SÉRGIO DE MELO ALVES JUNIOR

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO E MECANISMOS DE AÇÃO DA
PROTEÍNA COX-2 EM CULTURA DE CÉLULAS DE CARCINOMA
EPIDERMÓIDE BUCAL HUMANO**

São Paulo

2006

Sérgio de Melo Alves Junior

**Análise da expressão e mecanismos de ação da
proteína COX-2 em cultura de células de carcinoma
epidermóide bucal humano**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obter o título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Patologia Bucal.

Orientador: Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior.

São Paulo
2006

FOLHA DE APROVAÇÃO

Alves-Junior SM. Análise da expressão e mecanismos de ação da proteína COX-2 em cultura de células de carcinoma epidermóide bucal humano [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

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:_____

4) Prof (a). Dr (a).

Titulação:_____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

5) Prof (a). Dr (a).

Titulação:_____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

DEDICATÓRIA

Rejane, em 11 anos de namoro construímos uma união muito forte, lembro cada ano de forma especial e todas as fases foram de harmonia e muita alegria, sempre com muito amor. Passamos três anos felizes em São Paulo e passaremos outros mais em qualquer lugar, porque estando juntos estaremos sempre felizes. Te amo!

Aos meus pais, não me lembro de ter pedido algo nestes três anos, mas também não me lembro de algum dia ter precisado pedir, o apoio como sempre veio de forma espontânea e algumas vezes quase por adivinhação. Ter pais como estes tem preço.

AGRADECIMENTOS

Professor **Décio** e Professora **Suzana**, agradeço em conjunto, não por falta de assunto, mas por excesso de gratidão igualmente aos dois. Décio, em quase 3 anos não me lembro de um só momento triste, você é uma das pessoas mais inteligentes que já conheci, nesse período recebi amizade, companheirismo e as portas estiveram sempre abertas para que eu desenvolvesse os trabalhos. A forma respeitosa e muito correta com que fui tratado fez surgir nossa amizade. Suzana você me recebeu no primeiro dia e a partir dali eu soube que teria um ano maravilhoso, a sua forma de tratar as pessoas é ímpar.

Professores **Andréa, Fábio, Kárem, Marília e Marina** tenho excelentes lembranças com cada um de vocês, o carinho com que vocês me receberam me fez sentir acolhido pela faculdade inteira. Tenham certeza que a minha admiração começou no início do curso, mas não termina com ele, levo em forma de conhecimento.

Dr **Ney** e Dra **Vera** tenho respeito e admiração, mas acima de tudo agradeço pela dedicação de tantos anos que tornou possível construir um curso de tão alto nível para todos nós, seus eternos alunos.

Professor **Ruy** e **Vanessa** não lembro quantas vezes pedi ajuda, mas sei que recebi sempre que solicitei.

Aos amigos de pós-graduação **Passador, Juliana, Adriano, Arlindo, Filipe, Luciana, Alexander, Káren, Carol, Nathalie, Katiuchia, Márcia, Camila, Alexandra, Renata, Fernanda, Tatiana, Lineu, Helder, Flávia Pontes, Flávia, Aluana, Cury, Patrícia, Michelly, Paulo Santos, Téssa, Paulo, Thais, Alexandre, Vanessa, Fábio, Ricardo e Cristiane.**

Ao **CESUPA** pela confiança no meu trabalho.

Aos professores **João Pinheiro, Graça Pinheiro, Manoel Fernando, Antônio Athayde, Fabrício Tuji e Oscar Pessoa**, obrigado pela ajuda durante estes 3 anos, é muito importante trabalhar em harmonia, sem competição e com competência.

Elisa, Zilda, Neia, Bia, Nair e Patrícia obrigado pela paciência e por todas as ajudas recebidas.

Ricardo Gomez, Mesquita, Dorinha e Cássia vocês construíram uma escada em Belém, obrigado!

Tio Manuel o senhor esteve presente durante todo o meu Doutorado e no de muitos amigos, nós lhe agradecemos.

Marina, Yonara e Kívia vocês fazem parte de um grupo especial de pessoas, o trabalho ao lado de vocês fica leve e prazeroso.

Felipe uma mente brilhante e um coração sem tamanho, foi um privilégio ter trabalhado contigo e uma honra ser teu amigo.

Trabalhar aos sábados e domingos só em boa companhia. Valeu **Édna** !!!

Alves Junior SM. Análise da expressão e mecanismos de ação da proteína COX-2 em cultura de células de carcinoma epidermóide bucal humano [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

RESUMO

Celecoxib é um antiinflamatório não esteroide (AINE), inibidor seletivo da ciclooxigenase-2 (COX-2) usado em pesquisas recentes como agente anti-carcinogênico. Os seus efeitos anti-neoplásicos dependem por um lado da sua capacidade de inibir a COX-2, mas por outro lado também age por mecanismos que independem da COX-2, em resumo o seu mecanismo de ação ainda não é completamente conhecido. O objetivo desta tese foi estudar os efeitos do celecoxib sobre as taxas de apoptose e os índices de proliferação celular de quatro linhagens celulares, Hn-6, Hn-19, Hn-30, Hn-31, de CECP e uma linhagem de queratinócitos mutada (HaCat), além de verificar se há correlação entre a expressão das proteínas COX-2, pAkt, β -catenina, CD1 e NF κ B e a inibição da proliferação celular. As células foram divididas em dois grupos: *a*, grupo controle; *b*, células cultivadas tratadas com celecoxib. A análise da expressão das proteínas pAkt, NF κ B, β -catenina, COX-2 e CD1 foi feita através da técnica de Western-blot. A indução de apoptose foi estudada com o Kit de Anexina. A proliferação celular foi monitorada através de curva de crescimento, com contagem celular na câmara de Neubauer e com o teste de viabilidade celular (Kit Cell Titer96) e a localização intracelular das proteínas foi avaliada por imunofluorescência. Os resultados mostraram significativo aumento no índice celular de apoptose e diminuição da proliferação celular. Após o tratamento com celecoxib, a imunofluorescência mostrou que a proteína CD1 teve diminuição

da expressão nuclear, a β -catenina exibiu discreto aumento citoplasmático, o pAkt também passou a ser expresso no citoplasma da Hn6, enquanto as outras proteínas estudadas mantiveram o mesmo padrão de localização na célula. O western blot complementou os resultados da imunofluorescência indicando uma diminuição nos níveis de CD1.

Palavras-Chave: Celecoxib; Cox-2; Ciclina D1; Apoptose; Quimioterapia

Alves Junior SM. Análise da expressão e mecanismos de ação da proteína COX-2 em cultura de células de carcinoma epidermóide bucal humano [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

ABSTRACT

Celecoxib, a cyclooxygenase-2 (COX-2) selective nonsteroidal anti-inflammatory drug, is a new anticarcinogenic agent. Its antitumor effects depend on the one hand on its COX-2-inhibiting potency, but on the other hand on COX-2-independent mechanisms, which until now have not been fully understood. The aim of this research was to study the effects of celecoxib in growth inhibition and apoptosis induction in four Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) cell lines, HN6, HN19, HN30, HN31 and HaCat an immortalized keratinocyte cell line, and verify if there is a correlation between the growth inhibition and the expression of COX-2, pAkt, β -catenin, CD1 and NF κ B. The Western Blot was used to analyze the COX-2, pAkt, β -catenin, CD1 and NF κ B protein expression level. Apoptosis induction was studied with the Annexin V kit. The cell lines proliferation will be measured through a growth curve with the Neubauer chamber and MTS method (KitCell Titer96), the proteins intracellular site was assed by immunofluorescence technic. The same cell lines without any treatment were used as controls. Results showed a significant increase in apoptotic cells index, and growth inhibition in cell lines treated with celecoxib. The proteins localization was determined through immunofluorescence. In control group the CD1 was located mostly in nucleus, after treatment CD1 nuclear localization was reduced, it could also be noticed an increase in cytoplasmic expression of β -catenin in all cell lines while pAkt cytoplasmic increase

was present exclusively in Hn6, the other proteins maintained their cellular localization,. The Western Blot results showed considerable reduction in CD1 levels with exception of Hn19 cell line.

Keywords: Celecoxib; Cox-2; Cyclin D1; Apoptosis; Chemotherapy

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 5.1 -	Curva de crescimento celular das cinco linhagens celulares estudadas. Pode-se observar a proliferação celular contínua e progressiva após três dias no grupo controle, enquanto o grupo tratado com celecoxib (100µM) exibiu diminuição da proliferação celular (* p<0.05 teste t Student).....	52
Figura 5.2 -	Teste de viabilidade celular realizado com o kit MTS cell Titer (promega). Pode-se observar a diminuição do número de células viáveis após aplicação do medicamento celecoxib (100µM) (* p<0.05 teste t Student).....	53
Figura 5.3 -	Detecção de células apoptóticas com kit Annexin V (Santa Cruz), as cinco linhagens celulares foram tratadas com celecoxib por 24h. Nota-se intensa marcação citoplasmática em verde pela anexina e o iodeto propídio no núcleo.....	56
Figura 5.4 -	Imunofluorescência da proteína pAkt. No grupo controle houve predomínio de marcação nuclear, mas em algumas células observou-se também marcação citoplasmática, principalmente na HaCat. Após tratamento com celecoxib o padrão de marcação nuclear continuou evidente, porém houve de expressão nuclear em algumas células da HaCat e aumento da expressão citoplasmática principalmente na linhagem Hn6.....	57
Figura 5.5 -	Imunofluorescência da proteína COX-2. No grupo controle o padrão de expressão foi exclusivamente citoplasmático. Após tratamento com celecoxib o padrão de marcação citoplasmático permaneceu inalterado.....	58
Figura 5.6 -	Imunofluorescência da proteína β-catenina. No grupo controle nota-se o padrão de marcação citoplasmático em algumas células, com predomínio de marcação na membrana citoplasmática. Após tratamento com celecoxib observa-se diminuição de expressão na membrana e uma maior nitidez do padrão citoplasmático.....	59
Figura 5.7 -	Imunofluorescência da proteína NF-kB. No grupo controle o padrão de expressão é predominantemente citoplasmático, mas em raras células também pode-se observar marcação nuclear. Após tratamento com celecoxib o padrão de marcação citoplasmático permaneceu inalterado, porém a marcação nuclear está totalmente ausente.....	60

Figura 5.8 -	Imunofluorescência da proteína CD1. No grupo controle nota-se o padrão de expressão nuclear. Após tratamento com celecoxib observa-se perda de expressão nuclear em algumas células que por vezes passam a exibir expressão citoplasmática.....	61
Figura 5.9 -	Representação gráfica da média de valores da proteína β -catenina.....	63
Figura 5.10 -	Representação gráfica da média de valores da proteína COX-2.....	63
Figura 5.11 -	Representação gráfica da média de valores da proteína pAkt.....	63
Figura 5.12 -	Representação gráfica da média de valores da proteína NF-kB.....	63
Figura 5.13 -	Representação gráfica da média de valores da proteína CD1.....	63
Figura 5.14 -	Western blot.....	63
Figura 5.15 -	Western blot. Notar a diminuição da expressão da proteína CD1.....	63

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 4.1 -	Relação das linhagens de neoplasias de carcinoma epidermóide que foram utilizadas no estudo com suas respectivas origens	41
Quadro 4.2 -	Concentrações, clones, procedência e tempo de incubação dos anticorpos utilizados na imunofluorescência.....	46
Quadro 4.3 -	Concentrações, clones, procedência e tempo de incubação dos anticorpos utilizados no western blot.....	50
Tabela 4.1 -	Gel 10% acrilamida com SDS (10x16).....	48
Tabela 5.1 -	Número de células $\times 10^4$ antes e após tratamento com celecoxib (100 μ M) (* $p < 0.05$ teste t Student).....	52
Tabela 5.2 -	Índice de células apoptóticas antes e após tratamento com celecoxib (100 μ M) por 24h (* $p < 0.05$ teste t Student).....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

APS	Ammonium persulfato / Persulfato de amônia
BSA	Bovine Serum Albumine / Albumina Sérica Bovina
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Médium / Meio de Ealgle Modificadfo por Dulbecco
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
HaCat	Linhagem celular de queratinócitos com mutação do p53
Hn-6	Linhagem celular de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço
Hn-19	Linhagem celular de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço
Hn-30	Linhagem celular de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço
Hn31	Linhagem celular de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço
mA	milliAmpere
mM	milimolar
PBSA	phosphate buffered saline, calcium and magnesium free / Solução tampão fosfato salina, sem cálcio e sem magnésio
pH	cologarítimo de concentração hidrogeniônica de uma solução, (potencial hidrogeniônico)
rpm	rotações por minuto
SDS	sodium dodecyl sulfate / dodecil sulfato de sódio
TEMED	Tetrametiletlenodiamino
μ M	micromolar

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Carcinoma epidermóide.....	18
2.2 Celecoxib.....	21
2.3 COX-2.....	25
2.4 pAkt.....	29
2.5 NFkB.....	32
2.6 β -catenina.....	34
2.7 Ciclina D1.....	36
3 PROPOSIÇÃO	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Cultivo Celular.....	41
4.2 Indução de apoptose e bloqueio da proliferação celular.....	43
4.3 Contagem celular.....	43
4.4 Teste de viabilidade celular.....	44
4.5 Imunofluorescência.....	45
4.6 Extração e quantificação de proteínas.....	47
4.7 Western-Blot.....	48
4.8 Análise estatística.....	50
5 RESULTADOS	51
5.1 Curva de crescimento.....	51
5.2 Viabilidade celular.....	53
5.3 Indução de apoptose.....	54
5.4 Padrão de marcação da imunofluorescência.....	54
5.5 Western-Blot.....	62
6 DISCUSSÃO	64
7 CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS	75
ANEXOS	86

1 INTRODUÇÃO

A alta incidência do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP) na população brasileira é um problema de saúde pública. Apesar do uso de quimioterapia e radioterapia no tratamento desta neoplasia estar avançando, o prognóstico para o paciente, a longo prazo ainda não é satisfatório, especialmente quando estas formas de tratamento são utilizadas de forma isolada. O tratamento mais eficaz para esta neoplasia é a cirurgia que pode trazer, por outro lado, importantes seqüelas para os pacientes (alterações funcionais na fala e deglutição além de comprometer a estética facial).

Por outro lado, a cirurgia não é capaz de tratar todos os casos, visto que lesões extensas e localizadas próximas às áreas vitais, quando removidas, podem apresentar as margens comprometidas. Em casos como estes, tem se utilizado a radioterapia como tratamento coadjuvante, alcançando-se bons resultados. A quimioterapia tem evoluído muito, principalmente quando pensa-se em lesões do sistema linfático ou lesões hematológicas. No entanto, estudos clínicos utilizando a quimioterapia como tratamento do carcinoma epidermóide precisam evoluir e a melhor maneira de contribuir para isto é estudando as vias de sinalização celular.

