CAMILA FRAGATA CHICARO

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA NF-kappaB ANTES E
DEPOIS DO TRATAMENTO COM DEXAMETASONA E OS ÓLEOS DE
COPAÍBA E ANDIROBA EM CULTURA DE CÉLULAS DE
CARCINOMA EPIDERMÓIDE BUCAL**

São Paulo

2009

Camila Fragata Chicaro

**Análise da expressão da proteína NF-kappaB antes e depois do
tratamento com Dexametasona e os óleos de Copaíba e Andiroba
em cultura de células de Carcinoma Epidermóide Bucal**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia da Universidade de São Paulo,
para obter o título de Mestre, pelo programa
de Pós Graduação em Odontologia

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Neves

São Paulo

2009

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

Chicaro, Camila Fragata

Análise da expressão da proteína NF-kappaB antes e depois do tratamento com Dexametasona e os óleos de Copaíba e Andiroba em cultura de células de Carcinoma Epidermóide Bucal / Camila Fragata Chicaro; orientador Adriana Neves. -- São Paulo, 2009.

126p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Patologia Bucal) -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Carcinoma de células escamosas de orofaringe – Antiinflamatórios – Ação antineoplásica 2. Antiinflamatório natural – Ação antineoplásica – Patologia bucal 3. Antiinflamatório sintético – Ação antineoplásica – Patologia bucal

CDD 617.63

BLACK D65

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

São Paulo, ____/____/____

Assinatura:

E-mail:

FOLHA DE APROVAÇÃO

Chicaro CF. Análise da expressão da proteína NF-kappaB antes e depois do tratamento com Dexametasona e os óleos de Copaíba e Andiroba em cultura de células de Carcinoma Epidermóide Bucal [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009

São Paulo, ____/____/____

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À Deus... *por me abençoar com a minha vida. Deu-me uma família que amo e que é base de tudo que sou. Deu-me saúde, capacidade e oportunidade para chegar até aqui. O que mais posso querer... só tenho a agradecer...*

Aos meus pais, Mario e Ana... *Vocês são minha fonte de inspiração, meu amor por vocês é maior que tudo e é eterno. Obrigada por dedicarem cada segundo de suas vidas ao meu crescimento e de minhas irmãs, não só como profissional, mas principalmente como pessoa. Sem vocês não seria quem sou. Se Deus permitisse viver mais uma vez pediria apenas uma coisa, vocês ao meu lado... Amo vocês demais.*

Às minhas irmãs, Marina e Paulinha... *amo muito vocês duas, mesmo me zutando tanto! rs Obrigada por sempre torcerem e acreditarem na minha capacidade, por todo amor, amizade e cumplicidade, que vai além da relação de irmãs. Mesmo cada uma seguindo às suas vidas não nos distanciaremos nunca! Vocês e os nossos pais são a base da minha vida.*

Carlinhos... *meu amor da infância, adolescência e de hoje... Obrigada por todos esses anos, sempre me apoiando e acreditando em tudo que me proponho a fazer. Você é especial e é por isso e por tudo que já passamos que quero construir com você uma família como a minha. Te amo!*

Aos meus queridos avós... *Albino, Matilde, Mario e Adelina (in memorian)... meu eterno amor e admiração pela vida, força, sabedoria e história de cada um de vocês. Onde quer que vocês estejam sei que estão olhando por mim. Vocês são um exemplo de vida a seguir...*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Dr. **Décio dos Santos Pinto Júnior** agradeço pelo acolhimento e amizade desde a graduação até hoje. Especialmente por acreditar em meu trabalho. Lembro-me de uma conversa em que estava entusiasmada mostrando vários esquemas que fiz das vias de sinalizações moleculares do carcinoma epidermóide e o Sr. me incentivou a seguir, demonstrou confiança em meu trabalho e vibrou comigo naquele momento; nunca esquecerei das palavras! Saiba que o admiro muito como pessoa e profissional, por sua inteligência e humor. No caminhar de nossas vidas conhecemos diversas pessoas, mas poucas são aquelas com um brilho especial. Obrigada!

À Prof. Dra. **Adriana Neves** agradeço desde o começo da orientação por toda a preocupação que teve comigo. Obrigada por oferecer subsídios que permitiram a finalização da minha pesquisa, e principalmente por dar um voto de confiança a mim permitindo que continuasse e finalizasse o meu projeto de pesquisa. A Sra., além de uma ótima profissional, é um exemplo de ser humano, por sua delicadeza, respeito, humildade e preocupação perante aos outros. Obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

À Prof. **Dra. Suzana C. O. M. Sousa** por sua disponibilidade. A Sra. é um ser humano especial, é completa... é uma mãezona! Fica aqui minha admiração por você.

Aos Professores da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo Prof. **Dra. Marina Magalhães**, Prof. Dr. **Fábio D. Nunes**, Prof. **Dra. Marília Martins**, Prof. **Dra. Andrea Mantesso** e Prof. **Dra Karen Ortega** agradeço por todos os conhecimentos transmitidos durante esse meu percurso e pelo convívio desde a iniciação científica.

À Profa. **Dra. Ana Carolina T. Capuano** pela parceria na apresentação de trabalhos e por fazer parte dessa minha trajetória, da qualificação até a defesa. Obrigada!

Ao Prof. **Dr. Moacyr Domingos Novelli** agradeço por sua amizade. O Sr. é uma pessoa iluminada, está um degrau acima. Obrigada pelas conversas nos corredores da nossa Faculdade!

À todos os colegas do curso de pós-graduação: **Camila Rodini, Flávia Caló, Couracin, Katiucia, Thaís, Márcia, Tati Libório, Juliana, Fernanda, Fabiana, Arthur, Alexandra, Luciana, Paulo, Alexandre, Vanessa, Karen, Fabiana, Fernanda Amorim, Ronald, Tessa, Maga, Mayra, Erika, Pathi Adachi, Felipe Daltoé, Cristiane, Roberto, Renata Acay, Fernanda Yamamoto, Curry, Marina e Aline.**

Aos colegas e “orientadores” durante a iniciação científica **Sergio Alves e Felipe Salles** agradeço pela imensa ajuda durante minha iniciação nesse mundo da pesquisa. Obrigada pela disponibilidade e amizade! Um agradecimento especial à você Serginho por contribuir

com minha pesquisa, se hoje estou defendendo minha dissertação com os óleos de Copaíba e Andiroba foi porque você me apresentou e disponibilizou amostras deles. Obrigada!

Ao pessoal da cultura **Fernanda Giudice, Fátima, Aluana, Bruno, Felipe Sperandio e Yonara** por toda amizade e torcida para a finalização do meu trabalho. Obrigada Yonara, Fê, Fátima é Alu pela ajuda durante os experimentos! Vocês vão longe!

À **Zilda e Néia** agradeço por sempre estarem disposta a me ajudar. Obrigada pelo carinho e amizade.

Às funcionárias da FOU SP pela amizade e ajuda durante todo o mestrado: **Mirtes, Elisa, Bia, Débora, Nair e Edna.**

Ao **Dr. Rodrigo Foronda** que foi meu professor e hoje é um grande amigo. Obrigada pela amizade e orientação, e, sobretudo por me incentivar a ser uma grande profissional.

Aos meus amigos do colégio, graduação e da vida, em especial: **Eloha, Lilian e Carol Marques**, obrigada por fazerem parte da minha vida, pelos conselhos, segredos, companheirismo e tudo mais! Cada uma seguiu o seu caminho, porém não impediu de continuarmos com a nossa amizade e torcida para o sucesso de cada uma.

À minha **prima Cris** agradeço pela correção da parte gramatical da minha dissertação. Sem contar o carinho e admiração que tenho por ela. Uma grande mulher.

À **Jane Cleide** por todo o carinho e amizade que demonstrou dia a dia durante esses 4 anos que trabalha em casa. Obrigada!

*“Suba o primeiro degrau com fé.
Não é necessário que você veja toda
a escada. Apenas dê o primeiro
passo.”*

(Martin Luther King)

Chicaro CF. Análise da expressão da proteína NF-kappaB antes e depois do tratamento com Dexametasona e os óleos de Copaíba e Andiroba em cultura de células de carcinoma epidermóide bucal [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

RESUMO

O carcinoma epidermóide (CE) representa mais de 90% das neoplasias malignas encontradas na boca. Em casos avançados, quando o controle locoregional já não é possível somente com o tratamento cirúrgico mais a radioterapia, a quimioterapia adjuvante e neoadjuvante torna-se uma importante modalidade de tratamento para aumentar a qualidade de vida e sobrevida desses pacientes. Eventos moleculares que ocorrem durante a carcinogênese assemelham-se àqueles observados no processo da inflamação. Dessa forma, o estudo de substâncias anti-inflamatórias pode ser um importante caminho para o desenvolvimento e aperfeiçoamento de novos agentes quimioterápicos para o câncer. O objetivo deste estudo foi verificar uma possível ação antineoplásica de 2 anti-inflamatórios naturais (óleos de Copaíba e Andiroba) e um sintético (Dexametasona) numa linhagem de carcinoma epidermóide de orofaringe (FaDu), além de verificar se há uma correlação da expressão da proteína NFkB (fator de transcrição de genes envolvidos nos processos de carcinogênese e inflamação) com a inibição da proliferação celular. Para tanto, foram feitas análises quantitativas (curvas de crescimento, curva de viabilidade celular e Western Blot) e qualitativas (imunofluorescência) antes e depois do tratamento celular com os fármacos. O grupo controle foi representado pelas mesmas células (FaDu) cultivadas na ausência dos fármacos pesquisados. Após tratamento foi observado diminuição do crescimento e da viabilidade celular promovida por todos os fármacos, porém com potenciais de ação diferentes. O óleo de Copaíba apresentou uma potente ação inibição da proliferação e indução de apoptose, este último verificado pela positividade do teste Tunel para células apoptóticas. O óleo de Andiroba e Dexametasona promoveram inibição da proliferação dessas células, mas não indução de apoptose, sendo que para o último

fármaco a ação foi dependente da concentração e tempo. Também pôde-se observar uma diminuição da expressão e marcação nuclear do NFkB por western Blot e imunofluorescência, respectivamente, após tratamento com os três anti-inflamatórios. Os óleos de Copaíba e Andiroba e a Dexametasona, anti-inflamatórios naturais e sintético, respectivamente, promoveram ação de inibição da proliferação celular da linhagem FaDu, tendo uma relação com os níveis diminuídos da proteína NFkB que é responsável pela regulação de genes envolvidos nos processos de proliferação e sobrevivência celular.

Palavras-Chave: carcinoma epidermóide, carcinogênese, inflamação, NFkB, Dexametasona, óleo de Copaíba, óleo de Andiroba

Chicaro CF. Analysis of NF-kappaB protein expression before and after treatment with Dexamethasone and oils Copaiba and Andiroba in cell lineage of Oral Squamous Cell Carcinoma [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

ABSTRACT

Squamous cell carcinoma represents more than 90% of oral cavity malignancies. In advanced cases, when locoregional control is not possible using only surgery and radiotherapy adjuvant chemotherapy may play an important role to improve the quality of life and survival of these patients. Molecular events that occur during carcinogenesis are similar to those observed in the inflammatory process. So, the study of anti-inflammatory substances may be an important way for the development of new chemotherapeutic drugs for cancer. The aim of this study was to analyze a possible antitumoral effect of 2 natural anti-inflammatory oils (Copaiba and Andiroba) and a synthetic drug (dexamethasone) in a cell lineage of oropharynx squamous cell carcinoma (FaDu). Moreover, we tried to correlate NFkB protein expression with the inhibition of cell proliferation. Drugs effects were evaluated through quantitative methods (Western Blot method, growth and cell viability curves) and qualitative analyses (Immunofluorescence methods) before and after cell treatment. The control group was represented by the same cells (FaDu) grown in the absence of the drugs studied. After treatment all drugs promoted reduced growth and cell viability but with different potential actions. Copaiba oil showed a potent anti-proliferation action and to be inductor of apoptosis; the latter checked by testing positive for Tunel apoptotic cells. Andiroba oil and Dexamethasone promoted inhibition of cell proliferation, but not induction of apoptosis. The Dexamethasone action was time and dose dependent. There was a decrease expression and nuclear staining of NFkB by Western Blot and Immunofluorescence methods, respectively, after treatment with three anti-inflammatory substances. Oils of Copaiba and Andiroba and the dexamethasone promoted inhibition of cell proliferation FaDu lineage, showing an

association with the level of expression of NFkB, which regulate genes that are involved in proliferation and cell survival.

Keywords: squamous cell carcinoma, carcinogenesis, inflammation, NFkB, Dexamethasone, Copaiba oil, Andiroba oil

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1 - Estímulos que induzem a ativação do NFkB e regulação de genes envolvidos no processo de carcinogênese. A: Ativação do NF-kappaB por agentes inflamatórios, carcinógenos, promotores de tumor, proteínas virais, stress, agentes quimioterápicos e radiação gama. B: A expressão de numerosos genes envolvidos na sobrevivência celular, proliferação, angiogênese, inflamação, invasão e metástase são regulados pela ativação do NF-kappaB (Aggarwall, 2004) 35
- Figura 2.2 - Ativação e translocação do NFkB para o núcleo onde regulará a expressão de genes alvos ligados à proliferação e sobrevivência das células neoplásicas. (Adaptado de BIO CARTA – www.biocarta.com) 36
- Figura 2.3 - Mecanismo de ação de glicocorticóides : G: Glicocorticóide; HSP-90: proteína de choque térmico; GR: receptor de glicocorticóide. A ligação do hormônio ao seu receptor resulta na formação do complexo receptor/glicocorticóide, ocorrendo a dissociação do dímero de HSP-90. Desta forma, o receptor o GR adquire uma afinidade maior pelo DNA, num processo denominado ativação do receptor. No citoplasma os GRs estão em equilíbrio entre as formas monomérica e dimérica. A seguir ocorre a translocação do complexo receptor/G para o núcleo , onde este se ligará a uma sequência específica de DNA, na forma de dímero (Adaptado de Wright, 1992)..... 43
- Figura 5.1 - Análise da indução de apoptose das células de carcinoma epidermóide de orofaringe (FaDu) após tratamento com os óleos de Copaíba 0.5mg/ml e Andiroba 1mg/ml e o anti-inflamatório Dexametasona 10^{-6} M. A-B-C – Copaíba 0.5mg/ml: marcação positiva das células mostrando a ocorrência de apoptose para esse grupo celular. D – Andiroba 1mg/ml e E - Dexametasona 10^{-6} M: Marcação negativa para apoptose. Células visualizadas com filtro especial para imunofluorescência. Marcação nuclear de todas as células com VectaShield com DAPI (Vector Laboratories, Ind. Burlingame, CA). 95
- Figura 5.2 - Níveis totais de NFkB e sua localização na linhagem FaDu antes e depois do tratamento com os óleos de Copaíba 0.5mg/ml e Andiroba 1mg/ml e o anti-inflamatório Dexametasona 10^{-6} M. A-C – Controle: acúmulo nuclear do NFkB. Com o decorrer do tempo há uma diminuição do padrão de marcação nuclear. D – Copaíba 0.5mg/ml: predomínio de marcação citoplasmática após tratamento. E-F – Andiroba 1mg/ml: após tratamento observou-se padrão de marcação citoplasmático em todas as células. G-H – Dexametasona 10^{-6} M: predomínio do padrão citoplasmático após tratamento 98

Figura 5.3 - Expressão da proteína NFkB pelas células da linhagem FaDu, antes e depois do tratamento com os óleo de Copaíba 0.5mg/ml por 3 horas, óleo de Andiroba 1mg/ml por 3 e 24 horas e Dexametasona 10^{-6} M por 24 e 48 horas. Descrição das amostras..... 102

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Estimativas, para o ano 2008, de números de casos novos por câncer, em homens e mulheres, segundo localização primária, sem câncer de pele não melanoma (INCA, 2008)	27
Tabela 4.1 - Western Blot. Concentrações e tempos de tratamento com Copaíba, Andiroba e Dexametasona.....	55
Tabela 4.2 - Western Blot. Gel 10% acrilamida	57
Tabela 4.3 - Imunofluorescência. Concentrações e tempos de tratamento com Copaíba, Andiroba e Dexametasona	59
Tabela 4.4 - Tunel. Concentrações e tempos de tratamento com Copaíba, Andiroba e Dexametasona.....	61
Tabela 4.5 - Solução rTdT Incubation Buffer. Para cada lâminula preparar 18ul de solução. Multiplicar o número de lâminulas pela quantidade de cada componente preparando uma única solução. Nesse experimento havia 5 lâminulas, assim para preparar a solução de rTdT Incubation Buffer procedeu-se da seguinte forma: Equilibration buffer (5x16ul=80ul), Nucleotid Mix (1.8x5=9ul), rTdT enzyme (0.36x5=1.8ul) tendo uma solução com volume final de 90.8ul	62
Tabela 5.1 - Número de células viáveis convertidos em valores de densidade óptica. Dados obtidos antes e depois do tratamento das células de carcinoma epidermóide de orofaringe com o óleo de Copaíba em diferentes concentrações. Teste estatístico de Mann-Whitney (significância com valores de $p<0.05$).....	67
Tabela 5.2 - Número de células viáveis convertidos em valores de densidade óptica. Dados obtidos antes e depois do tratamento das células de carcinoma epidermóide de orofaringe com o óleo de Andiroba em diferentes concentrações. Teste estatístico de Mann-Whitney (significância com valores de $p<0.05$)	70
Tabela 5.3 - Número de células viáveis convertido em valores de densidade óptica. Dados obtidos antes e depois do tratamento das células de carcinoma epidermóide de orofaringe com aplicação única do antiinflamatório Dexametasona em diferentes concentrações. Teste estatístico de Mann-Whitney (significância com valores de $p<0.05$)	73

Tabela 5.4 - Número de células viáveis convertidos em valores de densidade óptica. Dados obtidos antes e depois do tratamento das células de carcinoma epidermóide de orofaringe com aplicação diária do anti-inflamatório Dexametasona, em diferentes concentrações. Teste estatístico de Mann-Whitney (significância com valores de $p < 0.05$)	75
Tabela 5.5 - Número de células $\times 10^4$ antes e depois do tratamento com Copaíba 0.5mg/ml. Análise entre os grupos Controle e Copaíba 0.5mg/ml. Comparação concomitante dos grupos em cada momento (tempo) de observação. <i>Teste de Mann-Whitney</i> (significância quando $p < 0.05$)	78
Tabela 5.6 - Número de células $\times 10^4$ antes e depois do tratamento com Copaíba 0.5mg/ml. Análise concomitante dos quatro momentos de observação (T0, T24, T48 e T72) dentro de cada grupo separadamente. <i>Teste de Friedman</i> (significância quando $p < 0.05$)	79
Tabela 5.7 - Significância entre os momentos. Análise dos pares de momentos de cada grupo separadamente (Controle e Copaíba). <i>Teste dos Postos Sinalizados de Wilcoxon</i> , controlado pelo <i>Método de Bonferroni</i> (significância quando $p < 0.05$).....	80
Tabela 5.8 - Número de células $\times 10^4$ antes e depois do tratamento com Andiroba 1mg/ml e Dexametasona $[10^{-6}]$. Análise dos grupos Controle, Andiroba 1mg/ml, Dexametasona 10^{-6} M e Dexametasona 10^{-6} M. Comparação concomitante dos grupos em cada momento (tempo) de observação. <i>Teste de Kruskal-Wallis</i> (significância quando $p < 0.05$)	82
Tabela 5.9- Comparação dos pares de grupos (Controle, Andiroba e Dexametasona) em cada momento (tempo) de observação. <i>Teste de Mann-Whitney</i> , controlado pelo <i>Método de Bonferroni</i> (significância quando $p < 0.05$)	83
Tabela 5.10 - Número de células $\times 10^4$ antes e depois do tratamento com Andiroba 1mg/ml e Dexametasona $[10^{-6}]$. Análise concomitantemente dos quatro momentos de observação (T0, T24, T48 e T72) dentro de cada grupo separadamente. <i>Teste de Friedman</i> (significância quando $p < 0.05$)	84
Tabela 5.11 - Significância dos grupos. Análise dos pares de momentos de cada grupo separadamente (Controle e Dexametasona). <i>Teste dos Postos Sinalizados de Wilcoxon</i> , controlado pelo <i>Método de Bonferroni</i> (significância quando $p < 0.05$).....	87
Tabela 5.12 - Porcentagem de inibição das células da linhagem FaDu, após tratamento com o anti-inflamatório Dexametasona 10^{-6} M, e os óleos de Andiroba 1mg/ml e Copaíba 0.5mg/ml durante 24, 48 e 72 horas	90

