou et al., 2016). Interestingly, we observed that interfering with BRD4/histone H4 interaction resulted in deacetylate of p53. To our knowledge, this is the first time that JQ1 is shown to downregulate acetylated p53 in cancer. Total levels of p53 was also downregulated by JQ1 suggesting that JQ1 may be efficient in reducing the levels of mutant p53. In search for a mechanism involved in the JQ1-induced activation of cancer senescence, we looked into the expression levels of SIRT1, a class II histone deacetylases NAD + dependent associated with gene expression, cell cycle regulation, apoptosis, DNA repair, metabolism and life span (Brooks and Gu, 2009; Martins and Castilho, 2013). Indeed, downregulation of SIRT1 is found in aging organisms and during the activation of cellular senescence (Hayakawa et al., 2015).

Cellular senescence is a normal process when cell cease to divide permanently and irreversibly cell cycle arrest, but cancer cells can skip this scenario. This mechanism is possible by shortening of telomeres activation of oncogenes, DNA damage and inactivation of tumor suppressors. The global changes in chromatin structure as disruption of BRD4/H4 relationship may modification the promoter regions of tumor suppressor genes, as we found in p53 and p21 after JQ1 exposition and turn on senescence.

Small molecules capable of modulating the Epigenome like HDAC and bromodomain inhibitors have shown a common trend in activating cellular senescence in

normal and malignant tissues including head and neck cancers (Almeida et al., 2017; Di Bernardo et al., 2009; Vargas et al., 2014). For example, SAHA, a HDAC inhibitor class I and II, can activate senescence in breast cancer (Xu et al., 2005), glioblastoma (Hsu et al., 2016), colon carcinoma cells (Xu et al., 2005). Interestingly, this mechanism is not yet well explored associated with BRD4 inhibitors, but some studies shown that it can drives the same effect (Dong et al., 2018; Kamijo et al., 2017; Zanellato et al., 2017; Zhang et al., 2017) mainly by p21 activation. In general, when we are studding cancer therapy the first thought is inducing apoptosis in tumor cells. However, pass though senescence appears to be an important mechanism, but not so explored in carcinogenesis.

Along the activation of cellular senescence, HDAC inhibitors have also shown by our group and others to deregulate stem cell-associated genes resulting in disruption of cancer stem cells (Almeida et al., 2017; Cai et al., 2018; Giudice et al., 2013; Guimaraes et al., 2016; Wagner et al., 2018). BET inhibitors, however, have been used in diverse solid cancers from the lung, gastrointestinal, prostate, breast, brain, however little is known of its effect over the population of cancer stem cells (Cheng et al., 2013) and new approach may be studied in the future.

In fact, we do not know if gene mutations are facilitated by modifications in our epigenome or a dysfunctional epigenetic signaling advent from the accumulation of mutations. What is known, however, is that key tumor suppressor genes function is controlled by epigenetic modifications. Overall, found new chemotherapy able to target tumor suppressor genes and bring its functionality is exciting new approaches for cancer therapy brought by JQ1 (Figure 6).

## **Materials and Methods**

### *Cell Line*

HNSCC cell lines HN6, HN12, and HN13 were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (GE Healthcare Pittsburgh, PA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 1% antibiotic-antimycotic (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The cells were maintained in a 5% CO<sub>2</sub>-humidified incubator at 37 °C. Vehicle group was treated with 1uM DMSO, and JQ1 group was treated with 1uM of JQ1 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA).

### *Immunofluorescence and Immunohistochemistry*

The cells were seeded on glass coverslips in 6-well plates and fixed with paraformaldehyde at room temperature for 20 minutes. Tissue slides were sectioned into 3- $\mu$ m sections and placed on silanized slides. The slides were deparaffinized in xylene and hydrated in descending grades of ethanol. Antigen retrieval was performed prior to primary antibody incubation. The cell's coverslips and tissue samples were blocked with 0.5% (v/v) Triton X-100 in PBS and 3% (w/v) bovine serum albumin (BSA), and incubated with anti-BRD4, anti-NFKB, anti-p-SIRT-1 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA), anti-acetyl-Histone H4 Lys 5, 8, 12, 16, anti-p-Histone H2AX Ser139 (EMD Millipore, Burlington, MA, USA), anti-p16 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), and anti-ALDH1A1 (Abcam, Cambridge, MA, USA) as indicated. Cell's coverslips and tissue samples were then washed three times with 1x PBS and incubated with Alexa Fluor 488 or 568 secondary antibody for immunofluorescence (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 60 min at RT and then stained with DNA staining Hoechst 3342 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for visualization of DNA content. For immunohistochemistry the cells and tissue were incubated with biotinylated secondary antibody (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) followed by incubation with diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and stained with Mayer's hematoxylin. Immunofluorescence and Immunohistochemistry images were taken using a QImaging ExiAqua monochrome digital camera attached to a Nikon Eclipse 80i Microscope (Nikon, Melville, NY), visualized with QCapturePro software, and quantified with Adobe Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA, USA).

### *Colony formation*

For colony formation 600 cells were plated into 6-well cell culture plates determined by plating efficiency. After overnight incubation, cells were treated with JQ1 or DMSO as indicated every 12 hours. The cells grew for an additional 5 days to form colonies and were then fixed with 7:1 methanol and acetic acid, and then stained with 0.1% crystal violet. Colonies with more than 50 cells were counted as surviving colonies.

### *Invasion Assay*

HN6, HN12, HN13 cells were seeded (10<sup>4</sup>) on 24-well plates over a homogeneous thin layer of fibronectin (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) in Millicell Cell Culture

Inserts (Greiner Bio-one, Kremsmüster, Austria) that contained polycarbonate fiber membranes with 8µM diameter pores. Cells were maintained in DMEM and supplemented as usual, the vehicle group received 1µM of DMSO diluted in media, and the JQ1 group received the drug diluted in media. The lower chamber contained DMEM supplemented with 20% FBS and 1% antibiotic-antimycotic. After seeding, cells were incubated for 24 hours. Invasive cells in the lower chamber were stained with hematoxylin and eosin (H&E). Images were taken using a QImaging ExiAqua monochrome digital camera attached to Nikon Eclipse 80i Microscope (Nikon, Melville, NY, USA), and visualized using QCapturePro software.

### *Immunoblotting*

Cells were seeded in a 10cm<sup>3</sup> dish and treated as previous descriptions for 24 hours changing the DMSO or JQ1 every 6 hours. They were harvested in RIPA buffer and briefly sonicated. Protein lysates were separated by 12% SDS-PAGE and transferred to a polyvinyl difluoride membrane (Immobilon) (Millipore, Billerica, MA, USA) activated by methanol. 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-p53 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), anti-Acetyl-p53 (Lys382) (Cell Signaling, Danvers, MA, USA), anti-p21 (Abcam, Cambridge, MA, USA) and anti-GAPDH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) serving as a loading control. The reaction was visualized using ECL SuperSignal West Pico Substrate (Pierce Biotechnology, Waltham, MA, USA).

### *Flow cytometry*

The vehicle and JQ1 groups were stained by propidium iodide to evaluate cell cycle distribution. After 48 hours of treatment with DMSO or JQ1 for every 12 hours, cells (10<sup>6</sup>) were harvested and fixed with 100% ethanol on ice for a minimum of 20 minutes. The cells were pelleted and ethanol excess was discarded. The cells were resuspended in a PI-RNase solution (50 µg/mL PI + 100 µg/mL RNase, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and incubated for 20 minutes at room temperature. All samples were analyzed using a FACS Canto IV (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) at the University of Michigan Flow Cytometry Core, and the percentages of cells in subG0/G1, G1, S and G2 were calculated.

HN6, HN12 and HN13 cancer stem cell-like cells were identified by aldehyde dehydrogenase (ALDH- StemCell Technologies, Durham, NC, USA) activity combined with CD44-APC expression (BD Biosciences, clone G44-26) using flow cytometry. The Aldefluor kit was used according to the manufacturer's instructions to identify cells with high ALDH enzymatic activity followed by CD44-APC incubation. Cells with or without pretreatment as described previous were suspended with activated Aldefluor substrate (BODIPY amino acetate) or negative control (dimethylamino benzaldehyde, a specific ALDH inhibitor). All samples were analyzed using a BD Accuri™ C6 Plus (BD Biosciences San Jose, CA, USA).

#### *Tumor xenograft assay*

HN12 cells ( $5 \times 10^6$ ) were inoculated into the female nude mice (5-6-week age, 20 grams in weight average). Within 3-4 weeks, xenograft tumors were established, and tumor volumes were around 100 mm<sup>3</sup>. The mice were randomly assigned into vehicle and JQ1 group as mentioned previous. JQ1 was first dissolved in DMSO and then diluted in 1x PBS + 5% Tween 80 and administered through intraperitoneal injection. This drug was administered at 50 mg/kg/mouse once per day. Tumor height, length and width was measured using a digital pachymeter three times a week until it reached the maximum dimension allowed. Then, the mice were euthanized, and the tumor tissues were collected. Estimated daily tumor growth was calculated according to previous study (Enomoto et al., 2017). The animal procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) at University of Michigan and comply with the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals.

#### *Statistical analysis*

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Statistical analysis was performed using unpaired Student's t-test or Mann-Whitney test according normal distribution. Asterisks denote statistical significance (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; and NS  $p > 0.05$ ).

## Figures legend

**Figure 1.** Administration of JQ1 reduces BRD4 and H4ac Lys 5,8,12 and 16 cell levels. (A) Immunofluorescence to detect the percentage of positive cells of BRD4 (A, B, C) and H4ac (D, E, F) expression in HN6, HN12, and HN13 cell lines. Cell lines were treated with vehicle (control) or JQ1(1 $\mu$ M) for 6 hours. Ten fields were quantified using ImageJ software. Data in the graphs are shown as mean  $\pm$  SD. Asterisk denotes significant differences (\*\*\*\* $p$ <0.0001, \*\*\* $p$ <0.001, \* $p$ <0.05)

**Figure 2.** JQ1 prevents colony formation and decreases cellular invasion. (A) Representative graphic of clonogenic survival assay. The number of colonies was measured 7days after treated with vehicle or JQ1 every 12 hours (1 $\mu$ M - 600 cell seeded per well) N=3. Note that JQ1 prevents colony formation in all cell lines studied. (B) Illustrative images show only isolated single tumor cells could be observed within the JQ1 group. (C) Cell invasion assay was analyzed 24hours after vehicle (DMSO) or JQ1 treatment. JQ1 decrease the cells invasion capacity, N=3. (D) FACS analysis was performed to quantify cleaved caspase-3 in HNSSC cell lines after administration of JQ1 every 12 hours for 2 days. JQ1 group shows no significantly cleaved caspase-3 expression increase in HN6 and HN12 cell line, N=6.

