RENATA MENDES MOURA

**Avaliação do potencial antiproliferativo do dendrímero de poliglicerol
associado ao celecoxibe em linhagens celulares de carcinoma
epidermoide de cabeça e pescoço**

São Paulo

2014

RENATA MENDES MOURA

**Avaliação do potencial antiproliferativo do dendrímero de poliglicerol
associado ao celecoxibe em linhagens celulares de carcinoma
epidermóide de cabeça e pescoço**

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 e Estomatologia Básica e Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior

São Paulo

2014

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

Moura, Renata Mendes

Avaliação do potencial antiproliferativo do dendrímero de poliglicerol associado ao celecoxibe em linhagens celulares de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço / Renata Mendes Moura; orientador Décio dos Santos Pinto Júnior. -- São Paulo, 2014.

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

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Patologia e Estomatologia Básica e Aplicada. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Carcinoma de células escamosas. 2. Neoplasias de cabeça e pescoço. 3. Carcinogênese bucal. 4. Apoptose. 5. Anti-inflamatórios não-esteroides I. Pinto Júnior, Décio dos Santos. II. Título.

Moura RM. Avaliação do potencial antiproliferativo do dendrímero de poliglicerol associado ao Celecoxibe em linhagens celulares de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovado em: / /2014

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Em primeiro lugar dedico este trabalho à **Deus** que me deu determinação e saúde para que esta vitória fosse possível.

À minha mãe **Judite**, meu pai **Vitor** e ao meu irmão **Juninho** que com amor sempre me incentivaram nesta jornada.

À minha irmã **Fernanda** e meu cunhado **Carlos** que me apoiaram e acolheram com muito carinho em São Paulo e ao pequeno **Fabício** que sempre traz muita felicidade em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao **Professor Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior**, meu orientador, que me guiou com sabedoria nesta etapa da minha vida acadêmica, sendo um grande modelo e contribuindo muito para meu aprendizado e crescimento profissional. Obrigada pela confiança, pelo conhecimento, incentivo, compreensão e pelas oportunidades. Fica o orgulho de fazer parte deste grupo de pesquisa tão conceituado e da amizade que construímos.

Ao **Professor Dr. Alvaro Antônio Alencar de Queiroz**, orientador do meu Mestrado, que abriu novas portas em minha carreira. Obrigada pela amizade e pela grande contribuição e dedicação, dando o suporte necessário para que meu Doutorado fosse realizado.

Aos professores da Patologia Bucal da FOUSP; **Profa. Dra. Suzana Orsini Cantanhede de Souza**, **Profa. Dra. Marina Galotini Cury de Magalhães**, **Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes**, **Profa. Dra. Marília Treirveiller Martins**, **Profa. Dra. Andréa Mantesso**, **Prof. Dra. Karen Lopez Ortega**. Obrigada pelo conhecimento, estímulo, paciência e pelo exemplo profissional. Não há como medir o tamanho do aprendizado nestes anos de FOUSP.

Aos professores da FOUSP **Profa. Dra Luciana Corrêa**, **Prof. Dr. Norberto Sugaya**, **Prof. Dr. Celso A. Lemos** que contribuíram com tanta solicitude e sabedoria neste curso.

Aos funcionários da Patologia da FOUSP: **Zilda Ramos Alves, Néia Barbosa, Adriana Fraga Costa S Paris, Juvani Lago Saturno e Elisa Santos** que com muita competência e simpatia sempre ajudaram em tudo que foi necessário. Agradeço especialmente a **Adriana Fraga Costa S. Paris** que com muita paciência e presteza me ensinou as técnicas necessárias para realização deste trabalho, desenvolvendo meus conhecimentos práticos e científicos.

Aos **amigos** e **colegas** do curso de Pós-graduação em Patologia Bucal da FOUSP que torceram por mim e me acompanharam e ajudaram nesta jornada fazendo da Patologia da FOUSP um lugar especial Agradeço especialmente a **Flávia Rosin**, pela amizade e pela grande ajuda com o Wester-Blotting.

A **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior) pelo apoio financeiro que permitiu a realização do Doutorado.

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

RESUMO

Moura RM. Avaliação do potencial antiproliferativo do Dendrímero de Poliglicerol associado ao celecoxibe em linhagens celulares de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Corrigida.

Diversos mecanismos celulares estão associados à patogênese do Carcinoma Epidermoide de Cabeça e Pescoço (CECP). Algumas dessas alterações envolvem proteínas pertencentes à via de sinalização do Akt, e o fator de transcrição NF-kB, o qual têm importante papel na fisiologia normal e no câncer. A proteína COX-2, descrita em processos inflamatórios, também participa da carcinogênese e está associada com a via de sinalização do Akt e com o NF-kB. Dendrímeros são uma forma única de nanotecnologia, surgindo como nanotransportadores com a capacidade de penetrar na célula tumoral liberando drogas quimioterápicas em seu interior. Os benefícios desta tecnologia são o aumento da eficácia do princípio ativo utilizado e a redução dos seus efeitos secundários tóxicos. O Celecoxibe, antiinflamatório não esteroide, inibidor seletivo da COX-2, tem se mostrado um importante agente anticarcinogênico, no entanto seu mecanismo de ação no CECP não é totalmente compreendido. Neste trabalho, um Dendrímero de Poliglicerol associado ao Celecoxibe (PGLD-celecoxibe) foi sintetizado e caracterizado por técnicas de espectroscopia ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, Maldi-Tof, TLC e DSC. Além disso, o conjugado foi testado *in vitro* em três linhagens celulares de CECP. O PGLD-Celecoxibe foi sintetizado com sucesso e promoveu a redução da dose capaz de inibir a proliferação celular, reduzindo o IC 50 do Celecoxibe de forma significativa em todas as linhagens celulares, se aproximando da dose sérica alcançada por este medicamento, resultado corroborado pelo Ensaio de Migração Celular. O mecanismo de morte celular observado foi a apoptose, associada a diminuição significativa da expressão de COX-2 ou por uma via alternativa independente. Alguns dos grupos tratados apresentaram alteração na expressão das proteínas pAkt e NF-kB.

Palavras-chave: Carcinoma epidermóide. Celecoxib. Dendrímero de Poliglicerol. COX-2. Apoptose.

ABSTRACT

Moura RM, Evaluation of antiproliferative potential of Polyglycerol Dendrimer conjugated to Celecoxib in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma cell lines [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Corrigida.

Several cellular mechanisms are associated with the pathogenesis of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC). Some of these alterations involve proteins in the Akt signaling pathway and the transcription factor NF- κ B, which plays an important role in normal physiology and in cancer. COX-2 protein, described in inflammatory processes, and also involved in the carcinogenesis is associated with the Akt signaling pathway and the NF- κ B. Dendrimers are a unique form of nanotechnology, emerging as nanocarriers with the ability to penetrate the tumor cell releasing chemotherapeutic. This technology increases the active substance efficiency and reduces its toxic side effects. Celecoxib, a nonsteroidal anti-inflammatory, selective inhibitor of COX-2 has been shown to be an important anticancer agent, but its action mechanism in HNSCC is not fully understood. A polyglycerol dendrimer linked to celecoxib (PGLD-Celecoxibe) was synthesized and characterized by NMR spectroscopy ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, TLD, DSC and Maldi-Tof techniques. In addition, in vitro assays were performed in three HNSCC cell lines. The PGLD-Celecoxibe was successfully synthesized and provided a decrease in the dose able to inhibit cell proliferation reducing the IC₅₀ index of Celecoxib significantly in all cell lines, approaching to the serum dose achieved for this product, result supported by Wound Healing Assay. The cell death mechanism observed was apoptosis, which can be associated with significant reduction of expression of COX-2 also may be occurring by a COX-2 independent pathway. Some of the treated groups showed alterations in pAkt and NF- κ B proteins expression.

Keywords: Squamous cell carcinoma. Celecoxib. Polyglycerol Dendrimer. COX-2. Apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Histologia do CECF.....	23
Figura 2.2 - Síntese de prostaglandina via ácido araquidônico	26
Figura 2.3 - Via de sinalização PI3K/Akt	29
Figura 2.4 - Estrutura das proteínas Rel/NF-kB	31
Figura 2.5 - Mecanismo de ação do NF-kB	32
Figura 2.6 - Mecanismo de atuação do Celecoxibe. Via Alternativa.....	35
Figura 2.7 - Ilustração demonstrando um transportador de fármaco.....	37
Figura 2.8 - Primeira tentativa da síntese dendrímica	39
Figura 2.9 - Arquitetura de um Dendrímero.....	39
Figura 2.10 - Representação do método de síntese divergente de dendrímeros	40
Figura 2.11 - Representação do método de síntese convergente de dendrímeros ...	40
Figura 2.12 - Formas de associação do agente bioativo com o dendrímeros	42
Figura 2.13 - Dendrímero de Poliglicerol	45
Figura 4.1 - Síntese do Conjugado PGLD-Celecoxibe	48
Figura 5.1 - Espectro ^1H -NMR (A) e ^{13}C -NMR (B) do PGLD G4	60

Figura 5.2 - Espectro de massa MALDI-TOF do PGLD G4.....	61
Figura 5.3 - Espectro FTIR PGLD G4.....	63
Figura 5.4 - TLC de PGLD e PGLD-Celecoxibe	65
Figura 5.5 - Termograma DSC do Celecoxibe	66
Figura 5.6 - Perfis de liberação do celecoxibe no conjugado PGLD-Celecoxibe.....	67
Figura 5.7 - Diferentes grupos tratados da linhagem FaDu no momento da lesão .	71
Figura 5.8 - Diferentes grupos tratados da linhagem FaDu 24 horas após a lesão.	71
Figura 5.9 - Diferentes grupos tratados da linhagem FaDu 48 horas após a lesão.	72
Figura 5.10 - Diferentes grupos tratados da linhagem SCC9 no momento da lesão.	73
Figura 5.11 - Diferentes grupos tratados da linhagem SCC9 24 horas após a lesão.	74
Figura 5.12 - Diferentes grupos tratados da linhagem SCC9 48 horas após a lesão.	74
Figura 5.13 - Ensaio de Apoptose Grupo Controle.....	76
Figura 5.14- Ensaio de Apoptose Grupo PGLD	77
Figura 5.15 - Ensaio de Apoptose Grupo Celecoxibe.....	78
Figura 5.16 - Ensaio de Apoptose Grupo PGLD-Celecoxibe.....	79
Figura 5.17 - SCC9: Imunofluorescência para p-Akt	81
Figura 5.18 - SCC25: Imunofluorescência para p-Akt	82

Figura 5.19 - FaDu: Imunofluorescência para p-Akt.....	83
Figura 5.20 - SCC9: Imunofluorescência para COX-2.....	84
Figura 5.21 - SCC25: Imunofluorescência para COX-2.....	85
Figura 5.22 - FaDu: Imunofluorescência para COX-2	86
Figura 5.23 - SCC9: Imunofluorescência para NF-kB	87
Figura 5.24 - SCC25: munofluorescência para NF-kB	88
Figura 2.25 - FaDu: Imunofluorescência para NF-kB	89
Figura 5.26 - Ensaio de expressão de proteínas Western-Blotting	90

LISTA DE QUADROS

Quadro 2.1 -Estimativas de novos casos de Câncer para 2014.....	22
Quadro 4.1 - Linhagens de carcinoma epidermóide bucal humano utilizadas no estudo com sua respectiva origem	51
Quadro 4.2 - Clone, concentração e procedência dos anticorpos primários utilizados na imunofluorescência	56
Quadro 4.3 - Composição dos géis utilizados no Western Blotting	58
Quadro 4.4 - Anticorpos primários utilizados.....	59

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5.1 - SCC25 tratada com PGLD-Celecoxibe e Celecoxibe após 24 horas do tratamento	68
Gráfico 5.2 - SCC9 tratada com PGLD-Celecoxibe e Celecoxibe após 24 horas do tratamento	68
Gráfico 5.3 - FaDu tratada com PGLD-Celecoxibe e Celecoxibe após 24 horas do tratamento	69
Gráfico 5.4 - SCC9-Grafico IC 50	69
Gráfico 5.5 - SCC25-Grafico IC 50	70
Gráfico 5.6 - FaDu-Grafico IC 50	70
Gráfico 5.7 - FaDu: Porcentagem de área livre da lesão (0h, 24h e 48h)	72
Gráfico 5.8 - SCC9: Porcentagem de área livre da lesão (0h, 24h e 48h)	75
Gráfico 5.9 - Contagem de células em Apoptose em porcentagem	80
Gráfico 5.10-Quantificação da bandas obtidas no Western Blotting para COX-2	91
Gráfico 5.11-Quantificação da bandas obtidas no Western Blotting para pAKt	91
Gráfico 5.12-Quantificação da bandas obtidas no Western Blotting para NFκ-B	92

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AINEs	antiinflamatórios não-esteróides
Akt	atípica serina/treonina quinase
APS	persulfato de amônio
ATCC	American Type Culture Collection
AJCC	American joint committee on câncer
Bax	proteína X associada a BCL2
BCA	ácido bicinconínico
Bcl-2	B-cell leukemia/lymphoma 2
BSA	albumina de soro bovino
CD1	ciclina D1
CECP	carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço
CHO	Grupos Aldeídos
COX	ciclooxigenase
CREB	cAMP response element-binding
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindole dihidroclorídrico
DMEM	Dulbeco's Eagle Modified Medium
DMSO	Sulfoxido dimetil
DNA	ácido dioxirribonucléico
DSC	calorimetria diferencial de varredura
dUTP	Dioxiuridina, 5'-Trifosfato
ECL	dihidroclorídrico Enhanced Chemiluminescence
EGFR	receptor do fator de crescimento epidérmico
EPR	Enhanced Permeation and Retention
ERK	quinases reguladoras de sinal extracelular
FDA	food and drug administration
g	grama
GSK	quinase sintentizadora de glicogênio
HCl	ácido clorídrico
HER2	receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2
HPV	vírus papiloma humano
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência

I κ B	inibidor de quinase B
IKK	quinase I κ B
INCA	instituto nacional do câncer
Kda	kilodalton
l	litro
M	molar
MALDI-TOF	dessorção a laser assistida por matriz com tempo de voo
MDM2	murine double minute
2-MEK	mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase
m-THPC	meta tetrahidroxifenilclorina
m-TOR	mammalian target of rapamycin
MTS	methanethiosulfonate
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NF- κ B	fator nuclear kappa B
PAMAM	dendrímero poliamino amida
p-Akt	atípica serina/treonina quinase fosforilada
PBS	solução de fosfato-salina
PGG2	prostaglandina G2
PGH2	prostaglandina H2
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
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
Ras	RAt sarcoma
RPM	rotação por minuto
SCC	squamous cell carcinoma
SDS	dodecil sulfato de sódio
Ser	serina
TBST	Tris salina tamponada com Tween 20
TEMED	tetrametiletilenodiamino

TGF	fator de crescimento transformante
Thr	treonina
UICC	Union for International Cancer Control
UV	raio ultra-violeta
Wnt	wingless-type MMTV integration site family

LISTA DE SÍMBOLOS

K	graus Kelvin
μ	micro
%	porcentagem
α	alfa
β	beta
μ	micro
γ	gama
²	quadrado
°C	graus-Celsius
®	marca registrada
n	nano
m	mili
+	mais
Cu ²⁺	íon cúprico
Cu ⁺	íon cúproso
V	voltagem
mA	mili-amperagem
W	watts

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço	21
2.2 Carcinogênese	24
2.2.1 Relação entre Inflamação e Carcinogênese	26
2.2.2 Via de Sinalização PI3K/Akt/mTOR	27
2.2.3 Fator de transcrição nuclear kappa-B	30
2.3 Mecanismo de ação de Anti-inflamatórios Não Esteroidais no câncer	32
2.4 Dendrímeros como transportadores de AINEs	36
2.4.1 Dendrímero de Poliglicerol	44
3 PROPOSIÇÃO	46
4 MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1 Síntese e Caracterização do PGLD) e do PGLD-Celecoxibe	47
4.2 Cultivo das Linhagens Celulares	51
4.3 Ensaio de Viabilidade Celular	52
4.4 Ensaio de Migração Celular	53
4.5 Análise de Apoptose	54
4.6 Ensaio de Imunofluorescência	55
4.7 Extração e Quantificação de Proteínas	57
4.8 Western-Blotting	58
5 RESULTADOS	60
5.1 Síntese e Caracterização do PGLD e PGLD-Celecoxibe	60
5.2 Curva de Viabilidade Celular e Determinação do IC50	67
5.3 Ensaio de Migração Celular	70
5.4 Análise de Apoptose	76
5.5 Ensaio de Imunofluorescência	81
5.6 Western-Blotting	90
6 DISCUSSÃO	93
7 CONCLUSÕES	100
REFERÊNCIAS	102
ANEXOS	115

1 INTRODUÇÃO

O câncer de cavidade oral se mostra um importante e crescente problema de saúde pública que acomete a população no Brasil e no mundo. A última estimativa do Instituto nacional do Cancer apontou a ocorrência 15.290 novos casos em 2014. O carcinoma epidermoide representa mais de 90% das neoplasias malignas de cabeça e pescoço, apresentando taxas elevadas de morbimortalidade que estão, na maioria das vezes, relacionadas com o diagnóstico tardio e da resistência ao tratamento quimioterápico.

A patogênese do Carcinoma Epidermoide de Cabeça e Pescoço (CECP) é claramente multifatorial, envolvendo fatores extrínsecos, como fumo, alcoolismo e exposição a radiação solar. Dessa forma o seu desenvolvimento é um processo de vários estágios, no qual fatores externos e alterações genéticas estão associados.

A carcinogênese é um processo de múltiplos estágios, envolvendo gerações sucessivas de células, sendo o resultado desse acúmulo de alterações gênicas o fenótipo maligno.

Muito se tem pesquisado sobre as vias de sinalização desses eventos genéticos que levam à carcinogênese. Essas vias envolvem substâncias responsáveis pela regulação de processos celulares vitais como a Proteína Akt ou Proteína Quinase B (PKB), e fatores de transcrição como o NF- κ B.

