ALUANA MARIA DA COSTA DAL VECHIO

**Efeito apoptótico do Celecoxib em linhagens celulares derivadas de carcinoma
epidermóide de boca**

São Paulo
2011

Aluana Maria da Costa Dal Vechio

**Efeito apoptótico do Celecoxib em linhagens celulares derivadas de carcinoma
epidermóide de boca**

Versão Corrigida

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

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto
Júnior

São Paulo
2011

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

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

Vechio, Aluana Maria da Costa Dal

Efeito apoptótico do Celecoxib em linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de boca [versão corrigida] / Aluana Maria da Costa Dal Vechio; orientador Décio dos Santos Pinto Júnior. -- São Paulo, 2011.

93p. : fig., tab.; 30 cm.

Tese -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Patologia Bucal. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida de acordo com sugestões da Banca Examinadora em 04/08/2011

1. Carcinoma de células escamosas – Celecoxib – Efeitos. 2. Linhagens celular – Proliferação – Inibição. 3. Patologia Bucal. I. Pinto Júnior, Décio dos Santos. II. Título.

Vechio AMCD. Efeito apoptótico do Celecoxib em linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de boca Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Patologia Bucal.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

À **Deus**, e aos bons **espíritos de Luz**, pela força, amparo e conselhos sábios,

E a vocês, que fazem parte da minha vida:

Ao meu amado irmão, o **Fran**, uma pessoa simplesmente sensacional, que sempre foi meu companheiro, conselheiro, porto seguro e um orgulho para mim, enfim, você sempre será meu irmãozinho querido e um eterno amigo.

Aos meus pais, **Francisco** e **Dalva**, que sempre me apoiaram e me deram forças para eu prosseguir em frente e nunca deixaram eu desistir dos meus sonhos, mesmo que eles parecessem impossíveis.

Ao **Zé** pelo companherismo, carinho e acolhimento.

À minha querida avó **Maria** (*in memoriam*) pela paciência, amor e dedicação.

Agradecimento Especial

Ao Prof. Dr. **Décio dos Santos Pinto Júnior**, um profissional exemplar e um patologista invejável, agradeço por tudo que você me ensinou tanto durante as rotinas como no laboratório. Gostaria de dizer que se hoje estou terminando o doutorado é porque eu tive a sua ajuda e acolhimento em momentos bastante delicados. Agradeço por você ter acreditado em mim desde a iniciação, por toda ajuda que eu obtive no mestrado, por você ter me aceitado como sua orientada no meio do doutorado e ter comprado essa “briga” comigo. Sem dúvida, a sua ajuda foi essencial para a minha formação profissional e pessoal. Décio, você foi mais que um mestre, você foi um grande amigo.

Agradecimentos

Aos professores da disciplina da Patologia Bucal, **Marília, Suzana, Marina, Karém, Andrea e Fábio** e da Estomatologia clínica **Dante, Celso, Fábio, Fernando, Norberto e Andréia** meus sinceros agradecimentos pelos conhecimentos transmitidos e pela convivência agradável.

Aos colegas festeiros da patologia: **Rita, Bianca, Carla, Gabriela, Gustavo, Karin, Kaue, Luana, Lucyene, Marco Túlio, Michella e Clarinha**. Vocês contribuíram por dias mais alegres. Muito obrigada pelo companheirismo e a agradável e divertida convivência. Sempre lembrarei de vocês com carinho.

À todos os colegas do curso de pós graduação: **Ana Cláudia, Ana Paula, Carina, Catalina, Claudia, Fábio, Felipe Daltoé, Joelma, Juliana Seo, Marcio Augusto Márcio Cristofaro, Maria Fernanda, Marina Lara, Fabiana, Brunno, Roberto, Nathalie, Nelise, Paula, Renata, Ronald**. Muito obrigada!

Aos colegas do curso de pós graduação que participaram de alguma forma da minha vida e no momento não estão mais aqui na patologia: **Flávia Caló, Paty Adachi, Helder, Camila Rodini, Kati, Thaís, Márcia, Tati Libório, Juliana, Tuti (Arthur), Alexandra, Camila Fragata, Tessa, Fernanda Yamamoto, Flávia Pontes, Curry, Kívia, Renata Acay, Marina, Yonara, Serginho, Paulo Brás e Paulo SS**. Muito obrigada!

Aos funcionários simpáticos e prestativos da disciplina: **Zilda, Néia, Bia, Elisa, Juvani, Nair e Adriana**, meus sinceros agradecimentos.

Aos meus amigos de graduação: **Alcimara, Angélica, Deisy, Hélcio, Karina, Renatinha, Renata W, Tathy e Thiago**, pelos bons e maus momentos que passamos e pelo apoio dado quando escolhi fazer a pós graduação na patologia... amigos, quanta saudades.

Angel, Renatinha, Luana, Paty e Adriana valeu pelas saidinhas e momentos divertidíssimos que tivemos. E uma coisa é certa e eu aprendi: “Amigues, é só seguir a professora que vocês passam de ano”...(risos).

Nina, Andréia, Renata Gomes, Renata Araújo, Carol, Aline, D. Fátima e Kamila, um time e tanto....(risos). Obrigada pelas conversas, brincadeiras e amizade.

Julia, Denise e Ju Noguti, obrigada pela oportunidade, ensinamentos e pela amizade.

Cida, valeu pelas longas conversas de segunda a noite...quantas histórias.

***"Há pessoas que transformam o sol
numa simples mancha amarela,
mas há também aquelas que fazem
de uma simples mancha amarela
o próprio sol."***

Pablo Picasso

***“Uma vida sem desafios
não vale a pena ser vivida”***

Sócrates

Vechio AMCD. Efeito apoptótico do Celecoxib em linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de boca [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011.

RESUMO

O Celecoxib, antiinflamatório não esteroide, inibidor seletivo da COX-2, tem se mostrado um importante agente anticarcinogênico, mas o seu papel no carcinoma epidermóide de boca (CEB) não é totalmente compreendido. Sabe-se que diversas alterações genéticas estão associadas à patogênese do CEB, a neoplasia maligna mais comum de cabeça e pescoço. Algumas dessas alterações comprometem proteínas pertencentes à via de sinalização do Akt, envolvida em diferentes fenômenos celulares. É sabido que Akt pode ativar o fator de transcrição NF-κB, o qual tem importante participação na fisiologia normal e no câncer. A proteína COX-2, descrita inicialmente em processos inflamatórios, está associada com a oncogênese e recentemente tem sido associada com a via de sinalização do Akt e com o NF-κB. Portanto, o objetivo deste estudo foi analisar o efeito do Celecoxib sobre linhagens celulares de carcinoma epidermóide de boca e verificar a localização intracelular e a expressão das proteínas pAkt, NF-κB e COX-2 em linhagens celulares de carcinoma epidermóide de boca após o tratamento com o Celecoxib. Através da técnica de imunofluorescência, foram analisados os padrões de expressão das proteínas pAkt, NFκB e COX-2 em quatro linhagens celulares de carcinoma epidermóide bucal submetidas ao tratamento com Celecoxib, cuja a dose e o tempo foram obtidos a partir de ensaios de viabilidade celular. Também se realizou ensaio de apoptose celular. Como controle utilizou-se células não tratadas com o medicamento. O Celecoxib na dose de 30 μM por 24 horas causa apoptose. Na técnica de western blot, somente a linhagem SCC15 apresentou uma diminuição significativa para a COX-2. Entretanto, para p-Akt e NF-κB nenhuma alteração na expressão foi observada entre os grupos controle e tratado. Na imunofluorescência, houve alteração no padrão de expressão das proteínas pAkt, NF-κB e COX-2, quando se comparou os grupos controle e tratado. Portanto, o Celecoxib pode ser um eficaz agente terapêutico, uma vez que demonstrou grande eficácia na inibição da proliferação celular de linhagens celulares de CEB.

Palavras-chave: Carcinoma epidermóide. Celecoxib. Via de sinalização p-Akt/NF-κB. COX-2. apoptose.

Vechio AMCD. Apoptotic effect of Celecoxib in cell lines derived from oral squamous cell carcinoma [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011.

ABSTRACT

Celecoxib, nonsteroidal anti-inflammatory COX-2 selective inhibitor, has proven to be an important anticancer agent. However its role in oral squamous cell carcinoma (OSCC) is not entirely understood. This is the most common malignancy of head and neck region and it is known that various genetic alterations are associated with its pathogenesis. Some of these changes affect proteins belonging to the Akt signaling pathway, involved in different cellular processes. It is known that Akt can activate the transcription factor NF- κ B, which has important role in normal physiology and cancer. The COX-2 protein was firstly described in the inflammatory processes, is associated with oncogenesis and has recently been related with the Akt signaling pathway and with NF- κ B. Therefore, the aim of this study was to analyze the effect of Celecoxib on squamous cell carcinoma cell lines and to determine pAkt, NF- κ B and COX-2 intracellular localization and levels of expression in this cell lines after treated with Celecoxib. By immunofluorescence, we analyzed the pAkt, NF- κ B and COX-2 expression patterns in four oral squamous cell carcinoma cell lines treated with Celecoxib, which the dose and time were obtained from cell viability assays. Cellular apoptosis assay was also performed. As control the cells were not treated with this drug. Celecoxib causes apoptosis in the dose of 30 μ M for 24 hours. In the western blot technique, only the SCC15 cell line shows a significant decrease for COX-2. However, for p-Akt and NF- κ B no change in expression was observed between control and treated groups. On immunofluorescence, there were changes in the pAkt, NF κ B and COX-2 protein expression pattern when the control group was compared with treated group. Therefore, the Celecoxib can be an effective therapeutic agent, since it has shown great efficacy in the cellular proliferation inhibition of the OSCC cell lines.

Keywords: Squamous cell carcinoma. Celecoxib. p-Akt/NF- κ B pathway. COX-2. Apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Distribuição proporcional do total de mortes por câncer, segundo a localização primária do tumor, em homens, no Brasil, para os períodos entre 1979-1983 e 2003-2007.....	25
Figura 2.2 - Distribuição proporcional do total de mortes por câncer, segundo a localização primária do tumor, em homens, no Brasil, para os períodos entre 1979-1983 e 2003-2007.....	26
Figura 2.3 - Via da síntese das prostaglandinas e tromboxanos.....	36
Figura 2.4 - Via de sinalização PI3K/Akt	41
Figura 2.5 - Via de ativação do NF-kB	43
Figura 5.1 - Gráficos representativos da curva de viabilidade celular com Celecoxib nas linhagens celulares SCC4, SCC9, SCC15 e SCC25 nas concentrações de 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 75 μ M e 100 μ M e nos tempos de 24h, 48h, e 72h.....	57
Figura 5.2 - Gráficos representativos das curvas sigmoidais para o cálculo da IC ₅₀ nas linhagens celulares SCC4, SCC9, SCC15 e SCC25	58
Figura 5.3 - Análise da indução de apoptose das linhagens celulares de carcinoma epidermóide de boca (SCC4, SCC9, SCC15 e SCC25) após o tratamento com Celecoxib na concentração 30 μ M por 24 horas. Marcação em azul: Núcleo celular e em verde: célula apoptótica	60
Figura 5.4 - Localização intracelular da proteína p-Akt nas linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de boca quando em contato com o Celecoxib, pela técnica de imunofluorescência. Positividade nuclear (A, A', B, B', C, D, E, E', G e G'); positividade nuclear e citoplasmática (F, F', H e H').....	62

Figura 5.5 - Localização intracelular da proteína NF- κ B nas linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de boca quando em contato com o Celecoxib, pela técnica de imunofluorescência. Marcação citoplasmática (A, A' B, C, D, E, F e H); marcação citoplasmática e nuclear (G, G'); vacúolos intracelulares indicativos de células em apoptose (D, E, F e H).....64

Figura 5.6 - Localização intracelular da proteína COX-2 nas linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de boca quando em contato com o Celecoxib, pela técnica de imunofluorescência. Marcação citoplasmática espalhada (A, C, E, G e H); marcação citoplasmática granulosa (B, D e F); marcação em azul (DAPI): núcleo celular.....66

Figura 5.7 - Representação gráfica da média de valores da quantificação das proteínas COX-2, p-Akt e NF- κ B pelo western blotting. Abreviações: c - controle, t - tratado.....68

Figura 6.1 - Mecanismo molecular da ação do Celecoxib e seus efeitos anticarcinogênicos (50).....73

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Estimativas no Brasil, para o ano 2010, de número de casos novos por câncer, em homens e mulheres, segundo a localização primária (INCA, 2010)	23
Tabela 2.2- Estimativas no Brasil, para o ano 2010, de número de casos novos de câncer, por Estado (INCA, 2010)	24
Tabela 2.3- Comparação do agente convencional e da terapia molecular.....	32
Tabela 4.1- Relação das linhagens de carcinoma epidermóide bucal humano utilizadas no estudo com sua respectiva origem.....	48
Tabela 4.2- Clone, concentração e procedência dos anticorpos primários utilizados na imunofluorescência	52
Tabela 4.3- Gel 10% acrilamida com SDS (10X16 cm).....	54
Tabela 4.4- Clone, concentração e procedência dos anticorpos primários utilizados no Western Blotting	55
Tabela 5.1 - Padrão de marcação da reação de imunofluorescência para o anticorpo p-Akt nos grupos controle e tratado com Celecoxib	61
Tabela 5.2- Padrão de marcação da reação de imunofluorescência para o anticorpo NF-kB nos grupos controle e tratado com Celecoxib	63
Tabela 5.3- Padrão de marcação da reação de imunofluorescência para o anticorpo COX-2 nos grupos controle e tratado com Celecoxib	65

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AINEs	→	antiinflamatórios não-esteróides
Akt	→	atípica serina/treonina quinase
APS	→	persulfato de amônia
ATCC	→	American Type Culture Collection
B[a]P	→	benzo[a]pirene
Bax	→	proteína X associada a BCL2
BCA	→	ácido bicinconínico
Bcl-2	→	B-cell leukemia/lymphoma 2
BSA	→	albumina de soro bovino
C	→	controle
Ca ²⁺ +ATPase	→	enzima catalisadora da hidrólise da adenosina trifosfato via íon cálcio
CD1	→	ciclina D1
CE	→	carcinoma epidermóide
CEB	→	carcinoma epidermóide de boca
C/EBPB	→	CCAAT/enhancer-binding protein beta
CECP	→	carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço
Cm	→	centímetros
CO ₂	→	dióxido de carbono
COX	→	ciclooxigenase
CREB	→	cAMP response element-binding
DAPI	→	4',6-Diamidino-2-fenilindole dihidroclorídrico
DMEM	→	Dulbecco's Eagle Modified Medium
DMSO	→	Sulfoxido dimetil
DMT	→	dose máxima tolerada
DNA	→	ácido dioxirribonucléico
dUTP	→	2'-Dioxiuridina, 5'-Trifosfato
ECL	→	Enhanced Chemiluminescence
EGFR	→	receptor do fator de crescimento epidérmico
ERK	→	quinases reguladoras de sinal extracelular

FDA	→	food and drug administration
g	→	grama
GSK	→	quinase sintenzadora de glicogênio
HCl	→	ácido clorídrico
HER2	→	receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2
HPV	→	vírus papiloma humano
IC ₅₀	→	concentração inibitória de 50% da resposta biológica máxima
IgG (H+L)	→	imunoglobulina G (cadeia H + cadeia L)
IκB	→	inibidor de quinase B
IKK	→	quinase IκB
INCA	→	instituto nacional do câncer
Kda	→	kilodalton
l	→	litro
M	→	molar
MAPKAP1	→	proteína quinase mitogênica ativada associada à proteína 1
MDM2	→	murine double minute 2
MEK	→	mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase.
MHC	→	complexo de histocompatibilidade maior
m-THPC	→	meta tetrahydrofenilclorina
m-TOR	→	mammalian target of rapamycin
MTS	→	Methanethiosulfonate
NaCl	→	cloreto de sódio
NADH	→	nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NF-κB	→	fator nuclear kappa B
OSCC	→	Oral squamous cell carcinoma
p-Akt	→	atípica serina/treonina quinase fosforilada
PBS	→	solução de fosfato-salina
PDK1	→	phosphoinositide-dependent Kinase 1
PDT	→	terapia fotodinâmica
PGG2	→	prostaglandina G2
PGH2	→	prostaglandina H2
PH	→	pleckstrin homology
ph	→	potencial hidrogeniônico