Data in the graphs are shown as mean  $\pm$  SD. Asterisk denotes significant differences (\*\*\*\* $p$ <0.0001, \*\*\*  $p$ <0.001, \*\* $p$ <0.01, \*  $p$ <0.005, ns=  $p$ >0.005).

**Figure 3.** JQ1 drives G1 arrest. (A) Representative images collected by FACS. Vehicle and JQ1 group were treated every 12 hours for 1 day, N=3. (B) Pie graphs shown cell cycle phases data. Note that JQ1 treatment drives tumor cells to G1 phase. Data in the pie graphs are shown as mean of percentage of cell in every phase.

**Figure 4.** JQ1 reduces levels of p53 expression or activates cellular senescence. (A) representative staining for p16 (400x magnification). Immunohistochemistry assay shows JQ1 increases p16ink4 expression in HN6, HN12 and HN13 cell lines. Note the cell labeling manly after JQ1 application (lower row). (B) Fold change in HN6, HN12 and HN13 is 3.6, 2.26 and 2 respectively. Five fields were quantified and it was calculated the percentage of positive cells from total cells using ImageJ software. (C) Immunofluorescence labeling shows p-Sirt-1 expression is lower in JQ1 group. HNSSC

cell lines under vehicle or JQ1 treatment for 6hrs. Ten fields were quantified using ImageJ software. Data in the graphs are shown as mean  $\pm$  SD. (D) p53 and acetyl-p53 (lys382) expression decreases in cells submitted to different doses of JQ1 (0 uM, 1uM and 10 uM) treatment by western blot analysis. Note that p21 expression increases when after JQ1 treatment. No expression is found in HN12 cells.

Asterisk denotes significant differences (\*\*\*\* $p < 0.0001$ , \*\* $p < 0.01$ , \*  $p < 0.005$ ).

**Figure 5.** JQ1 target stem cells and halt tumor growth. (A) Illustrative images of ALDH (green) and CD44+ (red) populations. (B) Graph of ALDH and CD44+ bright cells. JQ1 group reduces cancer stem cell-like. (C) Xenograft assay. Illustrative pictures of clinical tumor, H&E staining and p16ink4 expression by IHC. (D) Graphic shows difference of tumor growth in mice group treated with vehicle or JQ1. Note the size difference mainly in days 28 and 30 of the experiment. (E) Graph of p16ink4 expression. JQ1 leads tumor cells to senescence. A higher p16ink4 expression was found in JQ1 group. Five fields were quantified and it was calculated the percentage of positive cells from total cells using ImageJ software. (E) ALDH1, (F) H2Ax and (H) p-Sirt-2 immunofluorescence staining. Ten fields were quantified using ImageJ software and a percentage of positive cells was calculated.

Data in the graphs are shown as mean  $\pm$  SD. Asterisk denotes significant differences (\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.005$ , ns=  $p > 0.005$ )

**Figure 6.** Schematic illustration of JQ1 as a therapeutic strategy. (A) BRD4 as a reader of acetyl-lysine histone leading an invasion, proliferation and more number of cancer stem cells (red dots). (B) JQ1 interfering BRD4 - acetyl-lysine histone binding and decreasing the invasion, proliferation and the number of cancer stem cells (red dots).