Um dos fatores que criam um ambiente favorável para a carcinogênese é o processo inflamatório. Diversos estudos têm apontado a relação entre o desenvolvimento de câncer e a superexpressão das enzimas formadoras de eicosanóides, tais como as ciclooxigenases (COX), presentes no processo inflamatório e em uma grande variedade de tumores em animais e em humanos.

Desta forma, um dos caminhos apontados para o tratamento quimioterápico do câncer está associado a utilização de antiinflamatórios não esteroidais (AINEs). O principal mecanismo de ação dos AINEs é a inibição da COX e consequente redução da conversão do ácido araquidônico (AA) em prostaglandinas.

Um exemplo de antiinflamatório não esteroide seletivo para COX-2, é o celecoxibe, aprovado pela *US Food and drug administration* (FDA) em 1998, este

fármaco possui meia-vida de 11.5 horas, sendo metabolizado pelo fígado e excretado por via hepática.

Atualmente tem se estabelecido que os efeitos anti-neoplásicos do celecoxibe estão associados a inibição do crescimento celular e a indução de mecanismos que levam a morte celular por apoptose e parada do ciclo celular. No entanto, os fenômenos moleculares envolvidos ainda não estão bem definidos.

Um dos obstáculos enfrentados é a necessidade de controlar a quantidade do fármaco a ser administrada, evitando causar danos ao organismo e ao mesmo tempo, proporcionar um tratamento eficiente, que alcance as células alvo. Para contornar tais problemas, transportadores ou carreadores, capazes de modular a liberação com alto grau de reprodutibilidade, surgiram como alternativas eficazes.

Para que um biomaterial possa ser utilizado como um sistema liberador de fármacos, além de biocompatibilidade e baixa citotoxicidade, uma série de atributos singulares são necessários. Neste campo, os polímeros dendriméricos ou dendrímeros, têm atraído grande interesse por exibirem características como monodispersividade, alta capacidade de carga, possibilidade de produção em larga escala e capacidade bioconjugação.

Um dendrímero que exibe características favoráveis para utilização como carreador farmacológico é o dendrímero de poliglicerol (PGLD). Devido a sua arquitetura núcleo-casca ele apresenta propriedades anfipáticas que permitem sua utilização no processo de encapsulamento e transporte de moléculas polares (tais como corantes e drogas) em ambientes hidrofílicos e hidrofóbicos. Seus grupos hidroxilas funcionais podem ser transformados e utilizados como sítios para imobilização de substâncias de interesse biológico.

Desta forma, a proposta para esta pesquisa é a conjugação de um AINE seletivo como o Celecoxibe ao Dendrímero de Poliglicerol, estudando suas propriedades e biofuncionalidade.

Os índices de viabilidade e proliferação celular e o padrão de expressão de proteínas com importante participação na resposta inflamatória e carcinogênese como COX-2, Akt e NF-kB serão avaliados através do estudo *in vitro* em células de CECP comerciais provenientes de língua (SCC9 e SCC25) e faringe (FaDu).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Carcinoma Epidermoide de Cabeça e Pescoço (CECP).

O Carcinoma Epidermoide é definido como neoplasia maligna com origem nas células tronco epiteliais presentes na camada basal. São classificadas como Carcinoma Epidermoide de Cabeça e Pescoço (CECP) neoplasias que acometem o trato aerodigestivo superior, envolvendo cavidade oral, faringe e laringe. O CECP está entre os seis tipos mais prevalentes de câncer em países desenvolvidos, e compreende em torno de 6% de todas as neoplasias malignas [1-3].

Deve-se ressaltar que apesar de o Instituto Nacional do Câncer (INCA) e a Classificação Internacional de Doença classificarem o Carcinoma Epidermoide intrabucal e o Carcinoma Epidermoide localizado no lábio em um único grupo (carcinoma oral) o último está associado a radiação ultravioleta, sendo mais comum em indivíduos de pele clara. Já o Carcinoma Epidermoide Intrabucal está associado ao tabagismo e etilismo e fatores genéticos. Sendo lesões com diferentes comportamentos biológico e clínico [4].

No Brasil, dados do INCA demonstrados no quadro 2.1, indicam que o câncer bucal ocupa o quinto lugar em incidência entre todos os tipos de câncer nos homens com 11.280 novos casos, para as mulheres serão 4010 novos casos totalizando 15.290 novos casos em 2014 [5].

Localização Primária da Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estado		Capitais		Estado		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	68.800	70,42	17.540	82,93	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	57.120	56,09	19.170	80,67
Colo do Útero	-	-	-	-	15.590	15,33	4.530	19,20
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	16,79	4.000	18,93	10.930	10,75	3.080	13,06
Cólon e Reto	15.070	15,44	4.860	22,91	17.530	17,24	5.650	23,82
Estômago	12.870	13,19	2.770	13,07	7.520	7,41	2.010	8,44
Cavidade Oral	11.280	11,54	2.220	10,40	4.010	3,92	1.050	4,32
Laringe	6.870	7,03	1.460	6,99	770	0,75	370	1,26
Bexiga	6.750	6,89	1.910	8,91	2.190	2,15	730	2,97
Esôfago	8.010	8,18	1.460	6,76	2.770	2,70	540	0,00
Ovário	-	-	-	-	5.680	5,58	2.270	9,62
Linfoma de Hodgkin	1.300	1,28	410	5,72	880	0,83	420	8,64
Linfoma não Hodgkin	4.940	5,04	1.490	6,87	4.850	4,77	1.680	7,06
Glândula Tireoide	1.150	1,15	470	1,76	8.050	7,91	2.160	9,08
Sistema Nervoso Central	4.960	5,07	1.240	5,81	4.130	4,05	1.370	5,81
Leucemias	5.050	5,20	1.250	5,78	4.320	4,24	1.250	5,15
Corpo do Útero	-	-	-	-	5.900	5,79	2.690	11,24
Pele Melanoma	2.960	3,03	950	4,33	2.930	2,85	1.150	4,57
Outras Localizações	37.520	38,40	9.070	42,86	35.350	34,73	8.590	36,49
Subtotal	203.930	208,77	51.100	241,30	190.520	187,13	58.710	248,46
Pele não Melanoma	98.420	100,75	19.650	92,72	83.710	82,24	22.540	95,26
Todas as Neoplasias	302.350	309,53	70.750	334,08	274.230	269,35	81.250	343,85

Quadro 2.1- Estimativas de novos casos de Câncer para 2014 [5].

A incidência do CECp aumenta com a idade, a faixa etária com maior acometimento de casos é a sexta década de vida, no entanto tem se observado mundialmente um aumento na incidência do CECp na faixa etária inferior a 45 anos. Nestes casos existem relatos de que o prognóstico é mais preocupante do que na faixa etária habitual. [6-7].

Com relação ao gênero a incidência é maior no sexo masculino do que no feminino, com uma proporção de aproximadamente 3:1. No entanto, alguns estudos mostram que essa proporção vem diminuindo nos últimos anos no mundo, devido ao aumento de consumo de álcool e tabaco entre as mulheres [8].

A patogênese da doença é claramente multifatorial e é relacionada a fatores genéticos e a fatores extrínsecos como uso de tabaco e álcool e exposição à radiação solar, que estão intimamente associados as alterações genéticas e associados podem elevar em até 35 vezes a chance de desenvolvimento da doença [4].

Infecções virais especialmente com o vírus Epstein-Barr (EBV) e Papilomavírus Humano (HPV) dos subtipos 16 e 18, deficiência na higiene oral e deficiências ou desequilíbrios de vitaminas e micronutrientes, tais como ácido fólico, vitaminas A, C, E, zinco e selênio também foram associados à ocorrência de CECp [9].

A participação do HPV na carcinogênese oral está associada a outros carcinógenos químicos e físicos, como o tabaco e o álcool. Alguns estudos consideram neoplasias em faringe associadas ao HPV uma entidade diferente com suas próprias características etiológicas e prognóstico [10].

Outros fatores que devem ser levados em conta são os fatores socioeducacionais, socioeconômicos e psicológicos que influenciam a procura precoce e a aceitação pelo tratamento [11].

Felizmente, dados epidemiológicos de CECP em São Paulo nos últimos 40 anos foram analisados e constatou-se que o tamanho inicial das lesões diagnosticadas entre as décadas de 60 e 80 foram significativamente maiores do que o tamanho das lesões diagnosticadas entre os anos de 2001 e 2008 [12].

Clinicamente o CECP aparece como lesões brancas, eritroplásicas ou, mais comumente, como ulcerações. Na figura 2.1 podemos observar o quadro histopatológico do carcinoma epidermoide, que apresenta um padrão sólido de crescimento caracterizado por cordões, ilhas ou ninhos formados por células epiteliais morfológicamente alteradas com grande potencial invasivo. As atipias são freqüentes e em alguns casos auxiliam o patologista no diagnóstico [3].

Figura 2.1 - Histologia do CECP.: Carcinoma Epidermoide bem-diferenciado: Caracterizado pela formação abundante de pérolas de queratina.

O sistema TNM para a classificação de tumores malignos foi desenvolvido nos anos 50 por Denoix, tendo sido incorporado pelo AJCC e pela UICC a partir de 1982, com a finalidade de padronizar a linguagem dos oncologistas [13].

A classificação por esse sistema avalia três características: tamanho do tumor em centímetros (T); acometimento dos linfonodos e sua extensão (N); e presença ou não de metástases distantes (M) e permite avaliar as características fundamentais do CECP como extensão local, disseminação regional e metástase à distância [14].

Entretanto, vários estudos têm mostrado que além do sistema TNM outros parâmetros são úteis na avaliação da agressividade tumoral em CECP, como o antígeno proliferativo de célula nuclear (PCNA), o índice de proliferação Ki-67, expressão da proteína TP53 e gradação de acordo com a morfologia do fronte de invasão [14-16].

A gradação histológica das partes mais profundas do CECP influencia diretamente na sobrevida dos pacientes, já que a recorrência local ou metástase precoce em gânglios linfáticos estão muito associadas a células neoplásicas no sítio invasivo que mostram-se indiferenciadas em relação as demais células tumorais. [17]

O tratamento do CECP envolve principalmente, cirurgia, quimioterapia e radioterapia. A escolha do tipo de tratamento depende da localização e estágio da doença. De forma geral, apenas uma forma de tratamento (cirurgia ou radioterapia) é escolhida para pacientes com doença em estágio inicial (I e II), já em pacientes com estágio III ou IV é empregada uma combinação de tratamentos que podem ser, cirurgia extensa com radioterapia ou radioterapia e quimioterapia. Contudo, neste grupo apenas 30% dos pacientes conseguem obter cura [5, 15,18].

2.2 Carcinogênese

Carcinogênese é a transformação de uma célula biologicamente saudável em uma célula capaz de proliferar de forma autônoma (célula potencialmente maligna) [10].

Este é um processo dinâmico, que envolve uma série de etapas envolvendo alterações genéticas e epigenéticas, compreendido desde as alterações mais

precoces a nível molecular, até a formação de um tumor que pode destruir o organismo hospedeiro [19].

Para o tecido epitelial de revestimento, esse desenvolvimento neoplásico evolui em estágios, os quais incluem hiperqueratose, hiperplasia, displasias em diversos graus, carcinoma in situ e por fim o surgimento do carcinoma epidermoide [20].

Como citado anteriormente, eventos moleculares indistinguíveis no microscópio estão presentes no processo de carcinogênese, promovendo instabilidade genômica e consequente desenvolvimento e progressão tumoral [21].

Alterações genéticas compreendem qualquer modificação irreversível na sequência do DNA (ácido desoxirribonucleico) como, por exemplo, mutação, deleção, amplificação [22].

Exposição a agentes carcinogênicos como álcool e tabaco podem causar danos em genes e até mesmo em cromossomos. Como exemplo podemos citar fenômenos como amplificação gênica, aumento da transcrição do DNA e a perda da heterozigosidade dos cromossomos 3p, 9p, 11p, 13p, 17p [23].

Tais alterações levam à ativação de oncogenes, como Ciclina D1 e EGFR, que promovem a proliferação celular desregulada e ativa mecanismos que permitem a sobrevivência celular. Outro evento causado por essas alterações genéticas é a inativação dos genes supressores de tumor, como o c-Mick, p53 e o p16, que coordenam funções essenciais do Ciclo Celular, envolvido na mitose da célula [4, 21, 24].

Alterações Epigenéticas como metilação do DNA, remodelação da cromatina com modificações nas histonas são responsáveis pelo silenciamento de genes supressores de tumores, de genes envolvidos na reparação do DNA e na adesão celular [26-27].

Todos esses fenômenos culminam na produção de fatores de crescimento ou no aumento do número de receptores na superfície celular, aumentando a sinalização de mensagens intracelulares e o aumento na produção de fatores de transcrição. Associado a inativação dos genes supressores de tumor, esses eventos resultam em células capazes de proliferar de forma autônoma, em perda de adesão celular e capacidade de invasão e metástase [4, 27].

2.2.1 Relação entre Inflamação e Carcinogênese

A associação funcional entre inflamação e câncer foi feita inicialmente por Virchow em 1983, que descreveu a presença de infiltrados leucocitários em tecidos tumorais e sustentou a teoria de que o câncer se inicia em locais acometidos por inflamações decorrentes de lesões e irritações por um longo período de tempo, levantando a hipótese de que a resposta inflamatória favorecia a proliferação celular [28].

A hipótese mais plausível para essa relação entre câncer e processo inflamatório está na presença de prostaglandinas, associadas à ciclooxygenase (COX), principalmente da isoforma COX-2, liberada na inflamação [29].

O papel da COX nas neoplasias foi sugerido após a demonstração de que alguns processos neoplásicos possuem altos níveis de metabólitos do ácido araquidônico, como a prostaglandina E2 (PGE2). A figura 2.2 demonstra a síntese de prostaglandinas através da metabolização dos fosfolípidos [30-32].

Figura 2.2 - Síntese de prostaglandina via ácido araquidônico [32]

Além da ação das espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, a superexpressão de COX-2 favorece mecanismos de promoção tumoral, como aumento da angiogênese, inibição da apoptose, modulação da resposta imune, maior capacidade de invasão e metástase. Além disso, a presença de COX-2 pode ser essencial para a vascularização e crescimento do tumor [33].

Diferentes tipos de tumores também apresentam a superexpressão da COX-2, como por exemplo, o câncer de pulmão, mama, cólon, esôfago e cabeça e pescoço. Essa superexpressão é mais comum em tumores que apresentam características associadas a um prognóstico muito ruim [34-38].

A associação entre a expressão de COX-2, do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), em carcinoma nasofaríngeo tratados foi avaliada e conclui-se que a alta expressão de COX-2, VEGF, e EGFR estavam associados a um pior prognóstico [39].

Estudos pré-clínicos têm relatado que a inibição da COX-2 durante a quimioterapia melhora o controle do crescimento tumoral e tem um efeito promotor de apoptose em diferentes tipos de tumores [40-42].

Dessa forma, estudos que permitam compreender os mecanismos moleculares envolvidos na relação entre o processo inflamatório e a carcinogênese se fazem necessários. Dentre esses mecanismos, a avaliação de mediadores químicos e das vias de sinalização celular através da ação de medicamentos anti-inflamatórios pode ser um importante alvo para quimioprevenção e terapia do câncer [43].

2.2.2 Via de Sinalização PI3K/Akt/mTOR

A Akt, ou PKB, é uma família de serina-treonina quinase representada por três isoformas homólogas, Akt 1 (PKB α), Akt 2 (PKB β), Akt 3 (PKB γ). A via de sinalização PTEN/PI3K/Akt/mTOR tem papel central em diversos processos celulares como metabolismo, crescimento celular e apoptose, sobrevivência e diferenciação celular [44].

Sendo assim, a via PI3K/AKT é constitutivamente ativa em vários tipos de câncer, fornecendo sinais proliferativos e anti-apoptóticos e possivelmente contribuindo para a resistência aos medicamentos. A via PI3K/Akt/mTOR está entre as vias de sinalização mais frequentemente alteradas, contribuindo para o processo de carcinogênese [44-45].

Outra proteína envolvida é a PTEN, proteína homóloga de fosfatase e angiotensina, a qual atua em oposição a via PI3K-Akt, invertendo a atividade da PI3K, evitando a fosforilação da proteína Akt [44].

Durante a carcinogênese a hiperativação do PI3K pode ser induzida por mutações ou por um aumento na atividade de seus reguladores, incluindo a ativação da oncoproteína Ras ou da inativação do gene PTEN (gene que codifica a proteína de mesmo nome) deletado no cromossomo 10 [44].

A ativação da via do Akt pode ocorrer através da amplificação do gene PI3K, mutação na Ras ou hiperexpressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) ou através de uma falha de atividade no gene PTEN [46].

Como observamos na figura 2.3 o primeiro passo para essa ativação é a ativação do receptor tirosino quinase, que leva a PI3K para a membrana celular. Ao ser ativada a PI3K converte o PIP2 (“Phosphatidilinositol-4,5-biphosphate”) em PIP3 (“Phosphatidilinositol-3,4,5-triphosphate”). Proteínas que contém o domínio PH se associam com a Akt e podem então se ligar a PIP3. Uma vez ligada ao PIP3 na membrana plasmática a Akt é fosforilada e se torna ativa. Ela então deixa a membrana celular para fosforilar substratos intracelulares [46-47].

Figura 2.3 - Via de sinalização PI3K/Akt [47].

O gene PTEN é um potente supressor de tumor e um regulador negativo da via PI3K/Akt. Mutações nesse gene são encontradas em 0-16% dos casos de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP), a ausência da expressão do PTEN é encontrada em 29% das neoplasias em língua e a perda de heterozigose no locus do gene PTEN foi identificada em cerca de 40% dos casos de CECP) [48].