Tabela 5.13 - Imunofluorescência. Concentrações e tempos de tratamento com os óleos de Copaíba e Andiroba e o anti-inflamatório Dexametasona para a realização dos ensaios de imunofluorescência	96
Tabela 5.14 - Concentrações e tempos de tratamento com os óleos de Copaíba e Andiroba e o anti-inflamatório Dexametasona para a realização dos ensaios de Western Blot.....	99
Tabela 5.15 - Western Blot. Dados em pixels da expressão da proteína NFkB pelas células da linhagem FaDu, antes e depois do tratamento com os óleo de Copaíba 0.5mg/ml por 3 horas, óleo de Andiroba 1mg/ml por 3 e 24 horas e Dexametasona 10^{-6} M por 24 e 48 horas. Descrição das amostras.....	102

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 5.1 - Teste de viabilidade celular realizado com o Kit MTS cell Titer (Promega). Curva realizada a partir dos dados obtidos antes e depois do tratamento das células de carcinoma epidermóide de orofaringe (FaDu) durante 24hs, 48hs e 72hs com diferentes concentrações do óleo de Copaíba. O grupo Controle não foi submetido a qualquer tratamento. O grupo Branco Copaíba recebeu a mesma quantidade de diluente (DMSO) dos grupos tratados com o óleo de Copaíba. Não foi possível desenhar as linhas referentes aos desvios-padrão de cada ponto, pois as mesmas confundem-se com facilidade, não permitindo a visualização das curvas de modo adequado 68
- Gráfico 5.2 - Teste de viabilidade celular realizado com o Kit MTS cell Titer (Promega). Curva realizada a partir dos dados obtidos de antes e depois do tratamento das células de carcinoma epidermóide de orofaringe (FaDu) durante 24hs, 48hs e 72hs com diferentes concentrações do óleo de Andiroba. O grupo controle não foi submetido a qualquer tratamento. Não foi possível desenhar as linhas referentes aos desvios-padrão de cada ponto, pois as mesmas confundem-se com facilidade, não permitindo a visualização das curvas de modo adequado 71
- Gráfico 5.3 - Teste de viabilidade celular realizado com o Kit MTS cell Titer (Promega). Curva realizada a partir dos dados obtidos de antes e depois do tratamento das células de carcinoma epidermóide de orofaringe (FaDu), durante 24hs, 48hs e 72hs, com apenas 1 aplicação do anti-inflamatório Dexametasona em diferentes concentrações. O grupo controle não foi submetido a qualquer tratamento. O grupo Branco Dexametasona recebeu a mesma quantidade de diluente (etanol) dos grupos tratados com o óleo Dexametasona. Não foi possível desenhar as linhas referentes aos desvios-padrão de cada ponto, pois as mesmas confundem-se com facilidade, não permitindo a visualização das curvas de modo adequado 74
- Gráfico 5.4 - Teste de viabilidade celular realizado com o Kit MTS cell Titer (Promega). Curva realizada a partir dos dados obtidos antes e depois do tratamento das células de carcinoma epidermóide de orofaringe (FaDu), durante 24hs, 48hs e 72hs, com aplicação diária do anti-inflamatório Dexametasona em diferentes concentrações. O grupo controle não foi submetido a qualquer tratamento. O grupo Branco Dexametasona recebeu a mesma quantidade de diluente (etanol) dos grupos tratados com o óleo Dexametasona. Não foi possível desenhar as linhas referentes aos desvios-padrão de cada ponto, pois as mesmas confundem-se com facilidade, não permitindo a visualização das curvas de modo adequado..... 76

- Gráfico 5.5 - Curva de crescimento celular da linhagem FaDu realizada com ou sem tratamento das células com o óleo de Copaíba 0.5mg/ml. Grupo Controle X Grupo Copaíba 0.5mg/ml. Observar o padrão de crescimento inversamente proporcional, onde há contínuo e progressivo crescimento celular no grupo Controle, enquanto o grupo tratado com Copaíba (0.5mg/ml) mostrou inibição da proliferação e morte celular 81
- Gráfico 5.6 - Curva de crescimento celular da linhagem FaDu realizada antes e depois do tratamento das células com o anti-inflamatório Dexametasona 10^{-6} M e o óleo de Andiroba 1mg/ml durante 24hs, 48hs e 72hs. As células do grupo Controle estavam livres de quaisquer tratamentos em todos os tempos observados. O tratamento com o anti-inflamatório Dexametasona 10^{-6} M foi realizado de duas formas: administração única (grupo Dexametasona 10^{-6} M) no T0 e única, mas diária da substância (grupo Dexametasona A 10^{-6} M – aplicação da substância a cada 24hs). 88
- Gráfico 5.7 - Porcentagem de inibição das células da linhagem FaDu, após tratamento com o óleo de Copaíba 0.5mg/ml durante 24, 48 e 72 horas 91
- Gráfico 5.8 - Porcentagem de inibição das células da linhagem FaDu, após tratamento com óleo de Andiroba 1mg/ml durante 24, 48 e 72 horas 91
- Gráfico 5.9 - Porcentagem de inibição das células da linhagem FaDu, após tratamento com uma aplicação ou aplicações diárias do anti-inflamatório Dexametasona 10^{-6} M durante 24, 48 e 72 horas.... 92

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

APS	Ammonium persulfato / Persulfato de amônia
BSA	Bovine Serum Albumine / Albumina Sérica Bovina
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FaDu	Linhagem de carcinoma epidermóide – sítio orofaringe
mA	milliAmpere
mM	milimolar
PBS	Phosphate Buffered Saline, calcium and magnesium free /Solução tampão fosfato salina, livres de cálcio e magnésio
pH	Cologarítimo de concentração hidrogeniônica de uma solução (potencial hidrogeniônico)
Rpm	Rotações por minuto
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate / Dodecil fosfato de sódio
TEMED	Tetrametiletenodiamino
μ M	Micromolar

SUMÁRIO

p.

1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1 CARCINOMA EPIDERMÓIDE	25
2.1.1 epidemiologia	25
2.1.1.1 incidência	25
2.1.1.2 fatores etiológicos	28
2.1.2 carcinogênese	32
2.2 NF-kB	34
2.3 INFLAMAÇÃO	37
2.4 TRATAMENTO	38
2.5 MEDICAMENTOS	40
2.5.1 Dexametasona	40
2.5.2 Óleos de Copaíba e Andiroba: anti-inflamatórios naturais	44
2.5.2.1 óleo de Copaíba	44
2.5.2.2 óleo de Andiroba	45
2.6 PROGNÓSTICO	46
3 PROPOSIÇÃO ⁴⁸	
4 MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1 CULTIVO CELULAR	49
4.2 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR	51
4.3 CONTAGEM CELULAR	54
4.4 ENSAIO DE WESTERN BLOT	54
4.4.1 extração e quantificação das proteínas	54
4.4.2 western Blot	56
4.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA	59
4.6 ANÁLISE DE CÉLULAS APOPTÓTICAS	61
5 RESULTADOS	64
5.1 CURVA VIABILIDADE	64
5.1.1 Controle X Copaíba	65

5.1.2 Controle X Andiroba	69
5.1.3 Controle X Dexametasona	71
5.2 CURVA DE CRESCIMENTO	77
5.2.1 Controle X Copaíba	77
5.2.2 Controle X Andiroba X Dexametasona.....	81
5.2.2.1 Controle X Andiroba 1mg/ml	84
5.2.2.2 Andiroba X Dexametasona	85
5.2.2.3 Controle X Dexametasona	85
5.3 PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO.....	88
5.3.1 Óleo de Copaíba 0.5mg/ml	89
5.3.2 Óleo de Andiroba 1mg/ml	89
5.3.3 Dexametasona 10^{-6} M	89
5.4 ANÁLISE DE CÉLULAS APOPTÓTICAS.....	92
5.4.1 Copaíba 0.5mg/ml	93
5.4.2 Andiroba 1mg/ml	93
5.4.3 Dexametasona 10^{-6} M	94
5.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA	96
5.5.1 Controle	96
5.5.2 Copaíba 0.5mg/ml	97
5.5.3 Andiroba 1mg/ml	97
5.5.4 Dexametasona 10^{-6} M	97
5.6 ENSAIO DE WESTERN BLOT.....	99
5.6.1 Copaíba 0.5mg/ml	100
5.6.2 Andiroba 1mg/ml	100
5.6.3 Dexametasona 10^{-6} M	100
5.6.4 Controle	101
6 DISCUSSÃO	103
6.1 ÓLEO DE COPAÍBA	105
6.2 ÓLEO DE ANDIROBA.....	108
6.3 DEXAMETASONA	111
7 CONCLUSÃO	114
REFERÊNCIAS.....	115
ANEXOS	124

1 INTRODUÇÃO

O Carcinoma Epidermóide (CE) é o câncer mais comum dos tecidos bucais, representando 95% das neoplasias malignas da boca. A falta de um diagnóstico precoce faz com que muitos casos sejam diagnosticados numa fase avançada, na qual o tamanho do tumor, presença de invasão e metástases contribuem para um pior prognóstico da doença podendo levar o paciente a óbito.

A cirurgia e/ou a radioterapia são, isoladas ou associadas, os métodos terapêuticos aplicáveis ao câncer de boca. Para lesões iniciais, tanto a cirurgia quanto a radioterapia têm mostrado bons resultados. A quimioterapia associada à radioterapia é empregada nos casos mais avançados, quando a cirurgia não é mais possível, sendo o prognóstico, nestes casos, extremamente ruim.

O processo de carcinogênese se dá através de inúmeras vias de sinalizações, ainda não muito bem compreendidas, que são responsáveis pela proliferação, adesão, sobrevivência e invasão das células neoplásicas para os tecidos vizinhos e órgãos distantes. Eventos moleculares que ocorrem no processo de carcinogênese assemelham-se àqueles observados durante o processo de cicatrização de uma ferida, desencadeados por reações inflamatórias e imunológicas. Assim em ambos os processos haverá liberação de diversos mediadores químicos como: fatores de crescimento (p.ex.: TGF- β , PDGF, EGF), citocinas (p.ex.: IL-1, IL-6), fatores de transcrição (p.ex.: NF κ B, GR), proteínas responsáveis pela degradação da matriz extracelular (p.ex.: Metaloproteinases) e progressão do ciclo celular (p. ex.: CD-1), que serão responsáveis pelos eventos de proliferação, diferenciação, quimiotaxia, invasão e metástase.

Diversos estudos estão sendo realizados com substâncias anti-inflamatórias naturais e sintéticas, com o intuito de que tais substâncias possam ter ação em alguma etapa do processo de carcinogênese. Pesquisas com anti-inflamatórios, principalmente aqueles inibidores específicos da ciclooxigenase-2 (COX-2) – enzima responsável pela conversão do ácido aracdônico para a via das prostaglandinas, e glicocorticóides sintéticos, estão sendo feitas para verificar uma possível ação anti-tumoral destes fármacos em diferentes tipos de tumores e de cultura de células neoplásicas, sendo que muitas mostraram resultados promissores. Em menor número, são observados estudos com anti-inflamatórios que agem especificamente na via dos leucotrienos, a qual desempenha um papel importante no processo de inflamação.

O estudo dos mecanismos moleculares envolvidos nas diversas vias de sinalizações, responsáveis pelos processos de inflamação e carcinogênese, pode contribuir para o desenvolvimento e aperfeiçoamento de substâncias destinadas à prevenção e terapia do câncer. O objetivo é a obtenção de fármacos que tenham sua ação em alvos específicos das vias, bloqueando ou diminuindo os processos de proliferação, invasão e metástase das células neoplásicas, de uma forma mais seletiva, minimizando ao máximo os efeitos colaterais indesejáveis da quimioterapia para o paciente e aumentando o poder de cura dessa modalidade de tratamento.

Dessa forma, é de grande importância estudos que verifiquem uma possível ação anti-neoplásica de diferentes substâncias anti-inflamatórias.

Com esse intuito, o objetivo deste trabalho foi verificar em uma linhagem celular, derivada de carcinoma epidermóide de Orofaringe (FaDu), uma possível ação anti-tumoral de três substâncias anti-inflamatórias (Dexametasona e os óleos naturais de Copaíba e Andiroba) e correlacionar essa ação com a diminuição da expressão da

proteína NFkB, a qual sabe-se estar envolvida em diferentes etapas do desenvolvimento do CE, através da regulação de genes alvos envolvidos nos processos de proliferação, sobrevivência, invasão e metástase dessa neoplasia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARCINOMA EPIDERMÓIDE

2.1.1 epidemiologia

2.1.1.1 incidência

O câncer de cabeça e pescoço é representado, em sua maioria, por neoplasias malignas epiteliais, do tipo carcinoma epidermóide (90%), seguidas por outros carcinomas (p.ex: Carcinoma verrucoso), sarcomas e melanomas (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER 2000; VERMOKEN, 2005), que acometem as vias aerodigestivas superiores (DEDIVITIS et al., 2004).

O carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP) é uma complexa doença que surge em diferentes locais, incluindo a cavidade oral, língua, faringe e laringe. Os tumores destes diferentes sítios têm distintas apresentações e desfechos clínicos e são associados com diferentes fatores de risco e características genéticas (YE et al., 2008).

Mais de 500.000 novos casos de CECP ocorrem por ano no mundo inteiro, sendo o sexto câncer mais comum (CHEN et al., 2006; CHOI; MYERS, 2008), tendo uma taxa de sobrevida de 5 anos de 50% (LIPPMAN; SUDBO; HONG, 2005).

Excluindo-se o câncer de pele, o câncer bucal pode ser considerado o mais comum da região de cabeça e pescoço, compreendendo 38% das neoplasias malignas dessa região. Na cavidade oral, 95% das neoplasias malignas encontradas são casos de carcinoma epidermóide (OLIVEIRA; SILVA; ZUCOLOTO, 2006).

Cerca de 40% dos cânceres de cabeça e pescoço ocorrem na cavidade bucal, 25% na laringe, 15% na faringe e o restante em outros sítios como glândulas salivares e tireóide (DOBROSSY, 2005).

No Brasil, a incidência do câncer bucal é considerada uma das mais altas do mundo (DEDIVITIS et al., 2004), estando entre o 5º e 7º tipo de câncer mais comum para o sexo masculino e feminino, respectivamente, segundo às estimativas de câncer para 2008 e 2009, publicadas pelo Instituto Nacional do Câncer. Para o ano de 2008 esperava-se 10.380 novos casos de câncer bucal para os homens e 3.780 para as mulheres, no de total 14.160 casos, representando aproximadamente 3% de todas as neoplasias malignas, segundo localização primária (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2008) (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Estimativas, para o ano 2008, de números de casos novos por câncer, em homens e mulheres, segundo localização primária, sem câncer de pele não melanoma (INCA, 2008)

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa de casos novos		
	Masculino	Feminino	Total
Próstata	49.530	-	49.530
Mama Feminina	-	49.400	49.400
Traquéia, Brônquio e Pulmão	17.810	9.460	27.270
Cólon e Reto	12.490	14.500	26.990
Estômago	14.080	7.720	21.800
Colo do Útero	-	18.680	18.680
Cavidade Oral	10.380	3.780	14.160
Esôfago	7.900	2.650	10.550
Leucemias	5.220	4.320	9.540
Pele Melanoma	2.950	2.970	5.920
Outras Localizações	55.610	62.270	117.880
Subtotal	175.970	175.750	351.720
Pele não Melanoma	55.890	59.120	115.010
Todas as Neoplasias	231.860	234.870	466.730

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

O câncer da cavidade oral e faringe incluem tumores de lábio, língua, gengiva, palato duro e mole, assoalho bucal, glândulas salivares, tonsilas, orofaringe, nasofaringe, hipofaringe e outros sítios menos freqüentes (CANTO; DEVESA, 2002).

Os sítios de origem que apresentam maior incidência e taxa de mortalidade são a língua, seguida pelo assoalho bucal. O CE de língua é significativamente o mais agressivo apresentando rápida invasão local e metástase (YE et al., 2008). Metade dos registros de morte por câncer bucal em São Paulo, no período de 1980 a 1998, referiu-se ao câncer de língua (ANTUNES et al., 2001). Em pacientes que não apresentam o hábito de fumar e naqueles considerados jovens (menos de 45 anos), a língua também é o principal local acometido.

A incidência do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço aumenta com a idade, mais de 95% dos casos ocorrem em pessoas com 40 anos ou mais, sendo que a idade média no momento do diagnóstico é na sexta década de vida (LAM; LOGAN; LUKE, 2006). Estudos epidemiológicos constataram o aumento do desenvolvimento do CE em pacientes com menos de 45 anos, a partir da década de

80. Nesses casos, o comportamento da neoplasia é controvertido, havendo relatos de piores prognósticos em comparação à habitual faixa etária (ATULA et al., 1996; LLEWELYIN; JOHNSON; WARNAKULASURIYA, 2001)

Em relação ao gênero, a incidência é maior no sexo masculino do que no feminino, com uma proporção de aproximadamente 3:1 (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2008). Porém, essa proporção vem diminuindo nos últimos anos, devido ao aumento, entre as mulheres, do consumo de tabaco e álcool (CANTO; DEVESA, 2002).

2.1.1.2 fatores etiológicos

O desenvolvimento de CEB é um processo multifatorial que exige o acúmulo de múltiplas alterações genéticas, influenciado por uma pré-disposição genética e fatores ambientais como uso de tabaco, álcool, inflamação crônica e infecção viral (CHOI; MYERS, 2008). Eventos mutagênicos podem ocorrer em nossas células decorrentes da exposição a agentes químicos, físicos e biológicos, bem como surgir espontaneamente (SCULLY; FIELD; TANZAWA, 2000a).

O fumo e o consumo de álcool são fatores de risco bem estabelecidos na maioria dos casos (NEVILLE et al., 1998; SCULLY; FIELD; TANZAWA, 2000a). Entretanto, uma pequena proporção ocorre em pacientes sem história de tabagismo e etilismo, sugerindo a presença de outros fatores de risco como dieta, radiação ultravioleta, microorganismos imunossupressão e hereditariedade (BAGAN et al., 2008; CANTO; DEVESA, 2002; SCULLY, 2002),. Não há um carcinógeno isolado

claramente definido ou aceito. É provável que mais de um fator seja necessário para desencadear a carcinogênese (NEVILLE et al., 1998).

- Fumo

O tabaco possui um papel bem estabelecido na etiologia do carcinoma epidermóide bucal, sendo responsável tanto pelo processo de iniciação como o de promoção (KARI et al., 1997; PRADO; TAVEIRA, 2003). A nicotina é o maior constituinte do tabaco. As nitrosaminas derivadas da nicotina são sugeridas como participantes da carcinogênese do tabaco. O tabaco chega a aumentar em 5 vezes o risco de desenvolvimento do CEB e, quando está associado ao hábito de consumir álcool, o risco pode aumentar para até 15 vezes (VARGAS et al., 2000).

- Álcool

A relação do álcool com o câncer é bem estabelecida, porém o específico mecanismo para seus efeitos carcinogênicos não é entendido (CANTO; DEVESA, 2002). Ao álcool é atribuído um papel sinérgico, pois ele atuará como agente promotor ou potenciador significativo para outros fatores etiológicos dos CEB, especilmnte o tabaco, na carcinogênese. O exato mecanismo do consumo de álcool como fator etilógico do CEB não é bem estabelecido, pois em geral os indivíduos consomem fumo e álcool simultaneamente (WEE; AGUDA, 2006). Porém alguns mecanismos têm sido propostos: o álcool pode atuar como solvente, facilitando a passagem de carcinógenos, como a nicotina, pela membrana celular; o etanol pode alterar enzimas microssomais envolvidas no metabolismo dos

carcinógenos no fígado; podem ativar substâncias carcinógenas; ou ainda ocasionam uma alteração do metabolismo intracelular das células epiteliais, que pode ser agravado por deficiências nutricionais. Entretanto, o consumo e abuso do álcool, por si só, não tem provado ser capaz de iniciar um câncer oral (WILIANS, 2000).

- Dieta

A deficiência de ferro, especialmente a forma grave e crônica, conhecida como síndrome de Plummer-Vinson ou de Peterson–Kelly, é associada a um risco elevado de CE de esôfago, faringe e de boca (região posterior).

A deficiência de vitamina A produz uma queratinização excessiva da pele e membranas mucosas. Tem-se sugerido que tal vitamina desempenha um papel protetor ou preventivo em relação ao pré-câncer e cânceres orais (NEVILLE et al., 1998).