Figure 1

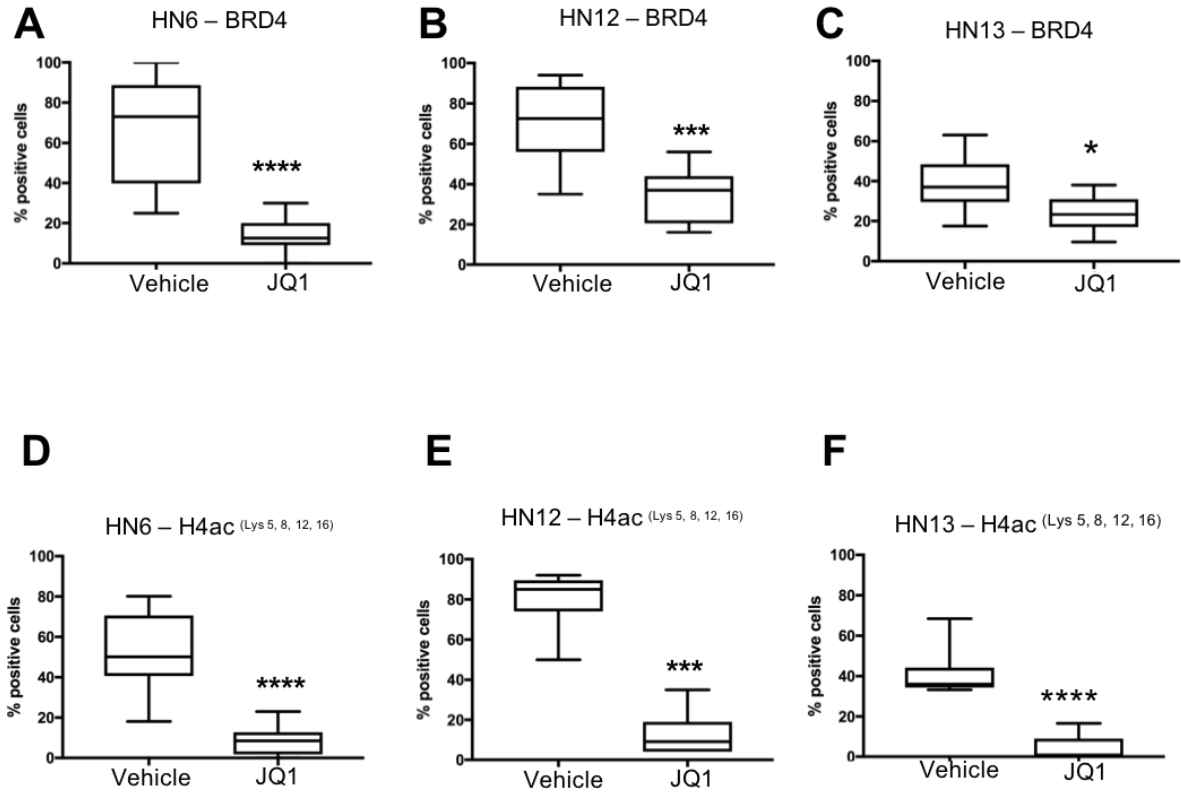




Figure 2

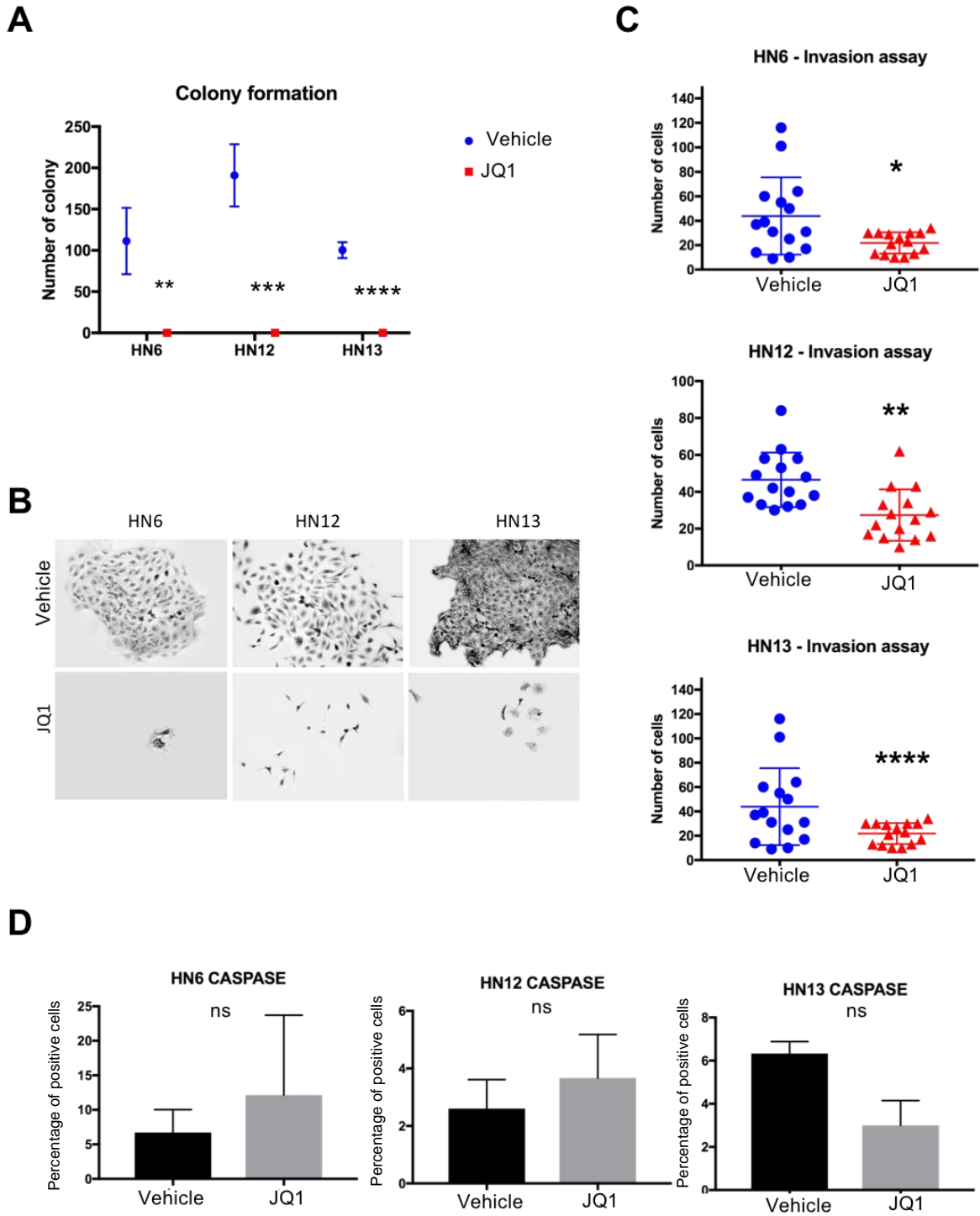


Figure 3

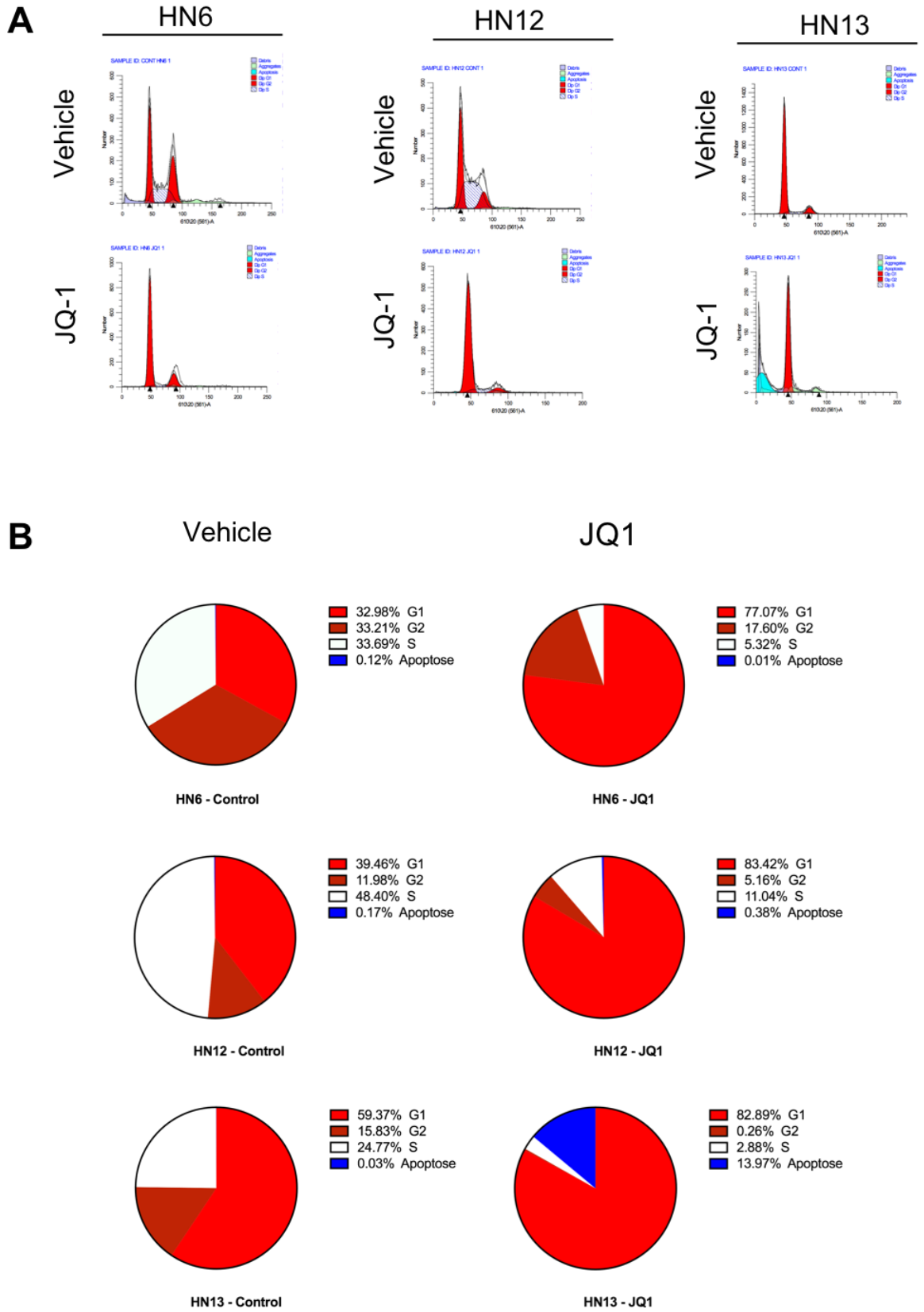


Figure 4

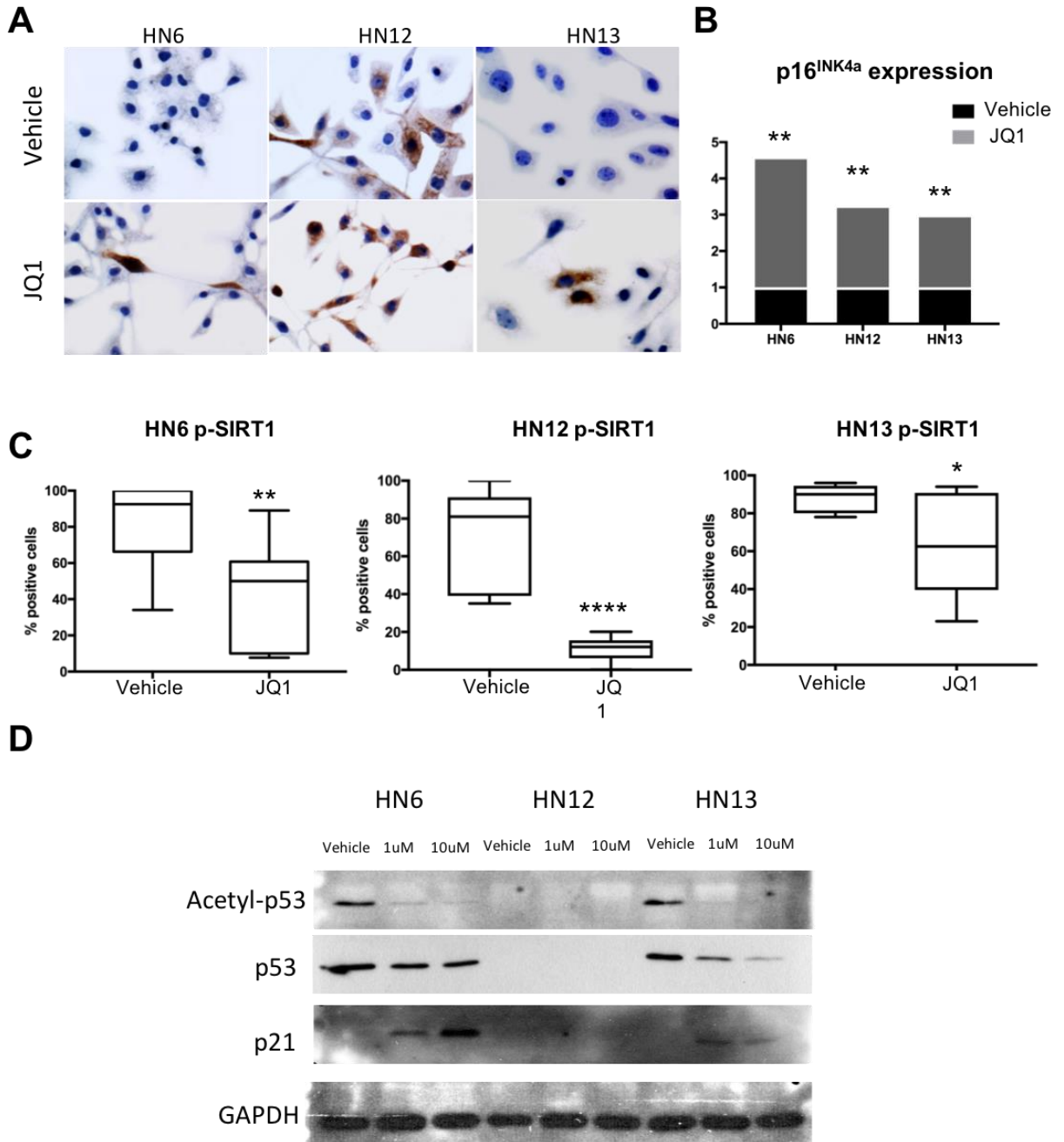


Figure 5

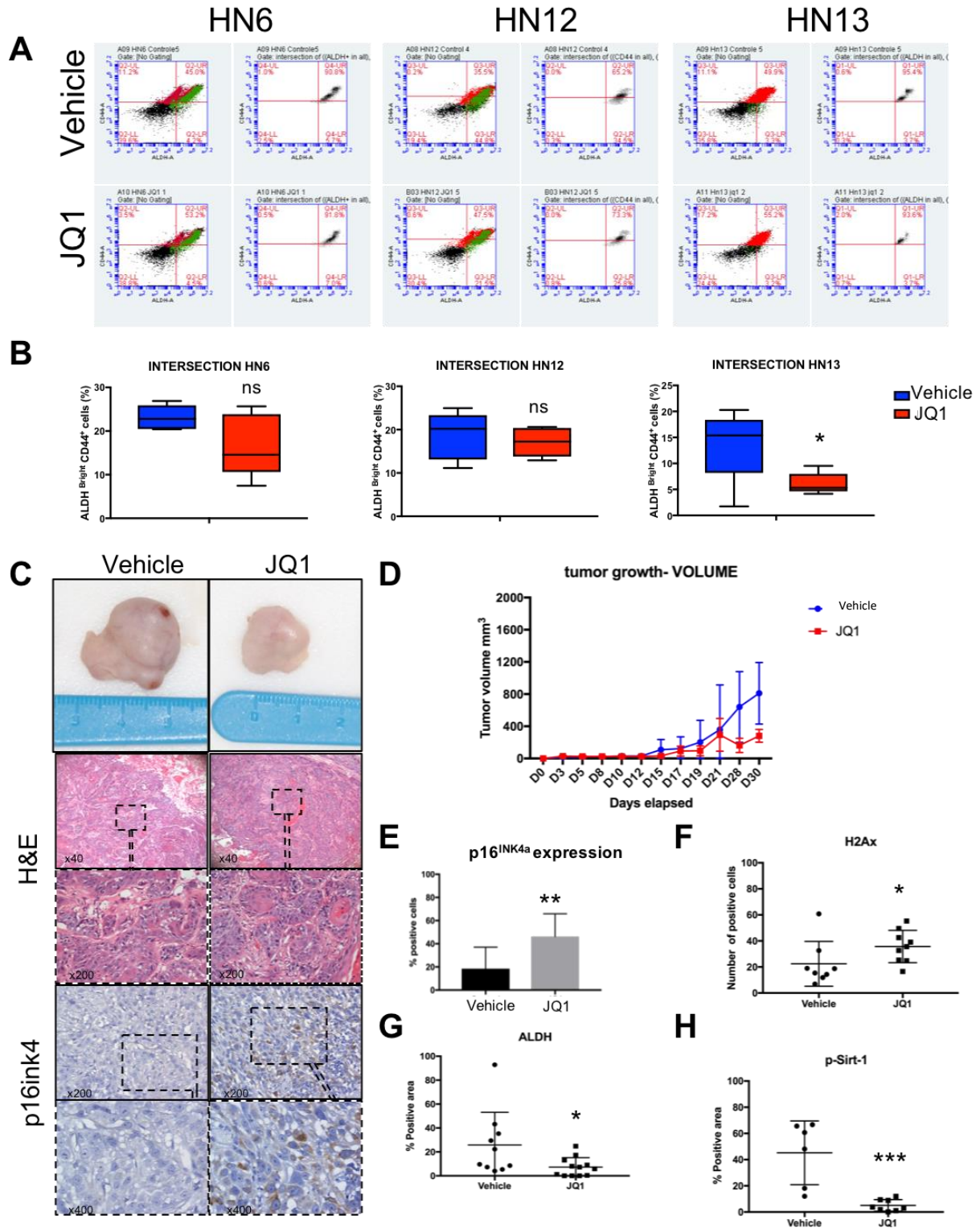
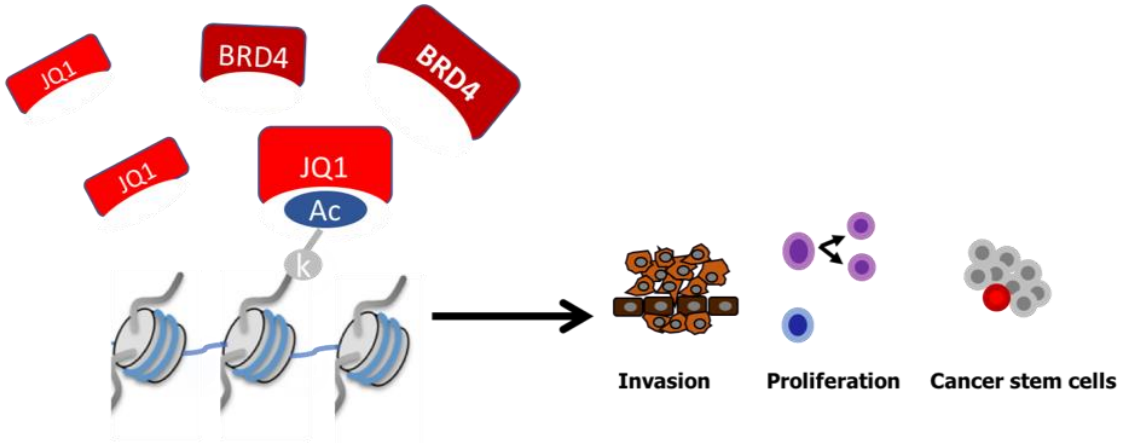
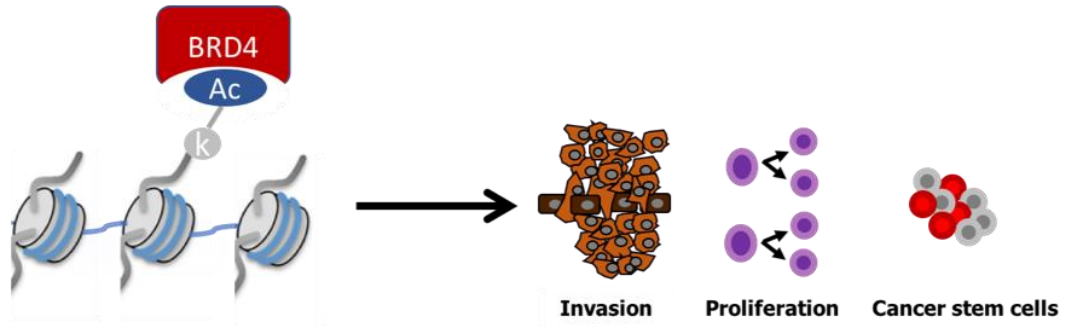


Figure 6



## References

- Agrawal, N., Frederick, M.J., Pickering, C.R., Bettegowda, C., Chang, K., Li, R.J., Fakhry, C., Xie, T.X., Zhang, J., Wang, J., *et al.* (2011). Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science* 333, 1154-1157.
- Almeida, L.O., Abrahao, A.C., Rosselli-Murai, L.K., Giudice, F.S., Zagni, C., Leopoldino, A.M., Squarize, C.H., and Castilho, R.M. (2014). NFkappaB mediates cisplatin resistance through histone modifications in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *FEBS Open Bio* 4, 96-104.
- Almeida, L.O., Guimaraes, D.M., Martins, M.D., Martins, M.A.T., Warner, K.A., Nor, J.E., Castilho, R.M., and Squarize, C.H. (2017). Unlocking the chromatin of adenoid cystic carcinomas using HDAC inhibitors sensitize cancer stem cells to cisplatin and induces tumor senescence. *Stem Cell Res* 21, 94-105.
- Barlev, N.A., Liu, L., Chehab, N.H., Mansfield, K., Harris, K.G., Halazonetis, T.D., and Berger, S.L. (2001). Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases. *Mol Cell* 8, 1243-1254.
- Brooks, C.L., and Gu, W. (2009). How does SIRT1 affect metabolism, senescence and cancer? *Nat Rev Cancer* 9, 123-128.
- Cai, M.H., Xu, X.G., Yan, S.L., Sun, Z., Ying, Y., Wang, B.K., and Tu, Y.X. (2018). Depletion of HDAC1, 7 and 8 by Histone Deacetylase Inhibition Confers Elimination of Pancreatic Cancer Stem Cells in Combination with Gemcitabine. *Sci Rep* 8, 1621.
- Castilho, R.M., Squarize, C.H., and Almeida, L.O. (2017). Epigenetic Modifications and Head and Neck Cancer: Implications for Tumor Progression and Resistance to Therapy. *Int J Mol Sci* 18.