Além disso, 47% dos casos de CECP mostram pelo menos uma alteração molecular na via PI3K/akt, incluindo a amplificação do PI3KA e do Akt2 superexpressão do p110a, e *downregulation* da proteína PTEN, o que sugere um papel crítico das vias PTEN/PI3K/Akt na carcinogênese [49].

Essas alterações moleculares interferem de várias formas na promoção da carcinogênese. Uma dessas formas é a superexpressão das metaloproteinases de matriz (MMPs), enzimas com a habilidade de degradar componentes da matriz extracelular, como colágeno, elastina, laminina, fibronectina e proteoglicanos. Uma

alta expressão de MMPs está diretamente associada ao potencial invasivo e metastático de vários tumores malignos humanos [50].

Um exemplo é a migração de linhagens celulares neoplásica e de células tronco mesenquimais promovida pela superexpressão de MMP9 e de Receptores de Quimiocinas (CCR7) promovida pela via PI3k-Akt [51].

Devido à supressão do PTEN, a ativação da via PI3K/Akt inicia a formação do tumor e estimula sua proliferação. Outra alteração capaz de induzir a proliferação tumoral é a deleção do TGF- β , um supressor de tumor. Dessa forma, a exclusão do PTEN combinada com a perda adicional de Tgfbr1 resulta na progressão de células pré-malignas em células cancerosas. A diminuição de Tgfbr1 também pode ativar a via de NF- κ B causando um aumento da produção de quimiocinas no estroma tumoral resultando em inflamação e indução da angiogênese [52-53].

A utilização de Fármacos inibidores de Akt, como o Afuresertib, demonstrou eficácia em estudos clínicos envolvendo doenças hematológicas malignas, incluindo mieloma múltiplo [54].

2.2.3 Fator de transcrição nuclear kappa-B

O Fator de transcrição nuclear kappa-B (NF- κ B) foi descrito por Sen e Baltimore em 1986, como uma proteína reguladora da expressão genica de imunoglobulinas em linfócitos B. Atualmente é conhecido que esse fator está envolvido na transcrição de diversos genes que regulam importantes processos biológicos incluindo a resposta inflamatória, a apoptose e a transformação neoplásica celular [55-56].

O NF- κ B é um heterodímero formado por membros da família de genes Rel. Nos mamíferos esta família é composta por 5 membros, RelA (p65), c-Rel, RelB, NF- κ B1 (p105/p50) e NF- κ B2 (p100/p52). Essas proteínas têm em comum uma região conservada de aproximadamente 300 aminoácidos, denominada domínio Rel, que tornam possível a formação de dímeros, ligação ao DNA e a interação com o inibidor de κ B [56].

Desta forma o NF- κ B é composto por duas subunidades e seu protótipo clássico é formado por uma proteína de 50kDa (NF- κ B1/p50) e uma proteína de

65kDa (RelA/p65). Em outros tipos celulares não leucocitários estes dímeros podem ocorrer com formações diferentes [56].

As proteínas RelA, RelB e c-Rel contêm um domínio de transativação na região C-terminal, necessário para a ativação da transcrição. Já o NF-KB1 (p105/p50) e NF-KB2 (p100/p52), apesar de não conter este domínio de transativação, são considerados precursores das proteínas p50 e p52, podem induzir a transcrição quando ligado a outras proteínas co-ativadoras como, por exemplo, Bcl-3 (figura 2.4) [57].

Figura 2.4- Estrutura das proteínas Rel/NF-κB [57].

O NF-κB só consegue realizar a transcrição gênica quando está localizado no núcleo. Dessa forma, em células não estimuladas, o NF-κB se mantém predominantemente citoplasmático, através da interação com os inibidores de κB. Para que isso aconteça, uma proteína denominada IKK, precisa ser ativada através da fosforilação pelo Akt. Em uma cadeia de reações a IKK ativada fosforila o IκB e o leva para a ubiquitinação e degradação (Figura 2.5) [58].

Apenas após a estimulação (por citocinas, produtos bacterianos e fatores de crescimento) o NF-κB pode ser ativado através de duas vias principais. Além disso, homodímeros NF-κB, p50-p50, podem ser gerados como parte de uma via atípica [59].

Como os complexos homodiméricos p50-p50 do NF-κB podem ligar elementos κB com elevada afinidade, é sugerido que esses homodímeros podem ter impacto sobre a função transcricional dos complexos NF-κB heterodiméricos [59-60].

A ativação do NF-kB também é relatada em tumores sólidos em estado de hipóxia. Esta falta de oxigenação causada pela deficiência de vascularização está associada a quimioresistência pela Cisplatina por exemplo. Estudos demonstram que a inativação do NF-kB, promove um aumento da apoptose em células tratadas com Cisplatina, diminuindo seu IC-50 [61].

Figura 2.5- Mecanismo de ação do NF-kB. Após liberação da IκB fosforilada o NF-kB sofre translocação para o núcleo onde irá determinar a transcrição do gene [58].

O crescimento de células de tumor de faringe humano em modelo nude mice estacionou com a inibição da expressão de NF-κB através da introdução de NF-κappaB p65siRNA. Existem trabalhos que mostram que a presença de NF-κB estimularia a COX-2, inclusive com a descoberta de dois sítios de ligação para o NF-κB em regiões promotoras de COX-2 [62-63].

2.3 Mecanismo de ação de Anti-inflamatórios Não Esteroidais em Neoplasias

Os avanços no conhecimento sobre as bases moleculares do câncer têm criado uma boa expectativa de terapias mais apuradas e eficazes para o tratamento da

doença. Embora se tenha atingido um sucesso razoável através da utilização da radioterapia e da cirurgia, duas das terapias mais utilizadas no tratamento do câncer, na maioria dos casos o sucesso da utilização dessas técnicas só é contemplado se o câncer estiver em estágio inicial [63].

Recentemente, a utilização de medicina complementar para prevenção e tratamento do Câncer, utilizando agentes quimioprotetores e antioxidantes tem sido enfatizada [64].

Sob essa perspectiva, a via das prostaglandinas no processo inflamatório, mais especificamente a enzima COX, desponta como um caminho farmacológico promissor na prevenção e tratamento do câncer e a utilização de Antiinflamatórios não-esteroidais (AINES) com finalidade quimioterápica vem sendo uma possibilidade amplamente estudada [65].

Os AINEs compõem um grupo variado de substâncias que compartilham das mesmas propriedades farmacêuticas. Estes compostos possuem uma variedade química, que em sua maioria, consistem de um ou mais anéis aromáticos ligados a um grupamento ácido funcional. Geralmente são ácidos orgânicos fracos que atuam principalmente nos tecidos inflamados apresentando ação analgésica, antitérmica e antiinflamatória em doses terapêuticas. Sua absorção é rápida e completa depois da administração oral (exceto as preparações entéricas). Não atravessam imediatamente a barreira hematoencefálica e são metabolizados principalmente pelo fígado e predominantemente excretados pela urina [66].

O principal mecanismo de ação dos AINEs ocorre através da inibição específica da COX e conseqüente redução da conversão do ácido araquidônico (AA) em prostaglandinas. O resultado desta reação é a produção de PGG₂, que por sua vez ao interagir com a enzima peroxidase configura a PGH₂, convertendo às prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos (TXs) [67].

Os agentes antiinflamatórios não esteroidais convencionais (não seletivos, os quais inibem tanto a enzima ciclooxigenase-1 (COX-1), quanto a ciclooxigenase-2 (COX-2), podem provocar efeitos colaterais, como distúrbios gastrintestinais e renais decorrentes da inibição da COX-1 [67].

Atualmente, com o intuito de reduzir os efeitos colaterais promovidos pelos AINES convencionais, foram desenvolvidos compostos que apresentam seletividade

pela inibição da enzima COX-2, fato que justifica a melhor tolerabilidade a este tipo de medicamento, evitando reações adversas. Esse tipo de antiinflamatório tem sido utilizado, de maneira rotineira, por pacientes com dor crônica e desconfortos associados, por exemplo, à osteoartrite e artrite reumatóide [67-69].

Uma vez que a COX-2 parece atuar na carcinogênese de várias formas, incluindo efeitos sobre apoptose, proliferação celular, imunomodulação, agressão do tumor, neoangiogênese e invasão tumoral, provavelmente mediado pela PGE₂, a inibição da enzima COX e da catálise de prostaglandinas (PG) inibiria a atuação destas no desenvolvimento de neoplasias[70].

Estudos epidemiológicos indicam que a utilização de AINEs reduz o risco de câncer de 40-50%, podendo ser preventiva para o câncer de pulmão [69]. O ácido acetilsalicílico demonstrou ação preventiva para câncer colorretal que superexpressam a COX-2 e sua influência no controle da doença já é estabelecida [71]. O uso prolongado de antiinflamatórios não esteroidais reduz o risco de câncer de cabeça e pescoço [72]. Além de reduzir a incidência de câncer de pulmão [73] e mama [74].

Desta forma a compreensão da participação das vias de sinalização celulares associadas a PG e COX-2 tanto em situações fisiológicas quanto patológicas e os efeitos de AINEs em sua inibição tem sido frequente alvo de investigação [75].

O celecoxibe, (4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il] benzenesulfonamida) é um fármaco antiinflamatório não esteroideal, capaz de inibir seletivamente a COX-2. O celecoxibe está disponível no mercado (nome comercial: Celebra[®]), na forma de cápsulas para uso oral de 100 e 200 mg sendo indicado para o tratamento sintomático da osteoartrite e artrite reumatóide; tratamento da dor aguda; e alívio dos sintomas de dismenorréia primária [76].

Recentemente o Celecoxibe tem sido explorado na quimioprevenção de vários tipos de câncer: ovariano, mamas, cólon, além de carcinoma gástrico, câncer de pâncreas, de bexiga e oral [77-78].

O tratamento de células de hepatocarcinoma (H22) com Celecoxibe promoveu a redução da expressão do Fator de Crescimento Endotelial Vascular VEGF-A e além de diminuição da expressão de PI3K, P-Akt e COX-2 com aumento da expressão de PTEN, demonstrando ação eficaz contra mecanismos associados a angiogênese e na proliferação celular [79].

Com relação a linhagens celulares de CECp, o uso de Celecoxibe tem efetivamente desacelerado seu crescimento. Possíveis alvos do celecoxibe incluem proteínas envolvidas na proliferação de células e controle de apoptose.

Baixas doses ($1\mu\text{M}$ e $10\mu\text{M}$) dos inibidores de COX-2, celecoxib e indometacina, inibiram a secreção de PGE2 nas linhagens de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço HN13 e OSCC3. Entretanto, essas baixas doses não bloquearam a proliferação celular, já que a redução do número de células viáveis só foi observada com doses mais elevadas dos medicamentos ($50\mu\text{M}$). Um experimento em fase 1 demonstrou boa taxa de resposta das células tumorais a esta droga com toxicidade mínima [52].

Além disso, a atividade antitumoral do Celecoxibe tem sido associada com um evento independente de COX-2 [76].

Esta via alternativa, independente da inibição da COX-2, envolve a desfosforilação e ativação de GSK-3 β , consequente fosforilação da β -catenina, promovendo a sua translocação da membrana celular para o citoplasma e o núcleo. Isso provoca uma consequente deficiência na atividade de ligação do DNA, com indução de caspase-3 e via do proteossomo (figura 2.6) [52,76].

Figura 2.6 - Mecanismo de atuação do Celecoxibe, via Alternativa [76]

Desta forma, o mecanismo de quimioprevenção do Celecoxibe ainda não é claro, mas é muito provável que seja multifatorial, com a inibição da COX-2, indução de apoptose e regulação da angiogênese [80].

No entanto efeitos colaterais decorrentes do uso prolongado e de altas doses desse medicamento como aumento do risco cardiovascular limitam a utilização do celecoxibe como adjuvante quimioterápico [67].

2.4 Dendrímeros como transportadores de AINEs

O grande desafio na implementação de terapia medicamentosa é o controle da dose de fármaco a ser empregada, evitando causar danos ao organismo, e ao mesmo tempo, proporcionando um tratamento eficaz, com absorção, metabolização e excreção adequadas. Em torno de 40% das moléculas farmacologicamente ativas descobertas são rejeitadas, devido principalmente, à reduzida solubilidade e biodisponibilidade. Para contornar tais problemas, transportadores capazes de modular a liberação do fármaco, surgiram como alternativas eficazes [81-82].

O transportador é empregado para apurar a farmacocinética e a biodistribuição do fármaco, além de fornecer uma cinética de liberação modificada e direcionada para o alvo, desta forma o transportador permite a redução da dose do medicamento utilizada e de seus efeitos adversos [63, 81].

O sistema de liberação controlada de fármacos elucida uma grande parte das limitações na utilização de muitos fármacos, promovendo a manutenção de sua concentração em nível ótimo por um tempo prolongado, sendo administrado, se possível, em apenas uma dosagem. Isso permite facilitar o tratamento diminuindo o número de doses do medicamento, de modo a simplificar o processo terapêutico, aumentando a adesão do paciente ao medicamento [83].

Desta forma, muitos estudos estão sendo realizados neste setor com a finalidade de desenvolver novas formulações com vantagens frente as formulações convencionais. Grande parte das estratégias para veiculação de fármacos em sistemas de liberação envolvem a nanotecnologia [84].

A nanobiotecnologia, conforme definido pelo National Nanotechnology Initiative (NNI), é o estudo e utilização de estruturas na faixa de tamanho de 1 a 1000 nm. O

objetivo geral da nanobiotecnologia é diagnosticar com precisão e mais cedo possível e tratar tão eficaz quanto possível, sem qualquer efeito colateral [84].

Sendo assim, a maior parte desses sistemas estão sendo atualmente desenvolvidos em escala nanométrica sendo caracterizados pela compartimentação de fármacos em ambientes restritos, podendo, com isso, direcioná-lo para as regiões pretendidas favorecendo a interação com os sistemas biológicos (figura 2.7) [63].

Figura 2.7- Ilustração demonstrando um transportador de fármaco [83].

Na quimioterapia antineoplásica, a obtenção de moléculas alvo-específicas, isto é, que tenham alta especificidade para determinada componente celular, possibilitando o transporte e a liberação do agente terapêutico apenas em sítios apropriados, aumentando sua eficácia e diminuindo seus efeitos colaterais, se torna particularmente benéfica [90].

Além de melhorar as propriedades do fármaco como solubilidade e tempo de circulação no plasma, os sistemas transportadores facilitam o direcionamento da droga ao tumor sólido. Quando se utiliza transportadores com um tamanho que permite a absorção dessas moléculas pela microvasculatura do tumor, com a ausência de drenagem linfática, temos um acúmulo seletivo de macromoléculas no

tecido tumoral, um fenômeno denominado 'Enhanced Permeation and Retention' (EPR) [63, 85, 104].

Para que um biomaterial possa ser utilizado como um sistema liberador de fármacos além de biocompatibilidade e baixa citotoxicidade, uma série de atributos singulares são necessários. Neste campo, os dendrímeros têm atraído grande interesse por exibirem características como monodispersividade, alta capacidade de carga, possibilidade de produção em larga escala e capacidade bioconjugação [83, 86].

Como relatado anteriormente, os dendrímeros são macromoléculas sintéticas monodispersas, que possuem uma arquitetura dividida em núcleo e periferia, e tem como característica a intensa presença de grupos reativos. Esta estrutura apresenta alto peso molecular, que pode ser perfeitamente controlado e grande área superficial com elevado grau de ramificação e de simetria, o que permite a síntese de micelas unimoleculares [87].

Essas macromoléculas tridimensionais são dotadas de pontos de ramificação em cada unidade monomérica, isto torna possível a síntese de estruturas com definidos números de geração e grupos funcionais terminais. Essas características peculiares dos dendrímeros permitem sua utilização como nanocarreadores para drogas, proteínas e ácidos nucleicos (DNA e RNA) [87].

Vögtle, em 1978 realizou a primeira síntese de dendrímeros relatada na literatura. Este dendrimer foi sintetizado a partir reações de adição, seguida de uma redução dos grupos nitrilos a aminas primárias de monômeros acrilonitrilo (figura 2.8) [89].

Figura 2.8 -Primeira tentativa da síntese dendrímica [89].

A síntese da estrutura tridimensional dos dendrímeros envolve o uso de núcleos polifuncionais que acumulam unidades monoméricas repetitivas de modo radial e exponencial, capaz de construir "braço-sobre-braço" até que uma topologia semelhante a uma árvore seja estabelecida. O passo seguinte para do crescimento molecular é a obtenção de grupos terminais funcionais. [90-91]. A figura 2.9 representa a arquitetura dendrímica.

Figura 2.9- Arquitetura de um Dendrímico [89].

A síntese de dendrímeros pode ser realizada de duas maneiras, a primeira seria o método divergente, em que se inicia com o núcleo adicionando-se a este sucessivas camadas de monômeros até se obter o dendrímero desejado. O principal desafio neste método é evitar a ocorrência de reações incompletas dos grupos terminais [92-93].

Figura 2.10- Representação do método de síntese divergente de dendrímeros [83].

O segundo método é o convergente utiliza-se, onde os ramos são sintetizados e depois unidos ao núcleo para produzir o dendrímero. A grande desvantagem deste método é que os efeitos da reação de esterificação dos segmentos ao núcleo limita o número de gerações obtidas [94-95] .

Figura 2.11- Representação do método de síntese convergente de dendrímeros [83].

Os recentes sucessos em simplificar e aperfeiçoar a síntese de dendrímeros fornecem uma grande variedade de estruturas e ao mesmo tempo reduzem os custos da sua produção [96].

Outra característica que favorece o emprego dos dendrímeros como sistema de liberação de fármacos é a possibilidade de modificação de seus grupos funcionais superficiais para marcação com moléculas célula-específica. Esse grupamento

superficial pode dar ainda aos Dendrímeros propriedades importantes como adesão celular e endocitose [97-98].