PI3K	→	Fosfatidilinositol 3-quinase
PIP2	→	Phosphatidilinositol-4,5-biphosphate
PIP3	→	Phosphatidilinositol-3,4,5-triphosphate
PKB	→	proteína quinase B
PTEN	→	homólogo de fosfatase e tensina
RADPLAT	→	radioterapia e concomitante intraarterial cisplatina
Ras	→	RAt sarcoma
RC	→	remissão completa
RP	→	remissão parcial
rpm	→	rotação por minuto
SCC	→	squamous cell carcinoma
SDS	→	dodecil sulfato de sódio
Ser	→	serina
SNPs	→	pleomorfismo simples do nucleotídeo
t	→	tratado
TBST	→	Tris salina tamponada com Tween 20
TEMED	→	tetrametiletilenodiamino
TGF	→	fator de crescimento transformante
Thr-	→	treonina
TSC	→	tuberous sclerosis complex
UVB	→	raio ultra-violeta do tipo B
Wnt	→	wingless-type MMTV integration site family

LISTA DE SÍMBOLOS

μ	→	micro
%	→	porcentagem
α	→	alfa
β	→	beta
γ	→	gama
2	→	quadrado
$^{\circ}\text{C}$	→	graus-Celsius
®	→	marca registrada
n	→	nano
m	→	mili
+	→	mais
Cu^{2+}	→	íon cúprido
Cu^{+}	→	íon cuproso
V	→	voltagem
mA	→	mili-amperagem
W	→	watts

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 CARCINOMA EPIDERMÓIDE	22
2.1.1 Incidência	22
2.1.2 Taxas de mortalidade e de sobrevida	24
2.1.3 Fatores etiológicos	27
2.2 CARCINOGENESE	28
2.3 MODALIDADES TERAPÊUTICAS	30
2.4 CELECOXIB	33
2.5 COX-2	35
2.6 Akt	39
2.7 NF-kB	42
3 PROPOSIÇÃO	47
4 MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1. CULTIVO CELULAR	48
4.2 CURVA DE VIABILIDADE CELULAR E CURVA DE DILUIÇÃO DO CELECOXIB	50
4.3 ANÁLISE DAS CÉLULAS APOPTÓTICAS	50
4.4 ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA	51
4.5 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	52
4.6 WESTERN-BLOTTING	53
5 RESULTADOS	56
5.1 CURVA DE VIABILIDADE CELULAR E CURVA DE DILUIÇÃO DO CELECOXIB	56
5.2 APOPTOSE	58
5.3 ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA	61
5.4 WESTERN-BLOTTING	67
6 DISCUSSÃO	69
7 CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS	78
ANEXO	94

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermóide (CE) é a neoplasia maligna mais comum da região decabeça e pescoço. A etiologia do CE é muito variada, não existindo um único fator causador definido ou aceito. Sua patogênese é claramente multifatorial, envolvendo fatores extrínsecos, como fumo, ingestão crônica de bebidas alcoólicas e radiação solar. Acredita-se atualmente que o desenvolvimento do CE é um processo de várias etapas, no qual inúmeros fatores externos e alterações genéticas podem estar envolvidos.

A carcinogênese é entendida como o resultado de um acúmulo de alterações gênicas que se processam ao longo das múltiplas gerações de um clone celular e geram progressivamente características fenotípicas particulares, culminando na manifestação completa do fenótipo neoplásico. Durante o desenvolvimento do câncer, as células neoplásicas adquirem um número de características fenotípicas que as levam à rápida e ilimitada proliferação, invasão dos tecidos vizinhos e metástases regionais e a locais secundários. Como resultado de inúmeras pesquisas no mundo, as vias de sinalização que estão alteradas durante a oncogênese e a forma como estas vias agem desregulando processos de proliferação e sobrevivência celular vem sendo elucidada.

O Akt, também chamado de proteína quinase B (PKB) é uma serina/treonina quinase considerada como reguladora crucial de vários processos celulares vitais, como apoptose, proliferação, diferenciação e metabolismo. A regulação inapropriada da via PKB/Akt tem sido associada com o desenvolvimento de vários tipos de cânceres em humanos. 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.

NF- κ B é um fator de transcrição, descoberto em 1986, que pode ser ativado por uma variedade de sinais como infecções, estresse oxidativo, carcinógenos, citocinas e Akt. Em células neoplásicas, o mecanismo de regulação pode ser modificado pela alteração de diferentes moléculas e o NF- κ B pode tornar-se

constitutivamente ativo levando à produção descontrolada de genes sob o seu comando, como por exemplo da COX-2.

Estudos demonstram que a via de sinalização Akt parece fazer parte do contexto de ação da COX-2. St-Germain et al. (2004) realizaram um estudo com objetivo de verificar a relação entre as proteínas Akt, NF- κ B e COX-2, utilizando linhagens de carcinoma de endométrio que possuíam 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- κ B ficou restrito ao citoplasma e os níveis de COX-2 diminuíram.

Vale ressaltar que não somente os tumores primários de CEB apresentam maiores níveis de expressão de COX-2 como também as suas células metastáticas. No entanto, o mecanismo preciso desempenhado pela COX-2 no processo de metástase continua desconhecido. Sabe-se que esta proteína está superexpressa em neoplasias de endométrio, ovário, estômago, esôfago dentre outras. Percebe-se nestes trabalhos que o prognóstico dessas neoplasias parece estar diretamente relacionado com a expressão da COX-2, refletindo um possível efeito terapêutico das drogas anti COX-2 no tratamento do câncer.

Em 1998 uma nova classe de drogas chamadas de inibidoras de COX-2 foi desenvolvida. O Celecoxib, uma sulfonamida cuja estrutura não está relacionada com a de outros AINEs existentes, foi o primeiro inibidor específico de COX-2 aprovado para tratar os sinais e sintomas de processos inflamatórios, sendo que sua maior vantagem parece ser o menor número de efeitos colaterais principalmente no que se refere ao trato gastrointestinal. Além disso, é o único AINE aprovado pelo FDA, em dezembro de 1999, para o tratamento adjuvante de pacientes com polipose adenomatosa familiar.

Desta forma, este projeto tem como proposta avaliar o efeito do Celecoxib em diferentes linhagens celulares de carcinoma epidermóide bucal e verificar se existem alterações na expressão e na localização das proteínas P-Akt, NF- κ B e COX-2 entre os grupos controle e tratado, uma vez que esse medicamento já vem sendo utilizado como agente quimioterápico em alguns tipos de cânceres.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CARCINOMA EPIDERMÓIDE

2.1.1 Incidência

Os cânceres de cabeça e pescoço são considerados como um dos mais prevalentes no mundo, sendo que mais de 90% de todos os cânceres dessa região são carcinomas epidermóides (1). Mundialmente, aproximadamente 600.000 novos casos de carcinoma de cabeça e pescoço são diagnosticados por ano (2, 3) e dois terços desses pacientes exibem localmente lesões em estágios avançados e/ou envolvimento de linfonodos regionais (4), sendo que apenas 34% dos casos são diagnosticados a tempo de propiciar alguma terapia ou cura para o paciente (5).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2010 e 2011, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), apontam que ocorrerão 489.270 casos novos de câncer/ano, sendo que 14.120 casos acometerão a cavidade oral. Para este período, são esperados 236.240 casos novos/ano para o sexo masculino e 253.030 casos novos/ano para o sexo feminino, sendo que na cavidade oral, são previstos 10.330 novos casos/ano para homens e 3.790 casos/ano para mulheres (Tabela 2.1). Vale ressaltar que essa estimativa realizada pelo INCA para o câncer da cavidade oral não se alterou de maneira significativa entre os períodos 2008-2009 e 2010-2011 (6).

Tabela 2.1 – Estimativas no Brasil, para o ano 2010, de número de casos novos por câncer, em homens e mulheres, segundo a localização primária (INCA, 2010)

Localização Primária	Estimativa de Casos Novos		
	Masculino	Feminino	Total
Neoplasia Maligna			
Próstata	52.350	-	52.350
Mama Feminina	-	49.240	49.240
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.800	9.830	27.630
Cólon e Reto	13.310	14.800	28.110
Estômago	13.820	7.680	21.500
Colo do Útero	-	18.430	18.430
Cavidade Oral	10.330	3.790	14.120
Esôfago	7.890	2.740	10.630
Leucemias	5.240	4.340	9.580
Pele Melanoma	2.960	2.970	5.930
Outras Localizações	59.130	78.770	137.900
Subtotal	182.830	192.590	375.420
Pele não Melanoma	53.410	60.440	113.850
Todas as Neoplasias	236.240	253.030	489.270

Segundo o INCA, aproximadamente um terço desses novos casos devem ocorrer no Estado de São Paulo (4.120 acometimentos), no ano de 2010 (Tabela 2.2) .

Tabela 2.2 – Estimativas no Brasil, para o ano 2010, de número de casos novos de câncer, por Estado (INCA, 2010)

Estados	Leucemias	Cavidade Oral	Pele Melanoma	Outras Localizações	Subtotal	Pele não melanoma	Todas as Neoplasias
Acre	20	20	20	100	470	230	700
Alagoas	120	130	30	540	2.410	1.360	3.770
Amapá	20	20	20	170	550	140	690
Amazonas	120	80	30	1.750	4.090	690	4.780
Bahia	440	790	120	3.720	14.110	6.670	20.780
Ceará	380	500	110	2.730	11.390	6.760	18.150
Distrito Federal	120	150	60	2.140	4.930	1.000	5.930
Espírito Santo	180	340	90	2.620	7.320	2.020	9.340
Goiás	270	350	100	2.840	8.650	3.870	12.520
Maranhão	190	90	20	1.620	4.540	1.390	5.930
Mato Grosso	130	150	40	1.360	4.050	1.510	5.560
Mato Grosso do Sul	130	150	50	1.750	4.880	1.450	6.330
Minas Gerais	940	1.180	460	16.870	38.360	8.270	46.630
Pará	260	190	50	1.670	5.710	2.010	7.720
Paraíba	170	240	40	900	3.840	2.690	6.530
Paraná	650	1.010	610	8.960	25.830	8.590	34.420
Pernambuco	390	580	120	3.820	13.200	6.470	19.670
Piauí	120	110	30	320	2.520	2.120	4.640
Rio de Janeiro	940	1.950	400	15.950	45.080	10.870	55.950
Rio Grande do Norte	190	210	30	450	3.340	2.930	6.270
Rio Grande do Sul	780	1.050	930	16.770	40.080	8.850	48.930
Rondônia	50	50	20	600	1.660	800	2.460
Roraima	20	20	20	200	520	110	630
Santa Catarina	360	450	480	3.080	11.970	7.160	19.130
São Paulo	2.450	4.120	1.990	45.520	111.580	24.480	136.060
Sergipe	70	160	40	680	2.540	1.070	3.610
Tocantins	70	30	20	770	1.800	340	2.140
Brasil	9.580	14.120	5.930	137.900	375.420	113.850	489.270

O câncer oral afeta duas vezes mais homens que mulheres, sendo que 95% dos casos ocorrem depois dos 40 anos de idade. Entretanto, nas últimas décadas, observou-se um aumento no número de casos em pacientes mais jovens (7).

2.1.2 Taxas de mortalidade e de sobrevida

O carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP) é a maior causa de morte associada ao câncer, é responsável por aproximadamente 6% de todos os

cânceres do mundo (3, 8) e a sua incidência está aumentando rapidamente nos países em desenvolvimento (9).

No Brasil, um levantamento realizado pelo INCA revelou que a taxa de mortalidade causada pelo carcinoma da cavidade oral não se alterou de maneira significativa entre os períodos de 1979-1983 e 2003-2007 para os sexos masculino e feminino (Figuras 2.1 e 2.2). Em uma distribuição regional, os maiores índices de mortes por câncer da cavidade oral para o sexo masculino foram encontrados nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Distrito federal enquanto que para o sexo feminino os maiores índices foram encontrados no Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Mato grosso do Sul, Distrito Federal e Pará (6).

Figura 2.1 - Distribuição proporcional do total de mortes por câncer, segundo a localização primária do tumor, em homens, no Brasil, para os períodos entre 1979-1983 e 2003-2007

Figura 2.2 -- Distribuição proporcional do total de mortes por câncer, segundo a localização primária do tumor, em homens, no Brasil, para os períodos entre 1979-1983 e 2003-2007

Apesar do tratamento multidisciplinar com cirurgia, radio e quimioterapia, a taxa de sobrevida não tem tido uma significativa melhora para os pacientes com câncer de boca e seu alto índice de mortalidade continua sendo uma forte característica desse tipo de tumor (10).

Alguns pacientes conseguem viver por um longo período após o tratamento do CECP, particularmente aqueles que são diagnosticados com a doença em um estágio precoce. Entretanto, a sobrevida diminui consideravelmente para pacientes que possuem recorrência do tumor ou metástases à distância e esse tempo é estimado em torno de 6-8 meses (11). Outro fato que pode contribuir para o decréscimo da sobrevida dos pacientes é o desenvolvimento de um segundo tumor primário, o qual apresenta uma taxa anual de ocorrência de 3-10% (12).

As taxas globais de sobrevida em 5 anos para os cânceres da cavidade oral/faringe e laringe é estimado em 58,3% e 64,5%, respectivamente (13).

Um estudo realizado recentemente mostrou que em países desenvolvidos, como EUA, a taxa de sobrevida de cinco anos para pacientes que tiveram câncer oral aumentou de 53% durante o período de 1975-77 para 63% no período de 1999-2005, e esta diferença foi estatisticamente significativa (13). Esse aumento na taxa de sobrevida dos pacientes pode ser parcialmente explicado pela ampliação na utilização de novas modalidades terapêuticas (9).

É importante ressaltar que muitas vezes os pacientes podem ser curados, mas podem experimentar mudanças debilitantes na aparência, fala, deglutição e respiração após a realização do tratamento (12).

2.1.3 Fatores etiológicos

O uso do tabaco e o consumo exagerado do álcool são os fatores de risco mais comumente associados ao desenvolvimento do CECP, pois há um efeito sinérgico. Segundo um estudo realizado nos Estados Unidos, o fumo é capaz de elevar em 20 vezes o risco relativo de desenvolver CECP (14).

Outros fatores também podem ser associados com a etiologia do CECP, incluindo o vírus de DNA, destaque para o vírus papiloma humano (HPV), susceptibilidade genética, pobre higiene oral, baixa ingestão de frutas e vegetais e carcinógenos ambientais, também desempenham um papel na iniciação ou desenvolvimento dessas lesões (3, 15, 16).

As lesões potencialmente malignas têm seu potencial de transformação aumentado quando em contato com carcinógenos, pois esses podem causar lesões genéticas sucessivas no epitélio, aumentando o risco de desenvolvimento de um carcinoma (17).

2.2 CARCINOGENESE

A progressão gradual da carcinogênese geralmente é vista no CECP e 5-20% das lesões pré-malignas, como leucoplasia e eritroplasia, desenvolvem-se em carcinoma *in situ* ou no carcinoma propriamente dito (18).

Recentes descobertas têm aumentado o conhecimento sobre os mecanismos básicos os quais controlam o crescimento normal das células e também ampliaram a habilidade de se investigar a natureza biológica do processo de iniciação do câncer. Sabe-se que a maioria das células neoplásicas são derivadas de expansão clonal e de um crescimento aberrante de células tronco ou células iniciadoras tumorais que readquirem a capacidade de auto-renovação (19).

As células normais proliferam somente quando precisam (homeostase ou injúria), como resultado de um delicado equilíbrio entre crescimento e fatores inibidores do crescimento, sob a influência de fatores bioquímicos provenientes das células vizinhas. No entanto, as células cancerígenas ignoram esses mecanismos de controle e seguem seu próprio programa para a escolha do momento da sua divisão (20).

Essas células crescem de forma desgovernada e podem exacerbar os programas de senescência e morte celular, tornando-se imortais, aumentando seu suprimento de oxigênio e nutrientes por promover a formação de novos vasos sanguíneos, adquirem habilidade de migrar do seu sítio de origem, invadindo os tecidos adjacentes e causando metástase à distância. Essas mudanças progressivas no comportamento celular resultam em uma proliferação desregulada, a qual é o passo inicial para uma completa malignização, devido ao acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas. Entre elas, duas classes de genes, os oncogenes e genes supressores tumorais, têm o principal papel em desencadear e promover o crescimento do câncer (20).

A ativação de oncogenes promove a proliferação celular e os genes supressores de tumor inibem esse crescimento, podendo contribuir na carcinogênese quando inativados por mutações ou por eventos genéticos e/ou epigenéticos (20, 21).