Existem evidências de que dietas ricas em frutas e vegetais diminuem o risco para os cânceres de cavidade oral e faringe. Uma dieta que inclui frutas frescas e vegetais ricos em betacaroteno, vitamina C e vitamina E tem sido associada com uma diminuição do risco para esses cânceres (CANTO; DEVESA, 2002).

- Hereditariedade

Embora fatores de estilo de vida como fumar, beber e outros desempenhem um papel importante na etiologia do CECP, alguns pacientes parecem suscetíveis devido a uma característica hereditária na sua capacidade ou incapacidade de

metabolizar agentes cancerígenos ou pré-cancerígenos, e/ou uma capacidade diminuída para reparar os danos no DNA devido à exposição aos agentes cancerígenos (SCULLY; FIELD; TANZAWA, 2000a).

- Vírus

Existem substanciais evidências de que o CECIP está relacionado a fatores etiológicos, como uso de tabaco, álcool e a associação desses, conforme acima relatado. Porém, há pacientes que desenvolvem o CE na ausência de exposição a estes fatores e na ausência de uma óbvia pré-disposição a um defeito genético. Agentes microbianos são possivelmente agentes etiológicos e há quase duas décadas atrás, foi achada a primeira evidência de ácido nucleico viral em CEB (SCULLY, 2002).

A etiologia do CEB pode estar envolvida com a presença do Papilomavírus humano (HPV), do vírus do herpes simples (HSV) e do Epstein-Barr vírus (EBV) (BAGAN et al., 2008; CANTO; DEVESA, 2002).

Mais de 100 diferentes genótipos de HPV têm sido isolados. Baseado na sua relação com câncer cervical, alguns tipos de HPV foram divididos em dois grupos, “alto risco” (HR-HPV: 16, 18, 31, 33 e 35), associados com lesões potencialmente malignas ou altamente malignas, e “baixo risco” (LR-HPV: 6, 11, 13 e 32), mais comumente associados à neoplasias benignas (verrugas, condiloma, hiperplasia epitelial focal, papiloma) (CAMPISI et al., 2007).

Com base na alta frequência de HR-HPV em CE de alguns sítios bucais como a orofaringe, a infecção por este vírus pode estar relacionada com o desenvolvimento do CE nesses sítios da boca (CAMPISI et al., 2007).

Apesar de todos esses achados, o preciso papel do HPV em lesões orais pré-malignas e em carcinoma epidermóide bucal ainda está sendo elucidado.

2.1.2 carcinogênese

Carcinogênese é o resultado de uma série de mutações genéticas que culminam no crescimento descontrolado de um clone celular e consequente desenvolvimento de uma lesão maligna altamente monoclonal, com posterior evolução de outras alterações genéticas, desenvolvendo um grau de heterogeneidade do tumor (SCULLY; FIELD; TANZAWA, 2000b). Em decorrência desses eventos, as células neoplásicas adquirem características que lhe proporcionam um crescimento ilimitado, independente dos sinais emitidos pelo hospedeiro (HANAHAHAN; WEINBERG, 2000), sendo elas:

- Angiogênese
- Potencial replicativo sem limites
- Invasão tecidual e metástase
- Insensibilidade a sinais anti-crescimento
- Auto-suficiência em sinais de crescimento
- Evasão à apoptose

O processo de formação do câncer, em geral, ocorre lentamente, sendo necessários muitos anos para que uma célula geneticamente alterada prolifere e dê origem a um tumor visível (Ministério da Saúde, 1996).

As alterações genéticas que culminarão no desenvolvimento da neoplasia podem ser de dois tipos:

- Genes supressores de tumor: Inativação desses genes através de eventos genéticos como mutação, perda da heterozigose, deleção, ou por modificações epigenéticas como uma metilação do DNA ou remodelação da cromatina.
- Oncogenes: ativação desses genes através de sua superexpressão devido à amplificação gênica, aumento da transcrição ou mudanças na estrutura, consequente de mutações (CHOI; MYERS, 2008; PERZ-ODÁÑEZ; BEAUCHEMIN JORDAN, 2006; SCULLY; FIELD; TANZAWA, 2000b; WILLIAMS, 2000).

Essas alterações podem resultar no aumento da produção de fatores de crescimento ou no número de receptores de superfície celular, aumentando a sinalização de mensagens intracelulares e/ou aumento da produção de fatores de transcrição. Em combinação com a perda da atividade de genes supressores de tumor, isso levará a um fenótipo celular capaz de aumentar a proliferação celular, promover perda da coesão celular e a habilidade de invasão para tecidos vizinhos ou metástases à distância (WILLIAMS, 2000).

A habilidade de metabolizar agentes cancerígenos ou pré-cancerígenos, reparar danos no DNA e controlar as sinalizações e o ciclo celular são fundamentais para a homeostasia. O CEB e muitos outros carcinomas podem se desenvolver se estes mecanismos forem alterados (SCULLY; FIELD; TANZAWA, 2000a).

Danos que ocorrem nos genes e cromossomos afetam o processo de regulação celular via transcrição proteica. O acúmulo e a falta do reparo desses danos, ao longo de um período, podem levar ao desenvolvimento do CEC (SCULLY; FIELD; TANZAWA, 2000a).

2.2 NF-kB

O NFkB é um dos maiores fatores de transcrição que regulam a expressão de genes envolvidos no controle da proliferação celular, sobrevivência, adesão, inflamação e outros (SURH et al., 2001).

O NFkB pertence a uma família de fatores de transcrição que inclui 5 genes, são eles (DOLCET et al., 2005):

- NF-kB1 (p50/p105),
- NF-kB2 (p52/p100),
- RelA (p65),
- c-Rel
- Rel B

Esses genes são estruturalmente relacionados. Em suas porções N-terminal, há um domínio homólogo com 300 aminoácidos, o qual é responsável pela ligação com o DNA, dimerização e associação com proteínas inibitórias. Esses cinco genes são capazes de produzir diferentes proteínas que são sintetizadas na sua forma madura e contêm um domínio de transativação que interage com o aparato de transcrição e com as proteínas (JOYCE et al., 2001).

Uma ampla gama de estímulos, incluindo mediadores pró-inflamatórias como IL-1, TNF, ésteres de forbol, fatores de crescimento, lipopolissacarídeos bacterianos, proteínas virais, radiação ionizante, radiação ultravioleta e outros podem induzir a expressão de genes através da ativação do NFkB (CARLSEN et al., 2004) (Figura 2.1).

Figura 2.1 - Estímulos que induzem a ativação do NFκB e regulação de genes envolvidos no processo de carcinogênese. A: Ativação do NF-kappaB por agentes inflamatórios, carcinógenos, promotores de tumor, proteínas virais, stress, agentes quimioterápicos e radiação gama.B: A expressão de numerosos genes envolvidos na sobrevivência celular, proliferação, angiogênese, inflamação, invasão e metástase são regulados pela ativação do NF-kappaB (AGGARWALL, 2004)

No citosol ele é incapaz de regular a transcrição genética, sendo necessária sua ativação e consequente translocação para o núcleo (Figura 2.2). Este controle é realizado pelo inibidor de κB (I-κB), que se liga ao NFκB, e o inativa, mantendo-o no citosol. Para que ocorra sua ativação é necessária a ação da proteína conhecida

como IKK. Esta proteína, ao ser fosforilada (por exemplo: via pAkt, TNF, IL-1), torna-se ativa, sendo então capaz de fosforilar o I-kB, levando-o para ubiquitinação e consequente degradação via proteossomos (SURH et al., 2001). Com a degradação do I-kB, o NFkB encontra-se livre no citoplasma e, desta forma, será translocado para o núcleo onde atuará como fator de transcrição de diferentes genes alvos envolvidos no processo de inflamação e carcinogênese (CHANG et al., 2003).

Figura 2.2 - Ativação e translocação do NFkB para o núcleo onde regulará a expressão de genes alvos ligados à proliferação e sobrevivência das células neoplásicas. (Adaptado de BIOCARTA – www.biocarta.com)

A ativação inapropriada do NFkB está relacionada com a patogênese de algumas doenças como: doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, inflamação crônica e câncer (CARLSEN et al., 2004). Na carcinogênese, o mecanismo de regulação do NFkB pode ser modificado pela alteração de diferentes moléculas,

tornando-o constitutivamente ativo (p.ex.: mutação do I κ B, aumento da atividade proteossomal, aumento da expressão de citocinas inflamatórias), resultando assim, numa transcrição descontrolada de genes sob seu comando, envolvidos na proliferação celular, regulação do ciclo celular, apoptose, invasão e metástase, como por exemplo: CD1, COX-2, Bcl-2, C-myc e MMP-9 (AGGARWALL et al., 2004, DOLCET et al., 2005).

2.3 INFLAMAÇÃO

A inflamação é um complexo processo que ocorre com uma variedade de mecanismos, levando a mudanças no fluxo sanguíneo local e liberação de diversos mediadores químicos como citocinas, fatores de crescimento, fatores de transcrição e outros. Esses mesmos mediadores estão presentes, em maior ou menor quantidade, durante o processo de carcinogênese. Dessa forma, diversas pesquisas têm relacionado ambos os processos (MIGNOGNA et al., 2004; RHODUS et al., 2005; SUN et al., 2006).

O processo inflamatório tem sido apontado como um fator de risco para cânceres humanos, particularmente de pulmão, bexiga, cólon, estômago e mama. Há hipóteses de que a produção de radicais livres, liberação de citocinas, síntese de prostagandina e leucotrienos possam modular o processo carcinogênico (Tamir; Tannenbaum, 1996).

Substâncias que possuem atividade anti-inflamatória estão sendo alvo de pesquisas para o tratamento de câncer. Alguns estudos têm relacionado a presença

de metabólitos do Ácido aracdônico (AA), principalmente aqueles resultantes da via de ação das enzimas cicloxigenase-2 (COX-2) e lipoxigenase-5 (LOX-5), em vários passos do processo de carcinogênese (HOQUE et al., 2005; SUN et al., 2006; YAO et al., 2003).

O estudo das vias de sinalizações e dos mediadores químicos envolvidos no processo inflamatório e na carcinogênese, através da ação de medicamentos anti-inflamatórios, pode ser um importante alvo para a quimioprevenção e terapia do câncer (KUNDO; SURH, 2004).

2.4 TRATAMENTO

O tratamento de CE é convencionalmente uma combinação de cirurgia, radioterapia e quimioterapia (CHEN et al., 1999). A cirurgia e radioterapia são, isolados ou associadamente, os métodos terapêuticos aplicáveis ao CECP que se encontram nos estágios iniciais e intermediários (estádio I-III) (CHOI; MYERS, 2008; GREENE et al., 2002). Para essas lesões, a associação do tratamento quimioterápico adjuvante dependerá do paciente ser considerado de alto risco (múltiplos linfonodos patologicamente positivos e/ou metástases que se estendem além da cápsula dos linfonodos). Quando há linfonodomegalia metastática associada, o esvaziamento cervical é indicado (uni ou bilateral). Tanto a cirurgia quanto a radioterapia apresentam bons resultados e suas indicações dependerão da localização do tumor e das alterações funcionais provocadas pelo tratamento, tendo uma taxa de cura de 80% para os estágios iniciais (INSTITUTO NACIONAL DO

CÂNCER, 2008). Em estágios avançados da doença (estádio IV), abordagens multidisciplinares não cirúrgicas estão sendo adotadas com uma frequência maior para melhorar o controle da doença, prolongar a sobrevivência e manter uma qualidade de vida aceitável para o paciente (CHOI; MYERS, 2008). A quimioterapia associada com a radioterapia são empregadas nesses casos, quando a cirurgia já não é indicada. Nessas condições, ainda não se observa uma melhora das taxas de sobrevida (PEREZ-ORDOÑEZ; BEAUCHEMIN; JORDAN 2006), com cura para apenas 30% dos pacientes (LICITRA; LOCATI; BOSSI, 2004). Apesar do tratamento quimioterápico para CEB não apresentar muitos resultados (LICITRA; LOCATI; BOSSI, 2004), nos últimos tempos cresceu o interesse por essa modalidade, particularmente quando esta é associada à radioterapia. A introdução de novos agentes terapêuticos, como por exemplo, a combinação de três drogas (Fluoracil, Cisplatina e Taxane), teve uma melhora da resposta ao tratamento em mais de 90% dos pacientes, sendo que 50% tiveram remissão total. Contudo, isso levou à maior citotoxicidade. Outro fator que contribuiu foi a melhora do controle locoregional que era o principal problema para o paciente, e também o fato de que os pacientes que respondem bem à quimioterapia, também respondem bem à radioterapia, o que torna a quimioterapia um marcador dos pacientes que podem ser submetidos ao tratamento radioterápico (ADELSTEIN; LEBLANC, 2006; VERMORKEN, 2005). Mesmo que a melhor combinação de tratamento cirúrgico e não cirúrgico seja utilizada, mais de 50% dos pacientes com CECP apresentam recidivas, quer localmente em linfonodos regionais quer em sítios à distância da lesão primária (CHOI; MYERS, 2008).

O significativo progresso que vem ocorrendo, na última década, relacionado à compreensão dos eventos genéticos moleculares do carcinoma epidermóide de

cabeça e pescoço, permite que novos estudos sejam feitos com o objetivo de melhorar ou criar novos procedimentos diagnósticos e terapêuticos para uma melhora do prognóstico do paciente (PEREZ-ORDOÑEZ; BEAUCHEMIN; JORDAN 2006).

2.5 MEDICAMENTOS

O estudo de substâncias com possíveis ações anti-neoplásicas tem o intuito de desenvolver novas drogas, menos tóxicas e mais ativas, com um melhor índice terapêutico, a partir de agentes que atuem em nível celular, interferindo no processo de crescimento e divisão das células neoplásicas. A maioria dos agentes anti-neoplásicos não possuem especificidade, ou seja, não destroem seletiva e exclusivamente as células tumorais. São, por isso, tóxicos para os tecidos. A ênfase maior reside na descoberta de substâncias análogas às já conhecidas, com efeitos tóxicos menos agressivos, sobretudo ao coração, pulmões, rins e sistema nervoso (BRAIN; MISSET; ROUESSE, 1999; TORRES; COURELAS; AFONSO 1999).

2.5.1 Dexametasona

Hormônios estão sendo utilizados como uma classe de quimioterápicos no controle do câncer. Os mais utilizados são os esteroidais, incluindo os

glicocorticóides. Os glicocorticóides (GCs) são hormônios esteroídicos sintetizados pela glândula adrenal e são produzidos a partir do colesterol, capturados na circulação sob forma de lipoproteínas. Os glicocorticóides sintéticos são produzidos a partir do ácido cólico bovino ou de plantas das famílias *Lalaceae* e *Discoriaceae* (ACEROLD, 1976). Dentre os glicocorticóides sintéticos estão: a Prednisona, a Prednisolona, a Triamcinolona e a Dexametasona.

Glicocorticóides, como a Dexametasona, possuem um grande valor no tratamento de desordens inflamatórias como artrite reumatóide, asma, dermatites, doenças autoimunes, como a doença de Crohn e edemas teciduais; também possuem atividade antipirética, ação antiemética durante a quimioterapia e são usados na terapia de indução de apoptose celular em células linfóides malignas (KOFER, 2000; Planey; LITWACK, 2000).

Esta classe de hormônios desempenha um importante papel na regulação do crescimento celular, diferenciação e apoptose (HERR et al., 2007; YANO et al., 2006). Sabe-se que os GCs exercem efeito antiproliferativo em diferentes tecidos, incluindo os de origem epitelial, fibroblástica, e linfóide, através da indução da parada do ciclo celular na fase G1 ou de apoptose (AUSSERLECHENER et al., 2004; LIU et al., 2009; WANG et al., 2006). O mecanismo clássico de ação dos glicocorticóides se baseia na interação destes com proteínas receptoras específicas (GR), que se situam no citoplasma na forma inativa. Estas se encontram associadas com proteínas de choque térmico (HSP-90) até que se liguem ao glicocorticóide. A ligação do hormônio ao seu receptor (GR) resulta na dissociação das HSP-90, exposição de sítios de ligação ao DNA e na sua translocação para o núcleo. Uma vez que se encontre no núcleo, o complexo hormônio-receptor se ligará a uma sequência específica do DNA, ativando ou reprimindo genes-alvos (SU et al., 2004).

A ação desses receptores é dependente do ciclo celular (PESTELL et al., 1999) (Figura 2.3).

Figura 2.3 - Mecanismo de ação de glicocorticóides : G: Glicocorticoide; HSP-90: proteína de choque térmico; GR: receptor de glicocorticoide. A ligação do hormônio ao seu receptor resulta na formação do complexo receptor/glicocorticoide, ocorrendo a dissociação do dímero de HSP-90 . Desta forma, o receptor o GR adquire uma afinidade maior pelo DNA, num processo denominado ativação do receptor. No citoplasma os GRs estão em equilíbrio entre as formas monomérica e dimérica. A seguir ocorre a translocação do complexo receptor/G para o núcleo , onde este se ligará a uma sequência específica de DNA, na forma de dímero (Adaptado de Wright, 1992)

Os GCs desempenham importante papel inibitório no processo inflamatório. Através da inibição da enzima fosfolipase A_2 não há a formação do ácido aracdônico com consequente inibição das vias dos Leucotrienos e Prostaglandinas. Em decorrência desse fato há a diminuição de mediadores inflamatórios, como o TNF e interleucinas (SIQUEIRA JR; DANTAS, 2000).

2.5.2 óleos de Copaíba e Andiroba: anti-inflamatórios naturais.

Segundo Veiga Jr. e Pinto (2005) “ A utilização de plantas com fins medicinais para tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade”. A Organização Mundial de Saúde (1998) define planta medicinal como sendo “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos, ou que sejam precursores de fármacos sintéticos”. Porém, o uso indiscriminado dessas plantas medicinais com pouca ou nenhuma comprovação científica de suas propriedades farmacológicas pode trazer sérios efeitos adversos, advindos da toxicidade dos elementos presentes (VEIGA JR; PINTO, 2005).

Óleos naturais são comumente utilizados pela medicina popular no norte e nordeste do Brasil por apresentarem uma possível ação anti-inflamatória de seus componentes, dentre eles destacam-se os óleos de Copaíba e Andiroba (BRITO et al., 2001a, 2001b; VEIGA JR; PINTO, 2005).

2.5.2.1 óleo de Copaíba

As Copaibeiras são árvores comuns na América Latina, em especial no Sudeste brasileiro e na região Amazônica. Pertencentes ao gênero *Copaífera*, contam com mais de 60 espécies catalogadas. Dessas árvores é exsudado, através do furo realizado no tronco, um óleo resina chamado óleo de copaíba. Estudos realizados

com óleos de Copaíba, obtidos de todo o Brasil, mostraram que esses óleos são misturas de Sesquiterpenos e Diterpenos, porém as concentrações destas substâncias podem variar nas diferentes espécies, resultando numa atividade terapêutica diferenciada entre os óleos (VEIGA JR et al., 2001). Nos óleos de copaíba, poucos constituintes ativos identificados foram testados isoladamente, como o β -bisabolol (anti-inflamatório) e o β -cariofileno (bactericida, antitumoral e anti-inflamatório) (VEIGA JR; PINTO, 2005).

No Brasil o óleo de Copaíba é popularmente utilizado para o tratamento de diversas doenças, devido às suas propriedades anti-inflamatórias, antissépticas, cicatrizantes e bactericidas (BRITO et al, 2001; CAVALCANTI et al., 2006; SOUZA JR; LAMARÃO; DAMOUS, 2000).

Estudos demonstram que Sesquiterpenos e diterpenos, encontrados em diferentes espécies de plantas, agem inibindo substâncias presentes na via dos leucotrienos, bem como substâncias da via da prostaglandina (BERMEJO et al., 2002, SHIN et al., 2005, WUBE et al., 2006).

2.5.2.2 óleo de Andiroba

A Andiroba, conhecida também como andirova, angirova, carapa, purga-de-santo-inácio e outros nomes, pertence à família das meliáceas. O óleo de Andiroba é extraído por prensagem de suas sementes. As principais substâncias biologicamente ativas no óleo de Andiroba, relacionadas com sua ação anti-inflamatória, são os limonóides e triterpenos (TAPPIN, 2008). Além da ação anti-

inflamatória, o óleo de Andiroba é utilizado também no combate às infecções do trato respiratório superior, dermatites, lesões dermatológicas secundárias, úlceras, escoriações, redução de dor, como bactericida e anti-parasita, como relaxante muscular, na redução de febre, prevenção de tumores, prevenção da formação de celulite (uso tópico) e como repelente de insetos (SOUZA JR et al., 1999). .