Diversas formas de intercâmbio entre a arquitetura dendrítica e moléculas hospedeiras têm sido propostas. Inicialmente, o estudo de dendrímeros como sistema liberador de fármacos era focado no seu uso como micela unimolecular e “caixas dendríticas” para o confinamento de fármacos em seu interior (envolvendo interações eletrostáticas, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio). O controle da incorporação de moléculas permite que fármaco e outros solutos sejam protegidos em seu interior, promovendo o seu isolamento em nível molecular durante o trânsito para células alvo, em espécies de nichos quimicamente determinados que funcionam como nanoarcalço [99-101].

Uma vantagem das micelas unimoleculares dendriméricas em relação às micelas poliméricas convencionais é que a estrutura micelar fica mais estável uma vez que os segmentos hidrofóbicos estão ligados covalentemente. Atualmente, novas abordagens para o controle da liberação da droga do compartimento micelar envolvem a utilização de poli(oxietileno), PEO, híbrido e de dendrímeros com grupos hidrofóbicos acetil sensíveis ao pH [101].

Outra forma de unir o princípio ativo ao dendrímero seria conjugando covalentemente para formar um pró-fármaco macromolecular, promovendo a interação entre o fármaco e a superfície dendrítica, explorando a multivalência das ligações covalentes do fármaco ligando-o a periferia do dendrímero (interações eletrostáticas e covalentes) [102].

Nestes casos, o carreamento da droga pode ser controlado com a variação do número de gerações e a liberação da droga pode ser ajustada com a inclusão de ligações degradáveis entre ela e o dendrímero. Os grupos presentes na superfície podem ser seletivamente construídos e transformados para originar um preciso espaçamento na superfície das moléculas, o que muitas vezes não é possível com nanopartículas convencionais. Os conjugados promovem o aumento da solubilidade e o acúmulo seletivo em tumores sólidos (EPR) e diminuem a toxicidade sistêmica [83, 102-104]. Esta abordagem tem sido utilizada, por exemplo, para sintetizar dendrímeros de poliéster como carreador do medicamento antineoplásico doxorubicin [100].

Uma segunda maneira de conjugar um agente bioativo covalentemente ao dendrímero é a sua conjugação em um ponto focal, moléculas corantes foram acopladas a um ponto focal de grupos aminas de diferentes tipos de dendrímeros para estudar sua captação celular. Um ligante dissulfeto também foi utilizado para acoplar dendrímeros a base de guanidina a anticorpos e nanopartículas poliméricas. Estes conjugados foram internalizados pelas células de mamíferos [105-106].

Figura 2.12- Formas de associação do agente bioativo com o dendrímeros [63].

No caso de fármacos encapsulados eles são liberados através da difusão da matriz droga/dendrímero, em fármacos conjugados aos dendrímeros a liberação vem através da clivagem das ligações covalentes que unem o pró-farmaco ao dendrímero. A sua alta solubilidade em um grande número de solventes orgânicos favorece o processamento e a rápida dissolução [63].

Comparado com lipossomas e micelas, os conjugados de medicamentos com dendrímeros demonstram maior estabilidade, devido às suas estruturas unimoleculares, sendo portanto, mais fáceis de manusear (formulação e

esterilização). No entanto, em adição ao desafio para a síntese de dendrímeros monodispersos de alta geração, a conjugação de um alto índice de drogas insolúveis na superfície dos dendrímeros podem resultar em aumento significativo da hidrofobicidade periférica. Isso pode levar a agregação do polímero e a um aumento na sua polidispersividade [107].

Uma análise comparativa entre os compostos encapsulados e conjugados foi feita com dendrímeros PAMAM de geração 5 e demonstrou que o complexo de inclusão melhorou a solubilidade em água mas apresentou uma liberação prematura da molécula bioativa, já os dendrímero conjugados covalentemente se mantiveram estáveis, sendo considerados adequados para a liberação de fármacos em um sítio específico em condições biológicas [107].

O emprego de dendrímeros com o propósito de originar a solubilização de fármacos insolúveis ou pouco solúveis tem sido muito explorado. Um exemplo seria a utilização de dendrímeros TPGS (d- α -tocopherol polyethylene glycol succinate) como transportadores de fármacos da família Taxanos, Docetaxel e paclitaxel, fármacos conhecidos por sua significativa atividade antineoplásica que possui uso restrito devido a sua baixa solubilidade em água. O TPGS se mostrou capaz de melhorar suas propriedades de solubilização [88].

Diversos fármacos antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) como cetoprofeno, ibuprofeno, diflunisal e naproxeno apresentaram um aumento significativo na sua solubilidade quando encapsulados por dendrímeros PAMAM. Os resultados mostraram que a solubilidade dos AINEs foi aproximadamente proporcional a concentração e geração dos dendrímeros utilizados. A ação da doxorubicina também foi mais eficiente no tratamento do câncer de cólon em ratos quando associada ao transporte polimérico [94, 106].

Devido à capacidade de permitir um domínio preciso sobre sua arquitetura e a apresentação de características favoráveis para essa finalidade, podemos presumir que estas moléculas ainda têm muito a oferecer para a terapêutica sendo ferramentas formidáveis para o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos mais seguros e eficazes.

2.4.1 Dendrímero de Poliglicerol

O dendrímero de poliglicerol (PGLD) exibe características favoráveis para utilização como carreador farmacológico. Este biomaterial tem como principal característica a presença de grupos hidroxilas e ligações éter. Devido a sua arquitetura núcleo-casca ele apresenta propriedades anfipáticas que permitem sua utilização no processo de encapsulamento e transporte de moléculas polares (tais como corantes e drogas) em ambientes hidrofílicos e hidrofóbicos. Seus grupos hidroxilas funcionais podem ser transformados e utilizados como sítios para imobilização de substâncias de interesse biológico.

O PGLD apresenta baixa temperatura de transição vítrea (T_g) e solubilidade em água. Sua sintetização é feita através do método divergente, que possibilita um melhor controle da técnica [83].

O dendrímero poliglicerol altamente ramificado tem sido utilizado no processo de encapsulamento e transporte de moléculas polares (tais como corantes e drogas) e, também, na criação de microambientes especiais no seu núcleo. Afinal, a síntese de dendrímeros permite gerar arquiteturas moleculares similares às observadas em sistemas biológicos e, devido a isso, essas macromoléculas são conhecidas como proteínas artificiais [110].

O poliglicerol dendrítico faz parte dessa classe de materiais versáteis e, por isso, apresenta um futuro promissor na área de aplicações biomédicas. Recentes progressos foram feitos na aplicação de dendrímeros biocompatíveis como transportadores de fármaco para o tratamento do câncer [83].

Figura 2.13- Dendrímero de Poliglicerol

O grupo de biomateriais da Universidade Federal de Itajubá tem estudado as propriedades bioquímicas do bioconjugado de dendrímico de poliglicerol associado ao ácido acetilsalicílico, o PGLD-AAS, apresentando em trabalhos anteriores sucesso na síntese desse composto e uma avaliação favorável de suas propriedades bioquímicas, no que se relaciona a biocompatibilidade, propriedades hemocompatíveis e de citotoxicidade adequadas para o contato com o sangue. Logo, o sistema PGLD-AAS pode atuar como transportador do agente antitumoral diretamente na corrente sanguínea [83].

Este material apresenta características adequadas relacionadas à biocompatibilidade, e funcionalidade como sistema carreador do ácido acetilsalicílico, tornando a utilização deste fármaco favorável ao tratamento antineoplásico [83].

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral desse trabalho é conjugar o celecoxibe ao PGLD, avaliando a citotoxicidade e viabilidade celular em condições *in vitro* deste composto em cultura de células de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP), analisando sua ação como potencial sistema liberador de fármacos e agente antineoplásico. Os seguintes objetivos específicos dessa dissertação são apresentados abaixo:

- a) Sintetizar e caracterizar por técnicas físico-químicas o conjugado PGLD-Celecoxibe.
- b) Verificar os efeitos do PGLD-Celecoxibe nos índices de proliferação celular das linhagens celulares SCC9, SCC25 e FaDu.
- c) Investigar as propriedades antitumorais do conjugado PGLD-celecoxibe frente a células tumorais da linhagem SCC9, SCC25 e FaDu, investigando os índices de apoptose pela técnica de TUNEL.
- d) Analisar através de imunofluorescência a localização intracelular das proteínas Akt, NF- κ B e COX-2, e possíveis alterações desta localização após o contato com o conjugado PGLD-Celecoxibe
- e) Analisar a expressão das proteínas Akt, NF- κ B e COX-2 através do western-blotting.

4 METODOLOGIA

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo sob o parecer número 224.090 em 20/03/2013 (ANEXO A).

4.1 Síntese e Caracterização do PGLD) e do PGLD-Celecoxibe

Nesse trabalho, o processo de síntese e caracterização do PGLD será realizado de acordo com os trabalhos anteriores do grupo de biomateriais da UNIFEI-MG. Para a síntese de famílias de PGLD de geração zero a quatro ($G = 0-4$), um processo iterativo de seis etapas onde a alilação de um núcleo de poliglicerol seguido da dihidroxilação catalítica com óxido de N-metilmorfolina da ligação alílica é adotado. O PGLD de terceira geração (10.1 g, 5.98 mmol, Grupos OH: 143.5 mmol) foi dissolvido em 50% (% em peso) de hidróxido de sódio (57mL) sob aquecimento. O próximo passo foi dissolver o PGLD(G_3), para isso foi adicionado TBAB (4.6 g, 14.3 mmol) sob intensa agitação. Foi adicionado então Cloreto Alílico (3-cloro-1-propeno, 75.7 mL, 930 mmol) sob agitação por 30 horas a 40 °C. Depois da adição de 143 mL de Tolueno a mistura, a fase orgânica foi separada, filtrada e concentrada usando um evaporador rotativo. O produto bruto foi ainda purificado por cromatografia de coluna líquida para se obter óleo incolor [111-112].

Para determinar o peso molecular do PGLD foi empregada a técnica de dessorção a laser assistida por matriz com tempo de voo (MALDI-Tof). Foi utilizado um espectrômetro (Bruker ProFLEX III MALDI-MS) com analisador de tempo de voo e detector tipo microcanal de placas (MCP) o comprimento de onda (λ) de trabalho foi 337 nm e o pulso foi de 3 ns. A matriz utilizada foi Ácido Indol Acrílico.

A estrutura do PGLD foi caracterizada através da Ressonância Magnética Nuclear ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$., 300 MHz) D_2O foi utilizado como solvente.

O PGLD foi funcionalizado com grupos Aldeídos (CHO) que podem se ligar a amina primária do celecoxibe através de uma reação de alquilação redutiva [113].

Uma solução de 12g de periodato de Sódio (NaIO_4) em 2 mL de água destilada foi adicionada através de gotejamento a solução de 10g de PGLD dissolvidos em 3 mL de água destilada a 25°C protegido da luz. A solução foi então dialisada (MWCO 3,500) em 5 L de água deionizada por 3 dias. A solução no tubo de dialise foi congelada e liofilizada para obtenção de 4,51g de PGLD-CHO [figura 4.1].

Figura 4.1- Síntese do Conjugado PGLD-Celecoxibe

A quantidade de CHO presente no PGLD foi medida através do método colorimétrico, foi utilizado 100 μL da solução de Schiff (Sigma-Aldrich), 800 μL e água destilada e 100 μL da solução de PGLD em água deionizada.

Uma curva de calibração foi preparada usando solução de formaldeído (Sigma-Aldrich) nas concentrações de 0-1.0 mmol.L^{-1} as amostras ficaram 120 min. em temperatura ambiente e a absorvância foi lida a 560 nm. Para ser conjugado ao PGLD-CHO, Celecoxibe (50mg) foi dissolvido em DMSO e adicionada a solução de 1 mg de PGLD-CHO em 5 mL de DMSO. O Sistema reacional foi mantido sob agitação por 1

hora. Em seguida uma Solução de Etanolamina (100 μ L, 10% v/v em DMF) é adicionada e a agitação é mantida por mais 1 hora. Cianoborohidrido sódico (NaBH_3CN , 20 mg) foi acrescentada a solução e mantida sob agitação por mais 48 horas. O meio reacional foi dialisado em 5L de água e depois liofilizado obtendo-se então o PGLD-Celecoxibe [figura 4.1 (3-4)].

A conjugação do Celecoxibe ao PGLD foi monitorada por cromatografia de camada delgada (TLC) e por calorimetria de varredura diferencial (DSC) e Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e Espectroscopia por Ressonância Magnética.

Para avaliar a pureza das soluções e monitorar a conjugação do Celecoxibe ao PGLD-CHO o TLC correu em solução comercial Kieslgel GF254 tipo 60 em placas de 20x20 cm com espessura de 0,25mm (Merck). A fase móvel para desenvolver o sistema foi composto por clorofórmio, acetato de etila e éter (10:5:1 v/v/v). Uma amostra de 5 μ L de Celecoxibe e o PGLD-Celecoxibe (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foram plaqueadas e transferidas para uma câmara contendo a fase móvel. A placa foi examinada em luz Ultra-Violeta (254 e 365 nm) e revelada em câmara de iodo (I_2).

As curvas de DSC foram registados em um Calorímetro Diferencial de Varredura DSC60 Shimadzu em cadinhos de alumínio selados sob atmosfera de nitrogênio. As medições foram realizadas a uma temperatura variando entre -90°C e 100°C . A velocidade de varredura foi 10 K.min^{-1} . O peso das amostras foi de 10mg.

O espectro infravermelho das amostras foram mensurados em Espectrômetro FT-IR spectrum 100 Shimadzu na faixa de frequência de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$.

O Espectro de Ressonância Magnética Nuclear das amostras foram obtidos em Espectrômetro Bruker AVANCE II (400MHz) usando D_2O como solvente e Tetrametilsilano (TMS) com padrão interno.

O montante de Celecoxibe conjugado ao PGLD foi avaliado através de espectrometria (Espectrômetro Cary 50 UV-Vis) a 255 nm.

O Conjugado PGLD-Celecoxibe (110 mg) foi dissolvido em solução PBS (pH 7,4). E transferido para bolsa de diálise (peso molecular de corte 3,5 kDa). Esta bolsa foi colocada em um recipiente contendo 20mL de PBS. Uma amostra de 100 μ L foi recolhida em intervalos de tempo específicos e a fase externa foi reabastecida com

100 µL de solução de PBS. A análise quantitativa de amostras colhidas foi realizada usando um ensaio de HPLC.

Método de HPLC foi realizada utilizando uma bomba de HPLC Waters 515 com um auto-injetor Rheodyne 7725I, duplo detector λ de absorvância Waters 2487, integrador 746 Chromatopac (Waters). A Coluna cromatográfica utilizada foi a C18 μ -Bondapak (250 $\times$ 3,9 milímetros, Waters). A fase móvel consistiu em KH_2PO_4 (0.01M) em água deionizada e destilada, acetonitrilo (40:60), 20 μL de Trietanolamina e ácido ortofosfórico para obtenção de pH final de 4,5. A fase aquosa foi eluída a um fluxo de 2,0 mL / min e o efluente foi monitorado a 260 nm. A análise quantitativa foi obtida através da medida dos índices da área do pico do padrão interno do fármaco. Uma solução estoque de Celecoxibe (100 $\mu\text{g/mL}$) foi preparada e soluções nas concentrações de 1.0, 2.5, 5.0, 10, 15, and 20 $\mu\text{g/mL}$ foram obtidas. Curva de calibração foi obtida utilizando os dados obtidos através do HPLC e das concentrações conhecidas do fármaco. A regressão linear foi utilizada para quantificar a concentração de Celecoxibe em amostras através da determinação da área do pico do padrão interno de droga e a comparação dos valores obtidos com aqueles da curva padrão, que foi obtida após a análise das amostras de calibração.

O percentual cumulativo de Celecoxibe em relação ao tempo foi obtido através da equação 4.1

$$\% \text{Liberação CXB} = \frac{(CXB)_{\text{liberado}}}{(CXB)_{\text{inicial}}}$$

Equação 4.1- CXB liberado e CXB inicial são a concentração de celecoxibe em um tempo t e no tempo inicial

4.2 Cultivo das Linhagens Celulares

Neste trabalho foram utilizadas linhagens celulares de carcinoma epidermóide bucal humano provenientes da ATCC (ATTC – American Type Culture Collection, Manassas, EUA) sendo elas SCC 9, SCC 25 e FaDu (quadro 4.1) foram cultivadas utilizando a seguinte metodologia: Plaqueamento das linhagens celulares em frascos de 75cm² contendo 15 ml de DMEM/F12 (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP, BR), e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA) para as linhagens SCC9 e SCC 25. Para linhagem FaDu foi utilizado meio DMEM (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino bovino (Cultilab, Campinas, SP, BR) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA) para a linhagem FaDu. As linhagens em cultura foram mantidas em estufa 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 utilizados.

Linhagem	Idade do Paciente	Sexo do Paciente	Localização
SCC9	25 anos	Masculino	Língua
SCC25	75 anos	Masculino	Língua
FaDu	56 Anos	Masculino	Faringe

Quadro 4.1 – Linhagens de carcinoma epidermóide bucal humano utilizadas no estudo com sua respectiva origem

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 até atingirem a sub-confluência na placa de cultura de onde serão descoladas pela ação da solução de tripsina (0,05%) /EDTA(0,02%) (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) em solução fosfato-salina, pH 7,2. Desta forma, em cada repetição deste procedimento obtemos uma nova passagem de linhagem celular.

Para a obtenção do número de células adequado para cada ensaio, a contagem de células foi realizada em câmara de Neubauer.

4.3 Ensaio de Viabilidade Celular

O Ensaio de Viabilidade Celular utilizando linhagens celulares pode ser considerado como um primeiro parâmetro indicativo da atividade antitumoral do PGLD-Celecoxibe. A velocidade de crescimento e multiplicação celular pode ser medida indiretamente, utilizando os corantes supravitais, sendo a intensidade da cor desenvolvida diretamente proporcional ao número de células presentes no meio.

Este ensaio será realizado segundo a norma ISO 10.993-5 utilizando-se controle negativo e positivo. O controle negativo será a linhagem celular em seu meio de cultura, como controle positivo a substância utilizada será o DMSO, um material que proporciona uma resposta citotóxica reprodutível.