As vias de sinalização podem desempenhar um importante papel no desenvolvimento do tumor e apresentar uma abordagem promissora para a solução

deste problema (9). Isso porque podem ocorrer mutações em genes que codificam componentes das vias de sinalização (por exemplo, Ras, RAF, PI3K, PTEN, Akt, receptores TSC1 e TSC2) ou em receptores *upstream*, os quais ativam essas vias. Estas, por sua vez, transmitem informações através de interações com diversas outras proteínas para o núcleo, onde ocorrerá o controle da expressão gênica (22, 23). Níveis elevados de componentes ativados pertencentes a essas vias são frequentemente associados com o pior prognóstico dos pacientes com câncer ou envelhecimento prematuro (24, 25). A expressão aumentada de substratos envolvidos nas vias de sinalização pode estar também relacionada com a sensibilidade alterada para terapia alvo em relação aos pacientes que não apresentam essas modificações nessa expressão (24).

Os conhecimentos emergentes sobre a função desregulada das vias de sinalização no CECP estão sendo explorados para identificar novos tratamentos. Algumas das abordagens promissoras que estão sendo estudadas incluem o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), inibidores da tirosina quinase e inibidores da via do Akt/mTOR (9, 24).

Nos carcinomas orais essas alterações genéticas são derivadas de múltiplos processos, como por exemplo, aberrações cromossomais, mutações no DNA, amplificações ou deleções e/ou alterações epigenéticas, tais como alteração na metilação que afeta a regulação genética (26). Além disso os fatores de risco para esses carcinomas e a aparência clínica das lesões pré-malignas são dados prognósticos pobres para avaliar o risco em desenvolver o câncer. Portanto, marcadores moleculares, que possam ser usados para a avaliação do risco de desenvolvimento desta neoplasia, são necessários (27).

Outra característica importante do comportamento do CECP é a invasão e metástase tumoral, um processo multifatorial e de múltiplas etapas biológicas complexas. O potencial invasivo das células tumorais (quebra da adesão célula-célula, aumento da motilidade e migração e controle da proteólise da matriz extracelular adjacente), o microambiente do hospedeiro e as interações entre hospedeiro-células tumorais estão entre os fatores que influenciam o estabelecimento e o desenvolvimento de lesões metastáticas (28, 29).

Logo, se marcadores moleculares que representassem eventos precoces e tardios pudessem ser apontados, seria possível identificar as pessoas que apresentassem maior risco de desenvolver um carcinoma, quando essas exibissem

uma lesão pré-maligna. Além disso, esses marcadores ajudariam no monitoramento das recorrências dessas lesões, tão bem como a avaliação da eficiência dos agentes quimioterápicos (30).

Várias moléculas têm sido implicadas na iniciação e progressão do carcinoma epidermóide bucal. Entre elas podemos citar p-Akt, NF-kB e COX-2, as quais serão discutidas posteriormente.

2.3 MODALIDADES TERAPÊUTICAS

A conduta clínica do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP) ainda é difícil, apesar do avanço considerável na compreensão da sua etiologia (9). Há uma grande necessidade de obter terapias mais eficazes e menos tóxicas que ajam nas células malignas e não tenha qualquer efeito sobre as células normais (9).

Atualmente, a cirurgia e a radioterapia são as principais medidas terapêuticas oferecidas aos pacientes com CECP. O uso da quimioterapia e a combinação quimio e radioterapia está associado, em um período de 5 anos, a uma melhora na sobrevida dos pacientes de somente 5% e 8%, respectivamente (31).

Enquanto os avanços na cirurgia e quimio-radioterapia oferecem uma melhor preservação dos órgãos nos casos de carcinomas de laringe e hipofaringe, esses progressos permanecem modestos na taxa de sobrevida dos pacientes com CECP nas últimas três décadas (32).

A quimioterapia tem sido aplicada nas fases incipientes dos CECP (9) e essa forma terapêutica parece ser uma estratégia promissora para a inibição do carcinoma antes da sua invasão e metástase. A quimioterapia tem algumas vantagens teóricas interessantes: entrega ideal da droga para o tumor, erradicação precoce de micro-metástases e melhor tolerância dos efeitos citotóxicos das drogas usadas (33). Entretanto na prática, seu uso é geralmente limitado devido à significativa toxicidade associada a esse método (9).

RADPLAT é uma nova técnica combinando a injeção intra-arterial de Cisplatina com a neutralização sistêmica por tiosulfato de sódio e concomitante radioterapia. Excelentes taxas de controle loco-regional podem ser alcançadas com o uso desta técnica, além de causar efeitos colaterais menores que aqueles

observados com a radioterapia convencional (9). Essa técnica tem sido um atrativo no tratamento dessas neoplasias, pois é possível administrar elevadas doses do agente citostático com menor toxicidade sistêmica, comparado à aplicação intravenosa (34).

No entanto, mesmo esse protocolo apresentando algumas vantagens sobre outras terapias, possui efeitos colaterais como mucosite, disfagia, leucopenia, pneumonia e osteorradionecrose (35).

Outra terapia relativamente específica no tratamento do câncer é a imunoterapia, em que mecanismos efetores da ativação imunológica são usados para destruir as células cancerígenas. O sucesso do efeito antineoplásico da imunoterapia geralmente depende da expressão do tumor e do antígeno do complexo histocompatibilidade maior (MHC) sobre as células tumorais alvo, células malignas sensíveis aos mecanismos efetores, induzindo e/ou aumentando a atividade dos antiefetores (36). Como a imunobiologia do CECP encontra-se intimamente associada com o sistema imune do hospedeiro, a reversão da imunossupressão é um objetivo terapêutico particularmente atraente neste tipo de terapia (37).

É importante ressaltar que todas as abordagens imunoterapêuticas para o CECP permanecem sob investigação, mas um número de agentes cuja eficácia e tolerabilidade são promissores entraram nas fases 2 ou 3 de testes clínicos (38).

A terapia fotodinâmica (PDT), também conhecida como terapia da fotoradiação ou fototerapia ou fotoquimioterapia, envolve o uso de agentes fotossensibilizantes (fotossensibilizadores) com a luz para destruir as células malignas. Dependendo do local do corpo a ser tratado, o agente fotossensibilizador pode ser injetado na corrente sanguínea ou aplicado sobre a pele. Após as células malignas terem absorvido a droga, uma luz é aplicada na área a ser tratada e esta faz com que a droga reaja com oxigênio molecular, gerando espécies reativas de oxigênio. Estes espécimes químicos podem danificar proteínas, lipídios, ácidos nucléicos, e outros componentes celulares (39).

A PDT não tem efeitos colaterais em longo prazo, é menos invasivo que a cirurgia e pode ser repetida diversas vezes no mesmo local, se necessário, com pouca ou nenhuma cicatriz. Entretanto, possui certas limitações, como por exemplo, só pode tratar carcinoma de áreas onde a luz possa atingir e não pode ser usado

para tratar neoplasias extensas. Os efeitos secundários do PDT incluem dor facial, edema, cicatrizes, constipação, hemorragia local e disfagia (40).

Agentes fotossensibilizadores, como temoporfina e meta tetrahidroxifenilclorina (mTHPC), oferecem um alternativo tratamento eficaz e promissor para o carcinoma epidermóide de boca em estágios precoces (40).

Outro tipo de terapia bastante interessante é a terapia molecular, que é uma modalidade de tratamento que tem como finalidade as moléculas e proteínas seletivamente expressas pelas células do tumor. Essas proteínas incluem os fatores de crescimento e seus receptores, moléculas de transdução de sinal, oncogenes, hormônios, moléculas relacionadas à apoptose, fatores ligados à angiogênese, assim como os inibidores de motilidade celular, invasão e proteólise. A terapia molecular tem várias vantagens quando comparada aos fármacos antineoplásicos convencionais (Tabela 2.3) (10).

Tabela 2.3 – Comparação do agente convencional e da terapia molecular (10)

	AGENTE CONVENCIONAL	TERAPIA MOLECULAR
Alvo	DNA, proteína	Específico da molécula da célula cancerígena
Mecanismo de ação	Citotóxico	Citotóxico e citostático
Dose ótima	Perto da DMT	Não necessariamente compatível com DMT
Término da terapia	RC ou RP do tumor	RC ou RP do tumor ou melhora da qualidade de vida
Acúmulo	Alto	Baixo
Perfil de toxicidade	Característico da estrutura do agente	Característico da molécula alvo
Supressão da medula óssea	Frequente	Raro (depende da molécula alvo)
Vômito e náusea	Frequente	Raro (depende da molécula alvo)

Abreviações: DMT – dose máxima tolerada; RC – remissão completa, RP – remissão parcial.

2.4 CELECOXIB

Mais de 20 anos atrás, cientistas verificaram que o tratamento com antiinflamatórios não-esteróides (AINEs) estava associado com a redução do risco e desenvolver o câncer de cólon (1, 2). Desde então, os efeitos anticarcinogênicos de AINEs têm sido avaliados em muitos ensaios clínicos randomizados (41-43).

Estudos epidemiológicos e a observação clínica sugerem que o consumo regular de AINEs pode reduzir o risco de desenvolver vários tipos cânceres humano. Estudos experimentais envolvendo uma variedade de modelos *in vitro* e *in vivo* demonstram que os AINEs podem atenuar o crescimento das células tumorais humanas, incluindo aquelas associadas com os carcinomas de cabeça e pescoço (44, 45).

Apesar do grande uso dos AINEs, Vane, em 1971, descobriu seu principal mecanismo de ação. Os AINEs são primordialmente inibidores de COX, por conseguinte, bloqueadores da formação de prostaglandina em tecidos normais e inflamados (46).

Os AINEs convencionais, que inibem a COX-1, possuem efeitos terapêuticos antiinflamatório, analgésico e antipirético, mas estão associados a graves efeitos colaterais, principalmente relacionados ao sistema gastrintestinal. Estas complicações ocorrem porque a COX-1 exerce importante função protetora na região gastrintestinal. Desta forma, os inibidores seletivos de COX-2 combatem às condições inflamatórias sem os efeitos colaterais da toxicidade gástrica e renal e sem inibir a função plaquetária (47).

Em 1998 uma nova classe de drogas chamadas de inibidoras de COX-2 foi desenvolvida. O Celecoxib, uma sulfonamida cuja estrutura não está relacionada com a de outros AINEs existentes (48), foi o primeiro inibidor específico de COX-2 aprovado para tratar os sinais e sintomas de processos inflamatórios, sendo que sua maior vantagem parece ser o menor número de efeitos colaterais principalmente no que se refere ao trato gastrintestinal (49). Além disso, é o único AINE aprovado pelo FDA, em dezembro de 1999, para o tratamento adjuvante de pacientes com polipose adenomatosa familiar (50).

Além do uso para tratamento de doenças inflamatórias crônicas, trabalhos demonstraram que muitos tipos de câncer produziam altos níveis de COX-2, fato

que sugeriu uma provável ação dos AINEs na prevenção e/ou tratamento do câncer (51).

O mecanismo utilizado pelos AINEs para inibir o desenvolvimento tumoral não é claramente entendido, mas talvez sua ação ocorra através da inibição da COX-2 e consequentemente na síntese das prostaglandinas e dos seus efeitos pró-cancerígenos, tais como proliferação, mobilidade e invasão celular, neo-angiogênese e inibição da apoptose (12, 52, 53).

Muitos estudos têm demonstrado que o celecoxib apresenta uma importante indicação clínica para o tratamento dos pacientes com câncer e já é utilizado para prevenir o câncer em pacientes com polipose adenomatosa hereditária (51).

Em ensaios clínicos com pacientes apresentando polipose adenomatosa familiar, o Celecoxib reduziu a formação de pólipos no cólon sem induzir a toxicidade intestinal. Além disso, o Celecoxib também se mostrou efetivo na inibição do crescimento tumoral e no aumento da sobrevivência de rato com câncer do trato urinário (54), sugerindo que ele pode ser útil também na quimioprevenção de outros tipos de câncer.

Pacientes portadores de polipose adenomatosa familiar tratados com celecoxib na posologia de 400mg por dia durante 6 meses revelaram uma diminuição de 28% no número de pólipos colo-retais comparado à 4,5% de redução pelo grupo placebo (52, 55). Com base nesses resultados, o celecoxib foi aprovado como agente terapêutico adjuvante no tratamento da polipose adenomatosa familiar pela FDA. Adicionalmente, estudos estão sendo realizados para determinar se inibidores seletivos de COX-2 previnem a recorrência de esporádicos adenomas colo-retais (52).

Uma revisão sistemática realizada recentemente averiguou a relação entre o uso de AINEs e aspirina e os riscos associados ao CECV. Nas bases desta revisão, nenhuma conclusão definitiva pode ser alcançada, pois os estudos investigativos foram limitados pelo potencial viés de seleção do grupo de estudo, pela falta de informações sobre o uso de medicamentos sem prescrição e o uso sem indicação dos mesmos (56).

Um estudo *in vitro* buscou elucidar se o celecoxib é capaz de reduzir o crescimento e a migração de células de carcinoma epidermóide oral. Os resultados indicam que a expressão e atividade da COX-2 podem estar associadas com as propriedades proliferativas e invasivas do CEB, uma vez que a inibição da

ciclooxigenase suprimiu o crescimento e a invasão tumoral via múltiplos mecanismos celulares e moleculares. Os autores ainda concluem que novos estudos são requeridos para avaliar se a inibição da COX-2 deveria ser considerada como parte do tratamento para carcinomas em estágios avançados (57).

O efeito antineoplásico do celecoxib ainda é pouco conhecido, mas as bases moleculares para tal efeito têm sido atribuídas principalmente à inibição da COX-2 (58, 59). O celecoxib pode atuar de outras formas, mesmo na ausência da COX-2, apresentando efeitos compatíveis com a prevenção do câncer, como inibição da proliferação celular, indução da apoptose, inibição da angiogênese (51). A via de sinalização do Akt pode ser uma das vias mais importantes na ausência da COX-2 e o celecoxib pode atuar promovendo alterações celulares que levam à ativação de outros genes alvo que também promovem a proliferação celular.

2.5 COX-2

COX é a enzima bifuncional, que desempenha duas atividades, peroxidase e ciclooxigenase, e é responsável pela conversão do ácido aracdônico, ácido graxo de 20 carbonos poliinsaturados, em prostaglandinas. O primeiro passo para a síntese das prostaglandinas é a hidrólise do fosfolípido presente na membrana, gerando aracdônatos livres, uma reação catalizada pela fosfolipase A. É importante lembrar que esse ácido liberado pode ser substrato de duas vias enzimáticas, a das ciclooxigenases (COX), que desencadeiam a síntese das prostaglandinas e dos tromboxanos, e a via das lipoxigenases, responsável pela síntese dos leucotrienos. Posteriormente, uma reação catalizada pela COX com função de ciclooxigenase introduz moléculas de oxigênio ao ácido aracdônico, produzindo prostaglandina G₂ instável. Esta por sua vez é rapidamente convertida pela COX com função de peroxidase em um produto estável, a prostaglandina H₂, a qual é uma precursora de todos os outros prostanóides (prostaglandinas e tromboxanos) (Figura 2.3) (60).

Figura 2.3 - Via da síntese das prostaglandinas e tromboxanos (60)

Duas isoformas (COX-1 e COX-2) foram clonadas, sendo que elas compartilham mais de 60% dos seus aminoácidos e têm atividade enzimática similar, mas diferem na sua regulação, distribuição e expressão (61, 62).

A COX-1 é expressa constitutivamente na maioria dos tecidos e é considerado um gene guardião, responsável pela citoproteção do estômago, vasodilatação do pâncreas e controle da agregação plaquetária. A COX-2, encontrada em um limitado número de células, pode ser induzida por vários estímulos, como hormônios, citocinas, fatores de crescimento e promotores tumorais (63-65). A sua expressão em células relacionadas à inflamação demonstra que esta isoforma está envolvida em processos patológicos, como em inflamações agudas e crônicas (66).

Ambas as isoformas da COX, 1 e 2, estão envolvidas na produção de prostaglandinas protetoras da mucosa e tromboxanos vasoconstritores. Portanto, a inibição prolongada da COX-2 pode alterar o equilíbrio de produção das prostaglandinas e dos tromboxanos (67, 68), explicando o porquê do aumento da

mortalidade cardiovascular e os danos na mucosa gastro-intestinal associado com o tratamento prolongado (68).

A ativação da COX-2 tem sido entendida como um evento precoce na carcinogênese e sua expressão aumentada foi associada com o desenvolvimento da instabilidade genômica (10). A COX-2 também parece estar relacionada com o aumento da produção de fatores de crescimento vascular, acarretando na neoangiogênese, assim como também é capaz de intervir na ação das citocinas envolvidas na inflamação crônica, que por sua vez, pode resultar no aumento da carcinogênese epitelial (69). Desta forma, essa proteína pode contribuir para o crescimento e a propagação de tumores por atuar na mitose, adesão celular, sistema imune e apoptose (10).

Essa elevada expressão, recentemente, tem sido relacionada com diferentes tipos de neoplasias sendo que o seu prognóstico parece estar diretamente interligada com a expressão da COX-2 (70-72). Dentre essas neoplasias podemos citar as de cabeça e pescoço, esôfago, estômago, pâncreas, hepatocelular, colorretal, mama e pulmão (10).