Estudos sobre as vias de sinalização celular podem contribuir para a descoberta ou aperfeiçoamento de quimioterápicos capazes de inibir a proliferação de células neoplásicas. Neste sentido, o laboratório de Biologia Celular da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo tem se dedicada ao estudo do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, com ênfase nas lesões

localizadas na região de cabeça e pescoço, com o objetivo de melhor compreender as vias de sinalização celular responsáveis pela progressão desta neoplasia.

Surgiu nos últimos anos uma grande frente de estudos sobre os efeitos dos antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) no tratamento do câncer. Pesquisas utilizando principalmente os medicamentos inibidores específicos da cyclooxygenase-2 (COX-2), como o celecoxib ou o rofecoxib, obtiveram sucesso na inibição da proliferação de diferentes neoplasias malignas em diferentes regiões do corpo. Apesar dos bons resultados alcançados pelas pesquisas, a forma como estes medicamentos atuam na inibição da proliferação do câncer, ainda é pouco compreendida. Inicialmente os estudos apontavam para a proteína COX-2 como o alvo principal dos medicamentos e como responsável pelos seus efeitos terapêuticos. No entanto, novos trabalhos contestaram estas afirmações e sugeriram que a inibição da proliferação era alcançada de forma independente da proteína COX-2. Esta discordância leva à necessidade da realização de pesquisas que contribuam para uma melhor compreensão sobre os efeitos destes medicamentos sobre o câncer, principalmente em lesões como o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, incluindo as lesões localizadas em boca que são pouco estudadas.

Diante da necessidade de se buscar novas formas de tratamento, este trabalho tem a proposta de estudar a eficácia do medicamento celecoxib na inibição da proliferação celular e sobre os índices de apoptose do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e também tentar contribuir para o entendimento sobre a sinalização celular desta neoplasia.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carcinoma epidermóide

As neoplasias malignas de cabeça e pescoço representam cerca de 5% de todos os cânceres em humanos no mundo e mais de 500.000 novos casos são diagnosticados a cada ano. No Brasil representam até 9% dos casos (COTRAN et al., 2000; FRANCESCHI et al., 2000; INCA, 2000; PARKIN, PISAN; FERLAY, 1999). Segundo Lippman, Sudbo e Hong (2005) o carcinoma epidermóide de boca é a neoplasia maligna mais comum da região de cabeça e pescoço com 300.000 novos casos por ano. Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2001), o câncer bucal é a sexta e oitava neoplasia maligna responsável pelo maior número de óbitos no Brasil entre homens e mulheres, respectivamente. Em 2001 ocorreram 8.145 novos casos, sendo 5.970 (8,2 por 100.000) em homens e 2.175 (2,9 por 100.000) em mulheres. Novos dados do INCA mostram um aumento do número de casos estimados para o ano de 2006 que deve atingir cerca de 13.680 novos casos. Dados sobre o carcinoma de faringe não aparecem listados.

Cerca de 90% dos casos de cânceres que ocorrem na região de cabeça e pescoço são carcinomas epidermóides, seguido por outros carcinomas (verrucoso, indiferenciados, de glândulas salivares menores), sarcomas e melanoma (INCA, 2000; VERMOKEN, 2005). Os carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço surgem a partir da mucosa do trato aéreo digestivo superior e incluem lesões da boca, faringe, laringe e seios para nasais (LICITRA; LOCATI; BOSSI, 2004). A

doença ocorre caracteristicamente em indivíduos entre a quarta e sexta décadas de vida; predominantemente naqueles do sexo masculino, expostos aos fatores de risco. Aparecem clinicamente como lesões brancas, eritroplásicas ou, mais comumente como ulcerações (EVERSOLE, 1984; FARIA et al., 2003; HOSSFELD, SHERMAN; LOVE, 1990; INCA, 2000; PRINCE; BAYLEY, 1999).

O exame histopatológico do carcinoma epidermóide demonstra um padrão sólido de crescimento caracterizado por cordões, ilhas ou ninhos formados por células epiteliais morfológicamente alteradas com grande potencial invasivo. As atipias são freqüentes e em alguns casos auxiliam o patologista no diagnóstico. (NEVILLE et al., 1995; SAPP; EVERSOLE; WISOCKI, 1998; WAHL et al., 1971).

Sua patogênese é claramente multifatorial, envolvendo fatores extrínsecos (notavelmente uso de fumo, ingestão crônica de bebidas alcoólicas e radiação solar). Apesar da comprovada influência de fatores extrínsecos na patogênese do carcinoma epidermóide, esta é uma doença genética (FRANCESCHI et al., 2000; HINDLE et al., 2000; NEVILLE et al., 1995; OGDEN; WIGHT, 1998). O carcinoma epidermóide começa a partir de uma lesão pré-maligna seguido de expansão clonal associada com alterações genéticas acumulativas e progressão fenotípica para a neoplasia maligna invasiva. Estas alterações genéticas resultam na ativação de genes supressores de tumor e ativação de proto-oncogenes. A migração intramucosa e expansão clonal das células transformadas com a formação de um campo de cancerização parecem ser responsáveis pela recorrência local e desenvolvimento de tumores adjacentes ao tumor primário (PEREZ-ORDONEZ; BEAUCHEMIN; JORDAN, 2006).

A formulação do prognóstico é importante tanto para orientação do paciente como para o planejamento da abordagem terapêutica e é realizada a partir da

análise das características de cada caso. Tais características, denominadas fatores de prognóstico, podem estar relacionadas à condição sistêmica do paciente (como seu estado geral), 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).

A maioria das lesões é diagnosticada tardiamente, quando então já alcançaram estágios avançados (FARIA et al., 2003; INCA, 2000; MASHBERG, 2000). Conseqüentemente, são registradas 271.000 mortes por ano, o que significa que menos de 50% dos pacientes sobrevivem decorridos os primeiros cinco anos de seguimento (HOSSFELD; SHERMAN; LOVE, 1990; MASHBERG, 2000).

Existem três modalidades para o tratamento do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. Os pacientes com doença em estágio inicial (I e II) são submetidos a apenas uma forma de tratamento (cirurgia ou radioterapia), enquanto os pacientes com estágio III ou IV necessitam de uma combinação de tratamentos que podem ser, cirurgia extensa com radioterapia ou radioterapia e quimioterapia. Contudo, neste grupo apenas 30% dos pacientes conseguem obter cura (LICITRA; LOCATI; BOSSI, 2004).

Durante algum tempo o tratamento quimioterápico contra o carcinoma epidermóide foi deixado de lado devido à falta de resultados convincentes que dessem suporte para esta modalidade de tratamento. No entanto, estudos recentes levantam três fatores importantes que renovaram o interesse sobre a quimioterapia, particularmente quando associada à radioterapia. A introdução de novos agentes terapêuticos é um dos novos fatores. Muitos centros estão explorando a combinação quimioterápica de três drogas: fluoracil, cisplatina e taxane. A resposta ao tratamento melhorou em mais de 90% dos pacientes e 50% dos pacientes tiveram remissão

total, contudo isto levou indubitavelmente à maior citotoxicidade e métodos para diminuí-la também devem ser investigados. O segundo fator foi a melhora do controle locoregional que era o principal problema para os pacientes. A terceira observação importante, é o fato de pacientes que respondem bem à quimioterapia também responderem ao tratamento radioterápico, o que torna a quimioterapia um marcador dos pacientes que podem ser tratados com radioterapia, sem necessidade cirúrgica. A quimioterapia permanece como método investigacional no tratamento desta doença e deve ser apropriadamente estudada antes de ser adotada como padrão (ADELSTEIN; LEBLANC, 2006; VERMORKEN, 2005).

2.2 Celecoxib

Há pouco mais de um século, com a descoberta da aspirina, as drogas antiinflamatórias não esteroidais se tornaram os agentes terapêuticos mais utilizados no tratamento da dor e inflamação associada com artrite (KISMET et al., 2004).

Apesar do grande uso dos AINEs, só no ano de 1971, Vane descobriu seu principal mecanismo de ação. AINEs são primordialmente inibidores de COX, por conseguinte, bloqueadores da formação de prostaglandina (pg) em tecidos normais e inflamados.

Os AINEs convencionais, que inibem a COX-1, possuem efeitos terapêuticos antiinflamatório, analgésico e antipirético. Contudo, estão associados a graves efeitos colaterais, principalmente relacionados ao sistema gastrointestinal. Estas complicações ocorrem porque a COX-1 exerce importante função protetora na

região gastrointestinal. Desta forma, um inibidor seletivo de COX-2 combate as condições inflamatórias sem os efeitos colaterais da toxicidade gástrica, renal e sem inibição de função plaquetária (FU et al., 2004).

O AINE celecoxib foi aprovado pelo *US Food and Drug Administration* (FDA) em 31 de dezembro de 1998 e também exibe efeitos antiinflamatório, analgésico e antipirético. A vida média do medicamento no organismo é de 11.5h e o organismo está totalmente livre do medicamento após 301h. Ele é metabolizado no fígado pelo citocromo p450 CYP2C9 e sua eliminação é feita por metabolismo hepático. Menos de 3% do medicamento é secretado como composto inalterado pela urina ou fezes, a máxima concentração plasmática é atingida 2 h após sua ingestão por via oral. A sua fórmula empírica é $C_{17}H_{14}F_3N_3O_2S$ e o seu peso molecular é 381.38 (KISMET et al., 2004; TIVE, 2000).

O celecoxib foi o primeiro inibidor específico de COX-2 aprovado para tratar os sinais e sintomas da osteoartrite e artrite reumatóide. Em estudos clínicos, o celecoxib demonstrou ser superior em eficácia se comparado com um grupo placebo e similar a outros AINEs no tratamento da osteoartrite e artrite reumatóide. Contudo, sua maior vantagem parece ser o menor número de efeitos colaterais, principalmente no que se refere ao trato gastrointestinal. O celecoxib foi melhor tolerado pelo trato gastrointestinal do que outros AINEs e apresentou resultados semelhantes ao grupo placebo (TIVE, 2000).

Nos últimos cinco anos tem crescido o interesse quanto aos efeitos cardiovasculares associados com o uso de AINEs inibidores seletivos de COX-2. Em outubro de 2004, o antiinflamatório rofecoxib foi retirado de circulação após a publicação de estudos que mostraram que com doses de 25 mg/dia havia o aumento de alterações cardiovasculares em pacientes portadores de pólipos no colorretal. O

estudo de revisão de McGettigan e Henry (2006) confirmou estes dados referentes ao rofecoxib e sugeriu que o celecoxib em doses comumente usadas não aumentaria a ocorrência de problemas cardiovasculares, mas levanta sérias questões quanto aos possíveis efeitos colaterais do diclofenaco.

Uma pesquisa com mais de três mil pacientes que faziam uso do celecoxib, visando prevenir ou tratar pólipos do colorretal, encontrou um aumento de duas vezes no risco de morte por problemas cardíacos, enfarte do miocárdio e outras alterações cardiovasculares. Neste trabalho, os autores sugerem que novos estudos devem ser feitos para verificar se doses menores do medicamento são capazes de tratar os pólipos sem causar alterações cardiovasculares (SOLOMON et al., 2006).

Além da discussão a respeito dos efeitos cardiovasculares do celecoxib, é preciso levar em consideração os benefícios que este remédio traz. Resultados de estudos clínicos randomizados mostram que os inibidores de COX-2 estão associados com aproximadamente 50% de redução do risco de úlceras e das complicações destas úlceras quando comparado com AINEs não seletivos. O celecoxib, quando indicado para 100.000 pacientes no período de um ano, resultou em 570, 226 e 746 menos complicações causadas por úlceras do que o diclofenaco, ibuprofen, e o naproxen, respectivamente. Correspondendo a 20, oito e 27 menos mortes decorrentes de complicações da úlcera respectivamente. Não houve aumento nas complicações cardiovasculares na comparação entre o celecoxib e os demais medicamentos estudados (VARAS-LORENZON et al., 2006).

Além do uso para tratamento de doenças inflamatórias crônicas, muitos estudos têm demonstrado que o celecoxib apresenta uma importante indicação clínica para o tratamento dos pacientes com câncer. O efeito anti-neoplásico do celecoxib ainda é pouco conhecido, mas as bases moleculares para tal efeito têm

sido atribuídas à inibição da COX-2 (FU et al., 2004; ROH et al., 2004; SHISHODIA; AGGARWAL, 2004; SHISHODIA; KOUL; AGGARWAL, 2004; VITAL-REYES et al., 2006).

Os inibidores do receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR) têm demonstrado uma modesta atividade contra o CECP, com respostas variando de 3.5% com dose diária de 250 mg a 10.6% quando a dose passa para 500 mg. Por este motivo um grupo de pesquisadores testou a eficácia quimioterápica do celecoxib associado com o gefitinib, que é um inibidor do EGFR. A adição do celecoxib não parece afetar o grau de toxicidade do gefitinib, mas contribui com a sua própria citotoxicidade para os efeitos colaterais. À respeito do tratamento, os pacientes apresentaram uma melhora de 22% comparado com os 11% e 4% observados quando o gefitinib foi utilizado isoladamente (WIRTH et al., 2005). Da mesma forma, o tratamento combinado com celecoxib, gefitinib e radiação pode agir sinergicamente eliminando células de câncer de pulmão através do aumento das taxas de apoptose (PARK et al., 2006).

Com o intuito de estudar a ação do celecoxib sobre a displasia epitelial no câncer de esôfago, foi realizada uma pesquisa com 238 pacientes. Após tratamento com duas doses diárias de 200mg de celecoxib, por um período de dez meses, não foi observada nenhuma melhora no quadro dos pacientes, permitindo concluir que a medicação não foi capaz de interferir na carcinogênese do epitélio do esôfago (LIMBURG et al., 2005).

2.3 COX-2

COX é a enzima responsável pela conversão do ácido aracdônico em prostanóides. Duas isoformas (COX-1 e COX-2) foram clonadas. Elas compartilham mais de 60% dos seus aminoácidos e têm atividade enzimática similar, mas diferem na sua regulação, distribuição e expressão (HILMI; GOH, 2006; KERN et al., 2006; KISMET et al., 2004; VAN REES et al., 2002).

A COX-1 é expressa constitutivamente na maioria dos tecidos e é considerada um gene guardião responsável pela citoproteção do estômago, vasodilatação do pâncreas e controle da agregação plaquetária. A COX-2 pode ser induzida por vários estímulos, como hormônios, citocinas, fatores de crescimento e promotores tumorais (ALTORKI, 2003; DVORY-SOBOL et al., 2006; VAN REES et al., 2002; YE et al., 2004).