Diversas pesquisas demonstraram que Triterpenos e Limonóides, substâncias ativas presentes no óleo de Andiroba e em outras plantas, agem inibindo a COX-2, enzima responsável pela conversão do Ácido aracdônico para a via das prostaglandinas, porém o exato mecanismo é desconhecido (DIAS et al., 2000; SHIN et al., 2005).

2.6 PROGNÓSTICO

A formulação do prognóstico é importante tanto para a orientação do paciente como para o planejamento da abordagem terapêutica e é realizado a partir da análise das características de cada caso. Tais características, denominadas fatores de prognóstico, podem estar relacionadas à condição sistêmica dos pacientes (como seu estado de saúde geral e do sistema imunológico), aos achados clínicos da neoplasia (como a localização e o tamanho da lesão) e a achados histológicos (invasão neural) ou moleculares (mutações ou induções) (CARDOSO, 2001).

Chen et al. (2004), em análise retrospectiva de 703 casos de CEB observaram que o estágio do câncer significativamente influencia na mortalidade. A taxa de sobrevida de 5 anos em pacientes tratados foi de 72% naqueles com T1, 38.9% nos

T2, 26.7% nos T3 e 11.8% nos T4. Seis variáveis afetam significativamente a sobrevida: tamanho do tumor, envolvimento de linfonodos cervicais, cirurgia, mascar betel, estadiamento e diferenciação histológica. Após controle inicial bem sucedido da doença, observam-se altas taxas de recorrência local e regional, principalmente nos pacientes diagnosticados com CE em estágio avançado.

O prognóstico será melhor à medida que a intervenção cirúrgica seja feita o mais cedo possível e fatores etiológicos, como fumo e álcool, sejam eliminados (CHEN et al., 2004).

3 PROPOSIÇÃO

Esse estudo propõe-se avaliar:

1. A expressão da proteína NFkB, na linhagem celular FaDu, antes e depois da aplicação dos medicamentos Dexametasona, óleo de Copaíba e óleo de Andiroba.
2. A ação dessas substâncias anti-inflamatórias na inibição da proliferação celular e indução de apoptose, e uma possível correlação com os níveis de expressão do NFkB, o qual sabe-se ser responsável pela regulação de genes envolvidos nesses processos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa pela Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo sob o número 210/08 (Anexo A – adendo).

4.1 Cultivo celular

Para o cultivo celular, foi utilizada uma linhagem celular originada de carcinoma epidermóide de orofaringe denominada FaDu (ATCC). As células foram plaqueadas em frascos de 25 cm² contendo 5ml de DMEM (Sigma Chemical Co., St Louis , MO-USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP, BR) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Sigma) e mantidas em incubadora (Precision Scientific) à temperatura controlada de 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

Todos os procedimentos de cultivos foram realizados em capela de fluxo laminar, seguindo os protocolos para manutenção da esterelidade dos materiais, suplementos e meio de cultura utilizados. O crescimento celular foi monitorado em microscópio invertido de fase (Zeiss – Axiovert 25 – Carl Zeiss, Oberköchen, Alemanha) e o meio de cultura trocado conforme a necessidade de cada linhagem.

Após ocuparem 70% do frasco, o que se denomina subconfluência, as células foram subcultivadas. O meio de cultura do frasco foi removido e separado em tubo

de centrifugação e a monocamada celular lavada uma vez com solução fosfato-alcalina, sem cálcio e magnésio (PBS A), Ph7,2. Em seguida, as células foram separadas com 1 ml de solução de tripsina (Sigma) a 0,25% com EDTA 1mM, durante 5 minutos, a 37°C. A tripsina foi inativada com o soro fetal bovino contido no meio de cultura reservado anteriormente e as células em suspensão transferidas para um tubo de ensaio e centrifugadas a 300g por 5 minutos, à temperatura ambiente. Após aspiração do sobrenadante, o precipitado de células foi ressuspenso em 1 ml de meio de cultura. Alíquotas de suspensão distribuídas em frasco de cultivo de 25 cm², contendo 5ml de meio de cultura e novamente levadas para a estufa, onde cada procedimento deu origem a uma nova passagem de linhagem celular.

Fármacos – origem

1. Os óleos de Andiroba e Copaíba foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Sérgio de Melo Alves Júnior. Os óleos foram extraídos das seguintes espécies de árvores:

- Óleo de Copaíba: *Copaífera reticulata* Ducke
- Óleo de Andiroba: *Carapa guianensis* Aublet

2. Dexametasona: Sigma Chemical Co., St Louis , MO-USA.

4.2 Teste de viabilidade celular

Os experimentos foram realizados em triplicata, numa placa de ELISA (96 poços), com uma densidade celular de 3×10^3 células por poço. Os grupos foram divididos da seguinte forma:

Todos os experimentos foram realizados simultaneamente em 7 grupos:

1. Grupo Controle I: sem aplicação de quaisquer substâncias no meio de cultura, as células foram submetidas ao teste de viabilidade celular após 24hs, 48hs e 72hs da contagem inicial (T0h). Esse grupo foi controle dos grupos controle II e III e do grupo tratado com o óleo de Andiroba.

2. Grupo controle II (Branco Copaíba): com aplicação de DMSO no meio de cultura, na mesma concentração utilizada para a diluição do óleo de Copaíba, no tempo denominado T0h e após 24hs, 48hs e 72hs da administração do medicamento, submetidas ao teste de viabilidade celular. O objetivo foi avaliar a possível citotoxicidade do DMSO, sendo utilizado como controle em relação ao grupo que foi tratado com óleo de Copaíba.

3. Grupo controle III (Branco Dexametasona): com aplicação de etanol no meio de cultura, na mesma concentração utilizada para a diluição da Dexametasona, no tempo denominado T0 e após 24hs, 48hs e 72hs da administração do medicamento, submetidas ao teste de viabilidade celular. O objetivo foi avaliar a possível citotoxicidade do etanol, sendo utilizado como controle em relação aos grupos tratados com Dexametasona.

4. Grupo A (Copaíba): as células foram tratadas com óleo de Copaíba, nas concentrações de 2mg/ml, 1mg/ml, 0,75mg/ml, 0,5mg/ml e 0,25mg/ml, no tempo

denominado T0 e após 24hs, 48hs e 72hs da administração do medicamento, submetidas ao teste de viabilidade celular. O Dimethylsulfoxide (DMSO) foi utilizado como solvente.

5. Grupo B (Andiroba): as células foram tratadas com óleo de Andiroba, nas concentrações de 2mg/ml, 1mg/ml, 0,75mg/ml, 0,5mg/ml e 0,25mg/ml, no tempo denominado T0 e após 24hs, 48hs e 72hs da administração do medicamento, submetidas ao teste de viabilidade celular. O óleo foi diluído previamente em DMEM.

6. Grupo C (Dexametasona): as células foram tratadas com Dexametasona (Sigma), nas concentrações de 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, no tempo denominado T0 e após 24hs, 48hs e 72hs da administração do medicamento, submetidas ao teste de viabilidade celular. O etanol foi utilizado como solvente.

7. Grupo D (Dexametasona A): as células foram tratadas com Dexametasona (Sigma), nas concentrações de 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, no tempo denominado T0, T24hs e T48hs e após 24hs, 48hs e 72hs da primeira administração do medicamento, submetidas ao teste de viabilidade celular. O etanol foi utilizado como solvente.

O teste de viabilidade celular de todos os grupos foi realizado com o MTS Kit Cell Titer96 (Promega, Madison, Wisconsin, USA). Em cada poço foram aplicados 20 µl da solução Cell Titer96, seguindo incubação por 180 minutos em estufa de CO₂ a 37°C. Esta reação é baseada na conversão celular do sal tetrazolium (MTS) incolor, em formazan azul por enzimas desidrogenase presentes em células metabolicamente ativas. Dessa forma, os poços que possuíam mais células viáveis produziram uma maior quantidade do sal formazan, tornando o meio azulado. A leitura da densidade óptica foi então proporcional ao número de células viáveis,

sendo realizadas em um aparelho de ELISA (ELX 800Bio-Tek instruments Inc.) com filtro de 562nm.

Após a realização do teste de viabilidade celular com os grupos celulares Controle e tratados com Dexametasona, Copaíba e Andiroba em diversas concentrações, foram realizados curva de crescimento, teste Tunel, ensaio de Western Blot e imunofluorescência com apenas uma concentração para cada medicamento. Sendo os grupos:

1. Grupo Controle: sem aplicação de quaisquer substâncias estimulantes ou inibidoras do crescimento celular.

2. Grupo Copaíba: as células foram tratadas com o óleo de Copaíba, na concentrações de 0,5mg/ml. O Dimethylsulfoxide (DMSO) foi utilizado como solvente.

5. Grupo Andiroba: as células foram tratadas com óleo de Andiroba, nas concentrações de 1mg/ml. O óleo foi diluído previamente em DMEM.

6. Grupo Dexametasona: as células foram tratadas com Dexametasona (Sigma), na concentração de 10^{-6} M apenas no tempo denominado T0. O etanol foi utilizado como solvene.

7. Grupo Dexametasona A: as células foram tratadas com Dexametasona (Sigma), na concentração de 10^{-6} M no tempo denominado T0, T24hs e T48hs . O etanol foi utilizado como solvente.

4.3 Contagem celular

Após ocuparem 70% do frasco, o que se denomina sub-confluência, as células foram tripsinizadas, como explicado anteriormente, e após rápida centrifugação, foram ressuspensas em 1 ml de meio. A partir desse momento, foi feita contagem prévia do número de células cultivadas em meio DMEM, utilizando-se a câmara de Neubauer.

Nos grupos Dexametasona e Andiroba, foram plaqueadas 25×10^4 células, tendo um grupo controle com o mesmo número de células. No grupo Copaíba, foram plaqueadas 50×10^4 células, com um grupo controle com o mesmo número de células. Após 24h, 48h e 72h da administração do medicamento, foram realizadas novas contagens para a confecção das curvas de crescimento celular, como forma de comparação dos níveis de proliferação celular entre os grupos controles e os grupos tratados. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.4 Ensaio de Western Blot

4.4.1 extração e quantificação das proteínas

Para o ensaio de Western Blot foram utilizados as concentrações e tempos de tratamento especificados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Western Blot. Concentrações e tempos de tratamento com Copaíba, Andiroba e Dexametasona

Medicamento	Concentração	Tempo de tratamento
Copaíba	0,5mg/ml	3hs
Andiroba	1mg/ml	3hs e 24hs
Dexametasona	10 ⁻⁶ M	24hs e 48hs

Quando as placas apresentaram-se em sub-confluência (70% da área cultivável), realizaram-se os tratamentos de cada grupo com as substâncias, concentrações e tempos especificados na Tabela 4.1. Assim, após o tempo especificado acima, removeu-se o meio, as células foram lavadas 2 vezes com PBSA a frio e colocadas sobre o gelo (4°C). Adicionou-se 0,5 ml/placa de tampão RIPA+ (10 mol/L Tris HCl pH 7,5; 1% de desoxicolato de sódio; 1% Triton X-100; 150 mM NaCl; 0,1% SDS, 2µg/ml aprotinina, 2µg/ml pepstatina, 1Mm PMSF) e as células incubadas por 10 minutos a 4°C e sob agitação. As placas foram raspadas e o lisado, então, centrifugado a 15.000 rpm por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi aliquoteado e estocado a -80 °C.

As proteínas foram quantificadas dos lisados, através do método do ácido biocinconinico (BCA Protein Assay Reagent Kit – Pierce), que tem por princípio a reação de peptídeos das amostras com o cobre resultando na redução do mesmo, formando um complexo de peptídeos com o cátion cuproso. Por sua vez, o ácido biocinconinico reage com o cátion cuproso, formando o complexo BCA-Cu⁺, produzindo uma cor púrpura que é lida no espectrofotômetro, no comprimento de onda de 562 nm. Ou seja, quanto mais intensa for a cor púrpura, ocorrerá mais absorção de luz, significando maior quantidade de proteína.

As amostras foram, então, analisadas por Western-Blot.

4.4.2 western blot

A mesma quantidade de proteína total (20 μ g) foi utilizada para os grupos estudados, o que permite posterior análise da porcentagem em que cada proteína de interesse se apresenta nessas proteínas totais. As alíquotas previamente quantificadas foram fervidas por 5 minutos, com tampão de amostra para a denaturação das proteínas (sample buffer), contendo 3% de dodecil sulfato e sódio (SDS), 150 mM tris pH 6,8, 15% de mercaptoetanol, 30% de glicerol e 0,01% de azul de bromofenol.

Em seguida, foi aplicada 20 μ g de proteína por canaleta, as quais foram empilhadas em gel de empilhamento (preparado com 0,15M tris, 40% bis-acrilamida, 10% SDS, 20% persulfato de amônia e TEMED), separadas em gel de poliacrilamida 10% (Tabela 4.2). Em seguida, foi realizado eletroforese a 120V, 100mA, 20W durante 3 horas. Utilizou-se o padrão de peso molecular Kaleidoscope (BioRad, Hercules, Califórnia, USA).

Tabela 4.2 - Western Blot. Gel 10% acrilamida

Substâncias	Gel de separação	Gel de empilhamento
	10% (para 20ml)	5% (para 20ml)
Água Mili Q	16,1 ml	12 ml
Acrilamida/bisacrilamida	13,3 ml	2,66 ml
Separating buffer	10 ml	-
Stacking buffer 4X	-	5 ml
SDS 10%	0,4 ml	0,2 ml
Persulfato de amônia	0,4 ml	0,2 ml
<i>Temed</i>	26,6ul	10ul

A transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose (Amersham) foi realizada por eletro-transferência úmida em aparelho especial (Hoefer miniVE, Amersham), com utilização do tampão de transferência (48 mM Tris-Base; 39 mM Glicina, 20% Metanol; pH 8,3) como recomendado pelo fabricante e utilizada uma voltagem de 100V, 70mA, 30W por 3 horas. Após a transferência, a membrana foi submetida à fase de bloqueio.

O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado utilizando-se 5% de leite em pó desnatado em TBST over night.

Em seguida, o anticorpo NF-kB foi diluído em solução de 5% de leite em pó desnatado em TBST e incubado durante 120 minutos em temperatura ambiente sob agitação. A descrição do anticorpo primário segue abaixo:

- Anticorpo primário para detecção da proteína: NFkB
- Hospedeiro: Rabbit

- Monoclonal
- Concentração: 1:250
- Clones: 51-0500
- Tempo de incubação: 2 horas

Após o período de incubação, foram realizadas 3 lavagens de 10 minutos com TBST para remoção do anticorpo não absorvido, sob agitação e em temperatura ambiente. O anticorpo secundário (conjugado com peroxidase) foi, então, aplicado por 1,5 horas e depois a membrana lavada 5 vezes com TBST por cinco minutos cada.

A revelação da reação foi realizada pelo método colorimétrico, através da utilização do kit Opti 4CN (Bio-Rad). Uma parte do diluente concentrado Opti-4CN foi adicionada a nove partes de água deionizada. Utilizou-se 0,25 ml para cada cm² da membrana. Para cada 10 ml do diluente preparado foram adicionados 0,2 ml de substrato Opti-4CN e colocado sobre a membrana. A membrana foi incubada no substrato por até 30 minutos, depois lavada em água deionizada por 15 minutos. Esta reação produziu uma coloração enegrecida nas bandas positivas para o anticorpo primário de interesse.

Como controle foi utilizado anticorpo para beta-actina (Sigma) gerado em camundongo.

As bandas formadas pelo anticorpo primário de interesse (NFkB) foram escaneadas, assim a expressão da proteína NFkB de cada banda foi convertida em pixels de imagem. Através do programa Image J (software de uso livre), os pixels de cada imagem correspondente às bandas foram quantificados e posteriormente realizou-se uma análise estatística dos valores obtidos.

4.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para o ensaio de imunofluorescência foram utilizados as concentrações e tempos especificados na tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Imunofluorescência. Concentrações e tempos de tratamento com Copaíba, Andiroba e Dexametasona

Medicamento	Concentração	Tempo de tratamento
Copaíba	0,5mg/ml	3hs e 24hs
Andiroba	1mg/ml	3hs e 24hs
Dexametasona	10^{-6} M	24hs e 48hs

As células dos grupos experimentais foram cultivadas sobre lamínulas de vidro estéreis. Para uma melhor visualização e clareza da reação não foi permitida a confluência celular.

No momento da reação, as lamínulas de vidro foram lavadas três vezes com PBS e, em seguida, fixadas com metanol absoluto por 6 minutos a -20° C e, então, lavadas 5 vezes em PBS.

Após a lavagem, as lamínulas seguiram para a fase de bloqueio, onde foram incubadas em solução de PBS 1X+BSA a 1% de forma que a superfície onde foram plaqueadas as células permaneceu imersa por 30 minutos. Após esse período, foram realizadas 4 novas lavagens em PBS.

Os anticorpo primário foi diluído em PBS + BSA a 1% na concentração e tempo de incubação descritos abaixo:

- Anticorpo primário para detecção da proteína: NFkB
- Hospedeiro: Rabbit
- Monoclonal
- Concentração: 1:50
- Clones: 51-0500
- Tempo de incubação: 2 horas
- Empresa: Zymed

Após lavar 5 vezes em PBS, realizou-se a incubação das lamínulas com o anticorpo secundário anti-rabbit conjugado com fluoresceína (Novocastra Laboratories Ltda – UK) na concentração de 1: 50 por 45 minutos, sendo a reação realizada em temperatura ambiente e em câmara escura. As lamínulas foram, então, lavadas 10 vezes em PBS.

Em seguida, as lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro previamente limpas, utilizando-se solução de VectaShield com DAPI (Vector Laboratories, Ind. Burlingame, CA 94010), objetivando a visualização do núcleo das células de forma que mesmo as células negativas possam ser evidenciadas.

As lamínulas foram fixadas com o uso de esmalte incolor e, logo em seguida, analisadas qualitativamente no microscópio de imunofluorescência (Zeiss Axiophot II, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

4.6 ANÁLISE DAS CÉLULAS APOPTÓTICAS

Sistema utilizado: DeadEnd Fluorometric Tunel System - Promega

Esse sistema detecta o DNA fragmentado de células apoptóticas através da incorporação catalítica da fluoresceína-12-dUTP à extremidade final 3'-OH do DNA, utilizando a enzima recombinante Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (rTdT). A fluoresceína-12-dUTP, ligada ao DNA, pode ser visualizada diretamente pelo microscópio de imunofluorescência. A análise ao microscópio mostrará em verde fluorescente as células apoptóticas e em azul fluorescente (DAPI) os núcleos de todas as células (apoptóticas ou não).

Os grupos tratados foram submetidos ao teste Tunel com as concentrações e tempos discriminados na tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Tunel. Concentrações e tempos de tratamento com Copaíba, Andiroba e Dexametasona

Medicamento	Concentração	Tempo de tratamento
Copaíba	0,5mg/ml	3hs e 24hs
Andiroba	1mg/ml	3hs e 24hs
Dexametasona	10 ⁻⁶ M	24hs e 48hs

As células dos grupos experimentais foram cultivadas sobre lamínulas de vidro estéreis. Para uma melhor visualização e clareza da reação não foi permitida a confluência celular. No momento da reação, as lamínulas de vidro foram lavadas três vezes com PBS e, em seguida, fixadas com Paraformaldeído 4% por 25 minutos a 4° C e, então, lavadas 2 vezes em PBS por 5 minutos.

Após a lavagem, as lâminulas foram permeabilizadas com 0,2% Triton X100 por 5 minutos. Seguiu-se, então, com duas lavagens com PBS por 5 minutos. Após a lavagem, incubaram-se as lâminulas com solução Equilibration Buffer (20ul em cada lâminula) por 10 minutos. Após esse período, foi realizada nova incubação com solução rTdT incubation buffer (Tabela 4.5), num volume final de 18ul por lâminula em câmara úmida e protegida da luz.