- Castilho, R.M., Squarize, C.H., Chodosh, L.A., Williams, B.O., and Gutkind, J.S. (2009). mTOR mediates Wnt-induced epidermal stem cell exhaustion and aging. *Cell Stem Cell* 5, 279-289.
- Cheng, Z., Gong, Y., Ma, Y., Lu, K., Lu, X., Pierce, L.A., Thompson, R.C., Muller, S., Knapp, S., and Wang, J. (2013). Inhibition of BET bromodomain targets genetically diverse glioblastoma. *Clin Cancer Res* 19, 1748-1759.
- Di Bernardo, G., Squillaro, T., Dell'Aversana, C., Miceli, M., Cipollaro, M., Cascino, A., Altucci, L., and Galderisi, U. (2009). Histone deacetylase inhibitors promote apoptosis and senescence in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 18, 573-581.
- Di Micco, R., Fontanals-Cirera, B., Low, V., Ntziachristos, P., Yuen, S.K., Lovell, C.D., Dolgalev, I., Yonekubo, Y., Zhang, G., Rusinova, E., *et al.* (2014). Control of embryonic stem cell identity by BRD4-dependent transcriptional elongation of super-enhancer-associated pluripotency genes. *Cell Rep* 9, 234-247.
- Dong, X., Hu, X., Chen, J., Hu, D., and Chen, L.F. (2018). BRD4 regulates cellular senescence in gastric cancer cells via E2F/miR-106b/p21 axis. *Cell Death Dis* 9, 203.
- Enomoto, K., Zhu, X., Park, S., Zhao, L., Zhu, Y.J., Willingham, M.C., Qi, J., Copland, J.A., Meltzer, P., and Cheng, S.Y. (2017). Targeting MYC as a Therapeutic Intervention for Anaplastic Thyroid Cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 102, 2268-2280.
- Fraga, M.F., Ballestar, E., Villar-Garea, A., Boix-Chornet, M., Espada, J., Schotta, G., Bonaldi, T., Haydon, C., Ropero, S., Petrie, K., *et al.* (2005). Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nature genetics* 37, 391-400.
- Giudice, F.S., Pinto, D.S., Jr., Nor, J.E., Squarize, C.H., and Castilho, R.M. (2013). Inhibition of histone deacetylase impacts cancer stem cells and induces epithelial-mesenchyme transition of head and neck cancer. *PLoS One* 8, e58672.