Os genes COX-1 e COX-2 estão localizados nos cromossomos humanos 9 e 1, respectivamente (KRAEMER; MEADE; DEWITT, 1992). Enquanto o gene COX-1 não possui um domínio TATA, o promotor do gene COX-2 contém um domínio TATA e sítios de ligação para fatores de transcrição, incluindo o fator nuclear-kB (NF-kB), o fator nuclear para expressão da interleucina-6 (NF-IL6) e a proteína de ligação do elemento de resposta AMP cíclico. Desta forma a expressão da COX-2 é regulada por mediadores envolvidos na inflamação. Lipopolissacarídeos, citocinas pró-inflamatórias (interleucina-1 β , fator de necrose tumoral (TNF) e fatores de crescimento) podem induzir a COX-2. Glucocorticóides, interleucina-4, interleucina-13 e a citocina antiinflamatória interleucina-10 podem inibir a expressão da enzima COX-2 (LEE et al., 1992; NIIRO et al., 1997; ONOE et al., 1996).

Os produtos da via da COX-2 podem exercer função regulatória na sua expressão através de um *feedback* positivo: a prostaglandina E2, principal produto da COX-2, aumenta a expressão da COX-2. A expressão da COX-2 em células relacionadas à inflamação (macrófagos e monócitos) demonstra que esta isoforma está envolvida em processos patológicos, como em inflamações agudas e crônicas. (HINZ; BRUNE; PAHL, 2000).

A estrutura da COX consiste em três domínios: um domínio do fator de crescimento epitelial N-terminal, um motivo de ligação de membrana e um domínio catalítico C-terminal que contém os sítios ativos da COX e da peroxidase. Dentro do canal hidrofóbico da enzima da COX existe uma diferença entre os aminoácidos na posição 523 (isoleucina na COX-1 e valina na COX-2). A molécula da valina na COX-2 é menor do que a isoleucina na COX-1, fornecendo um espaço 17% maior no sítio de ligação para AINE, o que permite uma ligação mais rápida na COX-2 do que na COX-1 e explica a especificidade de algumas drogas (HINZ; BRUNE 2001). Por definição, uma droga pode ser chamada de inibidora específica de COX-2 quando não causa inibição clinicamente significativa na COX-1, o celecoxib se enquadra nesta definição (LEESE et al., 2000; McADAM et al., 1999).

Recentemente, um grande número de pesquisas centrou seu foco na relação da COX-2 com neoplasias malignas em humanos. A elevada expressão da COX-2 tem sido relacionada com diferentes tipos de neoplasias (endométrio, ovário, estômago e esôfago). O prognóstico dessas neoplasias parece estar diretamente relacionado com a expressão da COX-2, o que nos faz acreditar em um efeito terapêutico das drogas anti COX-2 no tratamento do câncer (O'CONNOR et al., 2004; SEO et al., 2004; TATSUGUCHI, 2004; van REES, 2002; YU, HP et al., 2004).

O trabalho de Jiang et al. (2004), realizado em carcinomas epidermóides de esôfago demonstrou ausência de marcação ou marcação fraca da COX-2 em tecido normal. O tecido neoplásico dos mesmos pacientes, ao contrário, mostrou marcação forte ou moderada pela COX-2 indicando a sua possível participação na etiopatogênia do carcinoma epidermóide. Outras pesquisas que realizaram análises imunoistoquímicas da proteína COX-2 em carcinomas epidermóides de esôfago exibiram divergência quanto à relação entre o grau de marcação pela COX-2 e a sobrevida dos pacientes. No trabalho de Nozoe et al. (2005) houve correlação entre o aumento da expressão da COX-2 e a diminuição da sobrevida dos pacientes, enquanto outros estudos não encontraram relação entre o grau de expressão desta proteína e a sobrevida dos seus pacientes (HEEREN et al., 2005; SIVULA et al., 2005).

Shibata et al. (2005) estudando lesões em boca, analisaram a correlação da expressão da COX-2 com nove amostras de mucosa oral, 65 lesões com atipias e 50 casos de carcinoma epidermóide. Os seus resultados mostraram que a mucosa normal apresentou baixos índices de atipia e que a expressão de COX-2 foi maior nas displasias do que nos casos de carcinoma epidermóide, havendo correlação estatística entre os índices de expressão e a severidade da atipia, sendo maior nas atipias intensas.

As vias de sinalização, nas quais a COX-2 pode estar envolvida, têm merecido atenção em trabalhos recentes. A via de sinalização do Akt e a via de sinalização do Wnt são importantes objetos de estudos para tratamento de neoplasias e parecem fazer parte do contexto de ação da COX-2 (O'CONNOR et al., 2004; SEO et al., 2004; TESTA; BELLACOSA, 2001; TATSUGUCHI, 2004; van REES, 2002; YU, LL et al. 2004).

Outra importante associação parece existir entre a COX-2 e o EGFR. Moraitis et al. (2005) observaram que pacientes fumantes apresentavam elevada expressão de COX-2, ao contrário dos não fumantes, por isso fizeram uma pesquisa em que aplicaram a fumaça do cigarro em queratinócitos de mucosa bucal, os seus resultados constataram uma correlação entre a indução da expressão da COX-2 e a fosforilação do EGFR. Para comprovar este fato, eles utilizaram um bloqueador do EGFR que resultou na diminuição da expressão da COX-2.

Na tentativa de compreender e identificar a forma como a COX-2 atua nas neoplasias malignas, pesquisas encontraram uma importante correlação entre a expressão da COX-2 e a inibição da apoptose, associando o aumento nos níveis de PGE2 à modulação de fatores anti e pró apoptóticos, como o Bcl-2 e o Bax, respectivamente (ALTORKI, 2004; SHENG; SHAO; MORROW, 1998). Duas outras possibilidades de indução da expressão da COX-2 dentro da via do Akt merecem consideração. A primeira sugere que o *CCAAT/enhancer-binding protein beta* (C/EBPB), um fator de transcrição, localizado dentro da via do Akt, é responsável pela regulação do gene COX-2. A segunda possibilidade sugere que a inativação do GSK3, através da ativação do Akt pelos raios ultravioleta (UVB), participa de forma importante na indução da transcrição da COX-2 (REDDY; WADLEIGH; HERSCHMAN, 2000; TANG et al., 2001).

O câncer gástrico sofre forte influência dos produtos do cigarro, assim como o câncer de boca. O trabalho de Shin et al. (2004) estimulou a proliferação de uma linhagem de células de câncer gástrico e verificou que os níveis de COX-2 e c-myc aumentaram. Após a utilização de um inibidor de COX-2, houve uma diminuição na proliferação celular e também na expressão do c-myc. Quando realizado o bloqueio apenas do c-myc, houve uma diminuição da proliferação celular sem interferir nos

níveis de COX-2, segundo os autores isto mostra que a COX-2 participa do processo de carcinogênese acima do c-myc.

Há outras evidências que sugerem participação da COX-2 na carcinogênese. Por exemplo, estudos experimentais sugerem que as PGs derivadas da COX-2 promovem invasão e metástases e que o aumento da invasão tumoral está associada à ativação das metaloproteinases 1 e 2, responsáveis pela degradação da matriz do colágeno da membrana basal (TSUJII; KAWANO; DUBOIS, 1997).

2.4 pAkt

O Akt, que também é conhecido com PKB, é uma serina/treonina quinase de 59 kDa que é ativada quando as células são estimuladas por diversos fatores de crescimento. Akt é composto por três domínios, incluindo um domínio PH na porção N-terminal, um domínio kinase e uma calda hidrofóbica C-terminal (WANG; BRATTAIN, 2006). Akt foi caracterizado a partir da descoberta de dois genes akt1 e akt2, homólogos humanos do gene v-akt responsável pela leucemia em ratos. Estudos mostraram que estes genes continham uma proteína kinase semelhante às proteínas kinase A (PKA) e C (PKC), por isso ela foi chamada de PKB. Três membros da família PKB foram isolados e são conhecidos como PKB α (Akt1), PKB β (Akt2) e PKB γ (Akt3) (VARA et al., 2004).

Wang e Brattain (2006) relataram que a localização celular do Akt parece depender do contexto e da linhagem celular estudada. Por exemplo, o Akt está mais presente no citoplasma das seguintes linhagens celulares: CHO (ovário de rato),

HEK293 (células embrionárias de rim humano) e PC12 (células neuroendócrinas), enquanto a sua localização é predominantemente nuclear na HepG2 (fígado humano), HT1080 (fibroblasto humano) e nas células do câncer folicular. Acreditava-se que a localização nuclear do Akt ativado ocorria após um estímulo capaz de transportá-lo do citoplasma para o núcleo, mas os autores demonstraram em seu estudo que o Akt fosforilado, além de presente, também pode ser ativado no núcleo.

A via de sinalização PI3K/Akt regula funções celulares normais e fundamentais como: crescimento celular, proliferação, sobrevivência celular e movimentos. Processos estes que também são importantes na tumorigênese. A regulação inapropriada da via PI3K/Akt tem sido associada com o desenvolvimento de doenças como diabetes e câncer. Esta via de sinalização participa não só do desenvolvimento de neoplasias como também tem papel fundamental na resposta do câncer frente a variados agentes terapêuticos. Esta ligação entre a ativação da via do Akt e o câncer torna esta via um interessante alvo terapêutico (VARA et al., 2004; WEST; CASTILLO; DENNIS, 2002).

A ativação da via de sinalização celular do Akt começa a partir da ativação de um receptor de fator de crescimento que recruta a molécula phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) para a membrana, por ligação direta, ativando-a. Ao ser ativado, o próximo passo é a transformação de phosphatidylinositol (4,5)-phosphate (PIP2) em phosphatidylinositol (3,4,5)-phosphate (PIP3) pelo PI3K. PIP3 por sua vez recruta as proteínas kinases Akt e PDK1 para a membrana que conseqüentemente fosforila o Akt transformando-o em sua forma ativa (pAkt), capaz de regular inúmeras moléculas-alvo, responsáveis por funções como proliferação celular e apoptose (LUO; MANNING; CANTLEY, 2003).

Uma proteína importante nesta via de sinalização celular é o PTEN, responsável pela regulação da ativação do Akt. A transformação de fosfatidylinositol (4,5)-phosphate (PIP2) em fosfatidylinositol (3,4,5)-phosphate (PIP3) pelo PI3K é uma etapa crucial para a fosforilação e consequente ativação do Akt e é nesta etapa que o PTEN atua, inibindo a fosforilação e transformação de PIP2 em PIP3, com isso agindo de forma antagônica ao PI3K (WEST; CASTILLO; DENNIS, 2002).

Um exemplo sobre a atuação do Akt na proliferação celular é a sua atuação indireta sobre a proteína CD1 no ciclo celular através do GSK-3. O GSK-3 é uma proteína constitutivamente ativa em células que não estão sendo estimuladas, responsável por fosforilar as proteínas c-myc e CD1, mantendo-as em um estado inativo. O GSK-3 pode ser fosforilado por muitas kinases, incluindo proteína kinase C (PKC), p90, p70 e o Akt. Quando fosforilado o Akt inativa o GSK-3, por conseguinte pode-se afirmar que a via de sinalização PI3K/Akt é um ativador da ciclina D1, fator importante na progressão do ciclo celular. Desta forma, a degradação da CD1 induzida pelo GSK-3 é inibida pela ativação da via PI3K/Akt porque o Akt fosforila diretamente o GSK-3, inativando-o e permitindo a progressão da célula no ciclo celular (CHANG et al., 2003).

St-Germain et al. (2004) realizaram um estudo com objetivo de verificar a relação entre as proteínas Akt, NF- κ B e COX-2. Para isto utilizaram linhagens de câncer de endométrio que possuíam a proteína PTEN inativa o que leva a ativação do Akt. Os seus resultados sugeriram que o Akt exerce importante função regulatória sobre a expressão do NF- κ B, através da fosforilação do I κ B, nas células do câncer de endométrio. Quando fosforilado, o I κ B liberou o NF- κ B, que estava inativo no citoplasma, para entrar no núcleo e exercer sua função na transcrição

genética, aumentando os níveis de COX-2. Após realizar o bloqueio do pAkt, o NF-kB ficou restrito ao citoplasma e os níveis de COX-2 diminuíram.

2.5 NF-kB

O NF-kB não é um único gene, mas uma família de fatores de transcrição que inclui cinco genes: NF-kB1 (p50/p105), NF-kB2 (p52/p100), RelA (p65), c-Rel e RelB (DOLCET et al., 2005). Estes cinco membros são estruturalmente relacionados e contêm um domínio homólogo Rel (RHD) de 300 aminoácidos, localizado na porção N-terminal. O RHD é responsável pela ligação com o DNA, dimerização e associação com proteínas inibitórias. Estes 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).

NF-kB é um fator de transcrição, descoberto em 1986, que pode ser induzido por uma variedade de sinais como citocinas, fatores de crescimento, tirosina kinases, Ras/MAPK e pAkt (CARLSEN et al., 2004). O aumento da expressão de membros da família do receptor do fator de crescimento epitelial, receptor do fator de insulina, receptor do fator de necrose tumoral também podem ser responsáveis pela ativação do NF-kB. A sua capacidade de realizar a transcrição genética só é possível quando localizado no núcleo celular. No citosol ele é incapaz de regular a transcrição. Este controle é realizado pelo Inibidor de KB (I-KB) que se liga ao NF-kB e o inativa, mantendo-o no citosol. Para que isto ocorra, uma outra proteína

conhecida como IKK precisa ser fosforilada e ativada pelo pAkt, sendo então capaz de fosforilar o I-KB levando-o para ubiquitinação e conseqüente degradação. Na ausência do I-KB, o NF-kB entra no núcleo onde ele é capaz de induzir a transcrição (CHANG et al., 2003; DOLCET et al., 2005).

A ativação do NF-kB deve ser um evento muito bem regulado. Em células normais, o NF-kB só é ativado depois de receber o correto estímulo que o leve a transcrever os genes alvo. Apesar de ter importante participação na fisiologia normal, a regulação inapropriada do NF-kB está relacionada com a patogênese de algumas doenças: doença cardiovascular, diabetes tipo 2, inflamação crônica e câncer (CARLSEN et al., 2004). Em células tumorais este mecanismo de regulação pode ser modificado pela alteração de diferentes moléculas e o NF-kB pode se tornar constitutivamente ativo levando à produção descontrolada de genes sob o seu comando (DOLCET et al., 2005).