Outros mecanismos relacionados com a atividade da COX-2 podem ser citados como contribuintes para a carcinogênese, como por exemplo, a catalização da conversão de pró-carcinógenos em carcinógenos, diminuindo a apoptose e estimulando o fenótipo invasivo das células tumorais (69).

É importante destacar que a COX tem a capacidade de catalizar a conversão de pró-carcinógenos em carcinógenos, via peroxidase (73). Por exemplo, um pró-carcinógeno presente no tabaco fumado, benzo[a]pirene (B[a]P) estimula a transcrição da COX-2 que por sua vez cataliza a oxidação de B[a]P-7,8-diol em B[a]P-7,8-diol-9,10-epoxide que é altamente reativo em um componente fortemente mutagênico. Esse componente aumenta a possibilidade de indução mediada pelo B[a]P da COX-2, facilitando sua própria conversão em B[a]P-7,8-diol-9,10-epoxide e, portanto, amplificando uma dada dose de B[a]P na iniciação do tumor. Apesar de especulativo, esses achados sugerem o potencial papel dos inibidores de COX-2 na prevenção dos danos causados ao DNA pelo fumo (52, 74).

Foi verificado que o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço apresenta elevados níveis de COX-2, assim como no epitélio adjacente ao tumor e nas lesões pré-malignas, mas esse fato não ocorre no epitélio normal (53, 75). Além disso, estudos correlacionam a expressão desta proteína com o tamanho e prognóstico

dos CECP, sendo que quanto maior for a sua expressão, pior será o seu prognóstico (53, 76, 77).

Saba et al. (76) analisou a expressão de COX-2 em 25 lesões pré-malignas, 38 carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço cujos pacientes estavam fazendo quimioterapia e 10 tecidos normais como controle. Os resultados mostraram o mesmo padrão de expressão de COX-2 nas lesões pré-malignas em estágios iniciais e intermediários e nos epitélios normais, mas esse padrão se alterou na maioria das displasias intensas e nos carcinomas de cabeça e pescoço. Desta forma, concluiu-se que a inibição da COX-2 desempenha um importante papel na quimioprevenção do câncer e testes adicionais são necessários.

Vale ressaltar que não somente os tumores primários de CEB apresentam maiores níveis de expressão de COX-2 como também as suas células metastáticas. No entanto, o mecanismo preciso desempenhado pela COX-2 no processo de metástase continua desconhecido (57).

Interessantemente, a inibição da COX-2 aumenta a sensibilidade à radiação sem influenciar a resposta do tecido normal (10).

Terakado e colaboradores (78) demonstraram que o nível de expressão de COX-2 correlacionou-se inversamente com o aumento da sensibilidade do tumor à radiação. Além do mais, o tratamento com Celecoxib, um inibidor selectivo de COX-2, ampliou a resposta à radioterapia nas células HSC-2, que constitutivamente expressam COX-2. Desta maneira, os autores concluíram que os níveis de expressão de COX-2 estão associados com a tolerância à radiação e a inibição seletiva da COX-2 pode ser um potente adjuvante na radioterapia no CEB.

Uma importante correlação entre a expressão da COX-2 e a inibição da apoptose, associando o aumento nos níveis de prostaglandina E2 à modulação de fatores anti e pró apoptóticos, como o Bcl-2 e o Bax, respectivamente, pode ser feita (64, 79). 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 ultravioletas (UVB) participa de forma importante na indução da transcrição da COX-2 (80, 81). Ainda, Kundu et al. (2006) (82) sugerem que os níveis alterados de COX-2 podem estar

associados a inibição do I κ B, o que leva o NF- κ B ao núcleo celular e ativação de genes alvo, dentre eles a COX-2.

Além disso, a COX-2/prostaglandina E2 (PGE2) pode aumentar a atividade do EGFR *in vitro* e *in vivo* (83, 84) e o EGFR e o HER2 podem regular a transcrição de COX-2 (via MAPKAP1) (85).

2.6 Akt

A proteína Akt (atípica serina/treonina quinase) foi originalmente descoberta como um homólogo celular do retrovírus transformado AKT8 e como uma quinase com propriedades semelhantes às das proteínas quinases A e C (24, 86-88).

Akt contém um domínio homólogo ao *pleckstrin* amino-terminal (PH) o qual serve para ativar proteínas de membrana (87, 88). Na sua região central, a Akt tem um extenso domínio quinase e é ladeado por uma porção carboxi-terminal hidrofóbica e por regiões ricas em prolina (88).

A família de serina/treonina quinase PKB/Akt (59 Kda) consiste de 3 membros – PKB α (Akt1), PKB β (Akt2) e PKB γ (Akt3) - que são derivados de genes diferentes (89). Todas as três isoformas possui resíduos de treonina e serina fosforiláveis que junto com o domínio PH (“Pleckstrin Homology”) são críticos para a função do Akt. Em diferentes tipos de neoplasias, a ativação da proteína Akt1 (fosforilação dos sítios Thr-308 e Ser-473) parece ser predominante e parece estar relacionada com a proliferação e progressão tumoral (90).

A via do Akt tem sido profundamente estudada, pois essa proteína tem papel crítico na regulação do crescimento, proliferação e sobrevivência celular, metabolismo entre outras atividades da célula. Além disso, a ativação da proteína Akt ocorre com frequência nos tumores epiteliais humanos (91-93).

Em estudos prévios, a ativação do Akt no carcinoma epidermóide oral foi relacionado ao comportamento clínico agressivo e a perda das características histopatológicas da diferenciação epitelial. Desta forma, reforçando a hipótese da ação do Akt em alterar a morfologia, motilidade e invasividade da célula epitelial (94).

Evidências genéticas, bioquímicas e biológicas suportam o papel chave do Akt na transmissão de sinais às vias que são iniciadas por fatores de crescimento e oncogenes que estimulam a proteína PI3K (95). Logo, a identificação do substrato do Akt tem sido foco para numerosos trabalhos para entender o mecanismo pelo qual essa quinase age na sinalização da insulina, no crescimento celular, apoptose e no câncer (95).

A via do Akt pode ser ativada nos CECP pela super atividade do EGFR, mutação na Ras, amplificação do gene PI3K e mutações superexpressas ou ativadas associadas à deficiência da atividade do PTEN devido a alterações genéticas ou diminuição na sua expressão (30).

Para que ocorra a ativação da via do Akt, primeiro há a ativação de um receptor tirosino quinase, com consequente recrutamento da molécula PI3K para a membrana celular. Depois de sua ativação, a PI3K acrescenta um grupo fosfato à posição D3 do anel inositol, fazendo com que haja a conversão do PIP2 (“Phosphatidilinositol-4,5-biphosphate”) em PIP3 (“Phosphatidilinositol-3,4,5-triphosphate”). PIP3 servirá como um sítio de ancoragem para as proteínas que contem o domínio PH, tais como as proteínas Akt e PDK1 (“Phosphoinositide-dependent Kinase 1”) (96) (Figura1).

Após a ligação do Akt no PIP3 da membrana plasmática, há uma modificação conformacional nessa quinase, permitindo que a proteína PDK1 fosforile o Akt no seu domínio catalítico T-loop da treonina 308 (Thr308), resultando na sua ativação. Para uma completa ativação do Akt, uma segunda ativação na serina 473 (Ser473), localizada na porção C-terminal, deve ocorrer. Uma vez ativado, o Akt deixa a membrana celular para fosforilar substratos intracelulares (97) (Figura 2.4).

Em relação à mutação, Akt1 tem se mostrado mutado em alguns carcinomas de mama, colo, ovário e melanomas (102). Akt2 não está frequentemente mutado nos cânceres humanos e apenas 30% dos CECP apresentam essa mutação (103). Já a mutação do Akt3 é vista em algumas amostras de melanomas (104).

Os genes envolvidos na via de sinalização do Akt parecem ter um importante envolvimento na carcinogênese de cabeça e pescoço, e por isso, o estudo destes genes é fundamental para melhorar o entendimento sobre a progressão desta patologia e futuramente aperfeiçoar a terapêutica dos pacientes acometidos.

2.7 NF-kB

NF-kB (fator nuclear kappa B) representa um grupo de proteínas conservadas estruturalmente e evolucionariamente com atividade transcricional, a qual está envolvida na regulação de importantes processos, tais como inflamação, imunidade inata, proliferação e apoptose (105).

Os fatores transcricionais NF-kB em mamíferos são homo ou heterodímeros, compostos por 2 famílias de proteínas Rel. Cada membro dessas famílias contém aproximadamente 300 aminoácidos no domínio homólogo Rel, o qual é responsável por mediar a dimerização, a localização nuclear, a ligação com o DNA e a associação com a repetição anquirina encontrada nas endógenas proteínas inibidoras de kB (IκB) (106).

A primeira classe de proteínas Rel inclui RelA (p65), RelB e RelC, que quando sintetizada na sua forma madura, são subunidades do dímero NF-kB envolvido na ativação gênica. Inversamente, os membros da segunda classe consiste do NF-kB1 (p105) e NF-kB2 (p100) e eles requerem a proteólise dependente da ubiquitina dos seus terminais-C transcricionais, modulando o domínio e a repetição anquirina para a produção do p50 e p52, respectivamente (107).

NF-kB é um fator de transcrição, descoberto em 1986, que pode ser ativado por uma variedade de sinais como infecções, estresse oxidativo, carcinógenos, citocinas e Akt (108). Essa ativação ocorre através de 2 vias distintas, uma clássica e outra alternativa, mas ambas envolvem a iniciação total ou parcial de um complexo quinase inibidor de kB (IKKs), composto por 2 subunidades quinases altamente

homólogas, IKK α (IKK1) e IKK β (IKK2) e uma subunidade regulatória não-enzimática, IKK γ (NEMO) (109).

Todos os estímulos descritos anteriormente ativam a via de transdução de sinal que induz a ativação e a translocação do NF- κ B do citoplasma para o núcleo, onde ocorre a ativação de genes envolvidos com a sobrevivência celular (110). A sua capacidade de realizar a transcrição gênica só é possível quando está localizado no núcleo celular. Este controle é realizado pelo Inibidor de κ B (I κ B) que se liga ao NF- κ B e o inativa, mantendo-o no citosol. Para que isto ocorra outra proteína conhecida como IKK precisa ser fosforilada e ativada pelo Akt, sendo então capaz de fosforilar o I κ B levando-o para ubiquitinação e conseqüente degradação. Na ausência do I κ B, homo ou hetero dímeros do NF- κ B são translocados para o núcleo onde se ligam ao DNA e induzem a transcrição gênica (111, 112) (Figura 2.5).

Figura 2.5 - Via de ativação do NF- κ B (www.emdbiosciences.com)

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 (108).

O estresse/injúria induz a ativação do NF-kB, resultando em uma resposta antiapoptótica nas células normais. A semelhança do perfil da expressão gênica entre essa resposta de proteção e a do carcinoma epidermóide induziu pesquisadores à investigar o papel no NF-kB na carcinogênese do CECP (29).

Em células neoplásicas, o mecanismo de regulação pode ser modificado pela alteração de diferentes moléculas e o NF-kB pode tornar-se constitutivamente ativo levando à produção descontrolada de genes sob o seu comando (112). Logo, essa pode ser uma molécula importante para o desenvolvimento do CECP (113). A atividade constitutiva do NF-kB nas células neoplásicas protegem-nas da apoptose, e seu aumento no núcleo tem sido associado a um pior prognóstico nas displasias epiteliais intensas e nos carcinomas epidermóide de boca (114).

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, como exemplo o Bcl-2, ciclina D1 (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 (115, 116).

Recentemente, inúmeras evidências têm sugerido que a via de sinalização do NF-kB apresenta um papel crítico na carcinogênese, proteção da apoptose e quimioresistência em uma grande variedade de cânceres, tais como o de cabeça e pescoço, mama, fígado e estômago (117-119).

Uma grande diversidade de componentes têm sido mostrado como inibidores do NF-kB, tais como salicilatos, antioxidantes, antiinflamatórios não-esteroidais, prostaglandinas, glucocorticóides produtos naturais, como capsaicin e curcumin (120). Desses, alguns já estão sendo utilizados ou estão em desenvolvimento para prevenção ou terapia do câncer, como por exemplo, os glucocorticóides para as

neoplasias hematológicas e antiinflamatórios não-esteroidais para a prevenção do câncer de colón (29).

A resistência aos quimioterápicos contribuem para o pobre prognóstico dos CECP. Sabe-se que diversos mecanismos estão envolvidos com essa quimioresistência, tais como a super-regulação do Akt, aumento da expressão de Bcl-2 e do NF- κ B (121).

Alguns trabalhos mostram uma correlação entre o NF- κ B e a proteína COX-2. A expressão do IKK α tem sido correlacionada com aumento da expressão do NF- κ B e da COX-2 em carcinomas de colón, por outro lado, observou-se baixa expressão da COX-2, NF- κ B e IKK α em células epiteliais normais do colón (112). O NF- κ B seria responsável por induzir a COX-2, que por sua vez, induziria fatores angiogênicos (116). Yang et al. (2005) (122), em um estudo utilizando como metodologia 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 (123).

Existe uma implicação do NF- κ B como alvo terapêutico de diversas patologias, justamente pela existência de uma grande quantidade de genes que sofrem regulação por este fator de transcrição (124). Com relação ao câncer, a inibição do excesso de ativação de fatores de transcrição, incluindo o NF- κ B constitui-se em uma possibilidade terapêutica interessante e promissora (18, 125).

Um estudo realizado por Yan e colaboradores (4) forneceu evidências que a atividade do NF- κ B contribui significativamente para a invasão e metástase tumoral, uma vez que altos níveis dessa proteína foi observado em espécimes metastática de CECP. Resultados semelhantes aos da imunohistoquímica foram notados em linhagens celulares derivadas de CECP com diferente potencial metastático. No entanto, quando essas células foram tratadas com inibidores de NF- κ B, houve a redução da capacidade de invasão sem afetar a taxa de apoptose. Desta forma, os dados apresentados no estudo demonstram que tanto o NF- κ B como seus efetores envolvidos na sinalização *downstream* ou *upstream* podem ser alvos moleculares efetivos na detecção ou inibição da metástase dos CECP.

Outro interessante estudo realizado mostrou evidências que o cigarro causa a direta fosforilação e subsequente degradação do I κ B. Desta forma, o NF- κ B é

translocado para o núcleo onde participa da transcrição de vários genes responsáveis pela progressão do ciclo celular e regulação da apoptose (126).

3 PROPOSIÇÃO

Com vista no acima exposto, os objetivos do presente estudo são:

- 1) verificar os efeitos do medicamento Celecoxib sobre os índices de proliferação celular em linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóides bucal,
- 2) verificar se a diminuição do número de células ocorre por apoptose após o tratamento com o Celecoxib,
- 3) analisar a localização intracelular das proteínas COX-2, p-Akt e NF-kB e se há alteração desta localização após o contato das células com o medicamento,
- 4) analisar se há modificações nos níveis de expressão dessas proteínas em células derivadas de carcinoma epidermóide bucal tratadas com celecoxib.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo sob o parecer número 38/07 (Anexo A).

4.1. CULTIVO CELULAR

Para realização desse estudo foram utilizadas linhagens celulares de carcinoma epidermóide bucal humano (Tabela 4.1) provenientes da ATCC (ATCC – American Type Culture Collection, Manassas, EUA).

Tabela 4.1 – Relação das linhagens de carcinoma epidermóide bucal humano utilizadas no estudo com sua respectiva origem

LINHAGEM	IDADE DO PACIENTE	SEXO DO PACIENTE	LOCALIZAÇÃO
SCC4	55	Masculino	Língua
SCC9	25	Masculino	Língua
SCC15	55	Masculino	Língua
SCC25	70	Masculino	Língua

As células foram cultivadas em frascos plásticos de 25, 75 ou 175 cm² em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Eagle Modified Medium – MegaCell, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) suplementadas com 1/3 de meio de cultura Ham - F12 (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA), 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP, BR), 1% de solução antibiótica-antimicótica (Gibco, Invitrogen,

Carlsbad, Califórnia, USA) e 1% de L-glutamina (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA) mantidas em incubadora (Precision Scientific) à temperatura controlada de 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

Todos os procedimentos do cultivo foram realizados em capela de fluxo laminar, seguindo os protocolos para manutenção da esterilidade dos materiais, suplementos e meios de cultura a serem utilizados. O crescimento celular foi monitorado diariamente por um microscópio invertido de fase (Zeiss Axiovert 25 – Carl Zeiss, Oberköchen, 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 foi removido e separado em tubo de centrifugação e a monocamada celular lavada uma vez com solução de fosfato-salina, sem cálcio e magnésio (PBS), pH 7,2. Em seguida, as células foram separadas com solução de tripsina (tripsinização – 0,25% tripsina- 1mM EDTA, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) 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 foram transferidas para um tubo de ensaio e centrifugadas à 1300 rpm por 5 minutos, à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi aspirado e o precipitado de células foi ressuspenso em 1 ml de meio de cultura. Aliquotas da suspensão foram distribuídas em novos frascos de cultivo nos quais se acrescentou mais meio de cultura. Posteriormente, esses frascos foram novamente levados à estufa. Parte dessas células foi congelada em nitrogênio líquido para formação do banco de células do laboratório de cultura celular.