- Gonzales-Cope, M., Sidoli, S., Bhanu, N.V., Won, K.J., and Garcia, B.A. (2016). Histone H4 acetylation and the epigenetic reader Brd4 are critical regulators of pluripotency in embryonic stem cells. *BMC Genomics* 17, 95.
- Guimaraes, D.M., Almeida, L.O., Martins, M.D., Warner, K.A., Silva, A.R., Vargas, P.A., Nunes, F.D., Squarize, C.H., Nor, J.E., and Castilho, R.M. (2016). Sensitizing mucoepidermoid carcinomas to chemotherapy by targeted disruption of cancer stem cells. *Oncotarget* 7, 42447-42460.
- Hayakawa, T., Iwai, M., Aoki, S., Takimoto, K., Maruyama, M., Maruyama, W., and Motoyama, N. (2015). SIRT1 suppresses the senescence-associated secretory phenotype through epigenetic gene regulation. *PLoS One* 10, e0116480.
- Horne, G.A., Stewart, H.J., Dickson, J., Knapp, S., Ramsahoye, B., and Chevassut, T. (2015). Nanog requires BRD4 to maintain murine embryonic stem cell pluripotency and is suppressed by bromodomain inhibitor JQ1 together with Lefty1. *Stem Cells Dev* 24, 879-891.
- Hovest, M.G., Bruggenolte, N., Hosseini, K.S., Krieg, T., and Herrmann, G. (2006). Senescence of human fibroblasts after psoralen photoactivation is mediated by ATR kinase and persistent DNA damage foci at telomeres. *Mol Biol Cell* 17, 1758-1767.
- Hsu, C.C., Chang, W.C., Hsu, T.I., Liu, J.J., Yeh, S.H., Wang, J.Y., Liou, J.P., Ko, C.Y., Chang, K.Y., and Chuang, J.Y. (2016). Suberoylanilide hydroxamic acid represses glioma stem-like cells. *J Biomed Sci* 23, 81.
- Jang, J., Huh, Y.J., Cho, H.J., Lee, B., Park, J., Hwang, D.Y., and Kim, D.W. (2017). SIRT1 Enhances the Survival of Human Embryonic Stem Cells by Promoting DNA Repair. *Stem Cell Reports* 9, 629-641.
- Kamijo, H., Sugaya, M., Takahashi, N., Oka, T., Miyagaki, T., Asano, Y., and Sato, S. (2017). BET bromodomain inhibitor JQ1 decreases CD30 and CCR4 expression and proliferation of cutaneous T-cell lymphoma cell lines. *Arch Dermatol Res* 309, 491-497.
- Liu, H., Fergusson, M.M., Castilho, R.M., Liu, J., Cao, L., Chen, J., Malide, D., Rovira, II, Schimel, D., Kuo, C.J., *et al.* (2007). Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. *Science* 317, 803-806.
- Liu, W., Stein, P., Cheng, X., Yang, W., Shao, N.Y., Morrissey, E.E., Schultz, R.M., and You, J. (2014). BRD4 regulates Nanog expression in mouse embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Cell Death Differ* 21, 1950-1960.
- Loven, J., Hoke, H.A., Lin, C.Y., Lau, A., Orlando, D.A., Vakoc, C.R., Bradner, J.E., Lee, T.I., and Young, R.A. (2013). Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers. *Cell* 153, 320-334.
- Luo, J., Nikolaev, A.Y., Imai, S., Chen, D., Su, F., Shiloh, A., Guarente, L., and Gu, W. (2001). Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* 107, 137-148.
- Martins, M.D., and Castilho, R.M. (2013). Histones: Controlling Tumor Signaling Circuitry. *J Carcinog Mutagen* 1, 1-12.
- Nephew, K.P., and Huang, T.H. (2003). Epigenetic gene silencing in cancer initiation and progression. *Cancer Lett* 190, 125-133.
- Pant, V., and Lozano, G. (2014). Limiting the power of p53 through the ubiquitin proteasome pathway. *Genes Dev* 28, 1739-1751.
- Sedelnikova, O.A., Horikawa, I., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., Bonner, W.M., and Barrett, J.C. (2004). Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks. *Nat Cell Biol* 6, 168-170.
- Simboeck, E., Ribeiro, J.D., Teichmann, S., and Di Croce, L. (2011). Epigenetics and senescence: learning from the INK4-ARF locus. *Biochem Pharmacol* 82, 1361-1370.

- Stransky, N., Egloff, A.M., Tward, A.D., Kostic, A.D., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Kryukov, G.V., Lawrence, M.S., Sougnez, C., McKenna, A., *et al.* (2011). The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science* **333**, 1157-1160.
- Terzi, M.Y., Izmirlı, M., and Gogebakan, B. (2016). The cell fate: senescence or quiescence. *Mol Biol Rep* **43**, 1213-1220.
- Vargas, J.E., Filippi-Chiela, E.C., Suhre, T., Kipper, F.C., Bonatto, D., and Lenz, G. (2014). Inhibition of HDAC increases the senescence induced by natural polyphenols in glioma cells. *Biochem Cell Biol* **92**, 297-304.
- Wagner, V.P., Martins, M.D., Martins, M.A.T., Almeida, L.O., Warner, K.A., Nor, J.E., Squarize, C.H., and Castilho, R.M. (2018). Targeting histone deacetylase and NFkappaB signaling as a novel therapy for Mucoepidermoid Carcinomas. *Sci Rep* **8**, 2065.
- Xu, W.S., Perez, G., Ngo, L., Gui, C.Y., and Marks, P.A. (2005). Induction of polyploidy by histone deacetylase inhibitor: a pathway for antitumor effects. *Cancer Res* **65**, 7832-7839.
- Yeudall, W.A., Jakus, J., Ensley, J.F., and Robbins, K.C. (1997). Functional characterization of p53 molecules expressed in human squamous cell carcinomas of the head and neck. *Mol Carcinog* **18**, 89-96.
- Zanellato, I., Colangelo, D., and Osella, D. (2017). JQ1, a BET inhibitor, synergizes with cisplatin and induces apoptosis in highly chemoresistant malignant pleural mesothelioma cells. *Curr Cancer Drug Targets*.
- Zhang, H.T., Gui, T., Sang, Y., Yang, J., Li, Y.H., Liang, G.H., Li, T., He, Q.Y., and Zha, Z.G. (2017). The BET Bromodomain Inhibitor JQ1 Suppresses Chondrosarcoma Cell Growth via Regulation of YAP/p21/c-Myc Signaling. *J Cell Biochem* **118**, 2182-2192.
- Zhao, Y., Lu, S., Wu, L., Chai, G., Wang, H., Chen, Y., Sun, J., Yu, Y., Zhou, W., Zheng, Q., *et al.* (2006). Acetylation of p53 at lysine 373/382 by the histone deacetylase inhibitor depsipeptide induces expression of p21(Waf1/Cip1). *Mol Cell Biol* **26**, 2782-2790.
- Zhou, G., Liu, Z., and Myers, J.N. (2016). TP53 Mutations in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Their Impact on Disease Progression and Treatment Response. *J Cell Biochem* **117**, 2682-2692.



## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O CECP é uma doença multifatorial e nenhum agente etiológico isolado tem sido relacionado a essa doença (Rivera 2015). Contudo, nos últimos anos com o avanço da bioinformática e com a possibilidade de um rastreamento através de sequenciamentos genéticos com um grande número de pacientes, assim como realizado no TCGA, foi possível entender quais as principais alterações genéticas envolvidas nessa neoplasia. No entanto, além do p53 que foi encontrada sua mutação em 62% dos casos, não foi encontrado nenhum outro gene com prevalência em mais de 50% dos casos. Esses dados corroboram para o papel da epigenética nessa lesão (<https://cancergenome.nih.gov> acessado 23/03/18).

A epigenética é o termo usado para descrever mecanismos que provoquem alterações na expressão gênica sem que ocorram modificações na sequência do DNA (Weinhold 2006). Por se algo dinâmico, as mudanças epigenéticas tem sido um novo alvo para o tratamento do câncer com resultados promissores (Kejik et al. 2018; Wagner et al. 2018; Almeida et al. 2017). Sobre essa abordagem de terapia, além do estudo da metilação de DNA, ou ainda da inibição das HDACs, tem se ganhado destaque nos últimos anos, o papel da inibição dos leitores de histona com nova terapia para diversas neoplasias (Castilho, Squarize, and Almeida 2017; Martins and Castilho 2013).

Em estudos anteriores do nosso grupo, foram explorados aspectos epigenéticos relacionados com a carcinogênese (Webber et al. 2017; Wagner et al. 2017) e também com o uso de inibidores epigenéticos para o tratamento de CECP (Wagner et al. 2018; Almeida et al. 2017). Contudo, nunca havíamos explorado a papel dos bromodomínios nessa neoplasia. Nesse aspecto, optamos por estudar o papel do JQ1 nos CECP. JQ1 é uma nova droga utilizada para deslocar a conexão entre a histona acetilada e o BRD4 evitando assim o reconhecimento da acetilação das histonas (Filippakopoulos et al. 2010). Essa droga tem atingido resultados satisfatórios em outras lesões (Walti et al. 2018; Sahni and Keri 2018; Wang, Hong, et al. 2017) e como já relatado anteriormente por outros trabalhos, a acetilação das histonas desenvolve um importante papel na carcinogênese e sua inibição mostrou interessantes avanços no tratamento dessa neoplasia.

Primeiramente, utilizamos o JQ1 nas linhagens de CEC HN6, HN12 e HN13 e encontramos uma diminuição da expressão de BRD4 e H4. Então decidimos explorar através de ensaios mecanísticos qual seria o papel dessa droga nessas três linhagens.

Nós encontramos que, após o uso da droga, houve uma diminuição no número de colônias, além da diminuição do número de células com capacidade de invasão e um maior número de células em pausa na fase G1. Contudo, não encontramos diferença em relação a apoptose. A partir desses resultados, pensamos que a senescência pudesse estar sendo ativada após o uso do JQ1.

Foi realizada a imunomarcação do p16ink4, conhecido marcador de senescência e interessante, encontramos uma maior expressão desse marcador após o tratamento com JQ1. Além disso, também exploramos a expressão de SIRT1 como regulador do processo através da desacetilação do p53.

O CECP é uma lesão composta por diversas populações distintas de células e para conseguirmos um tratamento eficaz é necessária uma abordagem que de forma isolada ou combinada consiga diminuir essas populações de células (Wagner, Martins, and Castilho 2018). À vista disso, resolvemos também explorar qual seria a interferência do JQ1 nas células tronco-tumorais, através da marcação de CD44<sup>+</sup> e ALDH, marcadores já utilizados e descritos na literatura para a identificação de um fenótipo tronco celular (Adams et al. 2015). Encontramos uma diminuição na expressão desses marcadores em todas as linhagens estudadas. Corroborando com os resultados anteriores e reforçando o papel como um novo alvo terapêutico do BRD4.