Mais de 150 genes foram descritos como sendo regulados pelo NF-kB, que parece ser responsável pela transcrição de muitos genes importantes dentro da via de sinalização celular neoplásica. Exemplo: Bcl-2, CD1 e C-myc. Existe um sítio específico para kB dentro do promotor da CD1, desta forma o NF-kB ativa diretamente a transcrição da CD1 e com isso promove a entrada da célula no ciclo celular (AGGARWAL et al., 2004; JOYCE et al., 2001; RAVI; BEDI, 2004).

Originalmente o NF-kB foi descrito como um fator associado com a apoptose, já que agentes capazes de induzir a apoptose como o TNF- α , também induziam o NF-kB. Contudo foi mostrado a seguir que a inibição da ativação do NF-kB aumentava a apoptose (CHANG et al., 2003).

Alguns trabalhos mostram uma correlação entre o NF-kB e a proteína COX-2. A expressão do IKK α tem sido correlacionada com aumento da expressão do NF-kB

e da COX-2 em carcinomas de colorretal. Por outro lado, observou-se baixa expressão da COX-2, NF- κ B e IKK α em células epiteliais normais do cólon. (DOLCET et al., 2005). O NF- κ B seria responsável por induzir a COX-2, que por sua vez induziria fatores angiogênicos (VEGF, FGF, PDGF e TGF- β) (RAVI; BEDI, 2004). Yang et al. (2005), em um estudo utilizando como metodologia apenas a imunohistoquímica, também encontraram correlação entre a expressão das proteínas NF- κ B e COX-2 no carcinoma epidermóide de esôfago. Estes dados ganham credibilidade com a descoberta de dois sítios de ligação para o NF- κ B na região promotora da COX-2 (CHUN; SURH, 2004).

2.6 β - Catenina

β -catenina é uma proteína multifuncional de 92-kD, que parece estar envolvida em sinalização molecular, proliferação, e diferenciação. Evidências sugerem que a estabilização e subsequente acúmulo nuclear da β -catenina estão diretamente ligados a várias neoplasias malignas. Muitos estudos recentes também demonstraram a regulação da proteína COX-2 pela β -catenina, tornando-a um alvo em potencial da quimioprevenção por medicamentos antiinflamatórios (KUNDU; CHOY; SURH, 2006).

A β -catenina está envolvida basicamente em dois processos: adesão entre células e transdução de sinais. A relação da β -catenina com a adesão celular é bem conhecida. Em células epiteliais, a β -catenina é um componente intracelular das junções de aderência, as quais acontecem através de interações entre os domínios

extracelulares das caderinas. β -catenina ou catenina p120 se liga diretamente com o domínio citoplasmático da caderina E e o domínio amino-terminal da α -catenina respectivamente. Este último liga a β -catenina ao microfilamento de actina. A interação entre cateninas e caderinas é crucial para a adesão celular. Além da função na adesão celular, a β -catenina age como um oncogene através da modulação da via de sinalização celular do Wnt e transcrição de importantes oncogenes como a CD1 e o c-myc (KUNDU; CHOY; SURH, 2006; RODRIGUEZ-PINILLAA et al., 2005; ZHANG et al., 2005).

A via de sinalização Wnt/ β -catenina é a melhor compreendida dentre todas as vias do Wnt e é altamente conservada durante a evolução (MOON, 2005). Redução dos níveis de β -catenina na membrana citoplasmática e acúmulo no citoplasma são eventos freqüentes durante a carcinogênese do carcinoma epidermóide de esôfago (ZHANG et al., 2005).

A β -catenina, além de ser controlada pela via do Wnt, também pode ser regulada pelo Akt. Em células normais, a β -catenina citoplasmática é mantida em níveis baixos porque ela é controlada por um complexo de proteínas formado por APC, Axina e GSK-3, que regulam a fosforilação da β -catenina na porção N-terminal. O GSK-3 é uma proteína constitutivamente ativa, responsável por fosforilar a β -catenina, o que leva a sua degradação por proteólise dependente de ubiquitina. Alterações nesta via de sinalização, como a inibição do GSK-3b pelo Akt ou mutações no gene supressor de tumor APC, podem estabilizar a β -catenina no citoplasma com posterior migração para o núcleo, levando à formação do complexo β -catenina/TCF e alteração da expressão de genes alvo do TCF como c-myc, CD1, COX-2 e metaloproteinases (DENG et al., 2004; KARIM et al., 2004; VARA et al., 2004; ZHANG et al., 2005; YANG et al., 2006).

Recentemente aumentaram as evidências que sugerem uma participação da β -catenina na sinalização celular do CECP. Yang et al. (2006) mostraram que a via de sinalização celular Wnt/ β -catenina promoveu a invasão celular no Matrigel e também que a super expressão da β -catenina promoveu o crescimento neoplásico do CECP em camundongos.

Brown, Skinner e Vogiagis (2001) examinaram a distribuição da β -catenina em tumores do colorretal de animais tratados com AINEs. A ocorrência da β -catenina estava diretamente relacionada ao tamanho do tumor e inversamente relacionada às taxas de apoptose. O tratamento com AINEs resultou na redução do tumor, provavelmente em consequência da diminuição dos níveis de β -catenina nuclear, mas sem alterar sua concentração citoplasmática. Com isso, conclui-se, que a inibição da translocação nuclear da β -catenina, com o uso de AINEs, pode causar redução da transcrição de genes alvos associados à apoptose e proliferação celular. Outro estudo observou que algumas horas após o tratamento de uma linhagem celular humana de carcinoma de cólon com celecoxib (100 μ M), ocorreu a translocação da β -catenina da membrana citoplasmática para o citoplasma (MAIER et al., 2005).

2.7 CD1

Mais de 50 anos se passaram desde a descoberta do ciclo celular e de suas fases, em 1951, contudo, apenas em estudos mais recentes, constatou-se que o ciclo celular é um conjunto de eventos altamente conservados e ordenados,

culminando no crescimento e na divisão celular. Existem dois grandes grupos de fatores envolvidos no controle do ciclo celular: extra-celular (fatores de crescimento) e intra-celular (oncogenes e genes supressores de tumor). Tumorigênese é o resultado da desorganização do ciclo celular resultando em uma proliferação celular descontrolada. O controle do ciclo celular é feito por moléculas conhecidas como ciclinas, kinases dependentes de ciclinas (Cdks) e inibidores de Cdk (CKI) (GOLIAS; CHARALABOPOULOS; CHARALABOPOULOS, 2004).

Ciclinas são uma família de proteínas diretamente envolvidas na regulação do ciclo celular. Elas são proteínas de 38kDa relacionadas com a mitose de todos os seres eucariontes. Ciclinas são subunidades regulatórias das Cdks, controlando a progressão pelos pontos de checagem do ciclo celular através da fosforilação e inativação de outras moléculas (GOLIAS; CHARALABOPOULOS; CHARALABOPOULOS, 2004).

Existem diferentes tipos de ciclinas que estão presentes em diferentes fases do ciclo celular. Uma das mais importantes é conhecida como ciclina D. As células dos mamíferos contêm genes responsáveis por codificar três tipos de ciclinas D muito parecidas entre si (D1, D2, D3), que se associam de forma específica com CDK4 ou CDK6. Entre os três tipos de ciclinas, a ciclina D1 apresenta maior importância e correlação com o câncer (DIEHL, 2002).

O gene da ciclina D1, também conhecido como PRAD1 ou bcl-1, codifica uma proteína de 295 aminoácidos com sequência similar às outras ciclinas. O gene da CD1 está localizado na região do cromossomo 11q13, o qual tem sido relacionado frequentemente com translocações. Evidências indicam que o PRAD1 é um proto-oncogene envolvido na patogênese do linfoma das células do manto. Este gene também foi descrito amplificado em muitas outras neoplasias, incluindo o tumor de

pequenas células do pulmão, carcinoma epidermóide, neoplasias de mama e de esôfago. A associação das CD2 e CD3 com a formação de tumores é muito menos freqüente do que acontece com a CD1 (PESTELL et al., 1999).

A ciclina D1 é conhecida por possuir importante função no ponto de checagem G1/S do ciclo celular e é neste momento que os níveis de CD1 nuclear estão mais elevados. Existem evidências de estudos *in vitro* e *in vivo* sobre a sua associação no processo de carcinogênese do carcinoma epidermóide de esôfago (LEHRBACH; NITA; CECCONELLO, 2003).

A quantidade de CD1 varia de acordo com a fase do ciclo celular como mencionado acima. Ela tem vida curta, sendo ubiquitinizada e degradada pelo proteossomo rapidamente. A transcrição genética da CD1 é regulada por múltiplos fatores de transcrição, os quais são induzidos por sinais extra-celulares, vias de sinalização oncogênicas ou variações fisiológicas em outras proteínas celulares. A região promotora da CD1 inclui sítios de ligação para o NF-kB, E2F:DP, SP-1:Sp-3, AP-1/ β -catenina, STATS e CREB:CREM:ATF-2 (JOYCE et al., 2001).

Pesquisas indicam que o NF-kB age aumentando os níveis de CD1. A relação do NF-kB com o ciclo celular e principalmente com a CD1 foi demonstrada utilizando o IKB “super repressor” (IKB-SR), para inibir a atividade do NF-kB. O IKB-SR bloqueia o aumento da atividade nuclear do NF-kB e atrasa a entrada de células na fase S do ciclo celular. A diminuição da atividade nuclear não teve relação com os níveis das proteínas ciclina E, ciclina D2, ciclina D3, CDK2, p15, p16, p27 ou p21. Por outro lado, houve diminuição dos níveis da CD1 (JOYCE et al., 2001).

As transições do ciclo celular são governadas pela atividade das kinases dependentes de ciclinas (CDK). CDK faz parte de um complexo heterodímero composto por uma subunidade catalítica, a CDK e uma subunidade regulatória que é

a ciclina. A atividade catalítica de cada CDK é determinada pela ligação da ciclina. Cada complexo ciclina/CDK fosforila um determinado substrato responsável pela progressão celular no ciclo (DIEHL, 2002).

Fatores de crescimento induzem um aumento na atividade do RAS, que por sua vez induz aumento nos níveis de CD1. A CD1, em associação com as Kinases dependentes de ciclinas (CDK), fosforila a proteína retinoblastoma (RB) bloqueando a sua atividade inibidora de crescimento e promovendo a liberação do fator de transcrição E2F. Estes eventos facilitam a ativação da ciclina E-CDK2 e ciclina A-CDK2, moléculas necessárias tanto para entrar como para completar a fase S (STACEY, 2003).

A consequência da super-expressão da ciclina D1 é uma transição encurtada pelo ciclo celular que confere uma vantagem proliferativa às células e talvez limite a capacidade de reparação aos danos genômicos causados pela exposição a carcinógenos (PETTY; DRAGNEV; DMITROVSKY, 2003).

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Estudar os efeitos do Celecoxib sobre as taxas de apoptose e os índices de proliferação celular de quatro linhagens celulares de CECP e uma linhagem de queratinócitos mutada (HaCat).

3.2 Verificar se há correlação entre a expressão das proteínas COX-2, pAkt, β -catenina, CD1 e NF-kB e a inibição da proliferação celular.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo sob o parecer número 70/05 (Anexo A).

4.1 Cultivo Celular

Foram utilizadas quatro linhagens celulares de carcinoma epidermóide: Hn-6, Hn-19, Hn-30, Hn-31 e HaCat (queratinócitos com mutação no p53) (Quadro 4.1). As células foram plaqueadas em frascos de 25cm² contendo 5 ml 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.

LINHAGEM	NEOPLASIA	ORIGEM
HaCat	Queratinócito com p53 mutado	
Hn6	Carcinoma epidermóide	Base de língua
Hn19	Carcinoma epidermóide	Linfonodo
Hn30	Carcinoma epidermóide	Faringe
Hn31	Carcinoma epidermóide	Linfonodo

Quadro 4.1 - Relação das linhagens de neoplasias de carcinoma epidermóide que foram utilizadas no estudo com sua respectiva origem

Todos os procedimentos do cultivo se realizaram em capela de fluxo laminar seguindo os protocolos para a manutenção da esterilidade dos materiais, suplementos e meio de cultura a serem utilizados. O crescimento celular foi monitorado em microscópio invertido de fase (Zeiss - Axiovert 25- Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) e o meio de cultura trocado conforme a necessidade de cada linhagem celular.

Após ocuparem 70% do frasco, o que se denomina subconfluência, as células foram subcultivadas. O meio de cultura do frasco removido e separado em tubo de centrifugação e a monocamada celular lavada uma vez com solução fosfato-salina, sem cálcio e magnésio (PBS A), pH 7,2. Em seguida, as células foram separadas com 1ml de solução de tripsina (Sigma) a 0,25% com EDTA 1mM (Sigma) 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 cinco minutos, à temperatura ambiente. Após aspiração do sobrenadante, o precipitado de células foi ressuspensionado em 1ml de meio de cultura. Alíquotas da suspensão distribuídas em frascos de cultivo de 25 cm² contendo 5ml de meio de cultura, e novamente levadas de volta à estufa, onde cada procedimento deste deu origem a uma nova passagem de linhagem celular.

Todos os experimentos foram realizados simultaneamente em dois grupos: 1. Controle, sem aplicação de quaisquer substâncias estimulantes ou inibidoras do crescimento celular; 2. Estimuladas à apoptose e efeito anti-proliferativo, com aplicação de Celecoxib.

4.2 Indução de apoptose e bloqueio da proliferação celular

Para indução de apoptose e bloqueio da proliferação celular, utilizamos o celecoxib, princípio ativo do Celebra, inibidor específico da COX-2. O celecoxib foi doado pela Companhia Farmacêutica Pfizer. Depois de cultivadas sobre placas de vidro, as células foram tratadas com ou sem celecoxib (100 μ M) por 24hs, 48hs e 72hs. O *Dimethylsulfoxide* (DMSO) foi utilizado como solvente e a solução estoque de celecoxib tinha a concentração de 100mM. O grupo controle passou por todos os processos pelos quais passou o grupo celecoxib, sendo no entanto, tratado apenas com o solvente, DMSO, utilizado para diluir o celecoxib.