Os experimentos foram realizados em triplicata, em placa de 96 poços com uma densidade celular de 2×10^3 células por poço 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 celecoxibe. 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 Celecoxibe.

Os grupos experimentais foram divididos da seguinte forma:

Grupo 1-Controle negativo: Não houve adição de qualquer substância no meio de cultura.

Grupo 2- PGLD: Adição ao meio de cultura de PGLD sem associação de Celecoxibe.

Grupo 3- Celecoxibe: Adição ao meio de cultura de Celecoxibe diluído em DMSO nas diluições de 50 µL, 40 µL, 30 µL, 20 µL, 10 µL, 5 µL e 1 µL.

Grupo 4- PGLD-Celecoxibe: Adição ao meio de cultura de PGLD-Celecoxibe nas diluições de 50 µL, 40 µL, 30 µL, 20 µL, 10 µL, 5 µL e 1 µL.

Grupo 5- Controle Positivo: Adição ao meio de cultura de DMSO a uma concentração estoque de 50 µL.

A viabilidade celular após a exposição das linhagens celulares descritas ao Celecoxibe e PGLD-Celecoxibe, pode ser mensurada pela incubação com corante vital MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-y)5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil-2H-tetrazolio) e reagente acoplador de elétrons, PMS. (metassulfato de fenazina) na razão 20:1 em um volume total de 20 µL, e incubado por 2 horas. Após o período de incubação, a velocidade de crescimento e multiplicação celular é medida indiretamente.

No ensaio, o MTS é bio reduzido através da enzima mitocondrial solúvel no meio de cultura. A quantidade de MTS metabolizada pela população de células é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Para realizar essa medida a placa é levada a uma leitora ELISA ((ELX 800 Bio-Tek instruments Inc.) com filtro de 490 nm para leitura das densidades ópticas.

A concentração de Celecoxibe e PGLD- Celecoxibe que produz uma redução em 50% da absorção de MTS (IC50%) será considerada como o parâmetro de toxicidade. O índice de citotoxicidade foi estimado, ajustando modelos matemáticos às curvas construídas a partir da porcentagem de colônias formadas em relação ao controle versus a concentração, expressa em porcentagem [114].

4.4 Ensaio de Migração Celular

As linhagens celulares de carcinoma epidermoide SCC 9 e FaDu foram cultivadas utilizando a metodologia adequada (item 4.2). Para a obtenção de uma

suspensão celular com 4×10^4 células por mL de meio de cultura, quantidade adequada para o ensaio, a contagem de células será realizada em câmara de Neubauer.

As células foram então plaquedadas em Placas de Petri de 30mm. Assim que as células atingem a confluência total é realizada uma lesão através da delicada passagem de uma ponteira de 10 μ L promovendo a descontinuidade da monocamada de células. A primeira placa é tratada com o composto PGLD-Celecoxibe e a segunda placa com o Celecoxibe. O tratamento é feito por 30 minutos com ambos os compostos na concentração de 25 μ M e uma terceira placa não tratada é utilizada como controle e em uma quarta placa foi aplicada PGLD não associado ao medicamento. Após a troca do meio de cultura das placas a lesão é fotografada no momento do tratamento, 24 horas e 48 horas depois. Pontos de referencia foram demarcados em cada placa para que a mesma região seja fotografada nos diferentes momentos. Com a utilização do software Image J (NIMH, NIH) a área livre foi demarcada e o decréscimo percentual da área da lesão foi calculado. Os ensaios foram realizados em triplicata e foram utilizados a média dos valores obtidos em percentual para obtenção dos gráficos.

4.5 Análise de Apoptose

A presença de células em apoptose foi investigada pelo método TUNEL (*TdT mediated dUTP nick end labeling*). Esse sistema detecta o DNA fragmentado das células apoptóticas através d incorporação catalítica da fluoresceína com a finalidade de identificar as células em processo de apoptose via marcação de fragmentos terminais de DNA (porção 3' -OH), caracteristicamente relacionado com a fragmentação do DNA nuclear, possibilitando a identificação morfológica de células em apoptose.

Para este ensaio foram plaqueadas 10×10^4 células sobre lamínulas previamente estéreis, colocadas em poços de placas de doze poços. O tratamento foi feito da seguinte forma:

Grupo 1-Controle: Não houve adição de qualquer substância no meio de cultura.

Grupo 2- PGLD: Adição ao meio de cultura de PGLD sem associação de Celecoxibe.

Grupo 3- Celecoxibe: Adição ao meio de cultura de Celecoxibe diluído em DMSO nas concentrações de 25 μ L.

Grupo 4- PGLD-Celecoxibe: Adição ao meio de cultura de PGLD-Celecoxibe nas concentrações de 25 μ L.

As células tratadas permaneceram na estufa a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, por 30 minutos seguida da troca do meio de cultura.

Depois de 24 horas as lamínulas foram lavadas com PBS 1X, e deixadas por 25 minutos em paraformaldeído 4% à 4°C para fixação. Depois realizou-se nova lavagem com PBS 1X. Para este ensaio foi utilizado o kit DeadEnd® Promega, as amostras fixadas foram incubadas com 0,2% de triton-X por 5 minutos. As células foram então incubadas com 25 μ l 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.

4.6 Ensaio de Imunofluorescência

Neste ensaio, cada linhagem celular na concentração de 10×10^4 células é cultivada sobre lamínulas de vidro. Depois as células permanecerão em meio sem soro por 24 horas para em seguida realizar o tratamento com Celecoxibe e PGLD-Celecoxibe, o tratamento foi feito da seguinte forma:

Grupo 1-Controle: Não houve adição de qualquer substância no meio de cultura.

Grupo 2- PGLD: Adição ao meio de cultura de PGLD sem associação de Celecoxibe.

Grupo 3- Celecoxibe: Adição ao meio de cultura de Celecoxibe diluído em DMSO nas concentrações de 25 μ L.

Grupo 4- PGLD-Celecoxibe: Adição ao meio de cultura de PGLD-Celecoxibe nas concentrações de 25 μ L.

As células tratadas permaneceram na estufa a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ por 30 minutos seguida da troca do meio de cultura.

Após 24 horas do tratamento as lamínulas contendo as células serão lavadas em PBS, e depois da lavagem, é adicionado metanol suficiente para cobrir as lamínulas células por 6 minutos, à -20°C. Após esse período, as lamínulas são lavadas novamente com PBS e incubadas com 30 μ L de solução de PBS + BSA à 1% por 30 minutos e então, as lamínulas são novamente lavadas com PBS.

No próximo passo o anticorpo primário (quadro 4.2) diluído em PBS+BSA a 1% é incubado por 60 minutos em temperatura ambiente e câmara úmida e em seguida, lavadas novamente com PBS. O anticorpo secundário (Fluoresceína anti-mouse IgG (H+L) – Vector Laboratories, Ind. Burlingame, CA 94010) diluído em PBS+BSA à 1% por é incubado por 45 minutos em temperatura ambiente e câmara úmida, protegidos de luz. As lamínulas são novamente lavadas com PBS para posterior montagem das lâminas com Vecta Shild (Vector Laboratories, Ind. Burlingame, CA 94010). A imobilização das lamínulas é feita com o uso de esmalte incolor, e estas são armazenadas na geladeira na ausência de luz para posterior análise no microscópio de imunofluorescência (Zeiss Axiophot II, Carl Zeiss).

ANTICORPO	CLONE	TIPO	CONCENTAÇÃO	PROCEDENCIA
p-Akt	1/2/3-R	Policlonal	1:50	Santa Cruz Biotechnology
NF- κ B	P65 A	Policlonal	1:50	Santa Cruz Biotechnology
COX-2	29	Monoclonal	1:50	Santa Cruz Biotechnology

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

4.7 Extração e Quantificação de Proteínas

Neste processo, após a subconfluência das linhagens celulares, é realizado o tratamento com Celecoxibe e PGLD-Celecoxibe da seguinte maneira:

Grupo 1-Controle: Não houve adição de qualquer substância no meio de cultura.

Grupo 2- PGLD: Adição ao meio de cultura de PGLD sem associação de Celecoxibe.

Grupo 3- Celecoxibe: Adição ao meio de cultura de Celecoxibe diluído em DMSO nas concentrações de 25 μ L.

Grupo 4- PGLD-Celecoxibe: Adição ao meio de cultura de PGLD-Celecoxibe nas concentrações de 25 μ L.

Grupo 5- DMSO: Adição de DMSO ao meio de cultura.

As células tratadas permaneceram na estufa a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, por 30 minutos seguida da troca do meio de cultura. Após 24 horas do tratamento as lamínulas contendo as células serão lavadas em PBS.

A extração proteica foi realizada com auxílio de tampão um de lise (5 mL de 0.5M Tris pH 6,8, 4 mL de SDS 20%, 0,4 mL β -mercaptoetanol, 30,5 mL de água Milli Q) acrescido de coquetel inibidor de protease 1X (solução estoque concentrada em 7X em água Milli Q- Protease Inhibitor Cocktail Tablets- Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA.). Para placas de 6 poços a quantidade de células plaqueadas foi de aproximadamente 5×10^4 e utilizou-se 300 μ L/poço.

Após remoção do meio de cultura e lavagem das placas com PBS 1X adiciona-se o tampão de lise acrescido do coquetel inibidor de protease a placa contendo as células era apoiada em gelo e raspada, o conteúdo foi colocado em tubo de 1,5 mL e em seguida 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 (Cu²⁺) 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.

4.8 Western-Blotting

As alíquotas previamente quantificadas padronizadas em 30 µg de proteínas 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 eletroforese em géis de acrilamida, conforme quadro 4.3.

	Gel de Resolução	Gel de Empilhamento
<i>Solução de Acrilamida 30%</i>	4,17mL	0,65mL
Tampão de Resolução	2,5mL	-
Tampão de Empilhamento	-	1,25mL
Água Destilada	3,05mL	3,0mL
SDS 10%	100µL	50µL
TEMED	8µL	8µL
10% Persulfato de Amônio	72µL	72µL

Quadro 4.3- Composição dos géis utilizados no Western Blotting

A eletroforese foi realizada a 100 V, 20 W, 100 mA durante 1,5 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 utilizando-se o tampão de transferência (48 mM Tris Base; 39

mM Glicina, 20% Metanol; pH 8,3). A transferência foi realizada à 60 V, 30 W, 70 mA por 1,5 horas em gelo.

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 (Quadro 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.

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.

Anticorpo	Tipo	Clone	Concentração	Procedência
pNFk-B	P65A	Policlonal	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
COX-2	29	Monoclonal	1:200	Santa Cruz Biotechnology
pAkt	1/2/3-R	Policlonal	1:200	Santa Cruz Biotechnology
β -actina	AC-5	Monoclonal	1:5000	Sigma

Quadro 4.4- Anticorpos primários utilizados

5 RESULTADOS

5.1 Síntese e Caracterização do PGLD e PGLD-Celecoxibe

O PGLD (G4) foi sintetizado em um processo de 2 passos baseado na alilação do Poliglicerol seguida da dihidroxilação catalítica. A figura 5A mostra o espectro da ^1H -NMR do PGLD os picos de caracterização apareceram nas seguintes regiões: (δ , ppm): 4.8 (OH), 4.04 ($\text{OCH}_2\text{-CH-CH}_2$), 3.95-3.40 ($\text{CH}_2\text{-O-CH}_2$).

A ^{13}C -NMR do PGLD é mostrada na figura 5.1B com os seguintes valores (δ , ppm): 62.9 (CH_2OH , unidade terminal), 82.0-81.5, 80.6-79.8, 74.7-73.9, 73.8-72.2, 71.8-70.7, 64.7, 63.1 ($\text{CH}_2\text{-O-CH}_2$, estrutura polieter).

Figura 5.1- Espectro ^1H -NMR (A) e ^{13}C -NMR (B) do PGLD G4. Espectro ^1H -NMR (C) e ^{13}C -NMR (D) indica grupos aldeídos terminais depois da oxidação com NaIO_4 . As medidas foram feitas em D_2O

O espectro de massa MALDI-TOF pode fornecer informações sobre as misturas de íons isoméricos produzidos como resultado da síntese incompleta. Produtos de síntese incompletas podem surgir a partir de falhas de síntese que ocorrem na etapa final e/ou a partir da propagação de deficiências de gerações anteriores. A Figura 5.2 mostra a MALDI-TOF-MS (matriz de IAA) m/z para PGLD G4.

Figura 5.2- Espectro de massa MALDI-TOF do PGLD G4

Esta população de íons reflete uma mistura isomérica de estruturas características de estruturas dendríticas. As espécies presentes no espectro de massa MALDI-TOF correspondem ao PGLD G4. Os picos maiores correspondem a espécies com m/z de 3495.28 $[M + H]$ e 3471.34 $[M - H_2O]$.

A massa calculada para o PGLD G-4 é de 3508 Da. Desta forma os valores teóricos e experimentais de massa estão de acordo com uma estrutura dendrítica simétrica PGLD.

Como pode ser observado no Esquema 4.1 a oxidação por NaIO₄ PGLD produz grupos aldeído na periferia do dendrímero. Estes grupos aldeídos seguida reagem com os grupos amino primários das moléculas de Celecoxibe resultando na ligação covalente da droga. A investigação da estrutura PGLD após a oxidação por NaIO₄ foi investigada por espectroscopia de ¹H-NMR and ¹³C-NMR. Apesar dos espectros do PGLD e do PGLD oxidado serem similares algumas diferenças podem ser notadas. A marca do Carbono mais evidente foi 10.8 ppm (¹H) e 203.2 ppm (¹³C), espectro relacionado ao Hidrogênio presente no Aldeído (CHO) (figura 5.1 C) e ao grupo Carbonila presente no Aldeído (CHO) (figura 5.1 D).

A interpretação do espectros infravermelhos obtidos é feita pelo perfil do espectro e pela presença de bandas de vibração características dos principais grupos químicos funcionais. Desta forma, a presença de moléculas de celecoxibe no PGLD foi confirmada pela presença de bandas típicas da droga no espectro FTIR. Os espectros FTIR do celecoxibe, PGLD e do PGLD-Celecoxibe estão demonstrados na figura 5.3. Os picos principais relacionados ao PGLD são bandas de absorção em 1000 a 1150 cm⁻¹ relativas a vibrações de estiramento dos grupos éter e uma ampla banda de estiramento para o grupo alquil foi observada de 2750 a 3000 cm⁻¹. As bandas do grupo Hidroxila (OH) foram observadas em 3000 a 3650 cm⁻¹. Em relação ao Celecoxibe, como mostrado no espectro FTIR na figura 5.3 B as absorções relacionadas com as bandas de estiramento foram observadas 3350-3220 cm⁻¹ (N-H), 1350-1180 cm⁻¹ (SO₂-N), 3097 (C-H, aromatic and 1350-1100 cm⁻¹ (C-F), valores que estão de acordo com a literatura [115].

Figura 5. 3- Espectro FTIR PGLD G4 .(A), CXB (B) e PGLD-Celecoxibe (C)

A interpretação do espectro PGLD-Celecoxibe (Figura 3C) ficou prejudicada devido a superposição do espectro típico do PGLD, que ficou em torno de 3350-3220 cm^{-1} (N-H) e na faixa de 1350-1100 cm^{-1} (C-F).

Deste modo, a adsorção foi observada como uma redução na intensidade de bandas relevantes do Celecoxibe. O fato que confirmou a presença de Celecoxibe dentro da estrutura PGLD foi o aparecimento de uma banda em 1720 cm^{-1} atribuída ao grupo carbonil da droga.

O TLC foi utilizado para confirmar a conjugação do Celecoxibe ao PGLD e avaliar a presença de resíduos que não reagiram depois da purificação. Desta forma, o Celecoxibe livre (que não reagiu) permaneceu no fundo da placa, enquanto o produto PGLD-Celecoxibe, que é solúvel no solvente de desenvolvimento, migraram com a frente de solvente para o topo da placa de sílica.

A faixa (B) da figura 5.4, que representa a solução purificada PGLD-Celecoxibe, não exibiram nenhuma fluorescência associada com Celecoxibe livre (resultados não mostrados aqui), enquanto que a fluorescência associada ao Celecoxibe conjugado com o PGLD foi observada. Assim, o TLC mostrou a remoção bem sucedida do Celecoxibe livre do conjugado PGLD-Celecoxibe.

Figura 5.4- TLC de PGLD (A), PGLD-celecoxibe (B) e celecoxibe (C). A placa de gel foi revelado em iodo, à temperatura ambiente (25 ° C). Em (B), não é observada a fluorescência devido à Celecoxibe que não reagiu no fundo da placa

Além disso, o DSC foi utilizada para determinar Celecoxibe livre no pró-fármaco PGLD-Celecoxibe, e os seus resultados são apresentados na Figura 5.5. Na curva DSC, o celecoxibe puro apresentou um pico endotérmico agudo a 165 ° C e uma entalpia de fusão (ΔH_f , of 90.07 J/g).

No termograma do PGLD não foi observado pico endotérmico associada à fusão mas uma temperatura de transição vítrea (T_g) de cerca de -50 ° C podem ser identificados.

PGLD não atingiu o ponto de fusão, devido ao seu caráter predominantemente amorfo.

Figura 5.5- Termograma DSC do Celecoxibe (A), PGLD (B) and PGLD-Celecoxibe (C)

No entanto, as verificações de DSC mostraram que a presença de Celecoxibe na cadeia lateral do PGLD aumentou a rigidez do dendrímero no conjugado e levou a um aumento na Tg de -59°C no PGLD para cerca de -25°C no conjugado.

Por outro lado, a introdução do Celecoxibe aumenta o valor de Tg do PGLD por causa da formação de ligações de hidrogénio internas entre as cadeias de dendrímero. No termograma de DSC do PGLD-Celecoxibe nenhum pico foi observado no termograma perto do ponto de fusão do Celecoxibe indicando que tanto o Celecoxibe quanto PGLD formaram uma única fase no conjugado PGLD-Celecoxibe.