Para validar os nossos resultados, resolvemos explorar o uso dessa droga *in vivo*, e realizamos xenoexerto de implantamos células da linhagem HN12 nos animais nudes. Encontramos resultados clínicos satisfatórios, além da diminuição do volume do tumor em relação aos animais tratados apenas com o veículo também a diminuição de marcadores como ALDH (células-tronco),  $\gamma$ -H<sub>2</sub>Ax (dano ao DNA) p-SIRT1 (desacetilação do p53) e p16ink4 (senescência).

Por fim, avaliando nossos resultados, podemos concluir que JQ1 é uma terapia promissora para o tratamento de CECP. Novos estudos são necessários para explorar, mais especificamente a forma de ação dessa droga. Além disso, acreditamos que o uso dessa droga combinada com outro agente quimioterápico que diminua a proliferação celular possa ser uma nova alternativa para o tratamento de pacientes com essa neoplasia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abner, E., M. Stoszko, L. Zeng, H. C. Chen, A. Izquierdo-Bouldstridge, T. Konuma, E. Zorita, E. Fanunza, Q. Zhang, T. Mahmoudi, M. M. Zhou, G. J. Filion, and A. Jordan. 2018. 'A new quinoline BRD4 inhibitor targets a distinct latent HIV-1 reservoir for re-activation from other 'shock' drugs', *J Virol*.
- Adams, A., K. Warner, A. T. Pearson, Z. Zhang, H. S. Kim, D. Mochizuki, G. Basura, J. Helman, A. Mantesso, R. M. Castilho, M. S. Wicha, and J. E. Nor. 2015. 'ALDH/CD44 identifies uniquely tumorigenic cancer stem cells in salivary gland mucoepidermoid carcinomas', *Oncotarget*, 6: 26633-50.
- Almeida, L. O., D. M. Guimaraes, M. D. Martins, M. A. T. Martins, K. A. Warner, J. E. Nor, R. M. Castilho, and C. H. Squarize. 2017. 'Unlocking the chromatin of adenoid cystic carcinomas using HDAC inhibitors sensitize cancer stem cells to cisplatin and induces tumor senescence', *Stem Cell Res*, 21: 94-105.
- Andisheh-Tadbir, A., D. Mehrabani, and S. T. Heydari. 2010. 'Sociodemographic and etiological differences of head and neck squamous cell carcinoma in young and old patients in southern Iran', *J Craniofac Surg*, 21: 126-8.
- Arshad, Z., J. Smith, M. Roberts, W. H. Lee, B. Davies, K. Bure, G. A. Hollander, S. Dopson, C. Bountra, and D. Brindley. 2016. 'Open Access Could Transform Drug Discovery: A Case Study of JQ1', *Expert Opin Drug Discov*, 11: 321-32.
- Baud, M. G. J., E. Lin-Shiao, T. Cardote, C. Tallant, A. Pschibul, K. H. Chan, M. Zengerle, J. R. Garcia, T. T. Kwan, F. M. Ferguson, and A. Ciulli. 2014. 'Chemical biology. A bump-and-hole approach to engineer controlled selectivity of BET bromodomain chemical probes', *Science*, 346: 638-41.
- Belkina, A. C., and G. V. Denis. 2012. 'BET domain co-regulators in obesity, inflammation and cancer', *Nat Rev Cancer*, 12: 465-77.
- Blancafort, P., J. Jin, and S. Frye. 2013. 'Writing and rewriting the epigenetic code of cancer cells: from engineered proteins to small molecules', *Mol Pharmacol*, 83: 563-76.
- Brandizzi, D., M. Gandolfo, M. L. Velazco, R. L. Cabrini, and H. E. Lanfranchi. 2008. 'Clinical features and evolution of oral cancer: A study of 274 cases in Buenos Aires, Argentina', *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 13: E544-8.
- Cancer Genome Atlas, Network. 2015. 'Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas', *Nature*, 517: 576-82.
- Castilho, R. M., C. H. Squarize, and L. O. Almeida. 2017. 'Epigenetic Modifications and Head and Neck Cancer: Implications for Tumor Progression and Resistance to Therapy', *Int J Mol Sci*, 18.
- Chang, H. H., C. P. Chiang, H. C. Hung, C. Y. Lin, Y. T. Deng, and M. Y. Kuo. 2009. 'Histone deacetylase 2 expression predicts poorer prognosis in oral cancer patients', *Oral Oncol*, 45: 610-4.
- Chen, J. J., J. L. Shah, J. P. Harris, T. T. Bui, K. Schaberg, C. S. Kong, M. J. Kaplan, V. Divi, D. Schoppy, Q. T. Le, and W. Y. Hara. 2017. 'Clinical Outcomes in Elderly Patients Treated for Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma', *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 98: 775-83.
- da Motta, L. L., I. Ledaki, K. Purshouse, S. Haider, M. A. De Bastiani, D. Baban, M. Morotti, G. Steers, S. Wigfield, E. Bridges, J. L. Li, S. Knapp, D. Ebner, F. Klamt, A. L. Harris, and A. McIntyre. 2017. 'The BET inhibitor JQ1 selectively impairs tumour response to hypoxia and downregulates CA9 and angiogenesis in triple negative breast cancer', *Oncogene*, 36: 122-32.

- Fakhry, C., M. Krapcho, D. W. Eisele, and G. D'Souza. 2018. 'Head and neck squamous cell cancers in the United States are rare and the risk now is higher among white individuals compared with black individuals', *Cancer*.
- Ferlay, J., H. R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers, and D. M. Parkin. 2010. 'Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008', *Int J Cancer*, 127: 2893-917.
- Filippakopoulos, P., and S. Knapp. 2014. 'Targeting bromodomains: epigenetic readers of lysine acetylation', *Nat Rev Drug Discov*, 13: 337-56.
- Filippakopoulos, P., J. Qi, S. Picaud, Y. Shen, W. B. Smith, O. Fedorov, E. M. Morse, T. Keates, T. T. Hickman, I. Felletar, M. Philpott, S. Munro, M. R. McKeown, Y. Wang, A. L. Christie, N. West, M. J. Cameron, B. Schwartz, T. D. Heightman, N. La Thangue, C. A. French, O. Wiest, A. L. Kung, S. Knapp, and J. E. Bradner. 2010. 'Selective inhibition of BET bromodomains', *Nature*, 468: 1067-73.
- Fontecha-Barriuso, M., D. Martin-Sanchez, O. Ruiz-Andres, J. Poveda, M. D. Sanchez-Nino, L. Valino-Rivas, M. Ruiz-Ortega, A. Ortiz, and A. B. Sanz. 2018. 'Targeting epigenetic DNA and histone modifications to treat kidney disease', *Nephrol Dial Transplant*.
- French, C. A. 2010. 'NUT midline carcinoma', *Cancer Genet Cytogenet*, 203: 16-20.
- Gallinari, P., S. Di Marco, P. Jones, M. Pallaoro, and C. Steinkuhler. 2007. 'HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics', *Cell Res*, 17: 195-211.
- Garraway, L. A., J. Verweij, and K. V. Ballman. 2013. 'Precision oncology: an overview', *J Clin Oncol*, 31: 1803-5.
- Gillenwater, A. M., M. Zhong, and R. Lotan. 2007. 'Histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid induces apoptosis through both mitochondrial and Fas (Cd95) signaling in head and neck squamous carcinoma cells', *Mol Cancer Ther*, 6: 2967-75.
- Gillison, M. L., G. D'Souza, W. Westra, E. Sugar, W. Xiao, S. Begum, and R. Viscidi. 2008. 'Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers', *J Natl Cancer Inst*, 100: 407-20.
- Giudice, F. S., D. S. Pinto, Jr., J. E. Nor, C. H. Squarize, and R. M. Castilho. 2013. 'Inhibition of histone deacetylase impacts cancer stem cells and induces epithelial-mesenchyme transition of head and neck cancer', *PLoS One*, 8: e58672.
- Groselj, B., N. L. Sharma, F. C. Hamdy, M. Kerr, and A. E. Kiltie. 2013. 'Histone deacetylase inhibitors as radiosensitisers: effects on DNA damage signalling and repair', *Br J Cancer*, 108: 748-54.
- Halkidou, K., L. Gaughan, S. Cook, H. Y. Leung, D. E. Neal, and C. N. Robson. 2004. 'Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer', *Prostate*, 59: 177-89.
- Hanahan, D., and R. A. Weinberg. 2000. 'The hallmarks of cancer', *Cell*, 100: 57-70.  
2011. 'Hallmarks of cancer: the next generation', *Cell*, 144: 646-74.
- Haslem, D. S., I. Chakravarty, G. Fulde, H. Gilbert, B. P. Tudor, K. Lin, J. M. Ford, and L. D. Nadauld. 2018. 'Precision oncology in advanced cancer patients improves overall survival with lower weekly healthcare costs', *Oncotarget*, 9: 12316-22.
- Howlander N., Noone A.M., Krapcho M., et al: SEER cancer statistics review 1975-2011. Bethesda (MD): National Cancer Institute, 2014.)
- Mrzenjak, A., F. Moinfar, M. L. Kremser, B. Strohmeier, P. B. Staber, K. Zatloukal, and H. Denk. 2006. 'Valproate inhibition of histone deacetylase 2 affects differentiation and decreases proliferation of endometrial stromal sarcoma cells', *Mol Cancer Ther*, 5: 2203-10.