4.3 Contagem celular

Após ocuparem 70% do frasco, o que se denomina subconfluência, as células foram tripsinizadas, como explicado anteriormente, e após rápida centrifugação foram ressuspensas em 1 ml de meio. A partir deste momento foi feita contagem prévia do número de células cultivadas em meio DMEM, utilizando-se a câmara de Neubauer. Dois frascos de cada linhagem celular foram plaqueados com 4×10^4 células e o medicamento celecoxib na concentração de 100 μ M, foi aplicado em apenas um dos frascos, sendo o outro considerado o grupo controle que recebeu a

mesma quantidade de DMSO do grupo tratado. Após 24h, 48h e 72h foram realizadas novas contagens para verificar o número de células presentes, para posteriormente serem realizadas as curvas de crescimento celular como forma de comparação dos níveis de proliferação celular entre o grupo controle e o grupo tratado. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

4.4 Teste de Viabilidade Celular

O experimento foi realizado, em triplicata, em uma placa de ELISA (96 poços). Foram utilizados o mesmo medicamento e tempo de aplicação utilizados para a contagem celular com a câmara de Neubauer. Devido ao tamanho reduzido dos poços e visando permitir que houvesse espaço para um crescimento normal das células, evitando inibição da proliferação por contato, o número de células plaqueadas foi menor (10^3). As células foram cultivadas em 100µl de meio por 24 horas, para em seguida realizar-se o tratamento com celecoxib. Após cada tempo de tratamento (24h, 48h e 72h), foi realizado o teste de viabilidade celular com o MTS *Kit* Cell Titer96 (Promega, madison, Wisconsin, USA). Em cada poço foram aplicados 20µl da solução Cell Titer96, seguindo incubação por 180 min em estufa de CO₂ a 37°C. Esta reação é baseada na conversão celular do sal tetrazolium (MTS) incolor, em formazam azul por enzimas de desidroxigenase presentes em células metabolicamente ativas. Desta forma, os poços que possuírem mais células viáveis produzirão maior quantidade do sal formazam tornando o meio azulado. A

leitura da densidade óptica será então proporcional ao número de células viáveis, sendo realizada em um aparelho de ELISA (ELX 800 Bio-Tek instruments Inc.) com filtro de 490nm.

4.5 Imunofluorescência

O cultivo celular foi realizado em placas de 6 poços, contendo uma lamínula previamente autoclavada. O experimento foi realizado no grupo controle e no grupo tratado com Celecoxib durante 24h. As lamínulas foram lavadas duas vezes com solução tampão fosfato-salina livre de Ca^{+2} e Mg^{+2} (PBS), pH 7,2 e fixadas na própria placa com metanol por 6 min a -20°C . As lamínulas foram novamente lavadas e o bloqueio feito com PBS/BSA 1% por 30 min. A partir desta etapa, as lavagens foram sempre realizadas em cinco frascos contendo PBS. O anticorpo primário anti-rabbit pAkt (Santa Cruz), anti-mouse COX-2 (Cayman), anti-rabbit NF-kB (Santa Cruz), anti-mouse CD1 (Dako) ou anti-mouse β -Catenina (Transduction) foi diluído em PBS/BSA 1% e incubado (50 μl) por 1h (Quadro 4.2). Após nova lavagem, foi feita incubação com anticorpo secundário conjugado à fluoresceína com diluição de 1:50 por 45 minutos (Amershan), ou então antimouse biotinilado 1:50 (Vector) por 30 minutos e Texas Red Estreptavidina 1:200 (Vector) por 30 minutos.

Soro	Tipo	[]	Procedência	Clones	Incubação
COX-2	Monoclonal	1:100	Cayman	160122	60 minutos
CD1	Monoclonal	1:100	Santa-Cruz Biotechnology	Sc8396	60 minutos
pAkt	Policlonal	1:50	Santa Cruz Biotechnology	Sc7985	60 minutos
NF-kB	Monoclonal	1:50	Santa-Cruz Biotechnology	Sc109	60 minutos
β -catenina	Monoclonal	1:200	Transduction		60 minutos

Quadro 4.2 - Concentrações, clones, procedência e tempo de incubação dos anticorpos utilizados na Imunofluorescência

As lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro com meio de montagem (Vectashild, Vector Lab, CA, USA), analisadas e fotografadas em microscópio de fluorescência (Zeiss Axiophot, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

Para detecção da apoptose, as linhagens celulares foram plaqueadas e tratadas da mesma forma como para o estudo da imunofluorescência. A apoptose celular foi identificada com o kit Annexin V (Santa Cruz[®]). O tampão fornecido no Kit foi diluído 10 X em água destilada (10 μ l do tampão em 90 μ l de água). Foram utilizados 5 μ l de anexina e 10 μ l de iodeto propídio. As lamínulas foram lavadas 4X em PBS para em seguida pingar o tampão e por último a anexina e o iodeto propídio. A reação permaneceu por 15 min abrigada de luz. Após nova lavagem, a lamínula foi montada (Vectashild, Vector Lab, CA, USA) e visualizada de acordo com o protocolo da imunofluorescência. A marcação citoplasmática em verde pela anexina significa que a célula está em apoptose inicial e a presença do iodeto propídio no núcleo pode indicar tanto um estágio tardio de apoptose como a ocorrência de necrose. Com o objetivo de comparar as taxas de apoptose no grupo controle com as taxas do grupo celecoxib, fez-se necessário a determinação do

índice de células apoptóticas. Para isto foram contadas, em três campos escolhidos de forma aleatória no microscópio, o número total de células presentes e o número de células em apoptose. Com isto obteve-se a porcentagem de células apoptóticas em cada linhagem celular.

4.6 Extração e quantificação de proteínas

Após a subconfluência (70% da área cultivável), foi realizado o tratamento com o celecoxib por 24h. O meio foi removido, as células lavadas 2X com PBSA a frio e colocadas sobre o gelo (4 °C). Foi adicionado 0,5 ml/placa de tampão RIPA⁺ (10 mM Tris HCl pH 7,5; 10mM 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 min nesta temperatura sob agitação. O lisado centrifugado a 15000 rpm por 15 min e o sobrenadante aliquoteado e estocado a -80 °C. As proteínas do lisado foram quantificadas com o kit BCA Protein Assay Kit da Pierce (Reagente B + Reagente A 1:50 + 25µl de amostra). A quantificação foi realizada em um aparelho de ELISA (ELX 800 Bio-Tek Instruments, Inc.) em placas de 96 poços contendo 200µl de BCA, além de 25 µl de cada lisado ou 25 µl de BSA, nas concentrações indicadas pelo fabricante, para realização da curva padrão. A leitura foi realizada com filtro de 562nm.

4.7 Western-blot (Burnette, 1981)

As alíquotas do lisado foram misturadas contendo 20µg de proteína total, com tampão de amostra para concentração final de 1X. Em seguida, as amostras foram fervidas por 5 min e então submetidas SDS-PAGE, sendo feita eletroforese à 100V por 180 minutos, em gel de acrilamida a 10% (Tabela 4.1). O padrão de peso molecular utilizado foi o Kaleidoscope Prestained Standards (BioRad).

Tabela 4.1 - Gel 10% acrilamida com SDS (10X16 cm)

	Gel de Separação	Gel de empilhamento
	10% (total 40 ml)	5% (total 10ml)
H ₂ O	15,9	6,80
Acrilamida/bisacrilamida 30:1	13,3	1,70
Tampão de separação	10,0	-
Tampão de empilhamento (4X conc.)	-	1,25
10% SDS	0,4	0,10
10% persulfato de amônio	0,4	0,10
Temed	0,016	0,01

A transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose foi feita por eletro-transferência em aparelho especial (Amersham mini VE) com o tampão de transferência (48mM Tris-Base; 39mM Glicina, 20% Metanol; pH 8,3) utilizado como recomendado pelo fabricante. A transferência foi feita com 30V por 180min. Após a transferência, a membrana foi submetida à fase de bloqueio ou lavada e seca para

posterior reação.

Para a imunoreação foi feito bloqueio dos sítios inespecíficos com 5% de leite em pó desnatado em TBST por 1-2h em temperatura ambiente, sob agitação. O bloqueio do pAkt foi realizado com TBST em BSA 1 %. Em seguida, a solução de bloqueio foi removida lavando-se a membrana com TBST. O anticorpo primário de interesse (anti-rabbit pAkt (Santa Cruz), anti-mouse COX-2 (Cayman), anti-rabbit NF- κ B (Santa Cruz), anti-mouse CD1 (Dako) ou anti-mouse β -Catenina (Transduction) foi diluído em solução de bloqueio e aplicado de acordo com o tempo recomendado pelo fabricante, e mantido à temperatura ambiente sob agitação (Tabela 4.4). Foram realizadas três lavagens para remoção do anticorpo não absorvido com TBST sob agitação durante 20 minutos e à temperatura ambiente. O anticorpo secundário foi então diluído em solução de bloqueio e aplicado por 1 hora, e depois lavado em TBST 1X por cinco minutos seguido de dois banhos de 10 minutos cada com PBS.

A detecção colorimétrica foi feita através do kit Bio-Rad. Uma parte do diluente concentrado Opti-4CN foi adicionada a nove partes de água deionizada. Foram utilizados 0,25ml para cada cm^2 da membrana. Para cada 10ml do diluente preparado foi adicionado 0,2ml de substrato Opti-4CN, misturando-se bem e colocando-os sobre a membrana. A membrana foi incubada no substrato por até 30min, depois lavada em água deionizada por 15 minutos, e pronta para documentação.

Soro	Tipo	[]	Procedência	Clones	Incubação
COX-2	Monoclonal	1:500	Cayman	160122	60 minutos
CD1	Monoclonal	1:250	Santa-Cruz	Sc8396	60 minutos
pAkt	Policlonal	1:250	Biotechnology Santa Cruz	Sc7985	60 minutos
NF-kB	Monoclonal	1:250	Biotechnology Santa-Cruz	Sc109	60 minutos
β -catenina	Monoclonal	1:750	Biotechnology Transduction		60 minutos

Quadro 4.3 - Concentrações, clones, procedência e tempo de incubação dos anticorpos utilizados no Western Blot

4.8 Análise Estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata para permitir a realização de testes estatísticos. Os experimentos, quando comparados dois a dois, foram submetidos aos testes t de student ou Mann Whitney e quando comparados em grupos de três ou mais colunas foram submetidos aos testes de variância ANOVA ou Kruskal Wallis. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0.05$.

5 RESULTADOS

Todos os experimentos foram realizados utilizando quatro linhagens celulares de carcinoma epidermóide: Hn-6, Hn-19, Hn-30, Hn-31 e HaCat (queratinócitos com mutação no p53). O medicamento Celecoxib foi aplicado nestas linhagens celulares, sempre na concentração de 100 μ M, quando atingiam a semiconfluência no frasco. O grupo controle recebeu sempre a mesma quantidade de DMSO, que foi o veículo utilizado para diluir o medicamento. O tempo de aplicação do medicamento variou de acordo com o experimento executado e será exemplificado a seguir.

5.1 Curva de Crescimento

Com o intuito de verificar a ação do celecoxib sobre a proliferação celular, foi realizada uma curva de crescimento após 24h, 48h e 72h da aplicação deste medicamento. Os resultados demonstraram uma clara ação do medicamento inibindo a proliferação celular de todas as cinco linhagens celulares. Esta ação teve relação direta com o tempo de exposição ao medicamento, mostrando relação inversamente proporcional entre o grupo tratado que teve contínua diminuição do número de células, e o grupo controle, que teve aumento do número de células nos períodos de 24h, 48h e 72h (Tabela 5.1 e Figura 5.1).

Tabela 5.1 – Número de células $\times 10^4$ antes e após tratamento com celecoxib ($100\mu\text{M}$) (* $p < 0.05$ teste t Student)

*	<i>HaCat</i>	<i>HaCat</i>	<i>Hn6</i>	<i>Hn6</i>	<i>Hn19</i>	<i>Hn19</i>	<i>Hn30</i>	<i>Hn30</i>	<i>Hn31</i>	<i>Hn31</i>
	<i>Cont</i>	<i>Cel</i>	<i>Cont</i>	<i>Cel</i>	<i>Cont</i>	<i>Cel</i>	<i>Cont</i>	<i>Cel</i>	<i>Cont</i>	<i>Cel</i>
0h	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
24hs	8.33	1.58	4.66	1.5	3.5	0.66	15.12	4.5	7.25	1.66
48hs	22.58	0.33	3.91	0.083	3.91	0.75	17.25	0.16	13.5	0.25
72hs	46.25	0.83	10.91	0.083	7.66	0.58	22.17	0	19.25	0.25

Figura 5.1 – Curva de crescimento celular das cinco linhagens celulares estudadas. Pode-se observar a proliferação celular contínua e progressiva após três dias no grupo controle, enquanto o grupo tratado com celecoxib ($100\mu\text{M}$) exibiu diminuição da proliferação celular (* $p < 0.05$ teste t Student)

5.2 Viabilidade Celular

Este experimento também foi realizado após 24h, 48h e 72h. Apesar de semelhante à curva de crescimento, aqui verificou-se a viabilidade celular e não apenas o número de células presentes. Os resultados mostraram que quanto maior o tempo de exposição ao medicamento menor o número de células viáveis em todas as linhagens celulares e maior o número de células viáveis no grupo controle (Figura 5.2). Os resultados da curva de crescimento e do teste de viabilidade celular demonstraram que o Celecoxib não só inibe a proliferação celular, mas também diminui o número de células viáveis.

Figura 5.2 – Teste de viabilidade celular realizado com o kit MTS cell Titer (promega). Pode-se observar a diminuição do número de células viáveis após aplicação do medicamento celecoxib (100µM) (* p<0.05 teste t Student)

5.3 Indução de Apoptose

Após comprovar que o celecoxib causava diminuição do número de células viáveis, tornou-se importante investigar se esta diminuição dava-se por meio de indução de apoptose ou se o medicamento estava primariamente causando necrose celular. O experimento foi realizado após 24h utilizando-se o kit Annexin V (Santa Cruz[®]) para identificação de células apoptóticas. A marcação citoplasmática da anexina em verde, comprovou a indução da apoptose celular pelo celecoxib. Apesar de o medicamento conseguir induzir apoptose em todas as linhagens celulares, notou-se diferença entre o grau de marcação nas diferentes linhagens. Após 24h houve grande elevação nos índices de apoptose das células tratadas, comparando-as com o grupo controle. A exceção ocorreu na linhagem Hn-19 que exibiu os menores índices de apoptose mesmo após 24h de tratamento (Tabela 5.2). A Figura 5.3 mostra a marcação pela anexina após 24h.