Tabela 4.5 - Solução rTdT Incubation Buffer. Para cada lâminula preparar 18ul de solução. Multiplicar o número de lâminulas pela quantidade de cada componente preparando uma única solução. Nesse experimento havia 5 lâminulas, assim para preparar a solução de rTdT Incubation Buffer procedeu-se da seguinte forma: Equilibration buffer (5x16ul=80ul), Nucleotid Mix (1.8x5=9ul), rTdT enzyme (0.36x5=1.8ul) tendo uma solução com volume final de 90.8ul

rTdT Incubatio Buffer	Quantidade (Volume final 18ul/lâminula)
Equilibration buffer	16 ul
Nucleotid Mix	1.8ul
rTdT Enzyme	0.36ul

A incubação foi feita a 37°C, por 20 minutos, seguida de uma incubação em temperatura ambiente por 40 minutos. Removeu-se o excesso da solução anterior e iniciou-se a última incubação com solução SCC 2x, por 15 minutos, em temperatura ambiente e protegida de luz. Após esse período, as lâminulas foram lavadas 5 vezes com PBS durante 5 minutos. Em seguida, as lâminulas foram montadas sobre

lâminas de vidro previamente limpas, utilizando-se solução de VectaShield com DAPI (Vector Laboratories, Ind. Burlingame, CA 94010), objetivando a visualização do núcleo das células de forma que mesmo as células negativas pudessem ser evidenciadas.

As lamínulas foram fixadas com o uso de esmalte incolor e, logo em seguida, analisadas no microscópio de imunofluorescência (Zeiss Axiophot II, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

5 RESULTADOS

Todos os experimentos foram feitos utilizando-se a linhagem celular de Carcinoma Epidermóide de Orofaringe FADU, realizando-se o tratamento destas células com o anti-inflamatório Dexametasona e os óleos de Copaíba e Andiroba. O tempo de aplicação e concentração dos medicamentos variaram de acordo com o experimento.

5.1 CURVA DE VIABILIDADE

Para determinar a melhor concentração para a utilização dos medicamentos Copaíba, Andiroba e Dexametasona foram realizadas curvas de viabilidade, onde as células de Carcinoma Epidermóide de Orofaringe (FADU) foram cultivadas com diferentes concentrações de cada substâncias durante 24, 48 e 72 horas de tratamento. Após cada tempo de tratamento, iniciou-se o teste de viabilidade com o Kit MTS cell Titer (Promega). Por fim, os resultados desse teste foram submetidos à análise estatística, utilizando-se o programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences), em sua versão 17.0 com aplicação do *Teste de Mann-Whitney*.

Baseando-se em concentrações pré-estabelecidas por outras pesquisas, estabeleceu-se a variação dos valores para mais e para menos. Abaixo encontram-se os valores das concentrações:

- Óleo de Copaíba: concentrações utilizadas em outras pesquisas que mostraram diminuição da viabilidade celular (0.5mg/ml e 1mg/ml). Concentrações para o experimento: 2mg/ml, 1mg/ml, 0.75mg/ml, 0.5mg/ml e 0.25mg/ml.
- Óleo de Andiroba: concentrações utilizadas em outras pesquisas, as quais mostraram diminuição da viabilidade celular (0.5mg/ml e 1mg/ml). Concentrações para o experimento: 2mg/ml, 1mg/ml, 0.75mg/ml, 0.5mg/ml e 0.25mg/ml.
- Dexametasona: Concentrações utilizadas em outras pesquisas, as quais mostraram uma diminuição da viabilidade celular (10^{-6} M, 10^{-7} M). Concentrações para o experimento: 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M.

O intuito desse experimento foi também verificar a viabilidade celular e não apenas o número de células presentes, quando estas são submetidas ao tratamento com as substância acima, por um período de 24hs, 48hs e 72hs.

5.1.1 Controle X Copaíba

Para esse grupo, observou-se uma expressiva diminuição da quantidade de células viáveis para todas as concentrações utilizadas durante os três tempos de tratamento realizados ($p=0.049$) (Tabela 5.1). Para todas as concentrações, o padrão de curva é bastante similar, em que se nota uma queda brusca nas primeiras 48hs e, a partir desse ponto, observa-se uma tendência à retomada do crescimento

(Gráfico 5.1). Para os valores de concentração de 2mg/ml, 1mg/ml e 0.5 mg/ml, observou-se um potencial de inibição da viabilidade celular, em todos os tempos, bastante similar. Dessa forma, para os outros experimentos (Curva de crescimento, detecção de apoptose, Western Blot e Imunofluorescência), a concentração escolhida para o tratamento das células foi de 0.5mg/ml, concentração esta utilizada em outros estudos e por ser o menor valor encontrado nesse experimento capaz de promover o mesmo efeito que as concentrações maiores também testadas.

Tabela 5.1 - Número de células viáveis convertidos em valores de densidade óptica. Dados obtidos antes e depois do tratamento das células de carcinoma epidermóide de orofaringe com o óleo de Copaíba em diferentes concentrações. Teste estatístico de Mann-Whitney (significância com valores de $p < 0.05$)

T 24hs	N	Média	Significância (p)
Controle	3	1232,33	—
Branco Copaíba	3	1162,00	0,275
Copaíba 2mg/ml	3	486,67	0,049
Copaíba 1mg/ml	3	514,33	0,049
Copaíba 0.75mg/ml	3	522,00	0,049
Copaíba 0.5mg/ml	3	537,00	0,049
Copaíba 0.25mg/ml	3	872,33	0,049
T 48hs	N	Média	Significância (p)
Controle	3	1688,67	—
Branco Copaíba	3	1571,67	0,513
Copaíba 2mg/ml	3	377,00	0,049
Copaíba 1mg/ml	3	447,00	0,049
Copaíba 0.75mg/ml	3	517,33	0,049
Copaíba 0.5mg/ml	3	442,67	0,049
Copaíba 0.25mg/ml	3	600,33	0,049
T 72hs	N	Média	Significância (p)
Controle	3	1924,67	—
Branco Copaíba	3	1879,67	0,827
Copaíba 2mg/ml	3	426,00	0,049
Copaíba 1mg/ml	3	418,00	0,049
Copaíba 0.75mg/ml	3	390,33	0,049
Copaíba 0.5mg/ml	3	411,67	0,049
Copaíba 0.25mg/ml	3	568,00	0,049

Gráfico 5.1 - Teste de viabilidade celular realizado com o Kit MTS cell Titer (Promega). Curva realizada a partir dos dados obtidos antes e depois do tratamento das células de carcinoma epidermóide de orofaringe (FaDu) durante 24hs, 48hs e 72hs com diferentes concentrações do óleo de Copaíba. O grupo controle não foi submetido a qualquer tratamento. O grupo Branco Copaíba recebeu a mesma quantidade de diluente (DMSO) dos grupos tratados com o óleo de Copaíba. Não foi possível desenhar as linhas referentes aos desvios-padrão de cada ponto, pois as mesmas confundem-se com facilidade, não permitindo a visualização das curvas de modo adequado

5.1.2 Controle X Andiroba

Para esse grupo também se observou diminuição da quantidade de células viáveis para todas as concentrações utilizadas durante os três tempos de tratamento realizado ($p=0.049$) (Tabela 5.2). Para tanto, a ação desse medicamento não foi tão potente quanto à promovida pelo óleo de Copaíba.

Para todas as concentrações, o padrão de curva é bastante similar, onde se nota uma queda da viabilidade celular nas primeiras 48hs de tratamento e, a partir desse ponto, observa-se uma tendência à retomada do crescimento (Gráfico 5.2).

Por fim, a concentração de 1mg/ml foi escolhida para a realização dos outros experimentos, pois apresentou ação de inibição da viabilidade celular com valores intermediários comparados com os das outras concentrações.

Tabela 5.2 - Número de células viáveis convertidos em valores de densidade óptica. Dados obtidos antes e depois do tratamento das células de carcinoma epidermóide de orofaringe com o óleo de Andiroba em diferentes concentrações. Teste estatístico de Mann-Whitney (significância com valores de $p < 0.05$)

T 24hs	N	Média	Significância (p)
Controle	3	1232,33	—
Andiroba 2mg/ml	3	987,67	0,127
Andiroba 1mg/ml	3	848,33	0,049
Andiroba 0.75mg/ml	3	926,67	0,049
Andiroba 0.5mg/ml	3	1130,33	0,827
Andiroba 0.25mg/ml	3	1114,33	0,513
T48hs	N	Média	Significância (p)
Controle	3	1688,67	—
Andiroba 2mg/ml	3	622,00	0,049
Andiroba 1mg/ml	3	712,33	0,049
Andiroba 0.75mg/ml	3	589,00	0,049
Andiroba 0.5mg/ml	3	810,33	0,049
Andiroba 0.25mg/ml	3	932,67	0,049
T72hs	N	Média	Significância (p)
Controle	3	1924,67	—
Andiroba 2mg/ml	3	687,67	0,049
Andiroba 1mg/ml	3	840,67	0,049
Andiroba 0.75mg/ml	3	619,67	0,049
Andiroba 0.5mg/ml	3	1117,00	0,049
Andiroba 0.25mg/ml	3	1105,00	0,049

Gráfico 5.2 - Teste de viabilidade celular realizado com o Kit MTS cell Titer (Promega). Curva realizada a partir dos dados obtidos de antes e depois do tratamento das células de carcinoma epidermóide de orofaringe (FaDu) durante 24hs, 48hs e 72hs com diferentes concentrações do óleo de Andiroba. O grupo controle não foi submetido a qualquer tratamento. Não foi possível desenhar as linhas referentes aos desvios-padrão de cada ponto, pois as mesmas confundem-se com facilidade, não permitindo a visualização das curvas de modo adequado

5.1.3 Controle X Dexametasona

Para os grupos celulares tratados com Dexametasona com aplicação única para todos os tempos (grupo Dexametasona) como os com aplicação diária

(Dexametasona A), observou-se que há tanto uma ação de inibição da viabilidade celular quanto de indução de proliferação celular dependendo dos tempos de tratamento e concentrações utilizadas (Gráficos 5.3 e 5.4). Baseando-se nesses valores, pode-se dizer que a ação de inibição da viabilidade celular promovida pela Dexametasona é tempo-concentração-dependente.

A principal ação de inibição da viabilidade celular foi promovida após 48hs de tratamento com Dexametasona em todas as concentrações observadas, porém, no caso do tratamento com Dexametasona com apenas uma única aplicação para todos os tempos, a diminuição da viabilidade celular para o T48hs somente foi significativa para as concentrações: 10^{-7}M , 10^{-6}M e 10^{-8}M ($p < 0.05$) (Tabela 5.3).

Observou-se uma diferença no potencial de ação de inibição da viabilidade celular entre as duas formas de tratamento, principalmente nas concentrações de 10^{-5}M e 10^{-9}M , com melhores resultados observados para a aplicação diária do medicamento (Tabela 5.4).

A concentração escolhida para a realização dos outros experimentos foi a de 10^{-6}M , pois apresentou ação de inibição celular estatisticamente significativa para dois dos três tempos analisados em ambas as formas de aplicação (T 48hs e T 72hs).

O grupo Branco Dexametasona, que apresenta apenas o diluente da Dexametasona, apresentou uma diminuição estatisticamente significativa da viabilidade celular quando comparado com o Controle, entretanto a curva apresentase em ascensão durante todos os tempos de tratamento, apresentando entretanto, valores menores que o do Controle (Gráfico 5.3). Assim, a ação de diminuição da viabilidade celular nesse tratamento pode ter sido somatizada pelo efeito conjunto do diluente e da substância Dexametasona.

Tabela 5.3 - Número de células viáveis convertido em valores de densidade óptica. Dados obtidos antes e depois do tratamento das células de carcinoma epidermóide de orofaringe com aplicação única do antiinflamatório Dexametasona em diferentes concentrações. Teste estatístico de Mann-Whitney (significância com valores de $p < 0.05$)

T 24hs	N	Média	Significância (p)
Controle	3	1232,33	—
Branco Dexametasona	3	1005,00	0,046
Dexametasona 10^{-5} M	3	1584,33	0,049
Dexametasona 10^{-6} M	3	1263,33	0,513
Dexametasona 10^{-7} M	3	1233,00	0,513
Dexametasona 10^{-8} M	3	1438,33	0,827
Dexametasona 10^{-9} M	3	1089,00	0,127
T 48hs	N	Média	Significância (p)
Controle	3	1688,67	—
Branco Dexametasona	3	1325,33	0,049
Dexametasona 10^{-5} M	3	1637,67	0,513
Dexametasona 10^{-6} M	3	1185,00	0,049
Dexametasona 10^{-7} M	3	1079,67	0,049
Dexametasona 10^{-8} M	3	1280,00	0,049
Dexametasona 10^{-9} M	3	1632,33	0,513
T 72hs	N	Média	Significância (p)
Controle	3	1924,67	—
Branco Dexametasona	3	1513,33	0,049
Dexametasona 10^{-5} M	3	1449,67	0,049
Dexametasona 10^{-6} M	3	1366,33	0,049
Dexametasona 10^{-7} M	3	1627,00	0,275
Dexametasona 10^{-8} M	3	1833,33	0,827
Dexametasona 10^{-9} M	3	2105,33	0,513

Gráfico 5.3 - Teste de viabilidade celular realizado com o Kit MTS cell Titer (Promega). Curva realizada a partir dos dados obtidos de antes e depois do tratamento das células de carcinoma epidermóide de orofaringe (FaDu), durante 24hs, 48hs e 72hs, com apenas 1 aplicação do anti-inflamatório Dexametasona em diferentes concentrações. O grupo controle não foi submetido a qualquer tratamento. O grupo Branco Dexametasona recebeu a mesma quantidade de diluente (etanol) dos grupos tratados com o óleo Dexametasona. Não foi possível desenhar as linhas referentes aos desvios-padrão de cada ponto, pois as mesmas confundem-se com facilidade, não permitindo a visualização das curvas de modo adequado

Tabela 5.4 - Número de células viáveis convertidos em valores de densidade óptica. Dados obtidos antes e depois do tratamento das células de carcinoma epidermóide de orofaringe com aplicação diária do anti-inflamatório Dexametasona, em diferentes concentrações. Teste estatístico de Mann-Whitney (significância com valores de $p < 0.05$)

T 24hs	N	Média	Significância (p)
Controle	3	1232,33	—
Dexametasona A 10^{-5} M	3	1482,33	0,049
Dexametasona A 10^{-6} M	3	1210,33	0,827
Dexametasona A 10^{-7} M	3	1357,67	0,049
Dexametasona A 10^{-8} M	3	1302,67	0,127
Dexametasona A 10^{-9} M	3	1094,33	0,275
T48 hs	N	Média	Significância (p)
Controle	3	1688,67	—
Dexametasona A 10^{-5} M	3	1130,67	0,049
Dexametasona A 10^{-6} M	3	810,67	0,049
Dexametasona A 10^{-7} M	3	1204,67	0,049
Dexametasona A 10^{-8} M	3	1081,67	0,049
Dexametasona A 10^{-9} M	3	1210,00	0,049
T 72hs	N	Média	Significância (p)
Controle	3	1924,67	—
Dexametasona A 10^{-5} M	3	1041,67	0,049
Dexametasona A 10^{-6} M	3	967,33	0,049
Dexametasona A 10^{-7} M	3	1222,67	0,049
Dexametasona A 10^{-8} M	3	1429,67	0,049
Dexametasona A 10^{-9} M	3	1336,33	0,049

Gráfico 5.4 - Teste de viabilidade celular realizado com o Kit MTS cell Titer (Promega). Curva realizada a partir dos dados obtidos antes e depois do tratamento das células de carcinoma epidermóide de orofaringe (FADU), durante 24hs, 48hs e 72hs, com aplicação diária do anti-inflamatório Dexametasona em diferentes concentrações. O grupo controle não foi submetido a qualquer tratamento. O grupo Branco Dexametasona recebeu a mesma quantidade de diluente (etanol) dos grupos tratados com o óleo Dexametasona. Não foi possível desenhar as linhas referentes aos desvios-padrão de cada ponto, pois as mesmas confundem-se com facilidade, não permitindo a visualização das curvas de modo adequado

5.2 CURVA DE CRESCIMENTO

Para verificar a ação do anti-inflamatório Dexametasona e dos óleos Copaíba e Andiroba sobre a proliferação celular das células de CE de orofaringe FADU, realizaram-se curvas de crescimento após 24h, 48h e 72h da aplicação dessas substâncias, cada qual com apenas uma concentração. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, utilizando-se o programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences), em sua versão 17.0.

5.2.1 Controle X Copaíba

Com o intuito de verificarmos possíveis diferenças sobre o padrão de crescimento entre os Grupos Controle e o tratado com Copaíba, quando comparados concomitantemente, e em cada momento (tempo) de observação, aplicou-se o teste estatístico de *Mann-Whitney* (Tabela 5.5).

Os resultados demonstraram uma relação inversamente proporcional do padrão de crescimento dos grupos em questão para todos os momentos observados (T24hs, T48hs e T72hs) (Gráfico 5.5). Houve uma clara ação de inibição da proliferação celular promovido pelo óleo de Copaíba na linhagem FADU. Em 24hs, 48hs e 72hs observou-se uma forte diminuição do número de células do grupo tratado com Copaíba 0.5mg/ml, quando comparadas no mesmo momento (tempo)

com o grupo Controle, com $p < 0.05$ para todos os tempos (0.0139, 0.0139 e 0.0132, respectivamente).

Tabela 5.5 - Número de células $\times 10^4$ antes e depois do tratamento com Copaíba 0.5mg/ml. Análise entre os grupos Controle e Copaíba 0.5mg/ml. Comparação concomitante dos grupos em cada momento (tempo) de observação. *Teste de Mann-Whitney* (significância quando $p < 0.05$)

Momento	Grupo	N	Média	Significância (p)
T0	Copaíba 0,5mg/ml	4	53,17	> 0,999
	Controle Copaíba	4	53,17	
	Total	8	53,17	
T24	Copaíba 0,5mg/ml	4	26,17	,0139
	Controle Copaíba	4	69,08	
	Total	8	47,62	
T48	Copaíba 0,5mg/ml	4	21,83	,0139
	Controle Copaíba	4	113,76	
	Total	8	67,80	
T72	Copaíba 0,5mg/ml	4	23,58	,0132
	Controle Copaíba	4	162,03	
	Total	8	92,81	

Com o intuito de observar se a ação do óleo de Copaíba foi apenas de inibição da proliferação celular, ou então de inibição, mas também indução de morte celular, aplicou-se o *Teste de Friedman* (Tabela 5.6), com o objetivo de verificarmos possíveis diferenças entre os 4 momentos de observação (T0, T24hs, T48hs, T72hs), quando comparados concomitantemente, dentro de cada um dos grupos. Assim, observou-se uma diminuição estatisticamente significativa ($p=0.019$) do número de células entre os tempos (T0, T24hs, T48hs e T72hs) dentro do Grupo de células tratadas com Copaíba 0.5mg/ml e um aumento do número de células do Grupo controle ($p=0.007$).

Tabela 5.6 - Número de células $\times 10^4$ antes e depois do tratamento com Copaíba 0.5mg/ml. Análise concomitante dos quatro momentos de observação (T0, T24, T48 e T72) dentro de cada grupo separadamente. *Teste de Friedman* (significância quando $p < 0.05$)

Grupo	Bloco de Momentos	N	Média	Significância (p)
Copaíba 0,5mg/ml	T0	4	53,17	0,019
	T24	4	26,17	
	T48	4	21,83	
	T72	4	23,58	
Controle Copaíba	T0	4	53,17	0,007
	T24	4	69,08	
	T48	4	113,76	
	T72	4	162,03	

Como ocorreram diferenças estatisticamente significantes entre os momentos dentro de cada grupo, aplicou-se o *teste dos Postos Sinalizados de Wilcoxon*, controlado pelo *Método de Bonferroni* para se identificar quais momentos tiveram diferenças entre si, quando comparados par a par (Tabela 5.7). Nota-se que, após o tratamento, para o Grupo tratado com Copaíba 0.5mg/ml nos tempos 24hs, 48hs e 72hs, há uma diminuição contínua do número de células, comparado com as do grupo controle (com $p < 0.05$), mostrando um efeito inibitório da proliferação celular. Em adição, nos tempos 24hs e 48hs há a possibilidade de estar ocorrendo morte celular traduzida pela queda do número de células ($p=0.068$) entre os tempos T0/T24/T48, quando comparadas à quantidade inicial de células no momento T0 dentro do próprio grupo (T24-T0, T48-T0, T48-T0, T72-T0). A partir do T48 até T72, observa-se uma retomada, ainda que pequena (com $p= 0.357$), do crescimento celular (Gráfico 5.5).