Os Perfis de liberação de Celecoxibe (0,1 M PBS pH 7,4) são mostrados no i 5.6. O Conjugado PGLD-Celecoxibe possui uma taxa de liberação associada a droga não estando associada a liberação inicial de ruptura que pode causar toxicidade.

Figura 5.6- Perfis de liberação do celecoxibe no conjugado PGLD-Celecoxibe (37 ° C PBS pH 7,4)

5.2 Curva de Viabilidade Celular e Determinação do IC50

Com o intuito de verificar a ação do Celecoxibe e do PGLD-Celecoxibe 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 (SCC9, SCC25 e FaDu).

Os resultados demonstram uma evidente ação do Celecoxibe inibindo a proliferação celular em doses mais baixas (entre 1 μ M e 10 μ M) nas 3 linhagens celulares estudadas. O número de células viáveis do controle foi maior, porém muito semelhante aqueles encontrados no grupo tratado com o Celecoxibe (Gráfico 5.1, 5.2 e 5.3), 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 SCC9, SCC25 e FaDu

evidenciando, desta forma, também o seu papel na morte celular. É importante ressaltar que a curva de ação do Celecoxibe foi similar nos três tempos experimentais. Para adequação e padronização dos experimentos o tempo escolhido para a aplicação do Celecoxibe foi de 24 horas.

Gráfico 5.1- SCC25 tratada com PGLD-Celecoxibe e Celecoxibe após 24 horas do tratamento

Gráfico 5.2- SCC9 tratada com PGLD-Celecoxibe e Celecoxibe após 24 horas do tratamento.

Gráfico 5.3- FaDu tratada com PGLD-Celecoxibe e Celecoxibe após 24 horas do tratamento

Além disso, com os resultados obtidos da curva de viabilidade, foi possível calcular a IC₅₀ (concentração inibitória de 50% da resposta biológica máxima do Celecoxibe e do PGLD-Celecoxibe após 24 horas de incubação. A diluição média mais adequada para todas as linhagens celulares foi a dose de 25 μ M após 24 horas de incubação para o Celecoxibe e 15 μ M para PGLD-Celecoxibe (Gráficos 5.4, 5.5 e 5.6).

Gráfico 5.4- SCC9 IC 50: Celecoxibe: 15,24 μ M PGLD-Celecoxibe: 24,1 μ M

Gráfico 5.5- SCC25 IC 50: PGLD-Celecoxibe: 12,37 μ M. Celecoxibe 25,93 μ M

Gráfico 5.6- FaDu IC 50: PGLD-Celecoxibe: 15,59 μ M. Celecoxibe 23,83 μ M

5.3 Ensaio de Migração Celular

Na figura 5.7 podemos observar os grupos controle (sem tratamento), o grupo exposto ao PGLD, o grupo tratado com Celecoxibe e o grupo tratado com PGLD-Celecoxibe da linhagem FaDu no momento da lesão realizada na monocamada de células.

Figura 5.7- Diferentes grupos tratados da linhagem FaDu no momento da lesão.

Na figura 5.8 observamos os diferentes grupos tratados após 24 horas de tratamento, as células em proliferação ocupam o espaço da lesão realizada.

Figura 5.8- Diferentes grupos tratados da linhagem FaDu 24 horas após a lesão.

Na figura 5.9 observamos os diferentes grupos tratados após 48 horas de tratamento, é possível observar que no grupo controle a proliferação das células na

lesão foi sensivelmente maior do que nos grupos tratados com Celecoxibe e Celecoxibe associado ao PGLD.

Figura 5.9- Diferentes grupos tratados da linhagem FaDu 48 horas após a lesão.

Através do Software Image J foi obtido o valor em pixels da área livre de células para cada placa tratada e a média dos valores obtidos de cada tipo de tratamento foi convertida em porcentagem sendo a área obtida no momento da lesão (momento 0) admitida como 100% de área livre de células.

Grafico 5.7- FaDu: Porcentagem de área livre da lesão (0h, 24h e 48h).

Desta forma, para linhagem FaDu no grupo controle 18,09% da área inicial permaneceu livre de células ao final das 48 horas e no grupo tratado com Dendrímero 24,9% da área inicial permaneceu livre de células. Já no grupo tratado com Celecoxibe 59,3% da área inicial permaneceu livre de células. No grupo tratado com Celecoxibe associado ao PGLD o resultado obtido foi de 67,1% da área inicial livre de células.

Na figura 5.10, podemos observar os grupos controle (sem tratamento), o grupo exposto ao PGLD, o grupo tratado com Celecoxibe e o grupo tratado com PGLD-Celecoxibe da linhagem SCC9 no momento da lesão realizada na monocamada de células.

Figura 5.10- Diferentes grupos tratados da linhagem SCC9 no momento da lesão.

A figura 5.11 demonstra os diferentes grupos tratados da linhagem SCC9 24 horas após a lesão onde as células começam a proliferar e ocupar a área da lesão.

Figura 5.11- Diferentes grupos tratados da linhagem SCC9 24 horas após a lesão.

Na figura 5.12 observamos os diferentes grupos tratados após 48 horas de tratamento, é possível observar que no grupo controle a proliferação das células na lesão foi sensivelmente maior do que nos grupos tratados com Celecoxibe e PGLD-Celecoxibe.

Figura 5.12- Diferentes grupos tratados da linhagem SCC9 48 horas após a lesão.

Através do Software Image J foi obtido o valor em pixels da área livre de células para cada placa tratada e a média dos valores obtidos de cada tipo de tratamento foi convertida em porcentagem sendo a área obtida no momento da lesão (momento 0) admitida como 100% de área livre de células.

Grafico 5.8- SCC9: Porcentagem de área livre da lesão (0h, 24h e 48h)

De acordo com os resultados obtidos podemos observar na amostra não tratadas a área da lesão não ocupada foi de 25,7% após 48 horas de confecção da lesão. Já nas linhagens tratadas apenas com o PGLD não associado ao Celecoxibe, observamos que 26,9% da área inicial continuou livre de células após 48 horas. Nas amostras tratadas apenas com o Celecoxibe observamos que área da lesão que permaneceu livre de células após 48 horas foi de 54,9%. No tratamento feito com o Celecoxibe associado ao PGLD, ou seja, utilizando o carreador, observamos que 63,1% da área inicial permaneceu livre de células após 48 horas.

5.4 Análise de Apoptose

Para comprovarmos que o celecoxibe promove a morte celular por apoptose nas células tumorais devemos observar coloração nuclear em verde, enquanto as células viáveis são observadas em azul.

No grupo controle encontramos um índice de células em apoptose mínimo nas duas linhagens analisadas (figura 5.13).

Figura 5.13- Ensaio de Apoptose Grupo Controle. A- Grupo Controle (SCC9) e B- Grupo Controle (SCC25). C e D- Grupo controle (FaDu).

No grupo tratado com apenas com o PGLD observamos a presença discreta de células apoptóticas coradas em verde (figura 5.14).

Figura 5.14- Ensaio de Apoptose Grupo PGLD. A- Grupo tratado com PGLD (SCC9) e B- Grupo tratado com PGLD (SCC25). C e D-Grupo tratado com PGLD (FaDu)

O terceiro grupo analisado foi tratado com o antiinflamatório Celecoxibe, observamos um índice um pouco maior de células apoptóticas coradas em verde (figura 5.15).

Figura 5.15- Ensaio de Apoptose: Grupo Celecoxibe. A- Grupo tratado com Celecoxibe (SCC9). e B- Grupo tratado com Celecoxibe (SCC25). C e D- Grupo tratada com Celecoxibe (FaDu)

O último grupo analisado foi o tratado com o sistema PGLD-Celecoxibe onde observamos o maior índice de células apoptóticas com o núcleo corado em verde (figura 5.16).

Figura 5.16- Ensaio de Apoptose Grupo PGLD-Celecoxibe. A-Grupo tratado com PGLD-Celecoxibe (SCC9) e B- Grupo tratado com PGLD-Celecoxibe (SCC25). C e D- Grupo tratado com PGLD-Celecoxibe (FaDu)

Procedeu-se a contagem dos núcleos viáveis e apoptóticos em três campos distintos e aleatórios para cada amostra, através do software Axion Vison 4.7 Carl Zeiss. A porcentagem média obtida está representada no gráfico 5.9.

Gráfico 5.9- Contagem de células em Apoptose em porcentagem

A análise de apoptose nos permite concluir que o Celecoxibe na concentração de 25 μ M promove a morte por apoptose nas células de CECP em cultivo (linhagens SCC9, SCC25 e FaDu). Comprovamos ainda que com a utilização do Dendrimer de Poliglicerol associado a este medicamento obtemos um aumento de sua eficácia na promoção da apoptose nessas linhagens.

5.5 Ensaio de Imunofluorescência

O propósito do ensaio imunofluorescência é avaliar a expressão de determinada proteína e a sua localização intracelular.

O grupo controle das quatro linhagens celulares estudadas para o anticorpo p-Akt apresentou marcação nuclear. Para o grupo tratado apenas com o Dendrímero PGLD a marcação nuclear também foi mantida. Já nos Grupos Celecoxibe, expressão citoplasmática foi observada nas linhagens SCC9 e FaDu. A linhagem SCC25 apresentou marcação nuclear. A expressão citoplasmática de p-Akt foi observada no Grupo PGLD-Celecoxibe, em todas as linhagem estudadas. As figuras 5.17, 5.18 e 5.19 mostram a imunofluorescencia para p-Akt nas linhagens SCC9, SCC25 e FaDu respectivamente.

SCC9

Figura 5.17- SCC9:Imunofluorescencia para p-Akt. A-Grupo Controle; B-Grupo PGLD; C-Grupo Celecoxibe e D- Grupo PGLD-Celecoxibe.

SCC 25

Figura 5.18- SCC25:Imunofluorescencia para p-Akt. A-Grupo Controle; B-Grupo PGLD; C-Grupo Celecoxibe e D- Grupo PGLD-Celecoxibe.

FaDu

Figura 5.19- FaDu: Imunofluorescencia para p-Akt. A-Grupo Controle; B-Grupo PGLD; C-Grupo Celecoxibe e D- Grupo PGLD-Celecoxibe.

Com relação a expressão da proteína COX-2 a positividade foi predominantemente citoplasmática para o grupo controle e para o grupo tratado apenas com o PGLD. Para o grupo tratado com Celecoxibe a expressão foi citoplasmática nas linhagens SCC9 e SCC25, sendo escassa na linhagem FaDu. O tratamento com PGLD-Celecoxibe promoveu uma marcação escassa em todas as linhagens. As figuras 5.20, 5.21 e 5.22 mostram a imunofluorescência para p-Akt nas linhagens SCC9, SCC25 e FaDu respectivamente.

Cox-2: SCC9

Figura 5.20- SCC9: Imunofluorescência para COX-2. A-Grupo Controle; B-Grupo PGLD; C-Grupo Celecoxibe e D- Grupo PGLD-Celecoxibe.

SCC 25

A

B

C

D

Figura 5.21- SCC25: Imunofluorescencia para COX-2. A-Grupo Controle; B-Grupo PGLD; C-Grupo Celecoxibe e D- Grupo PGLD-Celecoxibe.

FaDu

Figura 5.22- FaDu: Imunofluorescencia para COX-2. A-Grupo Controle; B-Grupo PGLD; C-Grupo Celecoxibe e D- Grupo PGLD-Celecoxibe.

Com relação a expressão da proteína NF- κ B a linhagem SCC9 demonstrou positividade citoplasmática tanto nos grupo controle e PGLD quanto nos grupos tratados com PGLD-Celecoxibe e Celecoxibe. Já as linhagens SCC25 e FaDu apresentaram no grupo controle e PGLD positividade citoplasmática e nuclear. A positividade apresentada pelos grupos tratados com Celecoxibe e PGLD-Celecoxibe foi citoplasmática. As figuras 5.23, 5.24 e 5.25 mostram a imunofluorescência para p-Akt nas linhagens SCC9, SCC25 e FaDu respectivamente.

SCC-9

Figura 5.23-SCC9: Imunofluorescência para NF- κ B. A-Grupo Controle; B-Grupo PGLD; C-Grupo Celecoxibe e D- Grupo PGLD-Celecoxibe.

SCC25

Figura 5.24- SCC25: Imunofluorescência para NF-kB. A-Grupo Controle; B-Grupo PGLD; C-Grupo Celecoxibe e D- Grupo PGLD-Celecoxibe.

FaDu

Figura 5.25- FaDu: Imunofluorescência para NF-kB. A-Grupo Controle; B-Grupo PGLD; C-Grupo Celecoxibe e D- Grupo PGLD-Celecoxibe.

5.6 Western Blotting

Após a padronização da quantidade de proteínas em cada amostra para 30µg a técnica de Western Blotting tem como objetivo avaliar expressão de determinadas proteínas presentes nas amostras (Figura 5.26).

COX-2

pAkt

NFkB

Figura 5.26- Ensaio de expressão de proteínas Western-Blotting

O tamanho das bandas em pixels foi mensurado através do software Image-J e suas médias foram plotadas nos gráficos a seguir.

O grupo 1 se refere a SCC9, o grupo 2 a SCC25 e o grupo 3 a FaDu

Gráfico 5.10- Quantificação das bandas obtidas no Western Blotting para COX-2.

O grupo 1 se refere a SCC9, o grupo 2 a SCC25 e o grupo 3 a FaDu.

Gráfico 5.11- Quantificação das bandas obtidas no Western Blotting para pAkt .

O grupo 1 se refere a SCC9, o grupo 2 a SCC25 e o grupo 3 a FaDu

Gráfico 5.12- Quantificação das bandas obtidas no Western Blotting para NF-kB.

6 DISCUSSÃO

A importância do microambiente tumoral na progressão do câncer é um fato bem estabelecido pela literatura atual. Já que neoplasias são compostas por um tecido complexo que contém células tumorais e estroma circundante, preenchido por diferentes tipos de células mesenquimais e matriz extracelular (ECM) [116].

Isso não é diferente para o CECP, a produção de fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, metaloproteinases de matriz (MMP), e mediadores inflamatórios influenciam o crescimento do tumor e determinam seu potencial invasão local e de metástase. Portanto, a compreensão da influência desses fatores abrem novas estratégias para o diagnóstico, prognóstico e terapia de CECP [116].

Uma dessas estratégias está relacionada a superexpressão de fatores [presentes no processo inflamatório como PGs e a COX. Isso tem levado a um grande interesse em elucidar os mecanismos envolvidos em possíveis efeitos antineoplásicos dos AINEs e de como eles estão associados a inibição da expressão da enzima COX ou a eventos independentes [75].

Em relação ao CECP muitos estudos têm demonstrado a superexpressão de COX-2 nesses tumores e que inibidores seletivos dessa proteína apresentam eficácia na diminuição dos índices de proliferação celular, no aumento da apoptose e na supressão da angiogênese. Outra importante associação é entre a dor apresentada em pacientes com CECP e a intensidade de marcadores resposta inflamatória [117].

O Celecoxibe, um fármaco anti-inflamatório não-esteróidal que inibe seletivamente a COX-2, demonstra um efeito antineoplásico importante para o tratamento de carcinoma epidermóide [118].

Através do ensaio de viabilidade celular, pudemos avaliar a porcentagem de células viáveis em diferentes doses de Celecoxibe e determinar o IC50, que foi fixado em 25 μ M. Este valor está de acordo com a literatura. Resultados anteriores do nosso grupo de pesquisa fixaram um valor semelhante a este [119-121].

Observamos também que o índice de viabilidade celular nas doses menores de Celecoxibe (1 μ M e 10) e o grupo controle, foi semelhante em todas as linhagens estudadas, apresentando apenas uma discreta diminuição. Com o aumento da dose,

ficou evidente uma grande diminuição na quantidade de células viáveis 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.

A capacidade de invasão e de migração celular foi avaliada por Li (2014) através do ensaio de migração celular transwell, demonstrando que o Celecoxibe tem um efeito inibitório significativo nesses fenômenos [123].

No presente trabalho o ensaio de migração celular demonstrou que o tratamento do Celecoxibe na dose estabelecida pelo IC50 inibiu a proliferação celular na lesão.

De acordo com os resultados obtidos, para linhagem FaDu o grupo controle apresentou 18,1% de área livre de células ao final das 48 horas. Já o grupo tratado com Celecoxibe a área não ocupada foi de 59,03% da área inicial livre de células demonstrando a capacidade do Celecoxibe em inibir a proliferação celular.

De acordo com os resultados obtidos podemos observar na linhagem SCC9 que na amostra não tratadas a área da lesão não ocupada após 48 horas da confecção da lesão foi de 25,7%, mostrando que houve proliferação celular. Nas amostras tratadas com o Celecoxibe observamos que área da lesão que permaneceu livre de células após 48 horas foi de 54,9% mostrando uma eficiência da capacidade anti-proliferativa deste princípio ativo nesta linhagem analisada.

Depois de confirmar que o Celecoxibe causa um considerável decréscimo na quantidade de células viáveis, e inibição da proliferação celular e invasão torna-se importante saber qual o mecanismo de morte celular esta atuando, se indução de apoptose ou se o medicamento provocava necrose celular.

Uma substância que consegue eliminar células neoplásicas primariamente através de necrose não tem valia como quimioterápico pois ira desencadear sérios efeitos colaterais ao paciente [123].

Para tanto, utilizou-se o sistema Tunel (DeadEND Fluorometric Tunel System-Promega) para a identificação de células apoptóticas e realizou-se apenas uma análise qualitativa. Felizmente, os resultados do ensaio de apoptose demonstraram a eficácia do Celecoxibe em promover a morte celular programada em todas as linhagens estudadas, na dose e tempo escolhidos, 25 μ M por 24 horas. Este resultado também é corroborado pela literatura [120-124].