5.4 Padrão de Marcação da Imunofluorescência

Os ensaios de imunofluorescência têm o objetivo de identificar se as proteínas escolhidas neste trabalho estavam expressas nas linhagens celulares e identificar as suas respectivas localizações celulares. As linhagens HaCat, HN6, HN19, HN30 e

HN31 e seus respectivos pares foram tratados com celecoxib na concentração de 100 μ M por 24h. Em seguida foram realizados ensaios com cinco proteínas diferentes: pAkt, NF-kB, β -catenina, COX-2 e CD1. Primeiro identificou-se a presença e localização celular destas proteínas no grupo controle. A proteína pAkt apresentava localização tanto citoplasmática quanto nuclear nas células da linhagem HaCat. As demais linhagens celulares exibiram presença quase que exclusivamente nuclear de pAkt. A proteína NF-kB estava presente no citoplasma celular e raramente pôde ser detectada no núcleo das células. Na maioria das vezes este fato ocorreu quando as células estavam em mitose. A localização da β -catenina, quando havia contato celular, era na membrana citoplasmática e quando as células estavam isoladas ela podia ocupar o citoplasma. A proteína COX-2 localizava-se exclusivamente no citoplasma celular, enquanto a CD1 apresentava localização exclusivamente nuclear. Após aplicação do celecoxib, poucas alterações puderam ser observadas quanto à localização destas proteínas. Houve discreto aumento da localização citoplasmática do pAkt na linhagem Hn6, diminuição da expressão nuclear na HaCat, enquanto as linhagens Hn19, Hn30 e Hn31 mantiveram o mesmo padrão de marcação. O NF-kB manteve o padrão de expressão citoplasmático, porém aquelas células em divisão, com expressão nuclear, não mais puderam ser observadas. Houve uma diminuição de expressão da β -catenina na membrana citoplasmática, mesmo nas células que apresentavam contato entre si, e notou-se maior expressão citoplasmática. A proteína COX-2 manteve o mesmo padrão citoplasmático de localização, enquanto a CD1 diminuiu consideravelmente a sua expressão nuclear e por vezes passou a ser expressa no citoplasma.

Tabela 5.2 – Índice de células apoptóticas antes e após tratamento com celecoxib (100 μ M) por 24h (* $p < 0.05$ teste t Student)

	<i>HaCat</i>	<i>Hn6</i>	<i>Hn19</i>	<i>Hn30</i>	<i>Hn31</i>
Controle*	2%	4%	3%	5%	5%
Celecoxib*	26%	30%	15%	27%	31%

Figura 5.3 - Imunofluorescência das cinco linhagens celulares estudadas mostrando marcação citoplasmática pela anexina e nuclear pelo iodeto propídio

Figura 5.4 – Imunofluorescência da proteína pAkt. No grupo controle houve predomínio de marcação nuclear, mas em algumas células observou-se também marcação citoplasmática, principalmente na HaCat. Após tratamento com celecoxib o padrão de marcação nuclear continuou evidente, porém houve perda de expressão nuclear em algumas células da HaCat e aumento da expressão citoplasmática principalmente na linhagem Hn6

Figura 5.5 - Imunofluorescência da proteína COX-2. No grupo controle o padrão de expressão foi exclusivamente citoplasmático. Após tratamento com celecoxib o padrão de marcação citoplasmático permaneceu inalterado

Figura 5.6- Imunofluorescência da proteína β -catenina. No grupo controle nota-se o padrão de expressão citoplasmático em algumas células, com predomínio de marcação na membrana citoplasmática. Após tratamento com celecoxib observa-se diminuição de expressão na membrana e uma maior nitidez do padrão citoplasmático

Figura 5.7 - Imunofluorescência da proteína NFkB. No grupo controle o padrão de expressão é predominantemente citoplasmático, mas em raras células também pode-se observar marcação nuclear. Após tratamento com celecoxib o padrão de marcação citoplasmático permaneceu inalterado, porém a marcação nuclear está totalmente ausente

Figura 5.8 – Imunofluorescência da proteína CD1. No grupo controle nota-se o padrão de expressão nuclear. Após tratamento com celecoxib observa-se perda de expressão nuclear em algumas células que por vezes passam a exibir expressão citoplasmática

5.5 Western Blot

As amostras protéicas utilizadas foram de 20µg para cada linhagem. HaCat, HN6, HN19, HN30 e HN31 e seus respectivos pares foram tratados com celecoxib na concentração de 100µM por 24h. Assim, com quantidades totais idênticas, pôde-se comparar a expressão das já citadas proteínas nos dois grupos experimentais.

Em relação à ciclina D1, pudemos observar diminuição dos seus níveis de expressão nas linhagens HaCat, HN6, HN30 e HN31 quando comparadas com o grupo controle. Apesar da evidente diminuição de expressão da proteína CD1 após tratamento com celecoxib, mesmo assim, as bandas foram quantificadas com auxílio do programa Image J e foi realizada análise estatística. O resultado do teste estatístico comprovou a diminuição dos níveis de CD1 e mostrou que esta diferença era estatisticamente significativa (Teste t Student $p < 0.05$). A linhagem Hn19 não exibiu alteração da expressão da CD1 após tratamento com celecoxib.

Pelo fato das demais proteínas estudadas, pAkt, NF-kB, β -catenina e COX-2, apresentarem de alguma forma relação com a proteína CD1, esperava-se encontrar alteração nos seus níveis de expressão. Contudo, nenhuma destas quatro proteínas sofreu alteração após tratamento com celecoxib, as membranas e os gráficos podem ser vistos nas Figuras 5.9 a 5.15.

Figura 5.9 – representação gráfica da média de valores da quantificação da proteína β -catenina

Figura 5.12 – representação gráfica da média de valores da quantificação da proteína NF-kB

Figura 5.10 – representação gráfica da média de valores da quantificação da proteína COX-2

Figura 5.13 – representação gráfica da média de valores da quantificação da proteína CD1

Figura 5.11 – representação gráfica da média de valores da quantificação da proteína pAkt

Figura 5.15 - Western-blot. Notar a diminuição de expressão da proteína CD1

Figura 5.14 - Western-blot

6 DISCUSSÃO

O tratamento quimioterápico do câncer significa uma intervenção farmacológica com o intuito de parar, inibir ou reverter a carcinogênese. Muitos estudos relataram que AINEs reduziram significativamente o risco, número, tamanho ou disseminação de diferentes tipos de câncer (FU et al., 2004; KISMET et al., 2004; PATEL et al., 2005; SHISHODIA; KOUL; AGGARWAL, 2004; ZHANG et al., 2006). Estudos também sugerem que AINEs possuem efeito sobre o carcinoma epidermóide em diferentes regiões do corpo (AGGARWAI et al., 2004; ALTORKI, 2004; CHAN et al., 2005), porém poucos realizaram pesquisas envolvendo lesões localizadas em boca (SOOD et al., 2005). As quatro linhagens celulares aqui estudadas são da região de cabeça e pescoço, sendo a Hn6 da base da língua, Hn19 do linfonodo, Hn30 da faringe e a Hn31 do linfonodo. As linhagens Hn30 e Hn31 são do mesmo paciente e provavelmente por este motivo apresentam morfologia e velocidade de crescimento similar (CARDINALI et al., 1995). Estas quatro linhagens celulares de carcinoma epidermóide propiciaram a possibilidade de comparação entre lesões de regiões diferentes da cabeça e pescoço. A discussão deste trabalho tem a finalidade de examinar de forma crítica os resultados e comparar com os achados da literatura.

Uma questão importante para trabalhos que estudam os efeitos de medicamentos em cultura celular é a comparação das doses utilizadas *in vitro* e a dose necessária para fazer efeito nos pacientes. Quando um paciente ingere doses diárias de 400mg de celecoxib, a concentração plasmática fica em torno de 3µM. Muito abaixo da utilizada neste estudo. Esta discrepância pode ser explicada pelo

fato da regressão tumoral em animais ou seres humanos acontecer em semanas ou meses, enquanto em cultura de células isto ocorre em horas (GROSCH et al., 2006). Esta hipótese é corroborada por Patel et al. (2005), que provou que o celecoxib possui efeito anti-proliferativo em linhagens de carcinoma de próstata com doses iguais às alcançadas clinicamente quando o tratamento é realizado por um período de 96 horas.

Outra questão importante a ser esclarecida é o fato de recentemente ter sido relatado que o uso prolongado de altas doses de AINEs seletivos de COX-2 é capaz de provocar problemas cardíacos. Segundo Tuynman et al. (2005) esta afirmação pouco afeta a aplicação do celecoxib em pacientes com adenocarcinoma de esôfago. Primeiro porque é inaceitável o uso de medicamentos citotóxicos como quimioprevenção em pacientes que ainda não estão doentes, o que difere totalmente dos procedimentos quimioterapêuticos aceitos e adotados em pacientes com câncer. Segundo, o curto período de administração desta droga como terapia neo-adjuvante, por apenas algumas semanas, não deve levar a complicações cardiovasculares, ao contrário do tratamento quimiopreventivo com aplicações por alguns anos. Desta forma, precisa-se determinar se baixas doses do celecoxib são capazes de agir no tratamento quimioterápico do câncer. Cui, Yu e Hu (2005) mostraram que baixas doses do celecoxib causaram significativa inibição do crescimento do carcinoma hepatocelular em camundongos.

Nesta pesquisa, os resultados da curva de crescimento e do teste de viabilidade celular demonstraram que o celecoxib não só inibe a proliferação celular, mas também diminui o número de células viáveis. Os resultados da curva de crescimento foram obtidos com a contagem do número de células, com ou sem tratamento com celecoxib nos períodos de 24h, 48h e 72h, utilizando-se a câmara

de Neubauer. Os resultados demonstraram que o medicamento foi capaz de inibir a proliferação celular de forma estatisticamente significativa em todas as linhagens celulares estudadas. A utilização do método MTS complementa os resultados obtidos com a curva de crescimento. Esta metodologia consiste em transformar uma substância incolor em outra azul, proporcionalmente ao número de células viáveis. Neste caso os resultados mostraram que o número de células viáveis diminuiu no grupo tratado com celecoxib, já nas primeiras 24h após a aplicação do medicamento e a diminuição do número de células viáveis continuou progressivamente após 48h e 72h. Utilizando estas duas metodologias, o resultado fica mais confiável porque foi unido um método de contagem de células realizado pelo pesquisador com outro realizado em um aparelho de Elisa que faz leitura colorimétrica. Alguns trabalhos utilizaram esta mesma técnica para verificar a ação de diferentes doses do celecoxib sobre linhagens de carcinoma hepato-celular e os resultados mostraram forte inibição da proliferação (CUI; YU; HU, 2005; LIU et al., 2005). Lee et al., (2006) também observaram diminuição da proliferação celular com a mesma metodologia. Eles estabeleceram uma linhagem de carcinoma epidermóide de boca e aplicaram variadas concentrações de celecoxib, observando uma diminuição da proliferação dose e tempo dependente.

A forma como aconteceu a diminuição do número de células precisava ser averiguada. Uma substância que consegue eliminar células neoplásicas primariamente através da necrose não tem valia no combate ao câncer, uma vez que também irá matar o paciente comprometido com a neoplasia, portanto era importante verificar se o tratamento estava induzindo as células à apoptose. Com este fim, utilizou-se o Kit Annexin V (Santa Cruz) e o resultado do experimento comprovou que a eficácia do celecoxib na diminuição do número de células era

devido à indução da apoptose e não estava pura e simplesmente causando necrose celular. As linhagens celulares apresentaram considerável aumento dos índices de apoptose após 24h de tratamento com o celecoxib. A exceção ocorreu na linhagem Hn-19 que exibiu os menores índices de apoptose mesmo após 24h de tratamento. Este resultado é interessante, pois esta linhagem apesar dos baixos índices de apoptose apresentou importante diminuição nos índices de viabilidade celular, demonstrando que a diminuição da proliferação celular ocorreu mais pela parada no ciclo celular do que pela morte programada da célula.

Após a constatação dos efeitos do celecoxib sobre as linhagens celulares estudadas, o próximo passo foi estudar algumas proteínas para tentar entender de que forma este medicamento estava agindo, e a primeira proteína escolhida foi a COX-2. Esta escolha parece lógica, já que o prognóstico de algumas neoplasias, como de endométrio, ovário, estômago e esôfago parece estar diretamente relacionado com a expressão da COX-2, o que nos faz acreditar em um efeito terapêutico das drogas anti COX-2 no tratamento do câncer (O'CONNOR et al., 2004; SEO et al., 2004; TATSUGUCHI et al., 2004; van REES et al., 2002; YU, LL et al., 2004).

Uma questão importante a ser respondida pelos trabalhos que utilizam AINEs no tratamento de neoplasias malignas é se o seu efeito está relacionado com inibição da COX-2, e de que forma esta proteína atua dentro da via de sinalização celular. Em alguns trabalhos encontrou-se uma relação entre o NF-kB e a proteína COX-2, nos carcinomas de cólon-retal. O NF-kB seria responsável por induzir a COX-2, que por sua vez induziria fatores angiogênicos (VEGF, FGF, PDGF e TGF- β) (RAVI; BEDI, 2004). Yang et al. (2005), em um estudo utilizando como metodologia a imunoistoquímica, encontraram correlação entre a expressão das proteínas NF-kB

e COX-2 no carcinoma epidermóide de esôfago. Um estudo recente também demonstrou a regulação da proteína COX-2 pela β -catenina, tornando-a um alvo em potencial da quimioprevenção por medicamentos antiinflamatórios (KUNDU; CHOY; SURH, 2006).

No entanto, neste trabalho, a dose aplicada nas linhagens celulares foi capaz de inibir a proliferação celular e de induzir a apoptose sem que houvesse diminuição dos níveis de COX-2. Estes dados sugerem que apesar de o celecoxib ser um inibidor específico de COX-2, há outras formas de atuação do medicamento sobre o carcinoma epidermóide. Outros trabalhos já haviam levantado esta possibilidade e sugeriram que o efeito anti-neoplásico do celecoxib ocorreria através de uma via de sinalização celular independente da COX-2. Com o objetivo de responder esta questão CUI, YU e HU (2005) realizaram um estudo com duas linhagens de carcinoma hepatocelular que apresentavam diferentes níveis de PGE₂. A aplicação de celecoxib resultou em inibição da proliferação similar em ambas as linhagens. Além disso, quando acrescentou-se PGE₂ no meio de cultura, houve apenas uma discreta diminuição dos efeitos do celecoxib, com isso demonstraram a diminuição da proliferação celular de forma independente da expressão da COX-2. Outro estudo utilizando o 2,5-Dimethyl-celecoxib (DMC), que é uma substância estruturalmente com as mesmas características do celecoxib, exceto pelo fato de não possuir a função inibitória da COX-2, conseguiu, apesar de sua incapacidade em inibir a COX-2, mimetizar os efeitos anti-neoplásicos do celecoxib tanto *in vitro* como *in vivo*, indicando que ambas as drogas são capazes de produzir efeitos citotóxicos independentemente da COX-2 (PYRKO; SORIANO; KARDOSH, 2006).