Tabela 5.7 - Significância entre os momentos. Análise dos pares de momentos de cada grupo separadamente (Controle e Copaíba). *Teste dos Postos Sinalizados de Wilcoxon*, controlado pelo *Método de Bonferroni* (significância quando $p < 0.05$)

Par de Momentos	Copaíba 0,5mg/ml	Controle Copaíba
T24 - T0	0,068	0,068
T48 - T0	0,068	0,068
T72 - T0	0,068	0,068
T48 - T24	0,068	0,046
T72 - T24	0,144	0,046
T72 - T48	0,357	0,046

Gráfico 5.5 - Curva de crescimento celular da linhagem FaDu realizada com ou sem tratamento das células com o óleo de Copaíba 0.5mg/ml. Grupo Controle X Grupo Copaíba 0.5mg/ml. Observar o padrão de crescimento inversamente proporcional, onde há contínuo e progressivo crescimento celular no grupo Controle, enquanto o grupo tratado com Copaíba (0.5mg/ml) mostrou inibição da proliferação e morte celular

5.2.2 Controle X Andiroba X Dexametasona

Com o intuito de verificarmos possíveis diferenças entre o crescimento celular dos Grupos Controle, Andiroba 1mg/ml, Dexametasona 10^{-6} M e Dexametasona A 10^{-6} M, quando comparados concomitantemente, e em cada momento (tempo) de observação, aplicou-se o teste estatístico de *Kruskal-Wallis* (Tabela 5.8).

Para cada momento observaram-se diferenças estatisticamente significantes (T24 $p=0.036$, T48 $p=0.01$ e T72 $p=0.006$) em relação ao número de células entre os quatro grupos dentro de cada tempo de tratamento. Com um crescimento celular maior observado para o grupo Controle e menor para o grupo tratado com o óleo de

Andiroba 1mg/ml, tendo os grupos da Dexametasona [10^{-6} M] uma posição intermediária, para cada Tempo de tratamento analisado separadamente ($p < 0.05$).

Tabela 5.8 - Número de células $\times 10^4$ antes e depois do tratamento com Andiroba 1mg/ml e Dexametasona [10^{-6}]. Análise dos grupos Controle, Andiroba 1mg/ml, Dexametasona A 10^{-6} M e Dexametasona 10^{-6} M . Comparação concomitante dos grupos em cada momento (tempo) de observação. *Teste de Kruskal-Wallis* (significância quando $p < 0.05$)

Momento	Grupo	N	Média	Significância (p)
T0	Controle	4	29,50	> 0,999
	Andiroba 1mg/ml	4	29,50	
	Dexametasona A 10^{-6} M	4	29,50	
	Dexametasona 10^{-6} M	4	29,50	
	Total	16	29,50	
T24	Controle	4	37,83	0,036
	Andiroba 1mg/ml	4	25,33	
	Dexametasona A 10^{-6} M	4	36,00	
	Dexametasona 10^{-6} M	4	36,00	
	Total	16	33,79	
T48	Controle	4	62,25	0,010
	Andiroba 1mg/ml	4	35,08	
	Dexametasona A 10^{-6} M	4	41,17	
	Dexametasona 10^{-6} M	4	45,67	
	Total	16	46,04	
T72	Controle	4	88,67	0,006
	Andiroba 1mg/ml	4	32,75	
	Dexametasona A 10^{-6} M	4	68,83	
	Dexametasona 10^{-6} M	4	65,17	
	Total	16	63,85	

Como encontramos diferenças estatisticamente significantes entre os quatro grupos, em três dos momentos de observação, aplicou-se o *Teste de Mann-Whitney*, controlado pelo *Método de Bonferroni* para identificarmos, através da comparação em par de grupos, e a cada momento de observação, quais grupos tiveram diferenças estatisticamente significantes relacionadas com o número de células,

comparando o potencial de ação de inibição da proliferação celular entre os grupos (Tabela 5.9).

Tabela 5.9 - Comparação dos pares de grupos (Controle, Andiroba e Dexametasona) em cada momento (tempo) de observação. *Teste de Mann-Whitney*, controlado pelo *Método de Bonferroni* (significância quando $p < 0.05$)

Momento	Par de Grupos					
	Controle Andiroba 1mg/ml	Controle Dexametasona A 10^{-6} M	Controle Dexametasona 10^{-6} M	Andiroba 1mg/ml Dexametasona A 10^{-6} M	Andiroba 1mg/ml Dexametasona 10^{-6} M	Dexametasona A 10^{-6} M Dexametasona 10^{-6} M
T24	0,020	> 0,999	> 0,999	0,020	0,020	> 0,999
T48	0,021	0,021	0,020	0,083	0,042	0,561
T72	0,021	0,043	0,020	0,021	0,020	0,767

Em adição, com o intuito de verificarmos o padrão de crescimento de cada grupo isoladamente, analisando se há ocorrência ou não de diminuição do número de células no decorrer dos tempos de tratamento (T0-T24-T48-T72), aplicou-se o *Teste de Friedman* (Tabela 5.10).

Tabela 5.10 - Número de células $\times 10^4$ antes e depois do tratamento com Andiroba 1mg/ml e Dexametasona $[10^{-6}]$. Análise concomitantemente dos quatro momentos de observação (T0, T24, T48 e T72) dentro de cada grupo separadamente. *Teste de Friedman* (significância quando $p < 0.05$)

Grupo	Bloco de Momentos	N	Média	Significância (p)
Controle	T0	4	29,50	0,007
	T24	4	37,83	
	T48	4	62,25	
	T72	4	88,67	
Andiroba 1mg/ml	T0	4	29,50	0,077
	T24	4	25,33	
	T48	4	35,08	
	T72	4	32,75	
Dexametasona A $10^{-6}M$	T0	4	29,50	0,019
	T24	4	36,00	
	T48	4	41,17	
	T72	4	68,83	
Dexametasona $10^{-6}M$	T0	4	29,50	0,026
	T24	4	36,00	
	T48	4	45,67	
	T72	4	65,17	

5.2.2.1 Controle X Andiroba

Para todos os momentos observados, notou-se uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0.05$) do número de células do grupo Andiroba 1mg/ml em relação ao grupo Controle. Porém essa diferença não mostrou um padrão de crescimento inversamente proporcional com o grupo Controle, como observado no grupo tratado com Copaíba 0.5mg/ml (gráfico 5.4), e sim a ocorrência de um crescimento celular para ambos os grupos, porém com diferenças no potencial desse crescimento. Quando analisado o número de células em cada tempo de tratamento para o grupo Andiroba 1mg/ml, não se notou diferenças estatisticamente significantes entre os

tempos. O número de células se manteve praticamente constante, durante todos os tempos de tratamento, sem exibir proliferação ou morte celular exacerbada por essas células sob efeito do óleo. Assim, pode-se dizer que, para esse grupo, observou-se inibição da proliferação celular, quando comparado com o grupo controle sem indução de morte celular significativa (Gráfico 5.6).

5.2.2.2 Andiroba X Dexametasona

Quando comparados os efeitos de inibição celular, baseados no número de células presentes em cada grupo, promovidos pelo anti-inflamatório Dexametasona 10^{-6}M e o óleo de Andiroba 1mg/ml, observou-se uma ação de inibição da proliferação celular maior para o grupo tratado com o óleo de Andiroba 1mg/ml em todos os tempos de tratamento realizados, com exceção do momento T48 entre Andiroba 1mg/ml e Dexametasona A 10^{-6}M , onde os números mostraram apenas uma tendência de uma ação maior de inibição da proliferação celular realizada com o óleo de Andiroba 1mg/ml ($p=0.083$) (Gráfico 5.6).

5.2.2.3 Controle X Dexametasona

Com o intuito de observarmos diferenças na ação da Dexametasona [10^{-6}M] em relação ao número de vezes de aplicação do medicamento, realizou-se o experimento com as duas formas de aplicação. A curva de crescimento não mostrou

diferenças estatisticamente significante no número de células de ambos os grupos de Dexametasona [10^{-6} M].

Comparando-se o grupo Controle com os grupos que realizaram tratamento com Dexametasona [10^{-6} M] notou-se que, nas primeiras 24 horas, não houve diferenças estatisticamente significantes no número de células para esses grupos ($p>0.999$). A partir de 48 horas de tratamento, observou-se uma diminuição estatisticamente significativa do número de células dos grupos tratados com Dexametasona [10^{-6} M], em relação ao grupo Controle.

Igualmente ao grupo tratado com o óleo de Andiroba 1mg/ml, não observamos uma relação de crescimento celular inversamente proporcional com o grupo Controle, em ambos os grupos houve uma tendência ao crescimento celular, porém a taxa de crescimento dos grupos tratados com Dexametasona [10^{-6} M] foi menor do que a do grupo Controle após 48 horas de tratamento.

Quando comparamos o número de células entre os tempos de tratamento (T0, T24, T48 e T72) para cada grupo isoladamente, notamos que há diferenças estatisticamente significantes entre os tempos. Dessa forma, aplicou-se o *Teste dos Postos Sinalizados de Wilcoxon*, controlado pelo *Método de Bonferroni*, com o intuito de identificarmos em quais tempos ocorreram uma diminuição ou aumento significativo do número de células (Tabela 5.11)

Tabela 5.11 - Significância dos grupos. Análise dos pares de momentos de cada grupo separadamente (Controle e Dexametasona). *Teste dos Postos Sinalizados de Wilcoxon*, controlado pelo *Método de Bonferroni* (significância quando $p < 0.05$)

Par de Momentos	Controle	Dexametasona A 10^{-6} M	Dexametasona 10^{-6} M
T24 – T0	0,068	0,273	0,273
T48 – T0	0,068	0,068	0,068
T72 – T0	0,068	0,068	0,068
T48 – T24	0,068	0,144	0,461
T72 – T24	0,068	0,068	0,066
T72 – T48	0,068	0,068	0,068

Apesar de não estatisticamente significativa, nota-se uma tendência ao crescimento do número de células de ambos os grupos Dexametasona e o grupo Controle, com diferenças na taxa de crescimento entre eles, onde se nota que o grupo Controle apresentou um crescimento maior que os grupos Dexametasona [10^{-6} M] (Gráfico 5.6).

Gráfico 5.6 - Curva de crescimento celular da linhagem FaDu realizada antes e depois do tratamento das células com o anti-inflamatório Dexametasona 10^{-6} M e o óleo de Andiroba 1mg/ml durante 24hs, 48hs e 72hs. As células do grupo Controle estavam livres de quaisquer tratamentos em todos os tempos observados. O tratamento com o anti-inflamatório Dexametasona 10^{-6} M foi realizado de duas formas: administração única (grupo Dexametasona 10^{-6} M) no T0 e única, mas diária da substância (grupo Dexametasona A 10^{-6} M – aplicação da substância a cada 24hs).

5.3 PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO

A partir dos dados da curva de crescimento das células dos grupos Controle e tratados, foram obtidas as porcentagens de inibição da proliferação celular nos três tempos de tratamento.

5.3.1 óleo de Copaíba 0.5mg/ml

No grupo tratado com Copaíba 0.5mg/ml, houve uma inibição da proliferação celular de 62,12% , 80.81% e 85.49%, nos tempos T24hs, T48hs e T72hs, respectivamente (Gráfico 5.7).

5.3.2 óleo de Andiroba 1mg/ml

No grupo tratado com Andiroba 1mg/ml, observou-se inibição da proliferação celular de 33,04%, 43.64% e 63.06%, após 24, 48 e 72 horas, respectivamente, da aplicação do medicamento (Gráfico 5.8).

5.3.3 Dexametasona 10^{-6} M

Para o grupos celulares tratados com Dexametasona 10^{-6} M, a inibição da proliferação celular foi parecida, como já observada na curva de crescimento. No T24 horas, a porcentagem é igual, pois para ambos os grupos, nesse momento, o medicamento só havia sido aplicado uma vez. No T 48hs, nota-se uma maior porcentagem de inibição da proliferação celular realizada pelo tratamento com aplicações diárias de Dexametasona 10^{-6} M, porém o contrário se nota no T 72hs,

onde há uma inversão do potencial de ação (Tabela 5.12). Entretanto, a análise estatística realizada com os dados da curva de crescimento mostrou que essas diferenças não foram estatisticamente significantes ($p.0.05$) (Gráfico 5.9).

Tabela 5.12 - Porcentagem de inibição das células da linhagem FaDu, após tratamento com o anti-inflamatório Dexametasona 10^{-6} M, e os óleos de Andiroba 1mg/ml e Copaíba 0.5mg/ml durante 24, 48 e 72 horas

Grupos	T24	T48	T72
Andiroba 1mg/ml	33,04%	43,64%	63,06%
Dexametasona A 10^{-6} M	4,85%	33,87%	22,37%
Dexametasona 10^{-6} M	4,85%	26,64%	26,50%
Copaíba 0,5mg/ml	62,12%	80,81%	85.49%

Gráfico 5.7 - Porcentagem de inibição das células da linhagem FaDu, após tratamento com o óleo de Copaíba 0.5mg/ml durante 24, 48 e 72 horas

Gráfico 5.8 - Porcentagem de inibição das células da linhagem FaDu, após tratamento com óleo de Andiroba 1mg/ml durante 24, 48 e 72 horas

Gráfico 5.9 - Porcentagem de inibição das células da linhagem FaDu, após tratamento com uma aplicação ou aplicações diárias do anti-inflamatório Dexametasona 10^{-6} M durante 24, 48 e 72 horas

5.4 ANÁLISE DE CÉLULAS APOPTÓTICAS

DeadEnd Fluorometric Tunal System (Promega)

Após tratamento com os três medicamentos, podemos notar uma diminuição do número de células, comparando-se com o Controle. Entre os medicamentos estudados, observamos uma maior diminuição para o grupo tratado com Copaíba 0.5mg/ml, mostrando não somente uma ação de inibição da proliferação celular, mas também de morte celular, pois houve decréscimo expressivo do número de células quando comparado com os valores iniciais (T0), como mostra o padrão decrescente da curva de crescimento, o qual não foi observado para os outros medicamentos.

Em decorrência desse fato, tornou-se importante investigar se esta diminuição dava-se por meio de indução à apoptose ou se o medicamento estava primariamente causando necrose. Para tanto, utilizou-se o sistema Tunel (DeadEnd Fluorometric Tunel System) para a identificação de células apoptóticas e se realizou apenas uma análise qualitativa (Figura 5.1).

5.4.1 Copaíba 0.5mg/ml

Para esse experimento, foi realizado tratamento com o óleo de Copaíba 0.5mg/ml durante 3 e 24 horas. Após cada tempo de tratamento, as células foram submetidas ao ensaio de detecção de células apoptóticas, realizado com o Sistema Tunel (DeadEnd Fluorometric Tunel System – Promega).

Para ambos os tempos de tratamento, observaram-se células com marcação nuclear em verde fluorescente, comprovando a indução à apoptose promovido pelo óleo de Copaíba na concentração de 0.5mg/ml durante 3 e 24 horas de tratamento.

5.4.2 Andiroba 1mg/ml

Para esse experimento, foi realizado tratamento com o óleo de Andiroba 1mg/ml durante 3 e 24 horas. Após cada tempo de tratamento, as células foram submetidas

ao ensaio de detecção de células apoptóticas, realizado com o Sistema TuneL (DeadEnd Fluorometric Tunel System – Promega).

Para ambos os tempos de tratamento, não se observaram células com marcação nuclear em verde fluorescente, mostrando que o óleo de Andiroba não possui, para essa concentração e tempo de tratamento, ação de indução de apoptose das células da linhagem FaDu.

5.4.3 Dexametasona 10^{-6} M

Para esse experimento, foi realizado tratamento com Dexametasona 10^{-6} M durante 24 e 48 horas. Após cada tempo de tratamento, as células foram submetidas ao ensaio de detecção de células apoptóticas, realizado com o Sistema TuneL (DeadEnd Fluorometric Tunel System – Promega).

Para ambos os tempos de tratamento, não se observou células com marcação nuclear em verde fluorescente, mostrando que o anti-inflamatório não possuiu, para essa concentração e tempo de tratamento, ação de indução de apoptose das células da linhagem FaDu.

Figura 5.1 - Análise da indução de apoptose das células de carcinoma epidermóide de orofaringe (FaDu) após tratamento com os óleos de Copaíba 0.5mg/ml e Andiroba 1mg/ml e o antiinflamatório Dexametasona 10^{-6} M. A-D: Grupo Copaíba - marcação positiva das células mostrando apoptose celular após tratamento com o óleo de Copaíba 0.5mg/ml (núcleo verde fluorescente). E: grupo Andiroba, F: grupo Dexametasona - Marcação negativa para apoptose. Células visualizadas com filtro especial para imunofluorescência. Marcação nuclear de todas as células com VectaShield DAPI (Vector Laboratories, Ind. Burlingame, CA)

5.5 ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

O objetivo desse ensaio foi analisar qualitativamente a expressão e o padrão de marcação (nuclear, citoplasmático ou ambos) da proteína NFkB na linhagem celular FaDu. As células foram tratadas com os tempos e concentrações especificados na Tabela 5.13.

Tabela 5.13 – Imunofluorescência. Concentrações e tempos de tratamento com os óleos de Copaíba e Andiroba, e o anti-inflamatório Dexametasona para a realização dos ensaios de imunofluorescência

Medicamento	Concentração	Tempo de tratamento
Copaíba	0,5mg/ml	3hs e 24hs
Andiroba	1mg/ml	3hs e 24hs
Dexametasona	10^{-6} M	24hs e 48hs

5.5.1 Controle

O grupo Controle apresentou células com marcação nuclear e citoplasmática para a proteína NFkB, principalmente com 3hs de cultivo celular. Nos tempos 24 e 48hs, ocorreu uma diminuição da marcação nuclear e manutenção da marcação citoplasmática (Figura 5.2).

5.5.2 Copaíba 0.5mg/ml

As células tratadas com Copaíba 0.5mg/ml apresentaram um padrão de marcação citoplasmática, porém pode-se observar, em algumas células, a presença de marcação nuclear (Figura 5.2).

5.5.3 Andiroba 1mg/ml

Com 3hs de tratamento com Andiroba 1mg/ml, já podemos observar uma perda da marcação nuclear, tendo apenas um padrão de marcação citoplasmática dessas células. Assim, o padrão de marcação nuclear apresentado nas células Controle não está presente quando há tratamento com Andiroba 1mg/ml (Figura 5.2).

5.5.4 Dexametasona 10^{-6} M

O padrão de marcação observado com 24 horas de tratamento é principalmente citoplasmático, porém pode-se observar uma fraca marcação nuclear dessas células. Após 48 hs a marcação nuclear não é observada (Figura 5.2).

Figura 5.2 - Níveis totais de NFκB e sua localização na linhagem FaDu antes e depois do tratamento com os óleos de Copaíba e Andiroba e o antiinflamatório Dexametasona. A-C: Controle - Padrão nuclear e citoplasmático de marcação. Com o decorrer do tempo há uma diminuição do padrão nuclear predominando marcação citoplasmática. D-E: Andiroba - em todos os tempos o padrão de marcação é citoplasmático. F-G: Dexametasona H: Copaíba - predomínio do padrão de marcação citoplasmático.

5.6 ENSAIO DE WESTERN BLOT

Foram realizados ensaios de Western Blot para os grupos Controle, Copaíba, Andiroba e Dexametasona nos tempos e concentrações especificados na Tabela 5.14.

Tabela 5.14 - Concentrações e tempos de tratamento com os óleos de Copaíba e Andiroba e o anti-inflamatório Dexametasona para a realização dos ensaios de Western Blot

Medicamento	Concentração	Tempo de tratamento
Copaíba	0,5mg/ml	3hs e 24hs
Andiroba	1mg/ml	3hs e 24hs
Dexametasona	10^{-6} M	24hs e 48hs

Após cultivo celular de cada grupo nos tempos acima discriminados, foram obtidos os lisados e realizada a quantificação proteica para que as amostras submetidas ao ensaio de Western Blot tivessem a quantidade de 20µg de proteínas totais.

5.6.1 Copaíba 0.5mg/ml

Após três horas de tratamento com Copaíba 0.5mg/ml, já se pôde observar uma diminuição dos níveis de expressão da proteína NFkB em relação ao grupo Controle. Essa diminuição também foi maior do que a observada no grupo celular tratado com Andiroba 1mg/ml durante o mesmo período de tempo (Tabela 5.15 e Figura 5.3).

5.6.2 Andiroba 1mg/ml

Para esse medicamento, também se observou diminuição dos níveis de expressão da proteína NFkB, após 3 e 24 horas de tratamento, quando comparados com o grupo Controle. Quando analisados os níveis de expressão da proteína NFkB, nos dois tempos de tratamento, dentro do grupo Andiroba 1mg/ml, pode-se observar uma tendência a um aumento da expressão com o decorrer do tratamento (Tabela 5.15 e Figura 5.3).