A morte celular por necrose ocorre, geralmente, em resposta à injúria severa às células e é caracterizada morfológicamente por aumento de volume citoplasmático e mitocondrial, ruptura da membrana plasmática e liberação do conteúdo extracelular, provocando uma resposta inflamatória. Esse processo pode afetar células vizinhas, ou seja, nesta condição um grande número de células lesadas ao mesmo tempo e devido ao desencadeamento do processo inflamatório, há alterações irreversíveis em todo tecido e/ou órgão. Por outro lado, o processo apoptótico envolve alteração de permeabilidade de membranas, condensação da cromatina, encolhimento celular, formação de corpos apoptóticos sem desintegração das organelas [125-126].

Durante o processo de carcinogênese os índices de apoptose no tecido diminui. Um dos fatores responsáveis por esse fenômeno é a superexpressão de COX-2 nas células. Esse efeito foi atribuído ao aumento da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 e diminuição da Bax, proteína pró-apoptótica quando níveis de COX-2 estão aumentado [127].

O próximo passo então foi avaliar a expressão da enzima COX-2, observamos que com a dose de Celecoxibe utilizada observamos uma diminuição na expressão de COX-2 em todas as linhagens no grupo tratado com celecoxibe em relação ao grupo sem tratamento, mas essa diferença foi observada com maior intensidade na linhagem FaDu. No western blotting, o teste t-student mostrou diferença significativa ($p < 0,05$) apenas na linhagem SCC9. Estes resultados estão de acordo com resultados obtidos pela literatura e pelo nosso grupo de pesquisa anteriormente [25-52- 120-128].

Possivelmente, a morte celular programada para as outras linhagens celulares deva estar ocorrendo por uma via independente da COX-2, como por exemplo, alterando a atividade da Ca^{2+} -ATPase localizada no retículo endoplasmático [76-120].

Para melhor compreender a participação do Celecoxibe nos mecanismos da carcinogênese, os seus efeitos sobre as vias de sinalização celulares envolvidos no processo inflamatório têm sido estudada.

Uma dessas vias de sinalização é a PI3K-Akt. A ativação dessa via através da fosforilação da proteína Akt promove a proliferação e sobrevivência celular. Esse fenômeno leva então ao crescimento do tumor e em alguns tipos de câncer como o de laringe está associado a radioresistência [129].

A reação de imunofluorescência realizada neste trabalho demonstrou que apenas a linhagem SCC25 apresentou marcação nuclear para pAkt. O ensaio de western blotting demonstrou que o tratamento com 25 µl de Celecoxibe promoveu a diminuição da expressão da proteína fosforilada pAkt em todas as linhagens estudadas, mas o teste t-student revelou que essa diferença só foi significativa para a linhagem FaDu. Este resultado está em concordância com resultados anteriores obtidos por nosso grupo de pesquisa, demonstrando que o tratamento com Celecoxibe não foi capaz de alterar de forma eficaz a atividade dessas proteínas, reforçando a teoria de uma participação de via independente da COX-2. [25-52-120-123].

A transcrição gênica só acontece quando o NF-κB se localiza no núcleo celular. Esta condição de inativação do NF-κB é controlada pelo Inibidor de KB (IκB) que o mantém confinado no citoplasma. Para que a ativação do NF-κB ocorra, a Akt precisa ativar uma outra proteína conhecida como IKK, sendo então capaz de fosforilar o IκB levando-o para ubiquitinação e conseqüente degradação. Na ausência do IκB, homômeros ou heterodímeros do NF-κB são translocados para o núcleo onde ligam-se ao DNA e induzem a transcrição [130-132].

No presente trabalho a linhagem SCC9 demonstrou positividade citoplasmática tanto nos grupos controle e PGLD quanto nos grupos tratados com PGLD-Celecoxibe e Celecoxibe. Já as linhagens SCC25 e FaDu apresentaram no grupo controle e PGLD positividade citoplasmática e nuclear. A positividade apresentada pelos grupos tratados com Celecoxibe e PGLD-Celecoxibe foi citoplasmática, demonstrando a ação do tratamento. A expressão do NF-κB foi avaliada também por western blotting e os resultados revelaram que com o tratamento com celecoxibe essa expressão diminuiu em todas as linhagens avaliadas no entanto essa diferença não foi significativa de acordo com o teste t-student.

No entanto a utilização do Celecoxibe na quimioterapia demandaria um uso prolongado em altas doses com pouca especificidade para as células cancerosas, normalmente resultando em baixa acumulação na região do tumor (ineficácia), e em efeitos secundários graves (toxicidade). Este desafio resultou no desenvolvimento de várias estratégias para melhorar a concentração de princípios ativos no local do tumor, aumentando a sua eficácia enquanto reduz os efeitos sistêmicos adversos associados [63].

Atualmente, a nanobiotecnologia emerge rapidamente como um setor de pesquisa com potencial aplicação em diagnóstico e em terapia, em que a vetorização de moléculas em nanocarreadores pode levar a inúmeras vantagens frente aos sistemas convencionais, como capacidade em atravessar barreiras biológicas, modulação da distribuição do fármaco e diminuição da toxicidade, aumento do tempo de circulação de substâncias lábeis ou rapidamente eliminadas veiculação de fármacos hidrofóbicos promovendo sua solubilização, entre outras [84-85].

Os Dendrímeros são nanoestruturas sintetizadas em camadas ramificadas. Começando com um núcleo, estas nanoestruturas crescer em camadas concêntricas para produzir aumentos graduais de tamanho, se tornando semelhantes às dimensões de muitas proteínas globulares presentes na biologia. Estas camadas concêntricas ramificadas são referidos como "gerações". A geração externa de cada Dendrímero apresenta um número preciso de grupos funcionais que podem atuar como uma plataforma para interações de nanopartículas de drogas. Estas características têm atraído atenção significativa na medicina para sua utilização como nanocarreadores de drogas, pequenas proteínas e DNA / RNA , em alguns casos, como drogas em nanoescala intrinsecamente ativos [132].

No presente trabalho desenvolvemos a conjugação do Celecoxibe ao Dendrímero de Poliglicerol (PGLD) através de ligações covalentes. Através de métodos de caracterização com técnicas padronizadas, entre eles a espectroscopia de ressonância magnética ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, Cromatografia de camada delgada (TLC), por calorimetria de varredura diferencial (DSC) e Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e Maldi-Tof. Essas técnicas demonstraram sucesso na síntese e conjugação do PGLD-Celecoxibe.

O emprego do PGLD como carreador e a eficácia do conjugado PGLD-Celecoxibe foi avaliada em linhagens de células de CECP (SCC9 e FaDu) Através do ensaio de viabilidade celular foi possível determinar o IC-50 do PGLD-Celecoxibe, que ficou em torno de 15 μM , demonstrando maior eficiência do que o Celecoxibe na forma original, com IC-50 de 25 μM . Este resultado demonstra a capacidade do PGLD de atuar como carreador do fármaco e diminuir a dose de celecoxibe com obtenção de resultado igualmente eficiente.

Através do ensaio de migração celular pudemos reforçar o efeito sinérgico do carreador com o Celecoxibe nas linhagens estudadas.

Os resultados obtidos para linhagem FaDu demonstrou no grupo controle que apenas 18,09% da área inicial permaneceu livre de células ao final das 48 horas e no grupo tratado com Dendrímero 24,9% da área inicial permaneceu livre de células, não promovendo uma ação significativa na inibição da migração celular. Já no grupo tratado com Celecoxibe 59,3% da área inicial permaneceu livre de células, o que representa uma ação inibitória na migração celular promovida pelo medicamento. No grupo tratado com Celecoxibe associado ao PGLD 67,1% da área inicial permaneceu livre de células, mostrando um resultado mais eficiente na inibição da migração celular que o grupo tratado com Celecoxibe.

Ainda de acordo com os resultados obtidos, para a linhagem SCC9 podemos observar na amostra não tratadas a área da lesão não ocupada após 48 horas da confecção da lesão foi de 25,7%, mostrando que houve proliferação celular. Já nas linhagens tratadas apenas com o PGLD não associado ao Celecoxibe, observamos que 26,9% da área inicial continuou livre de células após 48 horas, um resultado semelhante ao grupo controle que demonstra que o carreador sozinho não interfere no índice de proliferação celular. Nas amostras tratadas apenas com o Celecoxibe observamos que área da lesão que permaneceu livre de células após 48 horas foi de 54,9% mostrando uma eficiência da capacidade anti-proliferativa deste princípio ativo nesta linhagem analisada. No tratamento feito com o Celecoxibe associado ao PGLD, ou seja, utilizando o carreador observamos que 63,1% da área inicial permaneceu livre de células após 48 horas. Indicando um aumento da eficiência da ação anti-proliferativa desta droga quando associada ao PGLD.

O mecanismo pelo qual ocorre a morte celular das linhagens tratadas com PGLD-Celecoxibe foi investigado pelo método de TUNEL corroborando com os resultados do ensaio de migração celular. Sendo assim, as linhagens tratadas com PGLD não conjugado a droga demonstraram resultados semelhantes ao do grupo controle e as linhagens tratadas com PGLD-Celecoxibe obtiveram um resultado mais eficaz que o grupo tratado apenas com Celecoxibe, com uma contagem de células em apoptose significativamente maior.

A avaliação da expressão das proteínas COX-2 foi realizada através dos ensaios de imunofluorescência e western-blotting. No ensaio de imunofluorescência a marcação da COX-2 em todas as linhagens estudadas foi escassa no grupo tratado

com PGLD-Celecoxibe. No grupo tratado com Celecoxibe a COX-2 apresentou maior expressão nas linhagens SCC9 e SCC25. O grupo tratado com PGLD demonstrou resultado semelhante ao grupo controle. Estes resultados demonstram que o PGLD não promove alteração do metabolismo das células em cultura.

Através do ensaio de Western-blotting foi observada uma queda significativa da expressão de COX-2 nas linhagens SCC-9 e SCC-25 (teste t-student ($p < 0,05$)) quando os grupos celecoxibe e PGLD-Celecoxibe foram comparados. O grupo PGLD mostrou resultados semelhantes ao grupo controle em todas as linhagens estudadas.

A expressão da proteína fosforilada p-Akt também foi avaliada e o ensaio de imunofluorescência demonstrou que todas as linhagens estudadas apresentaram positividade citoplasmática para p-Akt no grupo tratado com PGLD-Celecoxibe. Já no grupo Celecoxibe essa marcação citoplasmática não ocorreu na linhagem SCC-25.

A quantificação da proteína p-Akt avaliada pelo ensaio western-blotting mostrou que o grupo PGLD-Celecoxibe obteve valores menores que o grupo celecoxibe mas esta diferença não foi significativa de acordo com o teste t-student. O grupo PGLD mas uma vez demonstrou resultados semelhantes ao grupo controle.

Com relação a proteína NF-kB a imunofluorescência demonstrou que para a linhagem SCC9, tanto no no grupo controle e PGLD quanto nos grupos tratados com Celecoxibe e PGLD-Celecoxibe apresentaram marcação citoplasmática. Já para as linhagens SCC25 e FaDu os grupos Controle e PGLD apresentaram positividade nuclear ecitoplasmática enquanto os grupos tratados com Celecoxibe e PGLD-Cellecoxibe não apresentaram positividade nuclear. Portanto, podemos concluir que o Celecoxibe foi capaz de inativar o NF-kB, não permitindo a sua translocação para o núcleo, mesmo quando não associado ao carreador PGLD. No entanto este resultado não ocorreu em todos os Grupos estudados.

A quantificação da expressão do NF-kB foi avaliada pelo ensaio de Western blotting mostrou que o grupo PGLD-Celecoxibe obteve valores menores que o grupo celecoxibe mas de acordo com o teste t-student esta diferença foi significativa apenas para a linhagem FaDu. O grupo PGLD mas uma vez demonstrou resultados semelhantes ao grupo controle.

7 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi investigada a atividade do PGLD-Celecoxibe nas linhagens celulares de CECF SCC-9, SCC25 e FaDu. Dentro dessa temática pode-se concluir com base nos resultados obtidos que:

1. As espectroscopias de ressonância magnética nuclear de prótons e carbono indicaram a estrutura arborescente do composto PGLD-Celecoxibe. Ao mesmo tempo, a análise por Maldi-Tof indicaram a isomolecularidade da estrutura dendrítica obtida.
2. A caracterização através de Cromatografia de camada delgada (TLC), calorimetria de varredura diferencial (DSC) e Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) demonstrou a pureza do PGLD-Celecoxibe sintetizado permitindo também a caracterização da quantidade de fármaco incorporado na estrutura dendrítica.
3. O PGLD-Celecoxibe apresentou não citotoxicidade em ensaio *in vitro*, demonstrando a possibilidade de desenvolver-se quimioterápicos vetorizáveis para o tratamento do câncer.
4. No ensaio com as células de linhagens tumorais, o PGLD-Celecoxibe diminuiu a viabilidade celular de uma maneira dose dependente.
5. A utilização do PGLD como carreador permitiu a redução da dose do IC-50 do Celecoxibe de 25 μ M para 15 μ M.
6. A apoptose foi a principal via de degeneração celular induzida pelo PGLD-Celecoxibe observado nesse trabalho.
7. O processo de apoptose pode estar associada a diminuição significativa da expressão de COX-2 como também pode estar ocorrendo por uma via independente da COX-2.
8. Com relação a expressão proteica podemos concluir que o Celecoxibe, associado ou não ao carreador não conseguiu bloquear a via p-Akt/Nf-kB em todas as linhagens estudadas, uma vez que, apesar de alteração na

expressão dessas duas proteínas em alguns dos grupos tratados, isso não ocorreu em todos grupos.

9. Com relação à localização intracelular, o celecoxibe foi capaz de alterar o local de expressão das proteínas p-Akt em algumas linhagens, mostrando a sua eficácia na regulação da proliferação, sobrevivência celular.

10. O Celecoxibe associado ao PGLD demonstrou maior eficácia na inibição da proliferação celular de linhagens celulares de CECF comparado ao resultado do fármaco livre.

REFERÊNCIAS¹

- [1] Conway DI, Hashibe M, Boffetta P, Wunsch-Filho V, Muscat J, La Vecchia C, et al. Enhancing epidemiologic research on head and neck cancer: INHANCE - The international head and neck cancer epidemiology consortium. *Oral Oncol.* 2009;45(9):743-6.
- [2] Koskinen WJ, Partanen J, Vaheri A, Aaltonen LM. HLA-DRB1, -DQB1 alleles in head and neck carcinoma patients. *Tissue Antigens.* 2006;67(3):237-40.
- [3] Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia Oral e Maxilofacial.* Rio de Janeiro: Guanabara, 2009. 705 p.
- [4] Scully C. Oral cancer aetiopathogenesis; past, present and future aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011;16(3):e306-11.
- [5] INCA- Instituto Nacional do Câncer 2014. Disponível em: URL: <http://www.inca.gov.br> [Data de acesso 17/07/2014].
- [6] Manuel S, Raghavan SK, Pandey M, Sebastian P. Survival in patients under 45 years with squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2003;32(2):167-73.
- [7] Lee CC, Ho HC, Chen HL, Hsiao SH, Hwang JH, Hung SK. Squamous cell carcinoma of the oral tongue in young patients: a matched-pair analysis. *Acta Otolaryngol.* 2007;127(11):1214-7.
- [8] Canto MT, Devesa SS. Oral cavity and pharynx cancer incidence rates in the United States, 1975-1998. *Oral Oncol.* 2002;38(6):610-7.
- [9] Hennessey PT, Westra WH, Califano JA. Human papillomavirus and head and neck squamous cell carcinoma: recent evidence and clinical implications. *J Dent Res.* 2009;88(4):300-6.
- [10] Psyrri A, Rampias T, Vermorken JB. The Current and Future Impact of Human Papillomavirus on Treatment of Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Ann Oncol.* 2014.

¹ De acordo com o Estilo Vancouver.

[11] Christophe V, Leroy T, Seillier M, Duthilleul C, Julieron M, Clisant S, et al. Determinants of patient delay in doctor consultation in head and neck cancers (Protocol DEREDIA). *BMJ Open*. 2014;4(7):e005286

[12] Marocchio LS, Lima J, Sperandio FF, Corrêa L, de Sousa SO. Oral squamous cell carcinoma: an analysis of 1,564 cases showing advances in early detection. *J Oral Sci*. 2010;52(2):267-73.

[13] Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D (Eds.): World Health Organization Classification of tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. IARC Press: Lyon 2005.

[14] Dunkel J, Vaittinen S, Grénman R, Kinnunen I, Irjala H. Prognostic markers in stage I oral cavity squamous cell carcinoma. *Laryngoscope*. 2013;123(10):2435-41.

[15] Bottomley A, Tridello G, Coens C, Rolland F, Tesselaar ME, Leemans CR, et al. An international phase 3 trial in head and neck cancer: quality of life and symptom results: EORTC 24954 on behalf of the EORTC Head and Neck and the EORTC Radiation Oncology Group. *Cancer*. 2014;120(3):390-8.

[16] Bădulescu F, Bădulescu A, Crișan A, Popescu FC. Study of the diagnosis and treatment of cancer located in the head and neck and correlation with expression of prognostic markers. *Rom J Morphol Embryol*. 2013;54(3):487-97.

[17] Ebrahimi A, Gil Z, Amit M, Yen TC, Liao CT, Chaturvedi P, et al. Primary Tumor Staging for Oral Cancer and a Proposed Modification Incorporating Depth of Invasion: An International Multicenter Retrospective Study. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 2014.

[18] Kanojia D, Sawant SS, Borges AM, Ingle AD, Vaidya MM. Alterations in keratins and associated proteins during 4- Nitroquinoline-1-oxide induced rat oral carcinogenesis. *J Carcinog*. 2012;11:14.

[19] Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF. The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007;23:675-99.

[20] Montenegro MR, Franco M. Patologia: Processos gerais. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 320p.