- Hsu, S. C., and G. A. Blobel. 2017. 'The Role of Bromodomain and Extraterminal Motif (BET) Proteins in Chromatin Structure', *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*.
- Huang, B., X. D. Yang, M. M. Zhou, K. Ozato, and L. F. Chen. 2009. 'Brd4 coactivates transcriptional activation of NF-kappaB via specific binding to acetylated RelA', *Mol Cell Biol*, 29: 1375-87.
- Hussein, A. A., M. N. Helder, J. G. de Visscher, C. R. Leemans, B. J. Braakhuis, H. C. W. de Vet, and T. Forouzanfar. 2017. 'Global incidence of oral and oropharynx cancer in patients younger than 45 years versus older patients: A systematic review', *Eur J Cancer*, 82: 115-27.
- Jung, M., K. A. Gelato, A. Fernandez-Montalvan, S. Siegel, and B. Haendler. 2015. 'Targeting BET bromodomains for cancer treatment', *Epigenomics*, 7: 487-501.
- Kanwal, R., and S. Gupta. 2012. 'Epigenetic modifications in cancer', *Clin Genet*, 81: 303-11.
- Kejik, Z., M. Jakubek, R. Kaplanek, J. Kralova, I. Mikula, P. Martasek, and V. Kral. 2018. 'Epigenetic agents in combined anticancer therapy', *Future Med Chem*.
- Kohnken, R., J. Wen, B. Mundy-Bosse, K. McConnell, A. Keiter, L. Grinshpun, A. Hartlage, M. Yano, B. McNeil, N. Chakravarti, B. William, J. E. Bradner, M. A. Caligiuri, P. Porcu, and A. Mishra. 2018. 'Diminished microRNA-29b level is associated with BRD4-mediated activation of oncogenes in cutaneous T-cell lymphoma', *Blood*, 131: 771-81.
- Kulikowski, E., C. Halliday, J. Johansson, M. Sweeney, K. Lebioda, N. Wong, M. Haarhaus, V. Brandenburg, S. Beddhu, M. Tonelli, C. Zoccali, and K. Kalantar-Zadeh. 2018. 'Apabetalone Mediated Epigenetic Modulation is Associated with Favorable Kidney Function and Alkaline Phosphatase Profile in Patients with Chronic Kidney Disease', *Kidney Blood Press Res*, 43: 449-57.
- Kumar, B., A. Yadav, J. C. Lang, T. N. Teknos, and P. Kumar. 2015. 'Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) reverses chemoresistance in head and neck cancer cells by targeting cancer stem cells via the downregulation of nanog', *Genes Cancer*, 6: 169-81.
- Langer, C. J., S. M. Gadgeel, H. Borghaei, V. A. Papadimitrakopoulou, A. Patnaik, S. F. Powell, R. D. Gentzler, R. G. Martins, J. P. Stevenson, S. I. Jalal, A. Panwalkar, J. C. Yang, M. Gubens, L. V. Sequist, M. M. Awad, J. Fiore, Y. Ge, H. Raftopoulos, L. Gandhi, and Keynote-investigators. 2016. 'Carboplatin and pemetrexed with or without pembrolizumab for advanced, non-squamous non-small-cell lung cancer: a randomised, phase 2 cohort of the open-label KEYNOTE-021 study', *Lancet Oncol*, 17: 1497-508.
- Lawlor, E. R., and C. J. Thiele. 2012. 'Epigenetic changes in pediatric solid tumors: promising new targets', *Clin Cancer Res*, 18: 2768-79.
- Leal, A. S., C. R. Williams, D. B. Royce, P. A. Pioli, M. B. Sporn, and K. T. Liby. 2017. 'Bromodomain inhibitors, JQ1 and I-BET 762, as potential therapies for pancreatic cancer', *Cancer Lett*, 394: 76-87.
- Lehrmann, H., L. L. Pritchard, and A. Harel-Bellan. 2002. 'Histone acetyltransferases and deacetylases in the control of cell proliferation and differentiation', *Adv Cancer Res*, 86: 41-65.
- Li, Y., and E. Seto. 2016. 'HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy', *Cold Spring Harb Perspect Med*, 6.
- Licitra, L., L. D. Locati, P. Bossi, and G. Cantu. 2004. 'Head and neck tumors other than squamous cell carcinoma', *Curr Opin Oncol*, 16: 236-41.
- Lin, A., S. Wang, T. Nguyen, K. Shire, and L. Frappier. 2008. 'The EBNA1 protein of Epstein-Barr virus functionally interacts with Brd4', *J Virol*, 82: 12009-19.

- Liu, W., P. Stein, X. Cheng, W. Yang, N. Y. Shao, E. E. Morrisey, R. M. Schultz, and J. You. 2014. 'BRD4 regulates Nanog expression in mouse embryonic stem cells and preimplantation embryos', *Cell Death Differ*, 21: 1950-60.
- Loven, J., H. A. Hoke, C. Y. Lin, A. Lau, D. A. Orlando, C. R. Vakoc, J. E. Bradner, T. I. Lee, and R. A. Young. 2013. 'Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers', *Cell*, 153: 320-34.
- Lund, A. H., and M. van Lohuizen. 2004. 'Epigenetics and cancer', *Genes Dev*, 18: 2315-35.
- Marmorstein, R., and M. M. Zhou. 2014. 'Writers and readers of histone acetylation: structure, mechanism, and inhibition', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6: a018762.
- Martinez, R. C., H. P. Sathasivam, B. Cosway, V. Paleri, S. Fellows, J. Adams, M. Kennedy, R. Pearson, A. Long, P. Sloan, and M. Robinson. 2018. 'Clinicopathological features of squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx in young patients', *Br J Oral Maxillofac Surg*.
- Martins, M. D., and R. M. Castilho. 2013. 'Histones: Controlling Tumor Signaling Circuitry', *J Carcinog Mutagen*, 1: 1-12.
- Meng, S., L. Zhang, Y. Tang, Q. Tu, L. Zheng, L. Yu, D. Murray, J. Cheng, S. H. Kim, X. Zhou, and J. Chen. 2014. 'BET Inhibitor JQ1 Blocks Inflammation and Bone Destruction', *J Dent Res*, 93: 657-62.
- Nakamura, Y., T. Umehara, K. Nakano, M. K. Jang, M. Shirouzu, S. Morita, H. Uda-Tochio, H. Hamana, T. Terada, N. Adachi, T. Matsumoto, A. Tanaka, M. Horikoshi, K. Ozato, B. Padmanabhan, and S. Yokoyama. 2007. 'Crystal structure of the human BRD2 bromodomain: insights into dimerization and recognition of acetylated histone H4', *J Biol Chem*, 282: 4193-201.
- Nicholls, S. J., K. K. Ray, J. O. Johansson, A. Gordon, M. Sweeney, C. Halliday, E. Kulikowski, N. Wong, S. W. Kim, and G. G. Schwartz. 2018. 'Selective BET Protein Inhibition with Apabetalone and Cardiovascular Events: A Pooled Analysis of Trials in Patients with Coronary Artery Disease', *Am J Cardiovasc Drugs*, 18: 109-15.
- Nicodeme, E., K. L. Jeffrey, U. Schaefer, S. Beinke, S. Dewell, C. W. Chung, R. Chandwani, I. Marazzi, P. Wilson, H. Coste, J. White, J. Kirilovsky, C. M. Rice, J. M. Lora, R. K. Prinjha, K. Lee, and A. Tarakhovsky. 2010. 'Suppression of inflammation by a synthetic histone mimic', *Nature*, 468: 1119-23.
- Paksa, A., and J. Rajagopal. 2017. 'The epigenetic basis of cellular plasticity', *Curr Opin Cell Biol*, 49: 116-22.
- Perez-Salvia, M., and M. Esteller. 2017. 'Bromodomain inhibitors and cancer therapy: From structures to applications', *Epigenetics*, 12: 323-39.
- Perez-Salvia, M., L. Simo-Riudalbas, P. Llinas-Arias, L. Roa, F. Setien, M. Soler, M. C. de Moura, J. E. Bradner, E. Gonzalez-Suarez, C. Moutinho, and M. Esteller. 2017. 'Bromodomain inhibition shows antitumoral activity in mice and human luminal breast cancer', *Oncotarget*, 8: 51621-29.
- Polverini, P. J., N. J. D'Silva, and Y. L. Lei. 2018. 'Precision Therapy of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma', *J Dent Res*: 22034518769645.
- Qi, J. 2014. 'Bromodomain and extraterminal domain inhibitors (BETi) for cancer therapy: chemical modulation of chromatin structure', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6: a018663.
- Qiu, H., X. Fang, Q. Luo, and G. Ouyang. 2015. 'Cancer stem cells: a potential target for cancer therapy', *Cell Mol Life Sci*, 72: 3411-24.
- Rettig, E. M., and G. D'Souza. 2015. 'Epidemiology of head and neck cancer', *Surg Oncol Clin N Am*, 24: 379-96.