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

4.2 CURVA DE VIABILIDADE CELULAR E CURVA DE DILUIÇÃO DO CELECOXIB

A verificação da diluição adequada do Celecoxib foi realizada através da curva dose dependente de viabilidade celular, utilizando-se o MTS (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay - Promega, Madison, Wisconsin, USA), cuja reação ocorre através da formação do sal formazan, de coloração azulada, resultante da reação de agentes redutores como o NADH e o sal tetrazolium. Desse modo, os poços com maior número de células viáveis apresentarão coloração azul.

O experimento foi realizado em quadruplicata, para todas as linhagens, em placas de ELISA (96 poços). Em cada poço, foram cultivadas 8×10^3 células em 100 µl de meio por 24 horas. Depois as células permaneceram em meio sem soro por 24 horas para em seguida realizar-se o tratamento com celecoxib. Foram testadas sete diluições do medicamento Celecoxib (1 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 75 µM e 100 µM), em três tempos distintos (24h, 48h, e 72h). A diluição do medicamento foi realizada com DMSO (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA). Como controle da reação foi utilizado células não submetidas ao tratamento com o Celecoxib.

Para cada leitura foi adicionado MTS (20 µl de MTS para cada 100 µl de meio de cultura). As placas foram protegidas da luz e novamente mantidas em incubadora de CO₂ à 37° por 180 minutos. Após esse período realizou-se a leitura em máquina de Elisa (ELX 800 Bio-Tek instruments Inc.) com filtro de 490 nm.

4.3 ANÁLISE DAS CÉLULAS APOPTÓTICAS

O teste Tunel (TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase) mediated X-dUTP nick end labeling) é um teste específico para a detecção de células apoptóticas ou em processo de apoptose celular.

Esse sistema detecta o DNA fragmentado de células apoptóticas através da incorporação catalítica da fluoresceína 12-dUTP à extremidade final 3'-OH do DNA, utilizando a enzima recombinante Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (rTdT). A fluoresceína 12-dUTP, ligada ao DNA, pode ser visualizada diretamente pelo

microscópio de imunofluorescência. A análise ao microscópio mostrará em verde as células apoptóticas e em azul (DAPI) os núcleos de todas as células, apoptóticas ou não.

Para ambos os grupos, foram plaqueadas 15×10^4 células sobre lamínulas previamente estéreis, colocadas em poços de placas de seis poços. Após o tratamento, as lamínulas foram lavadas com PBS 1x, fixadas com paraformaldeído 4% à 4°C por 25 minutos, lavadas novamente com PBS 1x e incubadas com 0,2% de triton-X por 5 minutos. Posteriormente as células foram lavadas com PBS 1x e incubadas com 25 µl de Equilibration Buffer (presente no Kit) em temperatura ambiente. O Equilibration Buffer foi removido e então, adicionou-se rTdT Incubation Buffer (presente no Kit) as lamínulas, as quais foram mantidas à 37°C em câmara úmida na ausência de luz por 1 hora. Posteriormente, diluiu-se a solução SCC (presente no kit) em água mili-Q na concentração 1:10, a qual ficou em contato com as células por 15 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS 1x por 5 minutos e montadas com meio de montagem contendo Dapi.

Os resultados foram avaliados em microscópio de luz fluorescente Zeiss (Zeiss Axiophot, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

4.4 ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

Foram cultivadas 9×10^4 células de cada linhagem celular sobre lamínulas de vidro. Depois as células permaneceram em meio sem soro por 24 horas para em seguida realizar-se o tratamento com Celecoxib 30 µM por 24 horas de incubação. Como controle da reação, foram utilizadas células não submetidas ao tratamento.

Posteriormente, as lamínulas contendo as células foram lavadas em PBS, e foi acrescentado depois da lavagem, metanol suficiente para cobrir as lamínulas. O metanol foi deixado em contato com as células por 6 minutos, à -20°C. Após esse período, as lamínulas foram lavadas novamente com PBS e incubadas com 30 µL de solução de PBS + BSA à 1% por 30 minutos e então, as lamínulas foram novamente lavadas com PBS.

Posteriormente, foi incubado o anticorpo primário (Tabela 4.2) diluído em PBS+BSA a 1% por 60 minutos em temperatura ambiente e câmara úmida e em seguida, lavadas novamente com PBS. Após tal lavagem, foi colocado sobre as lamínulas o anticorpo secundário (Fluoresceína anti-mouse IgG (H+L) – Vector Laboratories, Ind. Burlingame, CA 94010) diluído em PBS+BSA à 1% por 45 minutos em temperatura ambiente e câmara úmida, e a reação ocorreu na ausência de luz. Lavaram-se novamente as lamínulas com PBS para posterior montagem das lâminas com Vecta Shield (Vector Laboratories, Ind. Burlingame, CA 94010). As lamínulas foram fixadas com o uso de esmalte incolor, e foram armazenadas na geladeira na ausência de luz para posterior análise no microscópio de imunofluorescência (Zeiss Axiophot II, Carl Zeiss).

Tabela 4.2 - Clone, concentração e procedência dos anticorpos primários utilizados na imunofluorescência

ANTICORPO	CLONE	TIPO	CONCENTRAÇÃO	PROCEDÊNCIA
p-Akt	1/2/3-R	Policlonal	1:50	Santa Cruz Biotechnology
NF-kB	P65 A	Policlonal	1:50	Santa Cruz Biotechnology
COX-2	29	Monoclonal	1:50	Santa Cruz Biotechnology

4.5 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Após a subconfluência das linhagens acima citadas em frascos de 175 mm², foi realizado o tratamento com Celecoxib (30µM) por 24 horas. Posteriormente, as células foram removidas dos frascos por tripsinização, centrifugadas e o precipitado foi ressuspensionado diretamente em 1 ml de PBS 1X, seguido de centrifugação à 15.000 rpm por 5 minutos à 4°C. Após a centrifugação, foi sugado o sobrenadante e o precipitado foi ressuspensionado em 1 ml de tampão ANITA (10% de sucrose; 1% de Triton X-100; 20 mM de Tris; 137 mM de NaCl; 10% de glicerol; 2 mM de EDTA;

10mM de NaF; 1mM de Na_3VO_4) e a solução ficou em contato com o precipitado por 20 minutos em gelo. Posteriormente, o conteúdo contido no tubo de congelação foi centrifugado a 15.000 RPM por mais 30 minutos à 4°C e o sobrenadante foi recolhido, aliquoteado e estocado à -80°C.

As proteínas dos lisados foram quantificadas através do método do ácido biocinconínico (BCA Protein Assay Reagent Kit – Pierce, Rockford, IL, USA). Esse método tem por princípio a reação de peptídeos das amostras com o cobre (Cu^{2+}) resultando na sua redução e consequente formação de um complexo (peptídeos mais o cátion cuproso - Cu^+). O ácido biocinconínico, por sua vez, reage com o cátion cuproso, formando o complexo BCA- Cu^+ que produz uma cor púrpura. Essa cor é lida no espectrofotômetro no comprimento de onda de 562 nm. Portanto, quanto mais intensa for a cor púrpura, mais absorção de luz ocorrerá, significando maior quantidade de proteína.

4.6 WESTERN-BLOTTING

As alíquotas previamente quantificadas foram fervidas por 5 minutos com sample buffer (3% de dodecil sulfato e sódio (SDS), 150 mM Tris pH 6,8, 15% de mercaptoetanol, 30% de glicerol e 0,01% de azul de bromofenol) para a denaturação das proteínas. Em seguida, foram submetidas à SDS-PAGE em géis de acrilamida, conforme a tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Gel 10% acrilamida com SDS (10X16 cm)

	Gel de Separação 10% (total 40 ml)	Gel de empilhamento 5% (total 20ml)
<i>Solução de Acrilamida 30%</i>	13,3 ml	1,33 ml
<i>Tampão de separação</i>	10 ml	-
<i>Tampão de empilhamento</i>	-	2,5 ml
<i>10% SDS</i>	0,4 ml	0,1 ml
<i>Água destilada</i>	16,1 ml	6 ml
<i>10% persulfato de amônio</i>	0,4 ml	0,1 ml
<i>Temed</i>	26,6 μ l	10 μ l

A eletroforese foi realizada a 120 V, 20 W, 100 mA durante 3 horas. O padrão de peso molecular utilizado foi o Kaleidoscope® (Bio Rad, Hercules, CA, USA).

A transferência das proteínas que migraram do gel para a membrana de nitrocelulose (Hybond ECL Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) foi feita por eletro-transferência úmida em aparelho especial (Höefer, mini VE, Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) utilizando-se o tampão de transferência (48 mM Tris Base; 39 mM Glicina, 20% Metanol; pH 8,3) conforme recomendações do fabricante. A transferência foi realizada à 100 V, 30 W, 70 mA por 3 horas.

Após o término da transferência, foi realizado o bloqueio dos sítios inespecíficos com 5% de leite em pó desnatado em TBST (150 mM NaCl; 50 mM Tris HCl pH 7,5; 0,1% Tween 20 - anticorpos não fosforilados) ou 1% de BSA em TBST (150 mM NaCl; 50 mM Tris HCl pH 7,5; 0,1% Tween 20 - anticorpos fosforilados) por 2 horas em temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida, a solução de bloqueio foi removida, lavou-se a membrana com TBST e foi colocado o anticorpo primário (Tabela 4.4) diluído em solução de bloqueio. Essa solução ficou em contato com a membrana *overnight* à temperatura ambiente e sob agitação. Posteriormente, foi realizadas 3 lavagens para remoção do anticorpo não-absorvido com TBST sob agitação, à temperatura ambiente. Incubou-se o anticorpo secundário

diluído em solução de bloqueio aplicado por 1 hora, e depois lavado três vezes, sendo uma vez em TBST por 5 minutos e duas vezes com PBS por 10 minutos.

A detecção da reação foi feita através do kit ECL plus (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), e a revelação através de autoradiografia, com o Hiperfilm ECL (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), de acordo com as instruções do fabricante.

Como controle foi utilizado anticorpo gerado em camundongo β -actina (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA).

Posteriormente as bandas contidas nas películas radiográficas foram escaneadas e quantificadas no programa Image-J.

As reações foram feitas em triplicata para a realização do teste estatístico. Os resultados dos experimentos foram comparados dois a dois e o teste estatístico utilizado foi o teste-T de Student.

Tabela 4.4 - Clone, concentração e procedência dos anticorpos primários utilizados no Western Blotting

ANTICORPO	CLONE	TIPO	CONCENTRAÇÃO	PROCEDÊNCIA
p-Akt	1/2/3-R	Policlonal	1:200	Santa Cruz Biotechnology
NF-kB	P65 A	Policlonal	1:100	Santa Cruz Biotechnology
COX-2	29	Monoclonal	1:200	Santa Cruz Biotechnology
β-actina	AC-15	Monoclonal	1:3000	Biotechnology Transduction

5 RESULTADOS

Todos os experimentos foram realizados em quatro linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de boca (SCC4, SCC9, SCC15 e SCC25) e a concentração e o tempo que as células ficaram em contato com o Celecoxib foram 30 μ M e 24 horas, respectivamente.

5.1 CURVA DE VIABILIDADE CELULAR E CURVA DE DILUIÇÃO DO CELECOXIB

Com o intuito de verificar a ação do Celecoxib na proliferação celular, foi realizada uma curva de viabilidade após 24, 48 e 72 horas da aplicação do medicamento em diferentes concentrações nas linhagens celulares de carcinoma epidermóide bucal (SCC4, SCC9, SCC15 e SCC25).

Os resultados demonstram uma evidente ação do medicamento inibindo a proliferação celular em doses mais baixas (entre 1 μ M e 10 μ M) nas 4 linhagens celulares estudadas. O número de células viáveis do controle foi maior, porém muito semelhante aqueles encontrados no grupo tratado com o Celecoxib (Figura 5.1), mostrando uma redução na proliferação celular. No entanto, com o aumento da dose do medicamento, a quantidade de células viáveis diminui muito em relação ao grupo não tratado, tendendo a zero nas linhagens SCC4, SCC15 e SCC25, evidenciando, desta forma, também o seu papel na morte celular.

É importante ressaltar que a curva de ação do Celecoxib foi similar nos três tempos experimentais. Portanto, o tempo escolhido para a aplicação do Celecoxib foi de 24 horas.

Figura 5.1 - Gráficos representativos da curva de viabilidade celular com Celecoxib nas linhagens celulares SCC4, SCC9, SCC15 e SCC25, nas concentrações de 1 μM, 5 μM, 10 μM, 25 μM, 50 μM, 75 μM e 100 μM e nos tempos de 24h, 48h, e 72h

Além disso, com os resultados obtidos da curva de viabilidade, foi possível calcular a IC_{50} (concentração inibitória de 50% da resposta biológica máxima) através de curvas sigmoidais. A IC_{50} para cada linhagem celular nos três tempos distintos estão ilustradas na figura 5.2.

A diluição média mais adequada para todas as linhagens celulares foi a dose de 30 μM após 24 horas de incubação com o Celecoxib.

Figura 5.2 - Gráficos representativos das curvas sigmoidais para o cálculo da IC_{50} nas linhagens celulares SCC4, SCC9, SCC15 e SCC25

5.2 APOPTOSE

Após analisar os resultados obtidos com a curva de viabilidade, ficou evidente que o Celecoxib causa uma diminuição expressiva do número de células viáveis. Portanto, tornou-se importante investigar se o decréscimo celular ocorre por apoptose ou necrose celular. Para tanto, utilizou-se o sistema Tunel (DeadEND Fluorometric Tunel System) para a identificação de células apoptóticas e realizou-se apenas uma análise qualitativa.

Para ambos os grupos, controle e tratado, nas quatro linhagens celulares estudadas, observou-se células com marcação nuclear em verde. O grupo controle apresentou maior número de células que o grupo tratado (marcação em azul),

enquanto esse apresentou maior quantidade de células apoptóticas (marcação em verde) (Figura 5.3).

Desta forma, comprovou-se que o Celecoxib na concentração 30 μM por 24 horas causa apoptose e não necrose celular.

Figura 5.3 - Análise da indução de apoptose das linhagens celulares de carcinoma epidermóide de boca (SCC4, SCC9, SCC15 e SCC25) após o tratamento com Celecoxib na concentração 30 μ M por 24 horas. Marcação em azul: Núcleo celular e em verde: célula apoptótica

5.3 ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

O ensaio de imunofluorescência tem como objetivo mostrar se a linhagem estudada apresenta ou não a expressão de determinada proteína e a sua localização intracelular.

Para todas as linhagens estudadas, o número de células do grupo controle foi superior àquele encontrado no grupo tratado.

O grupo controle das quatro linhagens celulares estudadas para o anticorpo p-Akt apresentou marcação nuclear. No grupo tratado, essa marcação apenas foi mantida para as linhagens SCC4 e SCC9. As linhagens SCC15 e SCC25 a marcação foi nuclear e citoplasmática (Figura 5.4; Tabela 5.1).

Tabela 5.1 – Padrão de marcação da reação de imunofluorescência para o anticorpo p-Akt nos grupos controle e tratado com Celecoxib

<i>Linhagem</i>	<i>Grupo Controle</i>	<i>Grupo Tratado com Celecoxib</i>
SCC4	Núcleo	Núcleo
SCC9	Núcleo	Núcleo
SCC15	Núcleo	Núcleo/ citoplasma
SCC25	Núcleo	Núcleo/ citoplasma

Figura 5.4 - Localização intracelular da proteína p-Akt nas linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de boca quando em contato com o Celecoxib, pela técnica de imunofluorescência. Positividade nuclear (A, A', B, B', C, D, E, E', G e G'); positividade nuclear e citoplasmática (F, F', H e H')

Para o anticorpo NF-kB, o padrão de marcação citoplasmático não foi alterado entre os grupos controle e tratado, exceto para a linhagem celular SCC25 que no grupo controle apresentou positividade tanto citoplasmática como nuclear e no grupo com Celecoxib apenas citoplasmática (Figura 5.5; Tabela 5.2).