5.6.3 Dexametasona 10^{-6} M

Em 24 horas de tratamento, não observamos diferenças entre a expressão da proteína NFkB pelas células tratadas com Dexametasona e o Controle. Após 48

horas se observa uma diminuição dos níveis da proteína, quando comparados com os níveis de expressão, encontrados após 24 horas de tratamento, mostrando uma ação de inibição da proteína tempo-dependente para esse medicamento. Porém a diminuição nos níveis da proteína NfKB, após 48 horas de tratamento, não foi suficiente para promover uma parada do crescimento celular, com inversão da curva de crescimento para uma trajetória descendente, como observado no padrão de curva do grupo Copaíba 0.5mg/ml. O crescimento celular do grupo Dexametasona, apesar de menor, quando comparado com o grupo Controle, apresenta-se em ascendência ao longo do tempo (Tabela 5.15 e Figura 5.3).

5.6.4 Controle

No grupo Controle, diferentemente do esperado, após 48 horas, observou-se diminuição dos níveis da proteína NFkB. Esse fato pode ser decorrente da inibição por contato da proliferação celular, quando se tem a confluência dessas células durante o cultivo celular in vitro (Tabela 5.15 e Figura 5.3).

Tabela 5.15 - Western Blot. Dados em pixels da expressão da proteína NFkB pelas células da linhagem FaDu, antes e depois do tratamento com os óleo de Copaiba 0.5mg/ml por 3 horas, óleo de Andiroba 1mg/ml por 3 e 24 horas e Dexametasona 10^{-6} M por 24 e 48 horas. Descrição das amostras

Grupo	T3	T24	T48
Controle	22126,92	23327,93	21971,51
Copaiba 1mg/ml	19801,61	—	—
Andiroba 1mg/ml	20110,17	22791,86	—
Dexametasona A 10^{-6} M	—	23010,45	20793,22

Figura 5.3 - Expressão da proteína NFkB pelas células da linhagem FaDu, antes e depois do tratamento com os óleo de Copaiba 0.5mg/ml por 3 horas, óleo de Andiroba 1mg/ml por 3 e 24 horas e Dexametasona 10^{-6} M por 24 e 48 horas. Descrição das amostras

6 DISCUSSÃO

O carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP) é uma complexa doença que surge em diferentes locais, incluindo a cavidade oral, língua, faringe e laringe (YE et al., 2008). A falta de um diagnóstico precoce resulta numa porcentagem elevada de casos de CECP em estágios avançados, em que o tamanho do tumor, localização próximo a estruturas vitais, presença de invasão e metástases contribuem para o insucesso do tratamento convencional com cirurgia e/ou radioterapia, tendo como consequência um pior prognóstico com índices de sobrevida menores que 5 anos para os pacientes. Chen et al. (2004), em análise retrospectiva de 703 casos de CEB, observaram que o estágio do câncer significativamente influencia na mortalidade. A taxa de sobrevida de 5 anos em pacientes tratados foi de 72% naqueles com T1, 38.9% nos T2, 26.7% nos T3 e 11.8% nos T4.

Em casos avançados, quando o controle locoregional já não é possível somente com o tratamento cirúrgico mais a radioterapia, a quimioterapia adjuvante e neoadjuvante tornam-se importantes modalidades de tratamento para aumentar a qualidade de vida e sobrevida desses pacientes (PEREZ-ORDOÑEZ; BEAUCHEMIN; JORDAN, 2006).

Eventos moleculares que ocorrem durante a carcinogênese assemelham-se àqueles observados no processo da inflamação. Em ambos, há a liberação de diversos mediadores químicos como: fatores de crescimento (p.ex.: TGF-B, PDGF, EGF), citocinas (p.ex.: IL-1, IL-6), enzimas proteolíticas (p.ex.: Metaloproteinase 2 e 9), proteínas responsáveis pela progressão do ciclo celular (p. ex.: CD-1), fatores de transcrição (p.ex.: NFkB, GR) e outros (HOQUE et al., 2005; KUNDU; SURH, 2004;

SUN et al., 2006; TAMIR; TANNENBAUM, 1996; YAO et al., 2003;). Durante esses processos, numerosas cascatas de sinalização intracelular são desencadeadas pela ativação (normal ou anormal) do fator de transcrição NFkB que age independentemente ou conjuntamente na regulação da expressão de genes alvos envolvidos nos processos de proliferação, invasão e sobrevivência celular (KUNDU; SURH, 2004).

Dessa forma, o estudo de substâncias anti-inflamatórias pode ser um importante caminho para o desenvolvimento de novos fármacos com ação antineoplásica, com objetivo destes agirem em alvos específicos das vias, bloqueando ou diminuindo os processos de proliferação, invasão e metástase de uma forma mais seletiva, diminuindo, assim, os efeitos colaterais indesejáveis da quimioterapia para o paciente e aumentando o poder de cura dessa modalidade de tratamento.

Com esse intuito, o presente trabalho verificou uma possível ação antitumoral do anti-inflamatório Dexametasona e dos óleos de Copaíba e Andiroba numa linhagem celular de carcinoma epidermóide de orofaringe, denominada FaDu. Esse estudo também realizou uma correlação da atividade antitumoral desses medicamentos com os níveis de expressão da proteína NFkB, baseando-se nos seguintes fatores:

- Vários carcinógenos e promotores de tumor agem pela ativação do NFkB (p. ex.: cigarro, mediadores inflamatórios, lipopolissacarídeos bacterianos e outros);
- A expressão constitutiva do NFkB é frequentemente encontrada em células neoplásicas;
- A ativação do NFkB induz à resistência das células neoplásicas a agentes quimioterápicos e radiação;
- Vários genes envolvidos na iniciação, promoção e metástase das células são regulados pelo NFkB;

- A ativação do NFkB suprime a apoptose e promove a proliferação (AGGARWALL, 2004; SANDUR et al., 2006).

A fim de determinar a melhor concentração para o tratamento com os óleos de Copaíba e Andiroba e o anti-inflamatório Dexametasona, foram realizadas curvas de viabilidade em que as células de carcinoma epidermóide de orofaringe (FaDu) foram cultivadas com diferentes concentrações durante 24, 48 e 72 horas de tratamento. Em todas as concentrações testadas para os óleos de Copaíba e Andiroba, observou-se ação de inibição da viabilidade celular para todos os tempos de tratamento. Diferentemente, o anti-inflamatório Dexametasona promoveu uma ação dependente da concentração e tempo, com inibição das células viáveis encontrados somente após 48hs de tratamento e com as concentrações de 10^{-8} M, 10^{-7} M e 10^{-6} M. A inibição promovida pelo óleo de Copaíba foi mais exacerbada que a ação observada nos grupos tratados com Andiroba e Dexametasona, sendo que a última apresentou a menor ação. Lima et al. (2003), analisando a atividade antitumoral do óleo de Copaíba numa concentração de 1mg/ml e 0.5mg/ml em células de melanoma, observaram uma diminuição de 49.4% e 30.9% da viabilidade dessas células, respectivamente, em apenas 3 horas de tratamento.

6.1 ÓLEO DE COPAÍBA

Os resultados da curva de crescimento corroboram com aqueles encontrados na curva de viabilidade. No grupo tratado com Copaíba, a 0.5mg/ml, após 24hs, 48hs e 72 horas de tratamento, ocorreu uma inibição do crescimento celular de 62,12%,

80.81% e 85.49%, respectivamente. Esse resultado foi decorrente de uma ação de inibição da proliferação celular promovida pelo óleo, fato observado pela diminuição das células, quando comparadas com o grupo Controle ($p < 0.05$ para todos os tempos). Em adição, nos tempos 24hs e 48hs, observou-se morte celular traduzida pela queda do número de células ($p = 0.068$), entre os tempos T0/T24/T48, quando comparadas à quantidade inicial de células no momento T0 dentro do grupo tratado com Copaíba. Esse fato foi confirmado pelo teste Tunel (DeadEnd Fluorometric Tunel System – Promega), que detectou a presença de células apoptóticas em apenas 3 horas de tratamento com o óleo de Copaíba. Lima et al. (2003) demonstraram que, em tumor induzido por células de melanoma, em ratos, houve uma redução de 58% do crescimento tumoral e de 76% do peso tumoral após tratamento com o óleo de Copaíba. Com a mesma dose, também foi observada a redução do número de nódulos pulmonares de 47.1%, demonstrando, assim, uma atividade antitumoral do óleo. No Brasil, o óleo de Copaíba é popularmente utilizado para o tratamento de diversas doenças, devido às suas propriedades anti-inflamatórias, antissépticas, cicatrizantes e bactericidas (BRITO et al., 2001; CAVALCANTI et al., 2006; SOUZA JR; LAMARÃO; DAMOUS, 2000). Como anti-inflamatório, é utilizado no tratamento de bronquites, úlceras e cânceres. Estudos demonstraram que este óleo é uma mistura de Sesquiterpenos e Diterpenos. Poucos constituintes ativos identificados foram testados isoladamente, como o β -bisabolol (anti-inflamatório) e o β -cariofileno (bactericida, antitumoral e anti-inflamatório) (VEIGA JR; PINTO, 2005). Em adição, diversos estudos demonstram que a atividade anti-inflamatória de Sesquiterpenos e diterpenos, encontrados em diferentes espécies de plantas, é decorrente, dentre outras, da inibição de substâncias presentes na via dos leucotrienos, bem como substâncias da via da

prostaglandina (BERMEJO et al., 2002; SHIN et al., 2005; WUBE et al., 2006). Relacionando os fatos com o processo de carcinogênese, alguns estudos demonstraram a presença de metabólitos do Ácido aracdônico (AA), principalmente aqueles resultantes da via de ação das enzimas cicloxigenase-2 (COX-2) e lipoxigenase-5 (LOX-5), em vários passos do processo de carcinogênese (HOQUE et al., 2005; SUN et al., 2006 ; YAO et al., 2003). Pesquisas in vivo e in vitro mostraram que produtos do metabolismo do ácido aracdônico podem regular a taxa de proliferação e diferenciação de alguns tipos celulares. Os leucotrienos cisteínicos são metabólitos resultantes da ação da enzima LOX-5 sobre o ácido aracdônico e são capazes de induzir à produção de interleucina-1 (IL-1) e outras citocinas inflamatórias (HOQUE et al., 2005). Muitos desses agentes inflamatórios promovem sua ação com a ativação do NFkB, o qual regulará a expressão de genes envolvidos na proliferação e sobrevivência celular (AGGARWAL, 2004). Uma grande frente de estudos sobre os efeitos de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), principalmente os inibidores específicos da COX-2, observou a diminuição da proliferação celular em diferentes linhagens celulares neoplásicas (ALVES JR, 2006; SHISHODIA; KOUL; AGGARWAL, 2004), porém o mecanismo exato ainda não foi totalmente elucidado. Em menor número, há pesquisas com anti-inflamatórios que agem na via dos leucotrienos, considerada desempenhar um grande papel no processo inflamatório (CHEN et al., 2004; RIOUX; CASTONGUAY, 1998).

Substâncias anti-inflamatórias que agem inibindo esses agentes inflamatórios, inibirão a ação do NFkB ativado, diminuindo os eventos da carcinogênese, regulados por ele. Nesse estudo, observou-se que, após tratamento com o óleo de Copaíba a 0.5mg/ml, ocorreu uma diminuição da expressão da proteína NFkB. O padrão de marcação observado nas células antes do tratamento era nuclear. Com a

realização do tratamento, o NFkB passou a se apresentar em maior quantidade no citoplasma celular, porém algumas células ainda exibiam marcação nuclear. O padrão de marcação citoplasmático, observado após tratamento com o óleo, está de acordo com os relatos da literatura sobre a ativação e inativação do NFkB. No citosol, o NFkB é incapaz de exercer a transcrição gênica, sendo necessária sua ativação e translocação para o núcleo (AGGARWAL, 2004; CHANG et al., 2003; SURH et al., 2001;).

Hipótese do mecanismo de ação do óleo Copaíba: A inibição da proliferação e indução de apoptose pode ter ocorrido através da ação anti-inflamatória sobre mediadores da inflamação que ativam o NFkB, que, no caso da Copaíba, pode ter ocorrido com a interrupção da via da inflamação dos leucotrienos, já que diversos estudos mostraram ação dos Sesquiterpenos e Diterpenos (substâncias ativas do óleo de Copaíba) na inibição dessa via. Estudos com substâncias inibidoras específicas da via dos leucotrienos, como o Zileuton, podem analisar com maiores detalhes se a participação dessa via tem grande valor na carcinogênese do CE.

6.2 ÓLEO DE ANDIROBA

O óleo de Andiroba tem sido utilizado por populações indígenas da Floresta Amazônica para tratamento de tosse, convulsão, doenças de pele, artrite, reumatismo, infecções do ouvido, inflamações da garganta, cicatrização de feridas, repelente de insetos e câncer (COSTA-SILVA et al., 2008; SOUZA JR et al., 2000; VEIGA JR et al., 2001). Sabe-se que as principais substâncias biologicamente ativas relacionadas com sua ação anti-inflamatória são os limonóides e triterpenos

(TAPPIN, 2008). O presente estudo analisou a ação desse óleo sobre o crescimento celular de células de Carcinoma Epidermóide de orofaringe. Após tratamento realizado durante 24hs, 48hs e 72hs, numa concentração de 1mg/ml, notou-se uma diminuição das células quando comparados com o grupo Controle ($p < 0.05$). A porcentagem de inibição celular foi de 33,04%, 43.64% e 63.06%, após 24, 48 e 72 horas, respectivamente, à aplicação. Isso leva a crer que ocorreu uma diminuição da proliferação celular. Diferentemente do encontrado no tratamento com óleo de Copaíba 0.5mg/ml, não ocorreu diferenças ($p > 0.05$) no número de células entre os tempos de tratamento, mostrando um padrão de constância para essa curva, com tendência ao crescimento com o passar do tratamento. Como não ocorreu, em nenhum dos momentos observados, decréscimo do número de células em relação à quantidade inicial, apenas diminuição do crescimento celular quando comparado com o grupo Controle, pode-se dizer que o óleo de Andiroba, sob essas condições de tratamento, não induziu à morte celular significativa, hipótese confirmada com a negatividade do teste Tunel para células apoptóticas.

Diversas pesquisas demonstraram que Triterpenos e Limonóides, substâncias ativas presentes no óleo de Andiroba e em outras plantas, agem inibindo a enzima cicloxigenase 2 (COX-2), responsável pela conversão do Ácido aracdônico para a via das prostaglandinas, porém o exato mecanismo é desconhecido (DEGNER et al., 2006; DIAS et al., 2000; SHIN et al., 2005; SUH et al., 2004). Uma grande frente de estudos sobre a ação de fármacos anti-inflamatórios tem como alvo a enzima COX-2, responsável pela conversão do Ácido aracdônico para via das prostaglandinas. A utilização de inibidores específicos dessa enzima mostrou uma diminuição da proliferação celular em diferentes linhagens celulares neoplásicas (ALVES, 2006;

SHISHODIA; KOUL; AGGARWAL, 2004), porém o mecanismo exato ainda não foi totalmente elucidado.

Em adição ao efeito inibitório da proliferação celular promovido pelo óleo de Andiroba, observamos uma diminuição dos níveis de expressão da proteína NFkB, 3 e 24 horas após o tratamento. Essa diminuição foi menor que a promovida pelo tratamento com o óleo de Copaíba. Nos ensaios de imunofluorescência, houve uma clara mudança do padrão de marcação do NFkB depois do tratamento; no grupo Controle, observou-se um padrão nuclear para a maioria das células e, logo após o tratamento, esse padrão tornou-se citoplasmático para todas as células. A ação de inibição da proliferação celular realizada pelo óleo de Andiroba pode estar relacionada com a inativação do NFkB. Penido et al. (2006) observaram que tetranortriterpenóides, isolados do óleo da semente da *Carapa guianensis* (Andiroba), exibiram uma significativa atividade anti-alérgica (via da inflamação) devido à inibição do NFkB e IL-5.

6.3 DEXAMETASONA

Glicocorticóides desempenham um importante papel na regulação do crescimento, diferenciação e apoptose celular (HERR et al., 2007; YANO et al., 2006; WANG et al., 2006). Glicocorticóides, como a Dexametasona, possuem um grande valor no tratamento de desordens inflamatórias como artrite reumatóide, asma, dermatites, doenças autoimunes (doença de Crohn) e edemas teciduais. Também possuem atividade antipirética, ação antiemética durante a quimioterapia e são usados na indução da apoptose celular em células linfóides malignas (KOFLER, 2000; PLANEY; LITWACK, 2000).

A Dexametasona pode apresentar uma ação inibitória, estimulatória ou não apresentar efeito algum sobre a proliferação celular de diferentes modelos celulares (MORITA et al., 1999). Nesse estudo, através da análise de curvas de viabilidade celular com diferentes concentrações e tempos de tratamento, pôde ser observado o efeito ambíguo da Dexametasona sobre as células de carcinoma epidermóide de orofaringe (FaDu). Dependendo da concentração e tempo de tratamento, observou-se ora um efeito de estimulação do crescimento celular, ora de inibição. As concentrações que mostraram uma ação de inibição da viabilidade celular foram: 10^{-7} M 10^{-6} M e 10^{-8} M para um tempo de tratamento acima de 48 horas. Os resultados da curva de crescimento demonstraram que o medicamento foi capaz de inibir a proliferação celular, porém a ação foi dependente da concentração e tempo. Diversos estudos demonstraram o efeito antiproliferativo promovido pela Dexametasona em diferentes tecidos e tipos celulares (células de origem linfóide, epitelia, neural e outras) (AUSERLECHNER et al., 2004; GREENBERG et al., 2002;

WANG et al., 2006). Nesse estudo não foi observado morte celular após tratamento com Dexametasona em diferentes tempos com a concentração de 10^{-6} M, pois não houve, em nenhum dos momentos observados, decréscimo do número de células em relação à quantidade inicial, apenas diminuição do crescimento celular, quando comparado com o grupo Controle. O teste Tunel também foi negativo para esse grupo, confirmando, assim, a incapacidade dessa substância de induzir apoptose das células da linhagem FaDu sob as condições desse experimento. Este resultado está de acordo com os resultados de outras pesquisas (AUSERLECHNER et al., 2004), porém contraria outras que mostraram um efeito de indução da apoptose promovido pela Dexametasona (WANG et al., 2006).

O mecanismo básico de ação dos glicocorticóides, no processo de proliferação celular, ocorre na interação destes com proteínas receptoras específicas (GR), localizadas no citoplasma na sua forma inativa, formando um complexo hormônio-receptor que será translocado para o núcleo, ligando-se a uma sequência específica do DNA, ativando ou reprimindo genes-alvos como o NFkB (SU et al., 2004). Pensando-se em carcinogênese e sua possível relação com a inflamação, uma outra hipótese sobre a ação antitumoral desempenhada pela Dexametasona estaria em seu papel inibitório do processo inflamatório. Pela inibição da enzima fosfolipase A_2 não há a formação do ácido aracdônico com consequente inibição das vias dos Leucotrienos e Prostaglandinas. Em decorrência desse fato, há a diminuição de mediadores inflamatórios, como a IL-1 (SIQUEIRA JR; DANTAS, 2000). Com isso, há a diminuição da ativação do NFkB e sua translocação para o núcleo, desencadeando a inibição de genes alvos do processo de carcinogênese regulados pelo NFkB. Os resultados de inibição da proliferação das células de carcinoma epidermóide de orofaringe, observados nesse trabalho, após o tratamento com

Dexametasona, pode ser relacionado com os níveis de NFkB encontrados, já que a diminuição da expressão deste foi observada após 48 horas de tratamento, tempo este também observado para queda da proliferação dessas células.

O potencial de ação desse medicamento foi inferior, quando comparado com as ações promovidas pelos óleos de Copaíba e Andiroba, além do fato do tempo necessário para o início da inibição ter sido maior (48hs). Apesar dos resultados apresentados terem sido mais efetivos para as células tratadas com o óleo de Copaíba, isso não significa que os efeitos *in vivo* sejam melhores do que os esperados para o óleo de Andiroba e a Dexametasona, pois uma ação exacerbada de inibição da proliferação e indução de apoptose, durante um curto tempo de ação pode, indubitavelmente, ocasionar maior citotoxicidade para as células normais do paciente.