- Rivera, C. 2015. 'Essentials of oral cancer', *Int J Clin Exp Pathol*, 8: 11884-94.
- Roe, J. S., F. Mercan, K. Rivera, D. J. Pappin, and C. R. Vakoc. 2015. 'BET Bromodomain Inhibition Suppresses the Function of Hematopoietic Transcription Factors in Acute Myeloid Leukemia', *Mol Cell*, 58: 1028-39.
- Ropero, S., and M. Esteller. 2007. 'The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer', *Mol Oncol*, 1: 19-25.
- Sahni, J. M., and R. A. Keri. 2018. 'Targeting bromodomain and extraterminal proteins in breast cancer', *Pharmacol Res*, 129: 156-76.
- Saito, M., T. Momma, and K. Kono. 2018. 'Targeted therapy according to next generation sequencing-based panel sequencing', *Fukushima J Med Sci*.
- Segatto, M., R. Fittipaldi, F. Pin, R. Sartori, K. Dae Ko, H. Zare, C. Fenizia, G. Zanchettin, E. S. Pierobon, S. Hatakeyama, C. Sperti, S. Merigliano, M. Sandri, P. Filippakopoulos, P. Costelli, V. Sartorelli, and G. Caretti. 2017. 'Epigenetic targeting of bromodomain protein BRD4 counteracts cancer cachexia and prolongs survival', *Nat Commun*, 8: 1707.
- Seligson, D. B., S. Horvath, T. Shi, H. Yu, S. Tze, M. Grunstein, and S. K. Kurdistani. 2005. 'Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence', *Nature*, 435: 1262-6.
- Seoane-Romero, J. M., I. Vazquez-Mahia, J. Seoane, P. Varela-Centelles, I. Tomas, and J. L. Lopez-Cedrun. 2012. 'Factors related to late stage diagnosis of oral squamous cell carcinoma', *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 17: e35-40.
- Shi, J., and C. R. Vakoc. 2014. 'The mechanisms behind the therapeutic activity of BET bromodomain inhibition', *Mol Cell*, 54: 728-36.
- Song, J., J. H. Noh, J. H. Lee, J. W. Eun, Y. M. Ahn, S. Y. Kim, S. H. Lee, W. S. Park, N. J. Yoo, J. Y. Lee, and S. W. Nam. 2005. 'Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer', *APMIS*, 113: 264-8.
- Stonestrom, A. J., S. C. Hsu, K. S. Jahn, P. Huang, C. A. Keller, B. M. Giardine, S. Kadauke, A. E. Campbell, P. Evans, R. C. Hardison, and G. A. Blobel. 2015. 'Functions of BET proteins in erythroid gene expression', *Blood*, 125: 2825-34.
- Suraweera, A., K. J. O'Byrne, and D. J. Richard. 2018. 'Combination Therapy With Histone Deacetylase Inhibitors (HDACi) for the Treatment of Cancer: Achieving the Full Therapeutic Potential of HDACi', *Front Oncol*, 8: 92.
- Tamkun, J. W., R. Deuring, M. P. Scott, M. Kissinger, A. M. Pattatucci, T. C. Kaufman, and J. A. Kennison. 1992. 'brahma: a regulator of Drosophila homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2', *Cell*, 68: 561-72.
- Tan, M., H. Luo, S. Lee, F. Jin, J. S. Yang, E. Montellier, T. Buchou, Z. Cheng, S. Rousseaux, N. Rajagopal, Z. Lu, Z. Ye, Q. Zhu, J. Wysocka, Y. Ye, S. Khochbin, B. Ren, and Y. Zhao. 2011. 'Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification', *Cell*, 146: 1016-28.
- Taniguchi, Y. 2016. 'The Bromodomain and Extra-Terminal Domain (BET) Family: Functional Anatomy of BET Paralogous Proteins', *Int J Mol Sci*, 17.
- Thomas, M. L., and P. Marcato. 2018. 'Epigenetic Modifications as Biomarkers of Tumor Development, Therapy Response, and Recurrence across the Cancer Care Continuum', *Cancers (Basel)*, 10.
- Tong, W. G., R. Chen, W. Plunkett, D. Siegel, R. Sinha, R. D. Harvey, A. Z. Badros, L. Popplewell, S. Coutre, J. A. Fox, K. Mahadocon, T. Chen, P. Kegley, U. Hoch, and W. G. Wierda. 2010. 'Phase I and pharmacologic study of SNS-032, a potent and selective Cdk2, 7, and 9 inhibitor, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma', *J Clin Oncol*, 28: 3015-22.

- Verdone, L., M. Caserta, and E. Di Mauro. 2005. 'Role of histone acetylation in the control of gene expression', *Biochem Cell Biol*, 83: 344-53.
- Villar-Garea, A., and M. Esteller. 2004. 'Histone deacetylase inhibitors: understanding a new wave of anticancer agents', *Int J Cancer*, 112: 171-8.
- Wade, P. A., and N. Kikyo. 2002. 'Chromatin remodeling in nuclear cloning', *Eur J Biochem*, 269: 2284-7.
- Wagner, V. P., M. D. Martins, and R. M. Castilho. 2018. 'Histones Acetylation and Cancer Stem Cells (CSCs)', *Methods Mol Biol*, 1692: 179-93.
- Wagner, V. P., M. D. Martins, D. M. Guimaraes, A. C. Vasconcelos, L. Meurer, P. A. Vargas, F. P. Fonseca, C. H. Squarize, and R. M. Castilho. 2017. 'Reduced chromatin acetylation of malignant salivary gland tumors correlates with enhanced proliferation', *J Oral Pathol Med*, 46: 792-97.
- Wagner, V. P., M. D. Martins, M. A. T. Martins, L. O. Almeida, K. A. Warner, J. E. Nor, C. H. Squarize, and R. M. Castilho. 2018. 'Targeting histone deacetylase and NFkappaB signaling as a novel therapy for Mucoepidermoid Carcinomas', *Sci Rep*, 8: 2065.
- Wang, C. Y., and P. Filippakopoulos. 2015. 'Beating the odds: BETs in disease', *Trends Biochem Sci*, 40: 468-79.
- Wang, H., B. Hong, X. Li, K. Deng, H. Li, V. W. Yan Lui, and W. Lin. 2017. 'JQ1 synergizes with the Bcl-2 inhibitor ABT-263 against MYCN-amplified small cell lung cancer', *Oncotarget*, 8: 86312-24.
- Wang, L., X. Wu, P. Huang, Z. Lv, Y. Qi, X. Wei, P. Yang, and F. Zhang. 2016. 'JQ1, a small molecule inhibitor of BRD4, suppresses cell growth and invasion in oral squamous cell carcinoma', *Oncol Rep*, 36: 1989-96.
- Wang, L., X. Wu, R. Wang, C. Yang, Z. Li, C. Wang, F. Zhang, and P. Yang. 2017. 'BRD4 inhibition suppresses cell growth, migration and invasion of salivary adenoid cystic carcinoma', *Biol Res*, 50: 19.
- Warnakulasuriya, S. 2010. 'Living with oral cancer: epidemiology with particular reference to prevalence and life-style changes that influence survival', *Oral Oncol*, 46: 407-10.
- Webber, L. P., V. P. Wagner, M. Curra, P. A. Vargas, L. Meurer, V. C. Carrard, C. H. Squarize, R. M. Castilho, and M. D. Martins. 2017. 'Hypoacetylation of acetyl-histone H3 (H3K9ac) as marker of poor prognosis in oral cancer', *Histopathology*, 71: 278-86.
- Wei, W., and M. T. Lewis. 2015. 'Identifying and targeting tumor-initiating cells in the treatment of breast cancer', *Endocr Relat Cancer*, 22: R135-55.
- Weidner-Glunde, M., M. Ottinger, and T. F. Schulz. 2010. 'WHAT do viruses BET on?', *Front Biosci (Landmark Ed)*, 15: 537-49.
- Weinhold, B. 2006. 'Epigenetics: the science of change', *Environ Health Perspect*, 114: A160-7.
- Welti, J., A. Sharp, W. Yuan, D. I. Dolling, D. Nava Rodrigues, I. Figueiredo, V. Gil, A. Neeb, M. Clarke, G. Seed, M. Crespo, S. Sumanasuriya, J. Ning, E. Knight, J. C. Francis, A. Hughes, W. S. Halsey, A. Paschalis, R. S. Mani, G. V. Raj, S. Plymate, S. Carreira, G. Boysen, A. M. Chinnaiyan, A. Swain, and J. S. de Bono. 2018. 'Targeting bromodomain and extra-terminal (BET) family proteins in castration resistant prostate cancer (CRPC)', *Clin Cancer Res*.
- Wong, T., and D. Wiesenfeld. 2018. 'Oral Cancer', *Aust Dent J*, 63 Suppl 1: S91-S99.
- Wu, T., H. B. Pinto, Y. F. Kamikawa, and M. E. Donohoe. 2015. 'The BET family member BRD4 interacts with OCT4 and regulates pluripotency gene expression', *Stem Cell Reports*, 4: 390-403.



- Wu, X., D. Liu, X. Gao, F. Xie, D. Tao, X. Xiao, L. Wang, G. Jiang, and F. Zeng. 2017. 'Inhibition of BRD4 Suppresses Cell Proliferation and Induces Apoptosis in Renal Cell Carcinoma', *Cell Physiol Biochem*, 41: 1947-56.
- Xu, K., D. Chen, D. Qian, S. Zhang, Y. Zhang, S. Guo, Z. Ma, and S. Wang. 2018. 'AZD5153, a novel BRD4 inhibitor, suppresses human thyroid carcinoma cell growth in vitro and in vivo', *Biochem Biophys Res Commun*, 499: 531-37.
- Yang, Z., J. H. Yik, R. Chen, N. He, M. K. Jang, K. Ozato, and Q. Zhou. 2005. 'Recruitment of P-TEFb for stimulation of transcriptional elongation by the bromodomain protein Brd4', *Mol Cell*, 19: 535-45.
- Ye, W. 2016. 'The Complexity of Translating Anti-angiogenesis Therapy from Basic Science to the Clinic', *Dev Cell*, 37: 114-25.
- You, J., V. Srinivasan, G. V. Denis, W. J. Harrington, Jr., M. E. Ballestas, K. M. Kaye, and P. M. Howley. 2006. 'Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen interacts with bromodomain protein Brd4 on host mitotic chromosomes', *J Virol*, 80: 8909-19.
- Yuan, C., Z. Li, B. Qi, W. Zhang, J. Cheng, and Y. Wang. 2015. 'High expression of the histone demethylase LSD1 associates with cancer cell proliferation and unfavorable prognosis in tongue cancer', *J Oral Pathol Med*, 44: 159-65.
- Yun, M., J. Wu, J. L. Workman, and B. Li. 2011. 'Readers of histone modifications', *Cell Res*, 21: 564-78.
- Zdrojewicz, Z., R. Konieczny, P. Papier, and F. Szten. 2015. 'Brd4 Bromodomains Inhibitors and Other Modern Means of Male Contraception', *Adv Clin Exp Med*, 24: 705-14.
- Zeng, L., and M. M. Zhou. 2002. 'Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain', *FEBS Lett*, 513: 124-8.
- Zhang, Z., M. S. Filho, and J. E. Nor. 2012. 'The biology of head and neck cancer stem cells', *Oral Oncol*, 48: 1-9.
- Zhou, M., K. Huang, K. J. Jung, W. K. Cho, Z. Klase, F. Kashanchi, C. A. Pise-Masison, and J. N. Brady. 2009. 'Bromodomain protein Brd4 regulates human immunodeficiency virus transcription through phosphorylation of CDK9 at threonine 29', *J Virol*, 83: 1036-44.
- Zou, Z., B. Huang, X. Wu, H. Zhang, J. Qi, J. Bradner, S. Nair, and L. F. Chen. 2014. 'Brd4 maintains constitutively active NF-kappaB in cancer cells by binding to acetylated RelA', *Oncogene*, 33: 2395-404.
- Zupkovitz, G., J. Tischler, M. Posch, I. Sadzak, K. Ramsauer, G. Egger, R. Grausenburger, N. Schweifer, S. Chiocca, T. Decker, and C. Seiser. 2006. 'Negative and positive regulation of gene expression by mouse histone deacetylase 1', *Mol Cell Biol*, 26: 7913-28.