Tabela 5.2 – Padrão de marcação da reação de imunofluorescência para o anticorpo NF-kB nos grupos controle e tratado com Celecoxib

<i>Linhagem</i>	<i>Grupo Controle</i>	<i>Grupo Tratado com Celecoxib</i>
<i>SCC4</i>	Citoplasma	Citoplasma
<i>SCC9</i>	Citoplasma	Citoplasma
<i>SCC15</i>	Citoplasma	Citoplasma
<i>SCC25</i>	Citoplasma/ núcleo	Citoplasma

Figura 5.5 - Localização intracelular da proteína NF-κB nas linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de boca quando em contato com o Celecoxib, pela técnica de imunofluorescência. Marcação citoplasmática (A, A' B, C, D, E, F e H); marcação citoplasmática e nuclear (G, G'); vacúolos intracelulares indicativos de células em apoptose (D, E, F e H)

Em todas as linhagens celulares estudadas, independentemente do contato ou não com o Celecoxib, a positividade para a proteína COX-2 foi citoplasmática. No grupo controle, as células positivas, mostraram uma marcação difusa pelo citoplasma, enquanto que no grupo tratado essa marcação diminuiu e tornou-se granulosa. Esse padrão de marcação foi observado em todas as linhagens celulares, exceto na linhagem SCC25 que, em ambos os grupos, a marcação manteve-se dispersa (Figura 5.6 e Tabela 5.3).

Tabela 5.3 – Padrão de marcação da reação de imunofluorescência para o anticorpo COX-2 nos grupos controle e tratado com Celecoxib

<i>Linhagem</i>	<i>Grupo Controle</i>	<i>Grupo Tratado com Celecoxib</i>
SCC4	Citoplasma	Citoplasma
SCC9	Citoplasma	Citoplasma
SCC15	Citoplasma	Citoplasma
SCC25	Citoplasma	Citoplasma

Figura 5.6 - Localização intracelular da proteína COX-2 nas linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de boca quando em contato com o Celecoxib, pela técnica de imunofluorescência. Marcação citoplasmática espalhada (A, C, E, G e H); marcação citoplasmática granulosa (B, D e F); marcação em azul (DAPI): núcleo celular

5.4 WESTERN-BLOTTING

A técnica de Western Blot tem o objetivo de analisar a quantidade, nuclear e citoplasmática, de determinada proteína expressa pelas amostras.

Foi possível observar que só houve uma diminuição significativa para a proteína COX-2 na linhagem SCC15 tratada com Celecoxib (Test T-Student $p < 0,05$) (Figura 5.7). Para as demais linhagens, SCC4, SCC9 e SCC25, nota-se um decréscimo na expressão no grupo tratado, porém esse não foi significativo. O mesmo ocorreu para a expressão das proteínas p-Akt e NF-kb nas quatro linhagens celulares estudadas, nas quais não foi notada uma diminuição significativa da expressão dessas proteínas (Figura 5.7).

Figura 5.7- Representação gráfica da média de valores da quantificação das proteínas COX-2, p-Akt e NF-kB pelo western blot. Abreviações: c- controle, t-tratado

6 DISCUSSÃO

O risco de um indivíduo desenvolver um tumor da cabeça e pescoço com base na sua composição genômica não pode ser explicitamente determinado até o momento. É previsto que os pacientes com risco de desenvolver câncer de cabeça e pescoço são cada vez mais susceptíveis de serem identificados a partir do DNA de uma linha germinal, sob a forma de mutações ou SNPs (pleomorfismo simples do nucleotídeo) (9).

Já foi revisto a biologia molecular, genômica, proteômica e as alterações genéticas envolvidas no CECP. O alvo da destruição seletiva das células malignas pode ser atingido através do desenvolvimento de agentes capazes de identificar as vias moleculares que distingue as células tumorais e as não tumorais (9).

Assim como ocorre com as células normais, o crescimento e a progressão tumoral são dependentes de receptores de membrana celular que controlam a transdução de sinais intracelulares responsáveis pela regulação da proliferação celular, apoptose, angiogênese, adesão e motilidade celular. As vias de sinalização como EGFR, Ras, Wnt/ β -catenina, NF-KB, TGF- β , Stat e PI3K/Akt/m-TOR desempenham um papel importante na progressão do carcinoma epidermóide (127). Em última análise, compreender a atividade aberrante destas vias pode resultar no desenvolvimento de novas estratégias moleculares voltadas para a prevenção e tratamento do carcinoma epidermóide.

A integração de diagnóstico molecular e da abordagem baseada nos riscos moleculares para o tratamento do câncer, que é caminho a ser seguido, é o maior desafio a ser enfrentado pelos pesquisadores e clínicos (9).

Devido à falta de especificidade e limitada eficiência dos agentes citotóxicos no tratamento para o câncer, há a necessidade de desenvolver alvos moleculares terapêuticos que visam distinguir entre as células tumorais e normais (128, 129).

Uma proteína que está em evidência é a COX-2, pois a mesma é capaz de induzir a síntese de prostaglandinas e está sendo intensivamente avaliada como um potencial alvo molecular no tratamento quimiopreventivo.

Recentemente, a aplicação terapêutica dos AINEs na quimioprevenção do câncer tem sido o foco de muitas investigações. Alguns desses estudos têm revelado que a COX-2 está superexpressa nos CECP humanos e que inibidores

seletivos dessa proteína poderiam suprimir a proliferação celular e aumentar a apoptose em linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide bucal. Apesar de se observar que as linhagens celulares de CEB expressam COX-2 em diferentes níveis, elas mostram similaridades no que diz respeito à sua susceptibilidade aos efeitos antiproliferativos e apoptóticos causados pelo Celecoxib (57).

No entanto, ainda não está claro como o Celecoxib, AINEs inibidor seletivo de COX-2, exerce seus efeitos preventivos sobre o crescimento e a invasão nas células tumorais, tanto *in vivo* como *in vitro*, assim como na prevenção dos pacientes com história de CECP em desenvolver um segundo tumor primário(57).

Na tentativa de elucidar o efeito do Celecoxib no crescimento do carcinoma epidermóide, foi realizado uma curva de viabilidade celular utilizando-se diversas doses de Celecoxib (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 75 μ M e 100 μ M) em quatro linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide bucal (SCC4, SCC9, SCC15 e SCC25), durante 24, 48 e 72 horas. Os resultados obtidos por essas curvas podem ser extrapolados para uma análise quantitativa do número de células, ou seja, quanto maior for a taxa de viabilidade celular, maior será a quantidade de células presentes.

A taxa de viabilidade celular notada entre os grupos celulares tratados com doses de Celecoxib entre 1 μ M e 10 μ M e o grupo controle, que não teve contato com o medicamento, foi muito semelhante, porém essa taxa foi levemente superior no grupo controle. Logo, podemos concluir que em doses baixas o Celecoxib é capaz de causar uma inibição da proliferação celular.

Com o aumento da dose, ficou evidente uma grande diminuição na quantidade de células em todas as linhagens estudadas, sugerindo que o efeito do Celecoxib é dose-dependente, isto é, quanto maior a dose utilizada, menor será a quantidade de células viáveis. Nas linhagens SCC4, SCC15 e SCC25 a quantidade de células viáveis tendeu a zero mostrando o efeito que o medicamento pode ter na morte celular.

No entanto, as curvas de viabilidade para as 4 linhagens celulares foram bastante similares nos três tempo utilizados, sugestionando que a ação é dose dependente , mas não tempo dependente.

Portanto, essa curva mostrou que dependendo da dose utilizada o Celecoxib pode exercer uma simples inibição na proliferação celular ou uma diminuição na quantidade de células (morte celular).

Já as curvas sigmoidais para o cálculo da IC_{50} revelaram que as diferentes linhagens celulares necessitam de divergentes concentrações de um determinado medicamento para que ocorra uma inibição de 50% da resposta biológica máxima. A diluição de Celecoxib escolhida para a realização deste trabalho foi uma dose entre aquelas obtidas pelo cálculo da IC_{50} (30 μ M). Optou-se por não variar a dose, com a finalidade de averiguar os diversos efeitos causados pelo medicamento nas linhagens celulares de carcinoma epidermóide. Desta forma teríamos linhagens as quais se apresentariam mais sensíveis e outras mais resistentes ao uso desta droga. O mesmo ocorre com os pacientes tratados para o carcinoma epidermóide oral, alguns respondem melhor a determinada terapia do que outros.

Esse fato pode ser explicado pela heterogenicidade dos carcinomas epidermóide, o qual têm sido demonstrado por análises histológica, fenotípica e cariotípica (130). A heterogenicidade foi principalmente atribuída ao processo de expansão clonal na qual vários clones são continuamente gerados devido às mudanças genéticas (131). Logo um tumor pode ter um comportamento semelhante ao outro, mas não será igual. Além disso, diferentes vias de sinalização como EGFR, Ras, Wnt/ β -catenina, NF-KB, TGF- β , Stat e PI3K/Akt/m-TOR podem se apresentar alteradas na progressão do carcinoma epidermóide (127).

Depois de confirmar que o Celecoxib causa um considerável decréscimo na quantidade de células viáveis, torna-se importante saber qual o mecanismo utilizado, necrose ou apoptose.

A morte celular por necrose ocorre, geralmente, em resposta à injúria severa às células e é caracterizada morfológicamente por inchaço citoplasmático e mitocondrial, ruptura da membrana plasmática e liberação do conteúdo extracelular. Consequentemente, ocorre a geração de uma resposta inflamatória, que pode causar injúria e até morte de células vizinhas, ou seja, nesta condição um grande número de células são afetadas e lesadas ao mesmo tempo e devido ao desencadeamento do processo inflamatório, há alterações irreversíveis no tecido e/ou órgão afetado. Por outro lado, o processo apoptótico envolve alteração de permeabilidade de membranas, condensação da cromatina, encolhimento celular, formação de corpos apoptóticos sem desintegração de organelas. (132). Este processo de morte celular possui um papel essencial na manutenção da homeostase tecidual e é importante em certas condições patológicas, incluindo o

câncer. Portanto, fica claro, o porquê as células neoplásicas devem morrer por apoptose e não por necrose.

Para tanto, utilizou-se o sistema Tunel (DeadEND Fluorometric Tunel System) para a identificação de células apoptóticas e realizou-se apenas uma análise qualitativa. Felizmente, os resultados do ensaio de apoptose elucidaram a eficácia do Celecoxib em promover a morte celular programada em todas as linhagens estudadas, na dose e tempo escolhidos, 30 μ M por 24 horas.

Assim como o nosso estudo, outros estudos têm mostrado que o Celecoxib exerce seu efeito anticarcinogênico em várias linhagens de células de câncer, induzindo a apoptose (133-136). A apoptose, ou morte celular programada, pode ser induzida pela via extrínseca através da ativação de receptores envolvidos com a morte celular ou através da via intrínseca, por meio da liberação de citocromo c da mitocôndria (137, 138).

Aberrante regulação da apoptose é extremamente implicada nos cânceres, assim como em muitas outras doenças (por exemplo, inflamação e doenças auto-imunes). Por isso controlar a atividade das vias Ras/Raf/MEK/ERK e Ras/PI3K/PTEN/Akt/m-TOR têm sido o objetivo da indústria farmacêutica por muitos anos. A atividade de muitos componentes chave da cascata de apoptose é sensível aos inibidores que são alvos dessas vias (139).

Durante a carcinogênese, a apoptose apresenta-se diminuída. A superexpressão de COX-2 nas células epiteliais resulta em um decréscimo na taxa apoptótica. Esse efeito foi atribuído, no mínimo, em parte ao aumento da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (79) e diminuição da Bax, proteína pró-apoptótica, as quais podem ser observadas nos tumores de mama desenvolvidos em ratos transgênicos que superexpressavam COX-2 (140). Consistente com esses resultados, AINEs inibidores seletivos de COX-2 tem mostrado induzir apoptose em uma variedade de modelos experimentais (141, 142). Juntos, esses dados mostram uma clara relação entre a expressão da COX-2 e o programa de morte celular. Possivelmente, a superregulação de COX-2 prolonga a sobrevivência das células anormais, favorecendo o acúmulo de alterações genéticas sequenciais que aumentam o risco da carcinogênese (52).

Os nossos resultados demonstraram que apenas a linhagem SCC15 apresenta apoptose via inibição da COX-2 com consequente diminuição da formação de prostaglandinas e aumento da apoptose celular. Esse fato fica evidente

é a reguladora dessa via (101). A inibição do Akt pelo Celecoxib evita a proliferação de células, por promover efeitos antiapoptóticos e poderia ser um dos possíveis mecanismos pelo qual o Celecoxib induz um bloqueio do ciclo celular (50).

No presente estudo, foi observada uma diminuição na expressão das proteínas p-Akt e NF- κ B no grupo tratado das quatro linhagens celulares estudadas. Entretanto, essa diminuição não foi estatisticamente significativa, demonstrando que o grupo controle e tratado dessas linhagens apresentam níveis semelhantes de expressão dessas proteínas. Desta forma, fica evidente que o Celecoxib não foi capaz de inibir a via de sinalização do p-Akt/NF- κ B e reforçou a idéia que a ação apoptótica ocorreu por uma via independente de COX-2.

A técnica de western blot avaliou a quantidade total de proteína, nuclear e citoplasmática, expressa pelas linhagens celulares. Já a técnica de imunofluorescência, mostrou a localização intracelular dessas proteínas. Tendo isso em vista, o Celecoxib não foi capaz de causar uma alteração significativa na quantidade de proteína expressa, mas modificou a localização intracelular das proteínas p-Akt e NF- κ B e a forma de expressão da COX-2.

Sabe-se que após a ativação, Akt é capaz de translocar para o núcleo (24, 86, 143), onde afeta a atividade de uma série de reguladores de transcrição, tais como CREB, E2F, fator nuclear kappa de células B (NF- κ B) via inibidor de proteína quinase kappa B (IKK), fatores de transcrição da família forkhead e MDM2 que regula a atividade da p53. Estes são todos os substratos, seja direta ou indiretamente influenciados pelo Akt, e cada um pode regular a proliferação e sobrevivência celular (24, 86, 144). Ao lado dos fatores de transcrição, Akt é capaz de atingir um número de outras moléculas que influenciam o estado de sobrevivência da célula, incluindo: a molécula pró-apoptótica Bcl-2-associada ao promotor de morte (BAD) e quinase glicogênio sintase 3 β (GSK-3 β) (139).

Desta forma, um interessante resultado foi obtido com o uso do Celecoxib nas linhagens SCC15 e SCC25 para a proteína p-Akt que no grupo controle apresentou apenas uma marcação nuclear e no grupo tratado houve tanto expressão nuclear como citoplasmática. Talvez o Celecoxib, não seja capaz de inibir a via do p-Akt nessas linhagens celulares, mas tenha um papel importante na regulação da proliferação e sobrevivência celular.

Como mostrado nos resultados pelo western blotting, a proteína NF- κ B está expressa em todas as linhagens celulares, mas, segundo a imunofluorescência, esta

proteína está ativa apenas na linhagem celular SCC25, no grupo que não entrou em contato com o medicamento.

Como mencionado anteriormente, a capacidade do NF- κ B em realizar a transcrição gênica só é possível quando está localizado no núcleo celular. Este controle é realizado pelo Inibidor de κ B (I κ B) que se liga ao NF- κ B e o inativa, mantendo-o no citosol. Para que isto ocorra, outra proteína conhecida como IKK precisa ser fosforilada e ativada pelo Akt, sendo então capaz de fosforilar o I κ B levando-o para ubiquitinação e conseqüente degradação. Na ausência do I κ B, homo ou heterodímeros do NF- κ B são translocados para o núcleo onde ligam-se ao DNA e induzem a transcrição (111, 112).

Portanto, podemos concluir que o Celecoxib na linhagem celular SCC25 foi capaz de inativar o NF- κ B, não permitindo que houvesse a sua translocação para o núcleo. Além disso, essa inativação pode ter contribuído para a redução do número de células no grupo tratado.

Outro resultado bastante interessante foi a forma de expressão da COX-2. No grupo controle, ela foi citoplasmática e se mostrou dispersa. Já no grupo tratado, ela manteve-se citoplasmática, mas tornou-se granulosa. Isso pode ser explicado pelo fato das células de CEB superexpressarem COX-2 e por isso observamos uma marcação dispersa pelo citoplasma. No entanto, no grupo tratado, a marcação granulosa pode ser explicada pela inibição que o Celecoxib causou na COX-2, fazendo com que os locais com maior concentração desta proteína fossem marcados. É importante ressaltar que essa inibição só foi significativa para a linhagem SCC15, como mencionado anteriormente.