7 CONCLUSÕES

- O anti-inflamatório Dexametasona e os óleos de Copaíba e Andiroba apresentaram atividade antitumoral sobre as células de carcinoma epidermóide de orofaringe da linhagem FaDu, porém com diferentes potenciais de ação.
- O óleo de Copaíba inibiu o crescimento celular através da indução de apoptose e inibição da proliferação celular.
- A atividade antineoplásica promovida pelo óleo de Andiroba ocorreu através da inibição da proliferação celular, não sendo observada indução de apoptose por essa substância.
- A ação do anti-inflamatório Dexametasona ocorreu através da inibição da proliferação celular, sendo que esta atividade foi concentração-tempo dependente.
- Após tratamento das células da linhagem FaDu com o anti-inflamatório Dexametasona e os óleos de Copaíba e Andiroba, ocorreu a diminuição da expressão da proteína NFkB. Essa supressão do NFkB pode ser responsável pela indução de apoptose e inibição da proliferação celular promovida pelos medicamentos, já que o NFkB é responsável pela regulação de genes envolvidos nesses processos.

REFERÊNCIAS¹

Acerold L. Glucocorticoid therapy. *Medicine* 1976;55:39-65.

Adelstein DJ; LeBlanc M. Does induction chemotherapy have a role in the management of locoregionally advanced squamous cell head and neck cancer? *Clinical Oncology* 2006;24(17):2624-8.

Aggarwal BB. Nuclear factor- κ B: The enemy within. *Cancer cell* 2004;6(3):203-8.

Aggarwal S, Takada Y, Singh J, Myers JS, Aggarwal BB. Inhibition of growth and survival of human head and neck squamous cell carcinoma cells by curcumin via modulation of nuclear factor- κ B signaling. *International Journal of Cancer* 2004;111(5):679-92.

Alves Jr. SM. Análise da expressão e mecanismo de ação da proteína COX-2 em cultura de células de carcinoma epidermóide bucal humano [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2006.

Antunes JL, Biazevic MG, Araújo ME, Tomita NE, Chinellato LE, Narvai PC. Trends and spatial distribution of oral cancer mortality in São Paulo, Brazil, 1980-1998. *Oral Oncology* 2001;37(4):345-50.

Atula S, Grenman R, Laippala P, Syrjanen S. Cancer of tongue in patients younger than 40 years: a distinct entity? *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery* 1996;122(2):1313-9.

Ausserlechner MJ, Obexer P, Bock G, Geley S, Kofler R. Cyclin D3 and C-Myc control Glucocorticoid – induced cell cycle arrest but not apoptosis in lymphoblastic leukemia cells. *Cell Death and Differentiation* 2004;11:165-74.

Bagan JV, Jiménez Y, Murillo J, Poveda R, Díaz JM, Gavalda C, Margaix M, Scully C, Alberola TM, Torres Puente M, Pérez Alonso M. Epstein-Barr virus in oral proliferative verrucous leukoplakia and squamous cell carcinoma: A preliminary study. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal* 2008;13(2):110-3.

¹ De acordo com estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Belman S, Troll W. The inhibition of Croton Oil- promoted mouse skin tumorigenesis by steroid hormones. *Cancer Research* 1972;32:450-4.

Bermejo BP, Abad MJ, Diaz AM, Villaescuza L, Gonzales MA, Silva AM. Sesquiterpenes from *Jasonia Glutinosa*: in vitro anti-inflammatory activity. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2002;25(1):1-4.

Brain EGC, Misset JL, Rouesse J. Primary chemotherapy or hormonotherapy for patients with breast cancer. *Cancer Treatment Reviews* 1999;25(4):187-97.

Brito MVH, Oliveira RVB, Morais MR, Miranda JS, Reis JMC. Análise gástrica após administração de Copaíba: estudo experimental em ratos. *Gastroenterologia Endoscópica Digestiva* 2001;20(3):78-82.

Brito NMB, Silva PRF, Silva GCF, Casella SFM, Sampaio ARS, Carvalho RA. Avaliação macroscópica de feridas cutâneas abertas, em ratos, tratadas com o óleo de Andiroba. *Revista Paraense de Medicina* 2001;15(2):17-22.

Campisi G, Panzarella V, Giuliani M, Lajolo C, Di Fede O, Falaschini S, Di Liberto C, Scully C, Lo Muzio L. Human papillomavirus: its identity and controversial role in oral oncogenesis, premalignant and malignant lesions (review). *International Journal of Oncology* 2007;30(4):813-23.

Canto MT, Devesa SS. Oral cavity and pharynx cancer incidence rates in the United States, 1975-1998. *Oral Oncology* 2002;38(6):610-17.

Cardoso SV. Estudo da expressão imunoistoquímica da metalotioneína em carcinoma epidermóide bucal [Dissertação]. Minas Gerais: Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG; 2001.

Carlsen H, Alexander G, Austenaa LMI, Ebihara K, Blomhoff R. Molecular imaging of the transcription factor NF- κ B, a primary regulator of stress response. *Mutation Research* 2004;551(1-2):199-211.

Cavalcanti BC, Costa-Lotufo LV, Moraes MO, Burbano RR, Silveira ER, Cunha KM, Raos VS, Moura DJ, Rosa RM, Henrique JA, Pessoa C. Genotoxicity evaluation of Kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. *Food and Chemical Toxicology* 2006;44(3): 388-92.

Chang F, Lee JT, Navolanic PM, Steelman LS, Shelton JG, Blalock WL, et al. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression , apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia* 2003;17(3):590-603.

Chen IK, Huang HC, Lin LM, Lin CC. Primary squamous cell carcinoma: an analysis of 703 cases in Southern Taiwan. *Oral Oncology* 1999;35(2):173-179.

Chen JS, Pardo FS, Wang-Rodriguez J, Chu TS, Lopez JP, Aguilera J, et al. EGFR regulates the side population in head and neck squamous cell carcinoma. *The Laryngoscope* 2006;116(3):401-6.

Chen X, Wang S, Wu N, Yang CS. Leukorine A4 hydrolase as a target for cancer prevention and therapy. *Current Cancer Drug Targets* 2004;4(3):267-83.

Choi S; Myers JN. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. *Journal of Dental Research* 2008;87(1):14-32.

Costa-Silva JH, Lima CR, Silva EJ, Araújo AV, Fraga MC, Ribeiro e Ribeiro A, Arruda C, LafayetteSS, WanderleyAG. Acute and subacute toxicity of the *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) seed oil. *Journal of Ethnopharmacology* 2008;116(3):495-500.

Dedivitis RA, França CM, Mafra ACB, Guimarães FT, Guimarães AV. Características clínico-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia* 2004;70(1):35-40.

Degner SC, Kemp MQ, Bowden GT, Romagnolo DF. Conjugated linoleic acid attenuates cyclooxygenase-2 transcriptional activity via an anti-AP-1 mechanism in MCF-7 breast cancer cells. *The Journal of Nutrition* 2006;36(2):421-7.

Dias AM, Abad MJ, Fernandez L, Recuero C, Villaescusa L, Silvan AM, Bermejo P. In vitro anti-inflammatory activity of iridoids and triterpenoid compounds isolated from *Phillyrea latifolia* L. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2000;23(11):1307-13.

Dobrossy L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer Metastasis Reviews* 2005;24(1):9-17.

Dolcet X, Liobet D, Pallares J, Matias-Guiu X. NF- κ B in development and progress of human cancer. *Virchows Archiv* 2005;446(5):475-82.

Greenberg AK, Hu J, Basu S, Hay J, Reibman J, Yie TA, Tchou-Wong KM, Rom WN, Lee TC. Glucocorticoids inhibit lung cancer cell growth through both the extracellular

signal-related kinase pathway and cell cycle regulators. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2002;27:320-8.

Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz AG, Balch CM, Haller DG, Morrow M (eds) (2002). *American Joint Committee on Cancer (AJCC) cancer staging handbook*. 6th ed. New York: Springer –Verlag.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57-70.

Hayashido Y, Shirasuna K, Sugiura T, Nakashima M, Matsuya T. Effect of dexamethasone on invasion of human squamous cell carcinoma cells into collagen gel. *Cancer Letters* 1998;108(1):81-6.

Herr I, Gassler N, Friess H, Buchler MW. Regulation of differential pro and anti-apoptotic signaling by glucocorticoids. *Apoptosis* 2007;12(2):271-91.

Hoque A, Lippman SM, Wu TT, Xu Y, Liang ZD, Swisher S, Zhang H, Cao L, Ajani Ja, Xu XC. Increased 5-lipoxygenase expression and induction of apoptosis by its inhibitors in esophageal cancer: a potential target for prevention. *Carcinogenesis* 2005;26(4):785-91.

Instituto Nacional do Câncer – INCA. Estimativa de incidência de câncer para 2008/2009 no Brasil – 2008 [documento eletrônico]. Ministério da Saúde. Disponível em URL: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008>.

Joyce D, Albanese C, Steer J, Fu M, Bouzahzah B, Pestell rg. NfKb and cell-cycle regulation: the cyclin connection. *Cytokine Growth Factor Reviews* 2001;12(1):73-90.

Kari S; Alho O-P; Jokinen HK; Laara E. Carcinoma of the oral tongue in northern Finland: trends in overall incidence and patient and tumour characteristics. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 1997;26(10):480-3.

Kofler R. The molecular basis of the glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoblastic leukemia cells. *Histochemistry and Cell Biology* 2000;114(1):1-7.

Kundu JK, Surh YJ. Molecular basis of chemoprevention by resveratrol: NFkB and AP-1 as potential targets. *Mutation Research* 2004;555:65-80.

Lam L, Logan RM, Luke C. Epidemiological analysis of tongue cancer in South Australian for the 24 –years period, 1977-2001. *Australian Dental Journal* 2006;51(1):16-22.

Licitra L, Locati LD, Bossi P. Head and neck cancer. *Annals of Oncology* 2004;15(Suppl 4):iv267-iv73.

Lima SR, Júnior VF, Christo HB, Pinto AC, Fernandes PD. In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* hayne and its fractions. *Phytotherapy Research* 2003;17(9):1408-53.

Lippman SM, Sudbo J, Hong WK. Oral cancer prevention and the evolution of molecular – Targeted drug development. *Journal of Clinical Oncology* 2005;23:346-56.

Liu H, Huang X, Wang H, Shen A, Cheng C. Dexamethasone inhibits proliferation and stimulates SSeCKS expression in C6 rat glioma cell line. *Brain Research* 2009 april 10;1265:1-12.

Llewellyn CD, Johnson NW, WarnakulasuriyaKAAS. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people - a comprehensive literature review. *Oral Oncology* 2001;37(5): 401-18

Mignogna MD, Fedele S, Lo Russo L, Lo Muzio L, Bucci F. Immune activation and chronic inflammation as the cause of malignancy in ora lichen planus: is there any evidence? *Oral Oncology* 2004;40(2):120-30.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação Nacional de Controle de Tabagismo-CONTAPP. “Falando sobre câncer e seus fatores de risco”. Rio de Janeiro, 1996.

Morita K, Ishimura K, Tsuruo Y, Wong DL. Dexamethasone enhances serum deprivation –induced necrotic death of rat C6 glioma cells through activation of glucocorticoid receptors. *Brain Research* 1999;816(2):309-16.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia Oral & Maxilofacial*. 1ed. Trad. De Prof. Luiz Carlos Moreira. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998;(10):287-296.

Oliveira RL, Silva AR, Zucoloto S. Perfil da incidência e da sobrevida de pacientes com carcinoma epidermóide oral em uma população brasileira. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 2006;42(5):335-92.

OMS. Bulletin of the World Health Organization. Regulatory situation of herbal medicines. A worldwidw review, Geneva, 1998.

Penido C, Costa KA, Costa MFS, Pereira JFG, Siani AC, Henriques MGMO. Inhibition of allergen-induced eosinophil recruitment by natural tetranortriterpenoids is mediated by the suppression of IL-5, CCL11/eotaxin and NFkB activation. *International Immunopharmacology* 2006;6:109-121.

Perez-Ordñez B; Beauchemin M; Jordan RCK. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Journal of Clinical Pathology* 2006; 59(5):445-53.

Pestell RG, Albanese C, Reutens AT, Segall JE, Lee RJ, Arnold A. The cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in hormonal regulation of proliferation and differentiation. *Endocrine Reviews* 1999;20(4):501-34.

Planey SL, Litwack G. Glucocorticoid –induced apoptosis in lymphocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000;279(2):307-312.

Prado RF; Taveira LAA. Nicotina na carcinogênese química bucal. *Revista Brasileira de Patologia Oral* 2003;2(4):24-7.

Rhodus NL, Cheng B, Myers S, Miller L, Ho V, Ondrey F. The feasibility of monitoring NF-Kappa B associated cytokines: TNF-alpha, IL-1-alpha, IL-6 and IL-8 in whole saliva for the malignant transformation of oral lichen planus. *Molecular Carcinogenesis* 2005;44(2):77-82.

Rioux N, Castonguay A. Inhibitors of lipoxygenase: a new class of cancer chemopreventive agents. *Carcinogenesis* 1998;19(8):1393-400.

Sandur SK, Ichikawa H, Sethi G, Ahn KS, Aggarwall BB. Plumbagin (5-hidroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone) suppresses NF-kappaB activation and NF-kappaB-regulated gene products through modulation of p65 and IkappaBalpha kinase activation, leading to potentiation of apoptosis induced by cytokine and chemotherapeutic agents. *The Journal of Biological Chemistry* 2006;281(25):17023-33.

Scully C. Oral squamous cell carcinoma, from an hypothesis about a virus, to concern about possible sexual transmission. *Oral Oncology* 2002;38(3):227-34.

Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 1: chromosomal aberration. *Oral Oncology* 2000;36(3):256-63a.

Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 2: chromosomal aberration. *Oral Oncology* 2000;36(4):311-27b.

Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 3: chromosomal aberration. *Oral Oncol* 2000;36(5):404-13c.

Shin SG, Kang JK, Lee KR, Lee HW Han JW, Choi WS. Suppression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in RAW-264.7 macrophages by sesquiterpenes lactones. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A.* 2005;68(23-24):2119-31.

Shishodia S, Koul D, Aggarwal BB. Cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor celecoxib abrogates TNF-induced NF- κ B activation through inhibition of activation of I Kappa B alpha Kinase and Akt in human non-small cell lung carcinoma: correlation with suppression of COX-2 synthesis. *J Immunol* 2004; 173(3):201-22.

Siqueira Jr. JF, Dantas CJS. *Mecanismos Moleculares da Inflamação*. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica LTDA 2000,(7):83-103.

Souza Jr. OG, Cal RVR, Amoury Jr. RRC, Rocha ABMA. Efeito do óleo de Andiroba em cavidades peritoneal de ratos. *Revista Paraense de Medicina* 1999;13(2):47-50.

Souza Jr. OG, Lamarão LG, Damous SH. Colite induzida por ácido acético e tratada com enema de óleo de Copaíba. *Na Fac Med Univ Fed Pernamb* 2000;45(2):131-135.

Su H, Cheng WTK, Chen S, Lin C, Lien H, Chen S. Mouse keratinocytes express c98, a novel gene homologous to Bcl-2, that is stimulated by insulin-like growth factor 1 and prevents dexamethasone induced apoptosis. *Biochemica et biophysica Acta*;1676:127-37.

Suh N, Honda T, Finlay HJ, Barchowsky A, Williams C, Benoit NE, Xie QW, Nathan C, Gribble GW, Sporn MB. Novel triterpenoids suppress inducible nitric oxide synthase (iNOS) and inducible cyclooxygenase (COX-2) in mouse macrophages. *Cancer Research* 1998;58(4):717-23.

Sun Z, Sood S, Li N, Ramji D, Yang P, Newman RA, Yang CS, Chen X. Involvement of the 5-lipoxygenase/leukotriene A4 hydrolase pathway in 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced oral carcinogenesis in hamster cheek pouch, and inhibition of carcinogenesis by its inhibitor. *Carcinogenesis* 2006.

Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kB activation. *Mutation Research* 2001;480-481:243-268.

Tamir S, Tannenbaum SR. The role of nitric oxide (NO) in the carcinogenic process. *Biochemica et Biophysica Acta* 1996;1288(2):31-6.

Tappin MRR, Nakamura MJ, Siani AC, Lucchetti L. Development of an HPLC method for the determination of tetranortriterpenoids in *Carapa guianensis* seed oil by experimental design. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2008;48(4):1090-95.

Torres AC, Courelas CSS, Afonso IMS. Fármacos anti-neoplásicos e riscos toxicológicos. Lisboa: Universidade técnica de Lisboa-UTL 1999; pg. 1-15.

Vargas H; Pitman KT; Johnson JT; Galati LT. More aggressive behavior of squamous cell carcinoma of the anterior tongue in young women. *Laryngoscope* 2000;110(10):1263-6.

Veiga VF Jr, Zunino L, Calixto JB, Patitucci ML, Pinto AC. *Phytotherapy Research*, 2001;15(6):476-80.

Veiga Jr. VF, Pinto AC. Plantas medicinais: cura segura? *Quimica Nova* 2005;28(3):519-28.

Vermorken JB. Medical treatment in head and neck cancer. *Annals of Oncology* 2005;16(Suppl II):ii258-ii64.

Yano A, Fujii Y, Iwai A, Kawakami S, Kageyama Y, Kihara K Glucocorticoids suppress tumor lymphangiogenesis of prostate cancer cells. *Clinical Cancer Research* 2006;12:6012-17.

Yao M, Kargman S, Lam EC, Kelly CR, Zheng Y, Luk P, Kwong E, Evans JF, Wolfe MM. Inhibition of cyclooxygenase-2 by Rofecoxib attenuates the growth and metastatic potential of colorectal carcinoma in mice. *Cancer Research* 2003;63(3):586-92.

Ye H, Yu T, Temam S, Ziober BL, Wang J, Schwartz JL, Mao L, Wong DT, Zhou X. Transcriptomic dissection of tongue squamous cell carcinoma. *BMG Genomics* 2008;9:69.

Wang D, Muller N, McPherson KG, Reichardt HM. Glucocorticoids engage different signals transduction pathways to induce apoptosis in thymocytes and mature T cells. *Journal of Immunology* 2006;169:5-702.

Wee KB, Aguda BD. Akt versus p53 in a network of oncogenes and tumor suppressor genes regulating cell survival and death. *Biophys J* 2006;91:857-65.

Willians HK. Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2000;53(4):165-172.

Wright KD, Wright A, Duke JC, Gustafsson JA. DNA-binding by the glucocorticoid receptor: a structural and functional analysis. *J of Steroid Biochem , Molec Biol* 1992;41(3-4):249-72.

Wube AA, Gibbons S, Asres K, Streit B, Adams M, Bauer R, Bucar F. In vitro 12(S)-HETE and leukotriene Metabolism inhibitory activity of sesquiterpenes of *Warburgia ugandensis*. *Plant Med* 2006;72(8):754-6.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em pesquisa

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

DECLARAÇÃO
Protocolo 210/08

Declaramos que o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo recebeu e aceitou o adendo referente alteração do título do Projeto: "Análise da expressão das proteínas NFkB, Cd-1, Beta-catenina e Cox-2 antes e depois do tratamento com dexametasona e os óleos de Copaíba e Andiroba em cultura de células de Carcinoma Epidermóide Bucal." para: **"Análise da expressão da proteína NFkB antes e depois do tratamento com Dexametasona e os óleos de Copaíba e Andiroba em cultura de células de Carcinoma Epidermóide Bucal"**, da pesquisadora Camila Fragata Chicaro, sob a orientação da Profa Dra. Adriana da Costa Neves.

São Paulo, 09 de setembro de 2009.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador CEP/FOUSP

Parecer do Comitê de Ética em pesquisa (adendo)

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia

São Paulo, 09 de setembro de 2009.

Senhor Professor,

Venho por meio deste solicitar de Va. Sa. As devidas providências no sentido de alterar o nome da Pesquisa Nº de Protocolo 210/2008 de: "Análise da expressão das proteínas NFkB, Cd-1, Beta-catenina e Cox-2 antes e depois do tratamento com dexametasona e os óleos de Copaíba e Andiroba em cultura de células de Carcinoma Epidermóide Bucal." para: **"Análise da expressão da proteína NFkB antes e depois do tratamento com Dexametasona e os óleos de Copaíba e Andiroba em cultura de células de Carcinoma Epidermóide Bucal"**, da pesquisadora Camila Fragata Chicaro, sob a orientação da Profa Dra. Adriana da Costa Neves.

Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Jr.

Co-Orientador