Além da indução da apoptose e da inibição da proliferação celular, outro resultado interessante foi a diminuição da expressão dos níveis da proteína CD1,

identificada pelo western blot. A CD1 tem importante papel dentro do ciclo celular, sendo responsável pela progressão celular entre as fases G1/S. Os maiores níveis de CD1 estão presentes do meio da fase G1 até o ponto de checagem G1/S quando em conjunto principalmente com a Cdk 4 auxiliam as células na progressão dentro do ciclo celular (GOLIAS; CHARALABOPOULOS; CHARALABOPOULOS, 2004; LEHRBACH; NITA; CECCONELLO, 2003). Com a diminuição dos níveis de CD1 é possível que tenha havido uma parada das células dentro do ciclo celular mais especificamente na fase G1/S. Corroborando nossos achados, o trabalho de CHAN et al., (2005) mostrou que o celecoxib inibiu a proliferação de três linhagens celulares de carcinoma de faringe (HK-1, Hone-1 e CNE-2) através da diminuição dos níveis da CD1 e de forma independente da expressão da proteína COX-2. A imunofluorescência mostrou diminuição da expressão nuclear da CD1. Este fato também pode justificar a ação do celecoxib sobre a inibição da proliferação celular das linhagens celulares estudadas, já que quando fosforilada, a CD1 é exportada do núcleo para o citoplasma, e, saindo do núcleo, ela não atua como promotora do ciclo celular (DIEHL, 2002).

Sabe-se que a transição entre as diferentes fases do ciclo celular é controlada por diferentes ciclinas, Cdks e inibidores do ciclo celular. O tratamento de diferentes linhagens celulares tumorais com celecoxib induziu a parada do ciclo celular na fase G1, fato este que é acompanhado da diminuição da expressão das ciclinas A, B e D; aumento da expressão dos inibidores do ciclo celular $p21^{waf1}$ e $p27^{kip1}$ e perda da atividade das Cdks. Estas atividades parecem ser em parte independentes da inibição da COX-2 (GROSCH et al., 2006).

A proteína NF- κ B também foi estudada nesta pesquisa, já que a literatura mostrava uma possível relação entre esta proteína e a inibição de algumas

neoplasias, como no câncer cervical, após tratamento com celecoxib (KIM et al., 2004). Além disso, outro estudo demonstrou que a ativação do NF-kB pela fumaça do cigarro foi inibida pelo celecoxib em linhagens celulares de carcinoma de pequenas células de pulmão, tendo como consequência a posterior redução da expressão das proteínas COX-2, CD1 e metaloproteinases (SHISHODIA; KOUL; AGGARWAL, 2004).

Apesar das evidências na literatura da ação do celecoxib sobre o NF-kB, os resultados aqui apresentados não detectaram alteração nos níveis desta proteína. É importante ressaltar que o NF-kB só tem função na transcrição de outros genes quando localizado no núcleo, pois a sua localização citoplasmática significa que ele está sendo inativado pelo IKB. Através da técnica de imunofluorescência verificou-se que esta proteína estava situada no citoplasma e por este motivo não participava da sinalização celular das linhagens estudadas, fato este que justifica a não alteração dos seus níveis, constatado pelo western blot, após aplicação do celecoxib. Desta forma, com estes resultados não é possível concluir que o celecoxib não atue na proteína NF-kB, porém pode-se afirmar que ele é capaz de inibir as linhagens de carcinoma epidermóide por uma via que independe do NF-kB. A imunofluorescência mostrou algumas poucas células com expressão nuclear no grupo controle. Já o grupo tratado com celecoxib não mais exibiu este padrão de expressão. Apesar deste achado, fica difícil afirmar se a marcação nuclear era específica, pois só foi vista nas células em divisão e estas células tendem a expressar proteínas indiscriminadamente.

A proteína β -catenina faz parte tanto da via de sinalização celular do Wnt como do Akt e apresenta importante função na adesão celular, quando localizada na membrana celular, onde se liga à caderina E. A simples associação entre a pesquisa

de Yang et al. (2006) que mostra evidências da participação da β -catenina na carcinogênese do CECP, com a pesquisa de Brown, Skinner e Vogliagis (2001) que apontam os AINEs como capazes de inibir a progressão de lesões do colorretal através da alteração da β -catenina, já seria suficiente para justificar a realização de pesquisas que investiguem uma possível relação entre os efeitos dos AINEs sobre o CECP e a expressão da β -catenina. No entanto, há dois outros fatores que contribuíram para a inclusão desta proteína neste estudo. Primeiro, a demonstração da regulação da COX-2 pela β -catenina a torna um alvo em potencial dos AINEs. Segundo, a proteína β -catenina tem importante papel na transcrição da CD1 e esta proteína teve diminuição nos seus níveis de expressão nesta pesquisa, tornando importante averiguar se esta redução foi causada por uma alteração nos níveis de β -catenina.

Apesar dos resultados do western blot não suportarem uma relação entre a inibição da proliferação e os níveis de β -catenina, a técnica de imunofluorescência mostrou uma menor expressão na membrana citoplasmática e aumento no citoplasma celular após tratamento com celecoxib. Isto pode significar que a proteína β -catenina estaria sendo degradada no citoplasma. A β -catenina existe na célula em duas condições distintas: como uma forma de ligação entre células, unindo a caderina-E com filamentos de actina ou livre no citoplasma. A β -catenina, localizada na membrana pode ser liberada no citoplasma quando fosforilada. Quando livre no citoplasma, em células sem estímulo, a β -catenina sofre degradação proteossomal da seguinte forma: ela é primeiro fosforilada na serina 45 pela kinase CKI e subseqüentemente na serina 33/37 e treonina 41 pelo GSK-3. Quando fosforilada, a β -catenina é reconhecida pela ubiquitina ligase hTrcp e em seguida degradada pelo sistema 26S proteossomal. Ambos, APC e Axina, têm importante papel neste

processo ligando-se a diferentes regiões da β -catenina facilitando a ação do GSK3 (KUNDU; CHOY; SURH, 2006).

Os resultados desta pesquisa provaram que o celecoxib é capaz de combater as linhagens de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, diminuindo os níveis de expressão da proteína CD1 e aumentando os índices de apoptose. A proteína pAkt é uma kinase que possui papel chave na via de sinalização celular do carcinoma epidermóide, já que é responsável por fosforilar dezenas de outras proteínas contribuindo para a progressão desta neoplasia. Por isso ela foi investigada neste trabalho. A imunofluorescência detectou a sua presença tanto no núcleo como no citoplasma das linhagens celulares.

O Akt, quando localizado no citoplasma, está inativo, após um estímulo, que pode ser um fator de crescimento, ele é recrutado para a membrana citoplasmática juntamente com pdk-1 onde será fosforilado e irá desencadear uma cascata de sinalização celular responsável pela proliferação celular. Wang e Brattain (2006) mostraram, em seu trabalho, que a membrana não é o único local onde o Akt pode ser ativado, além de presente, ele também pode ser ativado no núcleo. Neste trabalho, a imunofluorescência mostrou o pAkt predominantemente no núcleo e após aplicação do celecoxib houve na linhagem Hn6 um aumento de pAkt no citoplasma. Caso o pAkt esteja sendo ativado no núcleo das células aqui estudadas, talvez neste caso em que houve aumento da expressão citoplasmática do pAkt, o celecoxib esteja diminuindo os níveis de CD1 por intermédio de uma alteração de localização celular do pAkt que passou do núcleo para o citoplasma. A perda da expressão nuclear em algumas células da HaCat também pode indicar um efeito do medicamento sobre o pAkt. Com relação aos resultados do western blot, Grosch et al. (2006) sugerem que o celecoxib atua em diferentes neoplasias diminuindo os

níveis de pAkt, mas sem alterar os níveis da proteína COX-2. Estes resultados divergem dos encontrados nesta pesquisa. Neste estudo os níveis de pAkt mantiveram-se inalterados após o tratamento das linhagens celulares com o celecoxib.

7 CONCLUSÕES

Após aplicação do medicamento celecoxib houve diminuição da proliferação celular e indução de apoptose em todas as linhagens celulares estudadas. A diminuição da proliferação celular das linhagens de carcinoma epidermóide ocorreu através da diminuição dos níveis da CD1, o que provavelmente ocasionou uma parada do ciclo celular na fase G1. A inibição da proliferação celular em decorrência da diminuição da proteína CD1 aconteceu de forma independente das demais proteínas estudadas.

REFERÊNCIAS¹

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

Aggarwal S, Takada Y, Singh S, 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. *Int J Cancer* 2004;111(5):679-92.

Altorki NK, Keresztes RS, Port JL, Libby DM, Korst RJ, Flieder DB, et al. Celecoxib, a Selective Cyclo-Oxygenase-2 Inhibitor, Enhances the Preoperative Paclitaxel and Carboplatin in Early-Stage Response to Non-Small-Cell Lung Cancer. *Clin Oncol* 2003;21(14):2645-50.

Altorki N. COX-2 a target for prevention and treatment of esophageal cancer. *J Surg Res* 2004;117(1):114-20.

Brown WA, Skinner SA, Vogliagis D. Inhibition of β -catenin translocation in rodent colorectal tumours. *Dig Dis Sci* 2001;46(11):2314-21.

Cardinali M, Pietraszkiewsc H, Ensley JF, Robbins KC. Tyrosine phosphorylation as a marker for aberrantly regulated growth-promoting pathways in cell lines derived from head and neck malignancies. *Int J Cancer* 1995;61:98-103.

Cardoso SV. Estudo da expressão imunoistoquímica da metalotioneína em carcinoma epidermóide bucal [Dissertação de mestrado]. Belo Horizonte: 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 Res* 2004;551(1-2):199-211.

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

Chan CM, Ma BB, Wong SC, Chan AT. Celecoxib induces dose dependent growth inhibition in nasopharyngeal carcinoma cell lines independent of cyclooxygenase-2 expression. *Biomed Pharmacot* 2005;59(Supl 2):268-71.

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.

Chun KS, Surh YJ. Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention. *Biochem Pharmacol* 2004;68(6):1089-100.

Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins: patologia estrutural e funcional. 6^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2000.

Cui W, Yu CH, Hu KQ. In vitro and in vivo effects and mechanisms of celecoxib-induced growth inhibition of human hepatocellular carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2005;11(22):8213-21.

Deng J, Xia W, Miller SA, Wen Y, Wang H-Y, Hung M-C. Crossregulation of NF- κ B by the APC/GSK-3 β /Catenin Pathway. *Mol Carcinog* 2004;39(3):139-46.

Diehl JA. Cycling to cancer with cyclin D1. *Cancer Biol Ther* 2002;1(3): 226-31.

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

Dvory-Sobol H, Cohen-Noyman E, Kazanov D, Figer A, Birkenfeld S, Madar-Shapiro L, et al. Celecoxib leads to G2/M arrest by induction of p21 and down-regulation of cyclin B1 expression in a p53-independent manner. *Eur J Cancer* 2006;42(3):422-6.

Eversole LR. Clinical outline of oral pathology: diagnosis and treatment. 2nd ed. Philadelphia: Lea & Fabiger; 1984.

Faria PR, Cardoso SV, Nishioka S, Silva SJ, Loyola AM. Clinical presentation of patients with oral squamous cell carcinoma when first seen by dentists or physicians in a teaching hospital in Brazil. *Clin Oral Invest* 2003;7(1):46-51.

Franceschi S, Bidoli E, Herrero R, Muñoz N. Comparison of cancers of the oral cavity and pharynx worldwide: ethiological clues. *Oral Oncol* 2000;36(1):106-15.

Fu SL, Wu YI, Zhang YP, Qiao MM, Chen Y. Anti-cancer effects of COX-2 inhibitors and their correlation with angiogenesis and invasion in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2004;10(13):1971-4.

Golias CH, Charalabopoulos A, Charalabopoulos K. Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *Int J Clin Pract* 2004;58(12):1134-41.

Grosch R, Maier TJ, Schiffmann S, Geisslinger G. Cyclooxygenase-2 (COX-2)-independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. *J Natl Cancer Inst* 2006;98(11):736-47.

Heeren P, Plukker J, van Dullemen H, Nap R, Hollema H. Prognostic role of cyclooxygenase-2 expression in esophageal carcinoma. *Cancer Letters* 2005;225(2):283-9.

HILMI I, GOH KL. Chemoprevention of colorectal cancer with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Chin J Dig Dis* 2006;7(1):1-6.

Hindle I, Downer MC, Moles DR, Speight PM. Is alcohol responsible for more intra-oral cancer? *Oral Oncol* 2000;36(4):328-33.

Hinz B, Brune K, Pahl, A. Cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes is modulated by cyclic AMP, prostaglandin E2 and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;278(3):790-6.

Hinz B, Brune K. Cyclooxygenase-2 – 10 years later. *J Pharmacol Exper Therap* 2001;300(2):367-75.

Hossfeld DK, Sherman CD, Love RR. Manual de oncologia clínica. 2ª ed. Berlin: Springer-Verlag; 1990.

Instituto Nacional do Câncer - INCA. Estimativa de incidência e mortalidade por câncer no Brasil – 2000 [documento eletrônico]. Ministério da Saúde [citado em 10 de agosto de 2004]. Disponível em URL: <http://www.inca.org.br/epidemiologia/estimativa2000/brasil.html> [20050815].

Instituto Nacional do Câncer - INCA. Registro hospitalar de câncer: dados das unidades hospitalares do INCA – Relatório anual 1993. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 2000.

Jiang J-G, Tang J-B, Chen C-H, Liu B-X, Fu X-N, Zhu Z-H, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in human esophageal squamous cell carcinomas. *World J Gastroenterol* 2004;10(15):2168-73.

Joyce D, Albanese C, Steer J, Fu M, Bouzazhah B, Pestell RG. NF- κ B and cell-cycle regulation: the cyclin connection. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001;12(1):73-90.

Karim RZ, Tse GMK, Putti TC, Scolyer RA, Lee CS. The significance of the Wnt pathway in the pathology of human cancers. *Pathol* 2004;36(2):120-8.

Kern MA, Haugg AM, Koch AF, Schilling T, Breuhahn K, Walczak H, Fleischer B, et al. Cyclooxygenase-2 inhibition induces apoptosis signaling via death receptors and mitochondria in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2006;66(14):7059-66.

Kim SH, Song SH, Kim SG, Chun KS, Lim SY, Na HK, et al. Celecoxib induces apoptosis in cervical cancer cells independent of cyclooxygenase using NF- κ B as a possible target. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004;130(9):551-60.

Kismet K, Akay MT, Abbasoglu O, Ercan A. Celecoxib: a potent cyclooxygenase-2 inhibitor in cancer prevention. *Cancer Detect Prev* 2004;28(2):127-42.

Kraemer SA, Meade EA, Dewitt DL. Prostaglandin endoperoxidase synthase gene structure: identification of the transcriptional start site and 5'-flanking regulatory sequences. *Arch Biochem Biophys* 1992;293(2):391-400.