Outra discussão importante a ser realizada, além dos mecanismos utilizados pelo Celecoxib para causar seus efeitos anticarcinogênicos, é sobre os efeitos colaterais nos pacientes que fazem o uso crônico desta droga. Sabe-se que o uso prolongado de AINEs tradicionais, que inibem COX-1 e COX-2, está associado aos graves efeitos colaterais gastrointestinais, tais como ulceração e perfuração da mucosa gástrica. Esses efeitos colaterais têm sido atribuídos à inibição da COX-1, que medeia a produção de prostaglandina gastro-protetora. Para contornar os efeitos colaterais associados à inibição de COX-1, inibidores seletivos de COX-2, como o Celecoxib e rofecoxib, foram desenvolvidos (145, 146). Os estudos clínicos encontraram que os inibidores seletivos de COX-2 tinham menos efeitos colaterais gastrointestinais e possuíam atividades antiinflamatórias, comparáveis aos dos

AINEs tradicionais (145). No entanto, o grupo dos inibidores COX-2, incluindo o Celecoxib, rofecoxib, valdecoxib, etoricoxib e lumiracoxib, está atualmente sob investigação devido as críticas por causa do risco aumento dos efeitos colaterais cardiovasculares (tais como um aumento da pressão arterial, acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio), que têm surgido após o uso prolongado do rofecoxib e valdecoxib (147, 148).

No entanto, os resultados para Celecoxib são um pouco diferentes. Embora um estudo tenha encontrado associação dos efeitos colaterais cardiovasculares, como infarto, derrame e insuficiência cardíaca, ao prolongado tratamento com Celecoxib (148), outro estudo clínico semelhante, um estudo experimental para a prevenção de espontâneos pólipos adenomatosos, não encontrou a relação citada entre o uso de Celecoxib e o aumento do risco cardiovascular. Assim, o FDA permitiu que o Celecoxib permanecesse no mercado, mas exigiu que o medicamento tivesse uma tarja modificada chamando a atenção para o possível risco cardiovascular, assim como os riscos para o trato gastrointestinal e pele (149, 150).

Outra questão importante a ser tratada é o porquê da diferença entre os resultados encontrados nos estudos em cultivo celular e no estudo *in vivo*. A concentração de Celecoxib utilizada na maioria dos experimentos de cultura celular é maior do que aquela alcançada no plasma de pacientes envolvidos em estudos clínicos para obter efeitos anticarcinogênicos. Quando se compara as concentrações de Celecoxib requeridas na maioria dos experimentos de cultura celular (40-100 μM) para induzir a apoptose com a máxima concentração plasmática obtidas em humanos após a administração de uma dose de 400 mg (aproximadamente 3 μM), nota-se que a concentração de Celecoxib necessária para induzir a apoptose *in vitro* foi de 5- 20 vezes maior que aquela *in vivo* (48, 151). Essa discrepância pode ser explicada pelo fato de que a regressão do tumor em doentes ou animais exige semanas ou meses de tratamento com a droga, enquanto os efeitos antiproliferativos em células cultivadas são observados após apenas algumas horas (152). Além disso, a proliferação de células cultivadas ocorre sob condições otimizadas, que não são comparáveis às condições *in vivo*. Somado a isso, temos a resposta a terapia antitumoral *in vivo* que inclui a resposta dos efeitos acumulados da quimioterapia ou radioterapia, por causa do tratamento repetido de pacientes com câncer durante semanas ou meses (153).

7 CONCLUSÕES

Com esse estudo podemos concluir que:

1. Dependendo da dose utilizada de Celecoxib em linhagens celulares de carcinoma epidermóide bucal, pode-se ter uma diminuição na taxa de proliferação celular ou na quantidade de células viáveis morte celular.
2. Na dose escolhida de Celecoxib para realizar este estudo, 30 μ M por 24 horas, o decréscimo das células viáveis ocorreu por apoptose.
3. O processo de apoptose pode estar associada a diminuição significativa da COX-2 como também pode estar ocorrendo por uma via independente da COX-2. Além disso, o Celecoxib não conseguiu bloquear a via p-Akt/Nf-kB, uma vez que não houve alteração na expressão dessas 2 proteínas nos grupos tratados.
4. Em relação à localização intracelular, o celecoxib foi capaz de alterar o local de expressão das proteínas p-Akt e NF-kB em algumas linhagens, mostrando a sua eficácia na regulação da proliferação, sobrevivência celular e inativação do fator de transcrição NF-kB.
5. O Celecoxib demonstrou grande eficácia na inibição da proliferação celular de linhagens celulares de CEB.

REFERÊNCIAS ¹

1. Rodrigues VC, Moss SM, Tuomainen H. Oral cancer in the UK: to screen or not to screen. *Oral Oncol*. 1998 Nov;34(6):454-65.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*. 2009 Jul-Aug;59(4):225-49.
3. Freedman ND, Schatzkin A, Leitzmann MF, Hollenbeck AR, Abnet CC. Alcohol and head and neck cancer risk in a prospective study. *Br J Cancer*. 2007 May 7;96(9):1469-74.
4. Yan M, Xu Q, Zhang P, Zhou XJ, Zhang ZY, Chen WT. Correlation of NF-kappaB signal pathway with tumor metastasis of human head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2011;10:437.
5. Chen JS, Pardo FS, Wang-Rodriguez J, Chu TS, Lopez JP, Aguilera J, et al. EGFR regulates the side population in head and neck squamous cell carcinoma. *Laryngoscope*. 2006 Mar;116(3):401-6.
6. .www.inca.gov.br
7. Dobrossy L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer Metastasis Rev*. 2005 Jan;24(1):9-17.
8. Lefebvre JL. Current clinical outcomes demand new treatment options for SCCHN. *Ann Oncol*. 2005;16 Suppl 6:vi7-vi12.
9. Mehrotra R, Ibrahim R, Eckardt A, Driemel O, Singh M. Novel Strategies in Therapy of Head and Neck Cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 2011 May;11(4):465-78.
10. Hamakawa H, Nakashiro K, Sumida T, Shintani S, Myers JN, Takes RP, et al. Basic evidence of molecular targeted therapy for oral cancer and salivary gland cancer. *Head Neck*. 2008 Jun;30(6):800-9.

¹ De acordo com estilo Vancouver.

11. Rhee JC, Khuri FR, Shin DM. Advances in chemoprevention of head and neck cancer. *Oncologist*. 2004;9(3):302-11.
12. Mohan S, Epstein JB. Carcinogenesis and cyclooxygenase: the potential role of COX-2 inhibition in upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol*. 2003 Sep;39(6):537-46.
13. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. 2011 Sep-Oct;60(5):277-300.
14. Biolchini F, Pollastri G, Figurelli S, Chiarini L. Carcinogen metabolism, DNA damage repair and oral head and neck squamocellular carcinoma (HNSCC). A review. *Minerva Stomatol*. 2005 Jul-Aug;54(7-8):405-14.
15. Chaudhary AK, Singh M, Sundaram S, Mehrotra R. Role of human papillomavirus and its detection in potentially malignant and malignant head and neck lesions: updated review. *Head Neck Oncol*. 2009;1:22.
16. Jayaprakash V, Rigual NR, Moysich KB, Loree TR, Nasca MA, Menezes RJ, et al. Chemoprevention of head and neck cancer with aspirin: a case-control study. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006 Nov;132(11):1231-6.
17. Warnakulasuriya S. Lack of molecular markers to predict malignant potential of oral precancer. *J Pathol*. 2000 Mar;190(4):407-9.
18. Baldwin AS. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J Clin Invest*. 2001 Feb;107(3):241-6.
19. Lobo N, Shimono Y, Qian D, Clarke M. The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007;23:675-99.
20. Hanahan D, Weinberg R. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
21. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*. 2008;358(11):1148-59.
22. McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, Bertrand FE, Ludwig DE, Basecke J, et al. Targeting survival cascades induced by activation of Ras/Raf/MEK/ERK,

PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways for effective leukemia therapy. *Leukemia*. 2008 Apr;22(4):708-22.

23. Casar B, Pinto A, Crespo P. ERK dimers and scaffold proteins: unexpected partners for a forgotten (cytoplasmic) task. *Cell Cycle*. 2009 Apr 1;8(7):1007-13.

24. Martelli AM, Evangelisti C, Chiarini F, Grimaldi C, Cappellini A, Ognibene A, et al. The emerging role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin signaling network in normal myelopoiesis and leukemogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Sep;1803(9):991-1002.

25. Korotchkina LG, Leontieva OV, Bukreeva EI, Demidenko ZN, Gudkov AV, Blagosklonny MV. The choice between p53-induced senescence and quiescence is determined in part by the mTOR pathway. *Aging*. 2011 Jun;2(6):344-52.

26. Partridge M, Emilion G, Pateromichelakis S, Phillips E, Langdon J. Field cancerisation of the oral cavity: comparison of the spectrum of molecular alterations in cases presenting with both dysplastic and malignant lesions. *Oral Oncol*. 1997;33(5):332-7.

27. Pedrero JM, Carracedo DG, Pinto CM, Zapatero AH, Rodrigo JP, Nieto CS, et al. Frequent genetic and biochemical alterations of the PI 3-K/AKT/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2005 Mar 20;114(2):242-8.

28. Fosslien E. Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Ann Clin Lab Sci*. 2000 Jan;30(1):3-21.

29. Allen CT, Ricker JL, Chen Z, Van Waes C. Role of activated nuclear factor-kappaB in the pathogenesis and therapy of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck*. 2007 Oct;29(10):959-71.

30. Molinolo AA, Amornphimoltham P, Squarize CH, Castilho RM, Patel V, Gutkind JS. Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. *Oral Oncology*. 2008 Apr-May;45(4-5):324-34.

31. Browman GP, Hodson DI, Mackenzie RJ, Bestic N, Zuraw L. Choosing a concomitant chemotherapy and radiotherapy regimen for squamous cell head and neck cancer: A systematic review of the published literature with subgroup analysis. *Head Neck*. 2001 Jul;23(7):579-89.

32. Mao L, Hong WK, Papadimitrakopoulou VA. Focus on head and neck cancer. *Cancer Cell*. 2004 Apr;5(4):311-6.
33. Bernier J, Bentzen SM. Altered fractionation and combined radio-chemotherapy approaches: pioneering new opportunities in head and neck oncology. *Eur J Cancer*. 2003 Mar;39(5):560-71.
34. Robbins KT, Kumar P, Wong FS, Hartsell WF, Flick P, Palmer R, et al. Targeted chemoradiation for advanced head and neck cancer: analysis of 213 patients. *Head Neck*. 2000 Oct;22(7):687-93.
35. van den Broek GB, Balm AJ, van den Brekel MW, Hauptmann M, Schornagel JH, Rasch CR. Relationship between clinical factors and the incidence of toxicity after intra-arterial chemoradiation for head and neck cancer. *Radiother Oncol*. 2006 Nov;81(2):143-50.
36. Rapidis AD, Wolf GT. Immunotherapy of head and neck cancer: current and future considerations. *J Oncol*. 2009;2009:346345.
37. Whiteside TL, Letessier E, Hirabayashi H, Vitolo D, Bryant J, Barnes L, et al. Evidence for local and systemic activation of immune cells by peritumoral injections of interleukin 2 in patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res*. 1993 Dec 1;53(23):5654-62.
38. Davidson HC, Leibowitz MS, Lopez-Albaitero A, Ferris RL. Immunotherapy for head and neck cancer. *Oral Oncol*. 2009 Sep;45(9):747-51.
39. Kubler AC, Scheer M, Zoller JE. Photodynamic therapy of head and neck cancer. *Onkologie*. 2001 Jun;24(3):230-7.
40. Hopper C, Kubler A, Lewis H, Tan IB, Putnam G. mTHPC-mediated photodynamic therapy for early oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2004 Aug 10;111(1):138-46.
41. Konturek PC, Konturek SJ, Bielanski W, Kania J, Zuchowicz M, Hartwich A, et al. Influence of COX-2 inhibition by rofecoxib on serum and tumor progastrin and gastrin levels and expression of PPARgamma and apoptosis-related proteins in gastric cancer patients. *Dig Dis Sci*. 2003 Oct;48(10):2005-17.

42. Pruthi RS, Derksen JE, Moore D. A pilot study of use of the cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib in recurrent prostate cancer after definitive radiation therapy or radical prostatectomy. *BJU Int*. 2004 Feb;93(3):275-8.
43. Sandler AB, Dubinett SM. COX-2 inhibition and lung cancer. *Semin Oncol*. 2004 Apr;31(2 Suppl 7):45-52.
44. Sirica AE, Lai GH, Zhang Z. Biliary cancer growth factor pathways, cyclooxygenase-2 and potential therapeutic strategies. *J Gastroenterol Hepatol*. 2001 Apr;16(4):363-72.
45. Wang Z, Fuentes CF, Shapshay SM. Antiangiogenic and chemopreventive activities of celecoxib in oral carcinoma cell. *Laryngoscope*. 2002 May;112(5):839-43.
46. Vane JR. Purity and stability of synthetic peptides such as angiotensins and kinins. *Nature*. 1971 Apr 9;230(5293):382.
47. Fu SL, Wu YL, 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 Jul 1;10(13):1971-4.
48. Maier TJ, Schilling K, Schmidt R, Geisslinger G, Grosch S. Cyclooxygenase-2 (COX-2)-dependent and -independent anticarcinogenic effects of celecoxib in human colon carcinoma cells. *Biochem Pharmacol*. 2004 Apr 15;67(8):1469-78.
49. Tive L. Celecoxib clinical profile. *Rheumatology*. 2000 Dec;39 Suppl 2:21-8; discussion 57-9.
50. Grosch S, Maier TJ, Schiffmann S, Geisslinger G. Cyclooxygenase-2 (COX-2)-independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. *J Natl Cancer Inst*. 2006 Jun 7;98(11):736-47.
51. Kashfi K, Rigas B. Is COX-2 a 'collateral' target in cancer prevention? *Biochem Soc Trans*. 2005 Aug;33(Pt 4):724-7.
52. Lin DT, Subbaramaiah K, Shah JP, Dannenberg AJ, Boyle JO. Cyclooxygenase-2: a novel molecular target for the prevention and treatment of head and neck cancer. *Head Neck*. 2002 Aug;24(8):792-9.

53. Gallo O, Franchi A, Magnelli L, Sardi I, Vannacci A, Boddi V, et al. Cyclooxygenase-2 pathway correlates with VEGF expression in head and neck cancer. Implications for tumor angiogenesis and metastasis. *Neoplasia*. 2001 Jan-Feb;3(1):53-61.
54. Grubbs CJ, Lubet RA, Koki AT, Leahy KM, Masferrer JL, Steele VE, et al. Celecoxib inhibits N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine-induced urinary bladder cancers in male B6D2F1 mice and female Fischer-344 rats. *Cancer Res*. 2000 Oct 15;60(20):5599-602.
55. Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB, et al. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med*. 2000 Jun 29;342(26):1946-52.
56. Wilson JC, Anderson LA, Murray LJ, Hughes CM. Non-steroidal anti-inflammatory drug and aspirin use and the risk of head and neck cancer: a systematic review. *Cancer Causes Control*. 2011 May;22(5):803-10.
57. Kwak YE, Jeon NK, Kim J, Lee EJ. The cyclooxygenase-2 selective inhibitor celecoxib suppresses proliferation and invasiveness in the human oral squamous carcinoma. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Jan;1095:99-112.
58. 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 May 1;64(9):3230-5.
59. Vital-Reyes V, Rodriguez-Burford C, Chhieng DC, Oelschlager DK, Reyes-Fuentes A, Barnes M, et al. Celecoxib inhibits cellular growth, decreases Ki-67 expression and modifies apoptosis in ovarian cancer cell lines. *Arch Med Res*. 2006 Aug;37(6):689-95.
60. Kerins DM, Murray R, FitzGerald GA. Prostacyclin and prostaglandin E1: molecular mechanisms and therapeutic utility. *Prog Hemost Thromb*. 1991;10:307-37.
61. Hilmi I, Goh KL. Chemoprevention of colorectal cancer with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Chin J Dig Dis*. 2006;7(1):1-6.
62. Kern MA, Haugg AM, Koch AF, Schilling T, Breuhahn K, Walczak H, et al. Cyclooxygenase-2 inhibition induces apoptosis signaling via death receptors and mitochondria in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2006 Jul 15;66(14):7059-66.

63. van Rees BP, Saukkonen K, Ristimaki A, Polkowski W, Tytgat GN, Drillenburger P, et al. Cyclooxygenase-2 expression during carcinogenesis in the human stomach. *J Pathol.* 2002 Feb;196(2):171-9.
64. Altorki N. COX-2: a target for prevention and treatment of esophageal cancer. *J Surg Res.* 2004 Mar;117(1):114-20.
65. 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 Feb;42(3):422-6.
66. Hinz B, Brune K, Pahl A. Cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes is modulated by cyclic AMP, prostaglandin E(2), and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Nov 30;278(3):790-6.
67. Funk CD, FitzGerald GA. COX-2 inhibitors and cardiovascular risk. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2007 Nov;50(5):470-9.
68. Coruzzi G, Venturi N, Spaggiari S. Gastrointestinal safety of novel nonsteroidal antiinflammatory drugs: selective COX-2 inhibitors and beyond. *Acta Biomed.* 2007 Aug;78(2):96-110.
69. Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner BM, et al. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res.* 2000 Mar 1;60(5):1306-11.
70. O'Connor JK, Avent J, Lee RJ, Fischbach J, Gaffney DK. Cyclooxygenase-2 expression correlates with diminished survival in invasive breast cancer treated with mastectomy and radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004 Mar 15;58(4):1034-40.
71. Seo SS, Song YS, Kang DH, 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 Mar;92(3):927-35.

72. 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 Jun;19(6):638-42.
73. Kelley DJ, Mestre JR, Subbaramaiah K, Sacks PG, Schantz SP, Tanabe T, et al. Benzo[a]pyrene up-regulates cyclooxygenase-2 gene expression in oral epithelial cells. *Carcinogenesis*. 1997 Apr;18(4):795-9.
74. Wiese FW, Thompson PA, Kadlubar FF. Carcinogen substrate specificity of human COX-1 and COX-2. *Carcinogenesis*. 2001 Jan;22(1):5-10.
75. Chan G, Boyle JO, Yang EK, Zhang F, Sacks PG, Shah JP, et al. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res*. 1999 Mar 1;59(5):991-4.
76. Saba NF, Choi M, Muller S, Shin HJ, Tighiouart M, Papadimitrakopoulou VA, et al. Role of cyclooxygenase-2 in tumor progression and survival of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Prev Res*. 2009 Sep;2(9):823-9.
77. Camacho M, Leon X, Fernandez-Figueras MT, Quer M, Vila L. Prostaglandin E(2) pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2008 Sep;30(9):1175-81.
78. Terakado N, Shintani S, Yano J, Chunnan L, Mihara M, Nakashiro K, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with radioresistance in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2004 Apr;40(4):383-9.
79. 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 Jan 15;58(2):362-6.
80. Reddy ST, Wadleigh DJ, Herschman HR. Transcriptional regulation of the cyclooxygenase-2 gene in activated mast cells. *J Biol Chem*. 2000 Feb 4;275(5):3107-13.
81. Tang Q, Gonzales M, Inoue H, Bowden GT. Roles of Akt and glycogen synthase kinase 3beta in the ultraviolet B induction of cyclooxygenase-2 transcription in human keratinocytes. *Cancer Res*. 2001 Jun 1;61(11):4329-32.

82. Kundu JK, Choi KY, Surh YJ. beta-Catenin-mediated signaling: a novel molecular target for chemoprevention with anti-inflammatory substances. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Jan;1765(1):14-24.
83. Buchanan FG, Wang D, Bargiacchi F, DuBois RN. Prostaglandin E2 regulates cell migration via the intracellular activation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*. 2003 Sep 12;278(37):35451-7.
84. Pai R, Soreghan B, Szabo IL, Pavelka M, Baatar D, Tarnawski AS. Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. *Nat Med*. 2002 Mar;8(3):289-93.
85. Subbaramaiah K, Norton L, Gerald W, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase-2 is overexpressed in HER-2/neu-positive breast cancer: evidence for involvement of AP-1 and PEA3. *J Biol Chem*. 2002 May 24;277(21):18649-57.
86. Martelli AM, Evangelisti C, Chiarini F, McCubrey JA. The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR signaling network as a therapeutic target in acute myelogenous leukemia patients. *Oncotarget*. 2011 Jun;1(2):89-103.
87. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC, Toker A. Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science*. 1997 Jan 31;275(5300):665-8.
88. Coffey PJ, Woodgett JR. Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur J Biochem*. 1991 Oct 15;201(2):475-81.
89. Hennessy B, Smith D, Ram P, Lu Y, Mills G. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discovery*. 2005;4(12):988-1004.
90. Nicholson K, Anderson N. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignance. *Cell Signal*. 2002;14(5):381-95.
91. Irie H, Pearline R, Grueneberg D, Hsia M, Ravichandron P, Kothari N, et al. Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol*. 2005;171:1023-34.

92. Larue L, Bellacosa A. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene*. 2005;24:7443-54.
93. Irie HY, Pearline RV, Grueneberg D, Hsia M, Ravichandran P, Kothari N, et al. Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol*. 2005 Dec 19;171(6):1023-34.
94. Lim J, Kim J, Paeng J, Kim M, Hong S, Lee J, et al. Prognostic value of activated Akt expression in oral squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol*. 2005;58:1199-205.
95. Luo J, Manning B, Cantley L. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell*. 2003;4(4):257-62.
96. Cantley L. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*. 2002;296(5573):1655-7.
97. Sarbassov D, Guertin D, Ali S, Sabatini D. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*. 2005;307(5712):1098-101.
98. Martin JL, Baxter RC. Expression of insulin-like growth factor binding protein-2 by MCF-7 breast cancer cells is regulated through the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/mammalian target of rapamycin pathway. *Endocrinology*. 2007 May;148(5):2532-41.
99. Zhang M, Fang X, Liu H, Wang S, Yang D. Blockade of AKT activation in prostate cancer cells with a small molecule inhibitor, 9-chloro-2-methylellipticinium acetate (CMEP). *Biochem Pharmacol*. 2007 Jan 1;73(1):15-24.
100. Pang RP, Zhou JG, Zeng ZR, Li XY, Chen W, Chen MH, et al. Celecoxib induces apoptosis in COX-2 deficient human gastric cancer cells through Akt/GSK3beta/NAG-1 pathway. *Cancer Lett*. 2007 Jun 28;251(2):268-77.
101. St-Germain ME, Gagnon V, Parent S, Asselin E. Regulation of COX-2 protein expression by Akt in endometrial cancer cells is mediated through NF-kappaB/IkappaB pathway. *Mol Cancer*. 2004 Mar 11;3:7.
102. Stemke-Hale K, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A, Neve RM, Kuo WL, Davies M, et al. An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res*. 2008 Aug 1;68(15):6084-91.

103. Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol.* 2009;4:127-50.
104. Davies MA, Stemke-Hale K, Tellez C, Calderone TL, Deng W, Prieto VG, et al. A novel AKT3 mutation in melanoma tumours and cell lines. *Br J Cancer.* 2008 Oct 21;99(8):1265-8.
105. Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell.* 2002 Apr;109 Suppl:S81-96.
106. Greten FR, Karin M. The IKK/NF-kappaB activation pathway-a target for prevention and treatment of cancer. *Cancer Lett.* 2004 Apr 8;206(2):193-9.
107. Qing G, Xiao G. Essential role of IkappaB kinase alpha in the constitutive processing of NF-kappaB2 p100. *J Biol Chem.* 2005 Mar 18;280(11):9765-8.
108. Carlsen H, Alexander G, Austenaa LM, Ebihara K, Blomhoff R. Molecular imaging of the transcription factor NF-kappaB, a primary regulator of stress response. *Mutat Res.* 2004 Jul 13;551(1-2):199-211.
109. Luo JL, Kamata H, Karin M. IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death--a new approach to cancer therapy. *J Clin Invest.* 2005 Oct;115(10):2625-32.
110. Clarkson R. Ikb kinase alpha: a link in the chain of the mammary cycle. *Breast Cancer Res.* 2002;4(5):173-5.
111. 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 Mar;17(3):590-603.
112. Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X. NF-kB in development and progression of human cancer. *Virchows Arch.* 2005 May;446(5):475-82.
113. Chang AA, Van Waes C. Nuclear factor-KappaB as a common target and activator of oncogenes in head and neck squamous cell carcinoma. *Adv Otorhinolaryngol.* 2005;62:92-102.

114. Zhang PL, Pellitteri PK, Law A, Gilroy PA, Wood GC, Kennedy TL, et al. Overexpression of phosphorylated nuclear factor-kappa B in tonsillar squamous cell carcinoma and high-grade dysplasia is associated with poor prognosis. *Mod Pathol*. 2005 Jul;18(7):924-32.
115. Joyce D, Albanese C, Steer J, Fu M, Bouzahzah B, Pestell RG. NF-kappaB and cell-cycle regulation: the cyclin connection. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2001 Mar;12(1):73-90.
116. Ravi R, Bedi A. NF-kappaB in cancer--a friend turned foe. *Drug Resist Updat*. 2004 Feb;7(1):53-67.
117. Pai SI, Westra WH. Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. *Annu Rev Pathol*. 2009;4:49-70.
118. Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, et al. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature*. 2004 Sep 23;431(7007):461-6.
119. Koyama S. Differential expression of intracellular apoptotic signaling molecules in tumor and tumor-infiltrating lymphocytes during development of invasion and/or metastasis of gastric carcinoma. *Dig Dis Sci*. 2003 Dec;48(12):2290-300.
120. Epinat JC, Gilmore TD. Diverse agents act at multiple levels to inhibit the Rel/NF-kappaB signal transduction pathway. *Oncogene*. 1999 Nov 22;18(49):6896-909.
121. Aggarwal S, Takada Y, Singh S, Myers JN, Aggarwal BB. Inhibition of growth and survival of human head and neck squamous cell carcinoma cells by curcumin via modulation of nuclear factor-kappaB signaling. *Int J Cancer*. 2004 Sep 20;111(5):679-92.
122. Yang F, Zeng Q, Yu G, Li S, Wang CY. Wnt/beta-catenin signaling inhibits death receptor-mediated apoptosis and promotes invasive growth of HNSCC. *Cell Signal*. 2006 May;18(5):679-87.
123. Chun KS, Surh YJ. Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention. *Biochem Pharmacol*. 2004 Sep 15;68(6):1089-100.

124. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Jan;8(1):49-62.
125. Ahmed KM, Dong S, Fan M, Li JJ. Nuclear factor-kappaB p65 inhibits mitogen-activated protein kinase signaling pathway in radioresistant breast cancer cells. *Mol Cancer Res.* 2006 Dec;4(12):945-55.
126. Anto RJ, Mukhopadhyay A, Shishodia S, Gairola CG, Aggarwal BB. Cigarette smoke condensate activates nuclear transcription factor-kappaB through phosphorylation and degradation of IkappaB(alpha): correlation with induction of cyclooxygenase-2. *Carcinogenesis.* 2002 Sep;23(9):1511-8.
127. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70.
128. Stephenson J. Researchers optimistic about sea change in cancer treatment. *JAMA.* 2001 Jun 13;285(22):2841-2.
129. Rowinsky EK. The pursuit of optimal outcomes in cancer therapy in a new age of rationally designed target-based anticancer agents. *Drugs.* 2000;60 Suppl 1:1-14; discussion 41-2.
130. Tremmel SC, Gotte K, Popp S, Weber S, Hormann K, Bartram CR, et al. Intratumoral genomic heterogeneity in advanced head and neck cancer detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet.* 2003 Jul 15;144(2):165-74.
131. Tabor MP, Brakenhoff RH, van Houten VM, Kummer JA, Snel MH, Snijders PJ, et al. Persistence of genetically altered fields in head and neck cancer patients: biological and clinical implications. *Clin Cancer Res.* 2001 Jun;7(6):1523-32.
132. Curtin JF, Donovan M, Cotter TG. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J Immunol Methods.* 2002 Jul 1;265(1-2):49-72.
133. Grosch S, Tegeder I, Niederberger E, Brautigam L, Geisslinger G. COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. *FASEB J.* 2001 Dec;15(14):2742-4.

134. Arico S, Pattingre S, Bauvy C, Gane P, Barbat A, Codogno P, et al. Celecoxib induces apoptosis by inhibiting 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 activity in the human colon cancer HT-29 cell line. *J Biol Chem*. 2002 Aug 2;277(31):27613-21.
135. Zhang Z, Lai GH, Sirica AE. Celecoxib-induced apoptosis in rat cholangiocarcinoma cells mediated by Akt inactivation and Bax translocation. *Hepatology*. 2004 Apr;39(4):1028-37.
136. Hsu AL, Ching TT, Wang DS, Song X, Rangnekar VM, Chen CS. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib induces apoptosis by blocking Akt activation in human prostate cancer cells independently of Bcl-2. *J Biol Chem*. 2000 Apr 14;275(15):11397-403.
137. Lim ML, Lum MG, Hansen TM, Roucou X, Nagley P. On the release of cytochrome c from mitochondria during cell death signaling. *J Biomed Sci*. 2002;9(6 Pt 1):488-506.
138. Green DR, Evan GI. A matter of life and death. *Cancer Cell*. 2002 Feb;1(1):19-30.
139. Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Kempf RC, Long J, Laidler P, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging*. 2011Mar;3(3):192-222.
140. Liu CH, Chang SH, Narko K, Trifan OC, Wu MT, Smith E, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *J Biol Chem*. 2001 May 25;276(21):18563-9.
141. Sawaoka H, Kawano S, Tsuji S, Tsujii M, Gunawan ES, Takei Y, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitors suppress the growth of gastric cancer xenografts via induction of apoptosis in nude mice. *Am J Physiol*. 1998 Jun;274(6 Pt 1):G1061-7.
142. Nishimura G, Yanoma S, Mizuno H, Kawakami K, Tsukuda M. A selective cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses tumor growth in nude mouse xenografted with human head and neck squamous carcinoma cells. *Jpn J Cancer Res*. 1999 Oct;90(10):1152-62.

143. Lee JT, Steelman LS, Chappell WH, McCubrey JA. Akt inactivates ERK causing decreased response to chemotherapeutic drugs in advanced CaP cells. *Cell Cycle*. 2008 Mar 1;7(5):631-6.
144. Knizetova P, Ehrmann J, Hlobilkova A, Vancova I, Kalita O, Kolar Z, et al. Autocrine regulation of glioblastoma cell cycle progression, viability and radioresistance through the VEGF-VEGFR2 (KDR) interplay. *Cell Cycle*. 2008 Aug 15;7(16):2553-61.
145. Alsalameh S, Burian M, Mahr G, Woodcock BG, Geisslinger G. Review article: The pharmacological properties and clinical use of valdecoxib, a new cyclooxygenase-2-selective inhibitor. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003 Feb 15;17(4):489-501.
146. Capone ML, Tacconelli S, Sciulli MG, Patrignani P. Clinical pharmacology of selective COX-2 inhibitors. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2003 May-Aug;16(2 Suppl):49-58.
147. Bresalier RS, Sandler RS, Quan H, Bolognese JA, Oxenius B, Horgan K, et al. Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *N Engl J Med*. 2005 Mar 17;352(11):1092-102.
148. Solomon SD, McMurray JJ, Pfeffer MA, Wittes J, Fowler R, Finn P, et al. Cardiovascular risk associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention. *N Engl J Med*. 2005 Mar 17;352(11):1071-80.
149. Maillard M, Burnier M. Comparative cardiovascular safety of traditional nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Expert Opin Drug Saf*. 2006 Jan;5(1):83-94.
150. Tegeder I, Geisslinger G. Cardiovascular risk with cyclooxygenase inhibitors: general problem with substance specific differences? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2006 Apr;373(1):1-17.
151. Niederberger E, Tegeder I, Vetter G, Schmidt A, Schmidt H, Euchenhofer C, et al. Celecoxib loses its anti-inflammatory efficacy at high doses through activation of NF-kappaB. *FASEB J*. 2001 Jul;15(9):1622-4.
152. Maier TJ, Janssen A, Schmidt R, Geisslinger G, Grosch S. 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 Aug;19(10):1353-5.

153. Liu WM, Joel SP. The schedule-dependent effects of etoposide in leukaemic cell lines: a function of concentration and duration. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2003 Apr;51(4):291-6.

Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

DECLARAÇÃO
Protocolo 38/07

Declaramos que o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo recebeu e aceitou o adendo referente a substituição da pesquisadora Aline Corrêa Abrahão para Aluana Maria da Costa Dal Vechio do projeto "ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE TRANSCRITOS E PROTEÍNAS COX-2, AKT, NFkB, IKB, MTOR E CD1 EM CULTURA DE CÉLULAS DE CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE CABEÇA E PESCOÇO TRATADAS COM CELECOXIB", sob orientação do(a) Professor(a) Doutor(a) Décio dos Santos Pinto Junior, Protocolo 38/2007, aprovado em 13 de abril de 2007.

São Paulo, 18 de março de 2011.

Profa. Dra. **Marcia Turolia Wanderley**
Coordenadora do CEP-FOUSP