Kundu JK, Choi K-Y, Surh Y-J. β -catenin-mediated signaling: A novel molecular target for chemoprevention with anti-inflammatory substances. *Biochem Biophys Acta* 2006;1765(1):14-24.

Lee SH, Soyoola E, Chanmugam P, Hart S, Sun W, Zhong H, et al. Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 1992;267(36):25934-8.

Lee EJ, Kim SH, Kwark YE, Kim J. Heterogeneous nuclear ribonuclear protein C is increased in the celecoxib-induced growth inhibition of human oral squamous cell carcinoma. *Exper Mol Med* 2006;38(3):203-9.

Leese PT, Hubbard RC, Karim A, Isakson PC, Yu SS, Geis GS. Effects of celecoxib a novel cyclooxygenase-2 inhibitor on platelet function in health adults: a randomized, controlled trial. *J Clin Pharmacol* 2000;40(2):124-32.

Lehrbach DM, Nita ME, Cecconello I. Molecular aspects of esophageal squamous cell carcinoma carcinogenesis. *Arq Gastroenterol* 2003;40(4):256-61.

Licitra L, Locati LD, Bossi P. Head and neck cancer. *Ann Oncol* 2004;15(Suppl 4):iv267–iv73.

Limburg PJ, Wei W, Ahnen DJ, Qiao Y, Hawk ET, Wang G, et al. Randomized, placebo-controlled, esophageal squamous cell cancer chemoprevention trial of selenomethionine and celecoxib. *Gastroenterol* 2005;129(3):863–73.

Lippman SM, Sudbo J, Hong WK. Oral cancer prevention an the evolution of molecular-targeted drug development. *J Clin Oncol* 2005;23(2):346-56.

Liu N-B, Peng T, Pan C, Yao Y-Y, Shen B, Leng J. Overexpression of cyclooxygenase-2 in human HepG2, Bel-7402 and SMMC-7721 hepatoma cell lines and mechanism of cyclooxygenase-2 selective inhibitor celecoxib-induced cell growth inhibition and apoptosis. *World J Gastroenterol* 2005;11(40):6281-7.

Luo J, Manning BD, Cantley LC. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: Rationale and promise. *Cancer Cell* 2003;4(4):257-62.

Maier TJ, Janssen A, Schmidt R, Geisslinger G, Grosch R. Targeting the beta-catenin/APC pathway: a novel mechanism to explain the cyclooxygenase-2-independent anticarcinogenic effects of celecoxib in human colon carcinoma cells. *FASEB J* 2005;19(10):1353-5.

McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, Kapoor S, Lawson JA, Fitzgerald GA. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(1):272-7.

McGettigan P, Henry D. Cardiovascular risk and inhibition of cyclooxygenase a systematic review of the observational studies of selective and nonselective inhibitors of cyclooxygenase 2. *JAMA* 2006;296(13):Epub.

Mashberg A. Diagnosis of early oral oropharyngeal squamous carcinoma: obstacles and their amelioration. *Oral Oncol* 2000;36(3):253-5.

Moon RT. Wnt/ β -Catenin pathway. *Sci Stke* 2005;271:1-4.

Moraitis D, Du B, Lorenzo MS, Boyle JO, Weksler BB, Cohen EG, et al. Levels of cyclooxygenase-2 are increased in the oral mucosa of smokers: evidence for the role of epidermal growth factor receptor and its ligands. *Cancer Res* 2005;65(2):664-70.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot J. Oral and maxillofacial pathology. Philadelphia: W.B. Saunders; 1995.

Niino H, Otsuka T, Izuhara K, Yamaoka K, Ohshima K, Tanabe T, et al. Regulation by interleukin-10 and interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils. *Blood* 1997;89(5):1621-8.

Nozoe T, Ezaki T, Kabashima A, Baba H, Maehara Y. Significance of immunohistochemical expression of cyclooxygenase-2 in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Am J Surg* 2005;189(1):110-5.

O'Connor JK, Arent J, Lee RJ, Fischbach J, Gaffney DK. Cyclooxygenase-2 correlates with diminished survival in invasive breast cancer treated with mastectomy and radiotherapy. *Int J Radiation Oncol Biol Phys* 2004;58(4):1034-40.

Ogden GR, Wight AJ. Aetiology of oral cancer: alcohol. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1998;36(4):247-51.

Onoe Y, Miyaura C, Kaminakayashiki T, Nagai Y, Noguchi K, Chen QR, et al. IL-13 AND IL-4 inhibit bone resorption by suppressing cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin synthesis in osteoblasts. *J Immunol* 1996;156(2):758-64.

Park JS, Jun HJ, Cho MJ, Cho KH, Lee JS, Ji, Pyo H. Radiosensitivity enhancement by combined treatment of celecoxib and gefitinib on human lung cancer cells. *Clin Cancer Res* 2006;12(16):4989-99.

Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999;80(6):827-41.

Patel MI, Subbaramaiah K, Du B, Chang M, Yang P, Newman RA, et al. Celecoxib inhibits prostate cancer growth: evidence of a cyclooxygenase-2-independent mechanism. *Clin Cancer Res* 2005;11(5):1999-2007.

Perez-Ordóñez B, Beauchemin M, Jordan RCK. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Pathol* 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 Rev* 1999;20(4):501-34.

Petty WJ, Dragnev KH, Dmitrovsky E. Cyclin D1 as a target for chemoprevention. *Lung Cancer* 2003;41(Supl 1):155-61.

Prince S, Bailey BMW. Squamous carcinoma of the tongue: review. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1999;37(3):164-74.

Pyrko P, Soriano N, Kardosh A, Yen-Ting Liu², Uddin J, Petasis NA, et al. Downregulation of survivin expression and concomitant induction of apoptosis by celecoxib and its non-cyclooxygenase-2-inhibitory analog, dimethyl-celecoxib (DMC), in tumor cells in vitro and in vivo. *Molecular Cancer* 2006 Epub.

Ravi R, Bedi A. NF- κ B in cancer: a friend turned foe. *Drug Resist Update* 2004;7(1):53-67.

Reddy ST, Wadleigh DJ, Herschman HR. Transcriptional regulation of the cyclooxygenase-2 gene in activated mast cells. *J Biol Chem* 2000;275(5):3107-13.

Rodríguez-Pinilla M, Rodríguez-Peralto JL, Hitt R, Sánchez JJ, Sánchez-Verde L, Alameddine F, et al. β -Catenin, NF- κ B and FAS protein expression are independent events in head and neck cancer: study of their association with clinical parameters. *Cancer Letters* 2005;230(1):141-8.

Roh JL, Sung MW, Park SW, Heo DS, Lee DW, Kim KH. Celecoxib can prevent tumor growth and distant metastasis in postoperative setting. *Cancer Res* 2004;64(9):3230-5.

Sapp JP, Eversole LR, Wysocki GP. *Patología oral y maxilofacial contemporánea*. Madrid: Harcourt Brace; 1998.

Seo SS, Song YS, Kang D-H, Park IA, Bang YJ, Kang SB, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in association with clinicopathological prognostic factors and molecular markers in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2004;92(3):927-35.

Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, Dubois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 1998;58(2):362-6.

Shibata M, Kodani I, Osaki M, Araki K, Adachi H, Ryoike K, et al. Cyclo-oxygenase-1 and -2 expression in human oral mucosa, dysplasias and squamous cell carcinomas and their pathological significance. *Oral Oncol* 2005;41(3):304-12.

Shin VY, Liu ESL, Ye Y-N, Koo MWL, Chu K-M, Cho C-H. A mechanistic study of cigarette smoke and cyclooxygenase-2 on proliferation of gastric cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;195(1):103-12.

Shishodia S, Aggarwal BB. Cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor celecoxib abrogates activation of cigarette smoke-induced nuclear factor (NF)-kappaB by suppression activation of IkappaBalpha Kinase in human non-small cell lung carcinoma: correlation with suppression of cyclin D1, COX-2, and matrix metalloproteinase 9. *Cancer Res* 2004;64(14):5004-12.

Shishodia S, Koul D, Aggarwal BB. Cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor celecoxib abrogates TNF- induced NF-kappa B activation through inhibition of activation of Ikappa B alpha kinase and Akt in human non-small cell lung carcinoma: correlation with suppression of COX-2 synthesis. *J Immunol* 2004;173(3):2011-22.

Sivula A, Buskens CJ, van Rees BP, Haglund C, Offerhaus GJA, van Lanschot JJB, et al. Prognostic role of cyclooxygenase-2 in neoadjuvant-treated patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Int J Cancer* 2005;116(6):903-8.

Solomon SD, Pfeffer MA, McMurray JJV, Fowler R, Finn P, Levin B, et al. Effect of celecoxib on cardiovascular events and blood pressure in two trials for the prevention of colorectal adenomas. *J Am Heart Assoc* 2006;114(10):1028-35.

Sood S, Shiff SJ, Yang CS, Chen X. Selection of topically applied non-steroidal anti-inflammatory drugs for oral cancer chemoprevention. *Oral Oncol* 2005;41(6):562-7.

Stacey DW. Cyclin D1 serves as a cell cycle regulatory switch in actively proliferating cells. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15(2):158-63.

St-Germain M-E, Gagnon V, Parent S, Asselin E. Regulation of COX-2 protein expression by Akt in endometrial cancer cells is mediated through NF- κ B/I κ B pathway. *Molec Cancer* 2004;3(7):1-11.

Tang Q, Gonzales M, Inoue H, Bowden T. Roles of akt and glycogen synthase kinase 3 β in the ultraviolet b induction of cyclooxygenase-2 transcription in human keratinocytes. *Cancer Res* 2001;61(11):4329-32.

Tatsuguchi A, Matsui K, Shinji Y, Gudis K, Tsukui T, Kishida T, et al. Cyclooxygenase-2 expression correlates with angiogenesis and apoptosis in gastric cancer tissue. *Hum Pathol* 2004;35(4):488-95.

Testa JR, Bellacosa A. Akt plays a central role in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98(20):10983-5.

Tive L. Celecoxib clinical profile. *Rheumatol* 2000;39(Supl 2):21-8.

Tsujii M, Kawano S, Dubois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(7):3336-40.

Tuynman JB, Buskens CJ, Kemper K, ten Kate FJW, Offerhaus JA, Richel DJ, van Lanschot JJB. Neoadjuvant selective cox-2 inhibition down-regulates important oncogenic pathways in patients with esophageal adenocarcinoma. *Ann Surg* 2005;242(6):840-50.

Van Rees BP, Saukkonen K, Ristimäki A, Polkowski W, Tytgat GNJ, Drilenburg P, et al. Cyclooxygenase -2 expression during carcinogenesis in the human stomach. *J Pathology* 2002;196(2):171-9.

Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 1971;231(25):232-5.

Vara, JAF, Casado E, Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, Gonzalez-Baron M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* 2004;30(2):193-204.

Varas-Lorenzo C, Andrew Maguire A, Castellsague J, Perez-Gutthann S. Quantitative assessment of the gastrointestinal and cardiovascular risk-benefit of celecoxib compared to individual NSAIDs at the population level. *Pharmacoepidemiol Drug Safety* 2006 In press.

Vermorken JB. Medical treatment in head and neck cancer. *Ann Oncol* 2005;16(Suppl 2): ii258–ii64.

Vital-Reyes V, Rodriguez-Burford C, Chhieng DC, Oelschlager DK, Reyes-Fuentes A, Barnes M, Grizzle WE. celecoxib inhibits cellular growth, decreases ki-67 expression and modifies apoptosis in ovarian cancer cell lines. *Arch Med Res* 2006;37(6):689–95.

Zhang G, Zhou X, Xue L, Quan L, Wang Y, Zhou C, et al. Accumulation of cytoplasmic b-catenin correlates with reduced expression of E-cadherin, but not with phosphorylated Akt in esophageal squamous cell carcinoma: Immunohistochemical study. *Pathol Int* 2005;55(6):310-7.

Zhang G-S, Liu D-S, Dai C-W, Li R-J. Antitumor effects of celecoxib on k562 leukemia cells are mediated by cell-cycle arrest, caspase-3 activation, and downregulation of cox-2 expression and are synergistic with hydroxyurea or imatinib. *Am J Hematol* 2006;81(4):242–55.

Wahi PN, Cohen B, Luthra UK, Torloni H. Types histologiques des tumeurs de la bouche et de l'oropharynx. Classification histologique internationale des tumeurs n^o. 4. Genenè/Roto-Sadag: Organisation Mondiale de la Santé; 1971.

Wang R, Brattain MG. AKT can be activated in the nucleus. *Cell Signal* 2006 Epub.

West KA, Castillo SS, Dennis PA. Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. *Drug Resint Upd* 2002;5(6):234-48.

Wirth LJ, Haddad RI, Lindeman NI, Zhao X, Lee JC, Joshi VA, Norris Jr CM, et al. Phase I study of gefitinib plus celecoxib in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 2005;23(28):6976-81.

Yang GZ, Li L, Ding HY, Zhou JS. Cyclooxygenase-2 is over-expressed in Chinese esophageal squamous cell carcinoma, and correlated with NF-kappaB: An immunohistochemical study. *Exp Mol Pathol* 2005;79(3):214-8.

Yang F, Zeng Q, Yu G, Li S, Wang C-Y . Wnt/h-catenin signaling inhibits death receptor-mediated apoptosis and promotes invasive growth of HNSCC. *Cel Signal* 2006;18(5):679-87.

Ye F, Wu J, Dunn T, Yi J, Tong X, Zhang D. Inhibition of cyclooxygenase-2 activity in head and neck cancer cells by genistein. *Cancer Letters* 2004;211(1):39-46.

Yu LL, Yu HG, Yu JP, Luo HS. Nuclear factor-kappa B regulates cyclooxygenase- 2 expression and cell proliferation in human colorectal carcinoma tissue. *Eksp Onkol* 2004;26(1):40-7.

Yu HP, Shi LY, Lu WH, Su YH, Li YY, Xu SQ. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in human esophageal cancer and in vitro inhibition by a specific COX-2 inhibitor, NS-398. *J Gastroenterol Hepatol* 2004;19(6):638-42.

ANEXO A – Parecer do comitê de ética em pesquisa

Faculdade de Odontologia
Universidade de São Paulo

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 70/05

O Grupo de Trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa "*Análise da expressão e mecanismos de ação da proteína COX-2 em células cultivadas de Carcinoma Epidermóide Bucal Humano*", de responsabilidade do Pesquisador **Sérgio de Melo Alves Junior**, sob orientação do Professor Doutor **Décio dos Santos Pinto Júnior**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 06 de junho de 2005

Prof.Dr. Rogério Nogueira de Oliveira
Coordenador do CEP-FOUSP