- [21] Mascolo M, Siano M, Ilardi G, Russo D, Merolla F, De Rosa G, et al. Epigenetic dysregulation in oral cancer. *Int J Mol Sci.* 2012;13(2):2331-53.
- [22] Lingen MW, Pinto A, Mendes RA, Franchini R, Czerninski R, Tilakaratne WM, et al. Genetics/epigenetics of oral premalignancy: current status and future research. *Oral Dis.* 2011;17 Suppl 1:7-22.
- [23] Allegra E, Baudi F, La Boria A, Fagiani F, Garozzo A, Costanzo FS. Multiple head and neck tumours and their genetic relationship. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2009;29(5):237-41.
- [24] Zhu G, Cai G, Liu Y, Tan H, Yu C, Huang M, et al. Quantitative iTRAQ LC-MS/MS Proteomics Reveals Transcription Factor Crosstalk and Regulatory Networks in Hypopharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *J Cancer.* 2014;5(7):525-36.
- [25] Giudice FS, Pinto DS, Nör JE, Squarize CH, Castilho RM. Inhibition of histone deacetylase impacts cancer stem cells and induces epithelial-mesenchyme transition of head and neck cancer. *PLoS One.* 2013;8(3):e58672.
- [26] Nijkamp MM, Span PN, Hoogsteen IJ, van der Kogel AJ, Kaanders JH, Bussink J. Expression of E-cadherin and vimentin correlates with metastasis formation in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Radiother Oncol.* 2011;99(3):344-8.
- [27] Williams HK. Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma. *Mol Pathol.* 2000;53(4):165-72.
- [28] Mueller MM. Inflammation in epithelial skin tumours: old stories and new ideas. *Eur J Cancer.* 2006;42(6):735-44.
- [29] Maturu P, Overwijk WW, Hicks J, Ekmekcioglu S, Grimm EA, Huff V. Characterization of the Inflammatory Microenvironment and Identification of Potential Therapeutic Targets in Wilms Tumors. *Transl Oncol.* 2014.
- [30] Bernardi A, Frozza RL, Hoppe JB, Salbego C, Pohlmann AR, Battastini AM, et al. The antiproliferative effect of indomethacin-loaded lipid-core nanocapsules in glioma cells is mediated by cell cycle regulation, differentiation, and the inhibition of survival pathways. *Int J Nanomedicine.* 2013;8:711-28.

- [31] Chen YF, Luo RZ, Li Y, Cui BK, Song M, Yang AK, et al. High expression levels of COX-2 and P300 are associated with unfavorable survival in laryngeal squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2013;270(3):1009-17.
- [32] Mosalpuria K, Hall C, Krishnamurthy S, Lodhi A, Hallman DM, Baraniuk MS, et al. Cyclooxygenase-2 expression in non-metastatic triple-negative breast cancer patients. *Mol Clin Oncol*. 2014;2(5):845-50.
- [33] Millanta F, Asproni P, Canale A, Citi S, Poli A. COX-2, mPGES-1 and EP2 receptor immunohistochemical expression in canine and feline malignant mammary tumours. *Vet Comp Oncol*. 2014.
- [34] Stabile LP, Rothstein ME, Gubish CT, Cunningham DE, Lee N, Siegfried JM. Co-targeting c-Met and COX-2 Leads to Enhanced Inhibition of Lung Tumorigenesis in a Murine Model with Heightened Airway HGF. *J Thorac Oncol*. 2014.
- [35] Bartova M, Ondrias F, Muy-Kheng T, Kastner M, Singer C, Pohlodek K. COX-2, p16 and Ki67 expression in DCIS, microinvasive and early invasive breast carcinoma with extensive intraductal component. *Bratisl Lek Listy*. 2014;115(7):445-51.
- [36] Roelofs HM, Te Morsche RH, van Heumen BW, Nagengast FM, Peters WH. Over-expression of COX-2 mRNA in colorectal cancer. *BMC Gastroenterol*. 2014;14:1.
- [37] Liu JF, Zhang SW, Jamieson GG, Zhu GJ, Wu TC, Zhu TN, et al. The effects of a COX-2 inhibitor meloxicam on squamous cell carcinoma of the esophagus in vivo. *Int J Cancer*. 2008;122(7):1639-44.
- [38] Kao J, Sikora AT, Fu S. Dual EGFR and COX-2 inhibition as a novel approach to targeting head and neck squamous cell carcinoma. *Curr Cancer Drug Targets*. 2009;9(8):931-7.
- [39] Pan J, Tang T, Xu L, Lu JJ, Lin S, Qiu S, et al. Prognostic significance of expression of cyclooxygenase-2, vascular endothelial growth factor, and epidermal growth factor receptor in nasopharyngeal carcinoma. *Head Neck*. 2013;35(9):1238-47.
- [40] Kelly JD, Hall E. Boxing bladder cancer with COX-2-specific inhibition. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011;4(10):1534-5.

- [41] Kim HJ, Yim GW, Nam EJ, Kim YT. Synergistic Effect of COX-2 Inhibitor on Paclitaxel-Induced Apoptosis in the Human Ovarian Cancer Cell Line OVCAR-3. *Cancer Res Treat.* 2014;46(1):81-92.
- [42] Xie X, Li J, Wang RC, Geng RL, Wang SY, Wang C, et al. [Effect of COX-2 Inhibitor Celecoxib on Proliferation, Apoptosis of HL-60 Cells and Its Mechanism]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2014;22(3):707-11.
- [43] Kundu JK, Liu L, Shin JW, Surh YJ. Thymoquinone inhibits phorbol ester-induced activation of NF- κ B and expression of COX-2, and induces expression of cytoprotective enzymes in mouse skin in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;438(4):721-7.
- [44] Molinolo AA, Marsh C, El Dinali M, Gangane N, Jennison K, Hewitt S, et al. mTOR as a molecular target in HPV-associated oral and cervical squamous carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2012;18(9):2558-68.
- [45] Spencer A, Yoon SS, Harrison SJ, Morris SR, Smith DA, Brigandi RA, et al. Novel AKT inhibitor afuresertib shows favorable safety, pharmacokinetics, and clinical activity in multiple myeloma: Phase 1 study results. *Blood.* 2014.
- [46] Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* 2005;307(5712):1098-101.
- [47] Riaz A, Zeller KS, Johansson S. Receptor-specific mechanisms regulate phosphorylation of AKT at Ser473: role of RICTOR in β 1 integrin-mediated cell survival. *PLoS One.* 2012;7(2):e32081.
- [48] Lee JY, Kang MB, Jang SH, Qian T, Kim HJ, Kim CH, et al. Id-1 activates Akt-mediated Wnt signaling and p27(Kip1) phosphorylation through PTEN inhibition. *Oncogene.* 2009;28(6):824-31.
- [49] 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;114(2):242-8.
- [50] Gong Y, Chippada-Venkata UD, Oh WK. Roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in prostate cancer progression. *Cancers (Basel).* 2014;6(3):1298-327.

[51] Zhang W, Tu G, Lv C, Long J, Cong L, Han Y. Matrix metalloproteinase-9 is up-regulated by CCL19/CCR7 interaction via PI3K/Akt Pathway and is involved in CCL19-driven BMSCs migration. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;451(1):222-8

[52] Abrahão AC, Giudice FS, Sperandio FF, Pinto Junior DoS. Effects of celecoxib treatment over the AKT pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2013;42(10):793-8.

[53] Bian Y, Terse A, Du J, Hall B, Molinolo A, Zhang P, et al. Progressive tumor formation in mice with conditional deletion of TGF-beta signaling in head and neck epithelia is associated with activation of the PI3K/Akt pathway. *Cancer Res*. 2009;69(14):5918-26.

[54] Spencer A, Yoon SS, Harrison SJ, Morris SR, Smith DA, Brigandi RA, et al. Novel AKT inhibitor afuresertib shows favorable safety, pharmacokinetics, and clinical activity in multiple myeloma: Phase 1 study results. *Blood*. 2014;124(3):33-8

[55] Skalnik DG. Transcriptional mechanisms regulating myeloid-specific genes. *Gene*. 2002;284(1-2):1-21.

[56] Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(1):49-62.

[57] Beinke S, Ley SC. Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem J*. 2004;382(Pt 2):393-409.

[58] Lin Y, Bai L, Chen W, Xu S. The NF-kappaB activation pathways, emerging molecular targets for cancer prevention and therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2010;14: 45–55.

[59] Pereira SG, Oakley F. Nuclear factor-kappaB1: regulation and function. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(8):1425-30.

[60] Yang TQ, Lu XJ, Wu TF, Ding DD, Zhao ZH, Chen GL, et al. MicroRNA-16 inhibits glioma cell growth and invasion through suppression of BCL2 and the nuclear factor- κ B1/MMP9 signaling pathway. *Cancer Sci*. 2014;105(3):265-71.

[61] Li F, Huang L, Su XL, Gu QH, Hu CP. Inhibition of nuclear factor- κ B activity enhanced chemosensitivity to cisplatin in human lung adeno-carcinoma A549 cells under chemical hypoxia conditions. *Chin Med J (Engl)*. 2013;126(17):3276-82.

[62] Jin H, Lou W, Sang J. [Inhibitory effect of NF-kappaB p65siRNA on human laryngeal carcinoma xenograft model in nude mice]. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*. 2013;27(15):836-8.

[63] Arias JL. Drug targeting strategies in cancer treatment: an overview. *Mini Rev Med Chem*. 2011;11(1):1-17.

[64] Glasauer A, Chandel NS. Targeting Antioxidants for Cancer Therapy. *Biochem Pharmacol*. 2014;91(1):4-19.

[65] Bernardi A, Frozza RL, Hoppe JB, Salbego C, Pohlmann AR, Battastini AM, et al. The antiproliferative effect of indomethacin-loaded lipid-core nanocapsules in glioma cells is mediated by cell cycle regulation, differentiation, and the inhibition of survival pathways. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:711-28.

[66] Lemmel EM, Bolten W, Burgos-Vargas R, Platt P, Nissilä M, Sahlberg D, et al. Efficacy and safety of meloxicam in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 1997;24(2):282-90.

[67] Bavry AA, Thomas F, Allison M, Johnson KC, Howard BV, Hlatky M, et al. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Cardiovascular Outcomes in Women: Results From the Women's Health Initiative. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*. 2014;7(4):603-10.

[68] Emery P. Clinical implications of selective cyclooxygenase-2 inhibition. *Scand J Rheumatol Suppl*. 1996;102:23-8.

[69] Emery P, Fleischmann RM, Hsia EC, Xu S, Zhou Y, Baker D. Efficacy of golimumab plus methotrexate in methotrexate-naïve patients with severe active rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 2014; 33(9):1239-46.

[70] Andrews P, Zhao X, Allen J, Li F, Chang M. A comparison of the effectiveness of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs and their derivatives against cancer cells in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2008;61(2):203-14.

[71] Fuchs CS. Aspirin, the new targeted therapy in colorectal cancer. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2014;12(3):186-9.

[72] Chen YF, Luo RZ, Li Y, Cui BK, Song M, Yang AK, et al. High expression levels of COX-2 and P300 are associated with unfavorable survival in laryngeal squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2013;270(3):1009-17.

[73] Cornett AL, Lutz CS. Regulation of COX-2 expression by miR-146a in lung cancer cells. *RNA*. 2014; 20(9):1419-30.

[74] Bartova M, Ondrias F, Muy-Kheng T, Kastner M, Singer C, Pohlodek K. COX-2, p16 and Ki67 expression in DCIS, microinvasive and early invasive breast carcinoma with extensive intraductal component. *Bratisl Lek Listy*. 2014;115(7):445-51.

[75] Greenhough A, Smartt HJ, Moore AE, Roberts HR, Williams AC, Paraskeva C, et al. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis*. 2009;30(3):377-86.

[76] Kao J, Genden EM, Chen CT, Rivera M, Tong CC, Misiukiewicz K, et al. Phase 1 trial of concurrent erlotinib, celecoxib, and reirradiation for recurrent head and neck cancer. *Cancer*. 2011;117(14):3173-81.

[77] Barnes MN, Chieng DF, Dreher M, Jones JL. Feasibility of performing chemoprevention trials in women at elevated risk of ovarian carcinoma: Initial examination of celecoxib as chemopreventive agent. *Gynecologic Oncology*. 2005; 98:376-82.

[78] Harris RE, Beebe-Donk J, Alshafie GA. Reduction in the risk of human breast cancer by selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. *BMC Cancer*. 2006 Jan 30;6:27.

[79] Sui W, Zhang Y, Wang Z, Jia Q, Wu L, Zhang W. Antitumor effect of a selective COX-2 inhibitor, celecoxib, may be attributed to angiogenesis inhibition through modulating the PTEN/PI3K/Akt/HIF-1 pathway in an H₂₂ murine hepatocarcinoma model. *Oncol Rep*. 2014;31(5):2252-60.

[80] Xu L, Stevens J, Hilton MB, Seaman S, Conrads TP, Veenstra TD, et al. COX-2 Inhibition Potentiates Antiangiogenic Cancer Therapy and Prevents Metastasis in Preclinical Models. *Sci Transl Med*. 2014;6(242):242ra84

[81] Ganta S, Devalapally H, Shahiwala A, Amiji M. A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery. *J Control Release*. 2008;126(3):187-204.

[82] Wei X, Senanayake TH, Bohling A, Vinogradov SV. Targeted nanogel conjugate for improved stability and cellular permeability of curcumin: synthesis, pharmacokinetics and tumor growth inhibition. *Mol Pharm*. 2014.

[83] Silva ARP. Estudo das propriedades bioquímicas do sistema arborescente PGLD-AAS para o tratamento do Câncer [Dissertação]. Itajubá: Universidade Federal de Itajubá;2008.

[84] Mishra B, Patel BB, Tiwari S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine*. 2010;6(1):9-24.

[85] Kapse-Mistry S, Govender T, Srivastava R, Yergeri M. Nanodrug delivery in reversing multidrug resistance in cancer cells. *Front Pharmacol*. 2014;5:159.

[86] Montanari, MLC, *et al*. Sistemas transportadores de drogas. *Quím. Nova*, 1998; 21(4):12-23

[87] Hung CH, Chang WW, Liu SC, Wu SJ, Chu CC, Tsai YJ, *et al*. Self-aggregation of amphiphilic [60]fullerenyl focal point functionalized PAMAM dendrons into pseudodendrimers: DNA binding involving dendriplex formation. *J Biomed Mater Res A*. 2014.

[88] Pooja D, Kulhari H, Singh MK, Mukherjee S, Rachamalla SS, Sistla R. Dendrimer-TPGS mixed micelles for enhanced solubility and cellular toxicity of taxanes. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014; 121(1):461-8.

[89] Tomalia DA, Hedstrand DM, Ferrito MS. Comb-burst dendrimer topology: new macromolecular architecture derived from dendritic grafting . *Macromolecules*.1991; 24:1435-8.

[90] Klajnert B, Bryszewsk N. Dendrimers: properties and applications. *Acta Biochimica Polonica*,2001; 48(1): 199-208..

[91] Matthews OA., Shipway AN, Stoddart,JF. Dendrimers – branching out from curiosities into new technologies *Prog.Polym.Sci*. 1998; 23:156.

[92] Jansen, J. F. G. A.; de Brabander-van den Berg, E. M. M. e Meijer, E. W.; Encapsulation of guest molecules into a dendritic box. *Science*. 1994; 266:1226-29.

[93] Jansen, F. F. G. A., Meijer, E. W. Drug Delivery systems. *Am. Chem. Soc*.1995; 117:4417.

- [94] Esfand R, Tomalia DA. Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Research Focus Reviews*. 2001; 6(8): 427-36.
- [95] Aulenta F, Hayes W, Rannard S. Dendrimers: a new class of nanoscopic containers and delivery devices. *European Polymer Journal*. 2003; 39:1741-71.
- [96] Patel RP, *et al*. Dendrimers: A new innovation in drug delivery. *Pharma Bio World*. 2007;1:42-52.
- [97] Gillies ER, Fréchet JMJ. Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery. *Drug Discovery Today*. 2005;10:35-43.
- [98] Florence AT. Dendrimers: a versatile targeting platform. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005; 57: 2104–5.
- [99] Jesse B, Grinstaff, MW. Therapeutic and diagnostic applications of dendrimers for cancer treatment. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008; 60:1037-55.
- [100] Lee CC, Gillies ER, Fox ME, Guillaudeu SJ, Fréchet JM, Dy EE, Szoka FC. A Single Dose of Doxorubicin-Functionalized Bow-tie Dendrimer Cures Mice Bearing C-26 Colon Carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. 103:16649–54.]
- [101] Hamilton SK, Harth E. Molecular Dendritic Transporter Nanoparticle Vectors Provide Efficient Intracellular Delivery of Peptides. *ACS Nano*. 2009; 3: 402–10.
- [102] Hamilton SK, Ikizler MR, Wallen C, Wright PF, Harth E. Effective Delivery of IgG Antibodies Into Infected Cells via Dendritic Molecular Transporter Conjugate IgGMTw. *Mol. BioSyst*. 2008; 4: 1209–11.
- [103] Bonduelle CV, Gillies EC. Dendritic Guanidines as Efficient Analogues of Cell Penetrating Peptides. *Pharmaceuticals*. 2010; 3: 636-66.
- [104] Markatou E, *et al*. Molecular interactions between dimethoxycurcumin and Pamam dendrimer carriers. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007; 339: 231-6
- [105] Indha NK, *et al*. Supramolecular Aggregates of Water Soluble Dendritic Polyglycerol Architectures for the Solubilization of Hydrophobic Compounds. *Macromol. Rapid Commun*. 2010; 31:1516–20.

[106] Lee CC, Szoka FC, et al. A single dose of doxorubicin-functionalized bow-tie dendrimer cures mice bearing C-26 colon carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(45):16649-54.

[107] Patri, AK Targeted drug delivery with dendrimers: Comparison of the release kinetics of covalently conjugated drug and non-covalent drug inclusion complex B. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005; 57: 2203– 14.

[108] Kurniasih IN, Liang H, Rabe JP, Haag R. Supramolecular aggregates of water soluble dendritic polyglycerol architectures for the solubilization of hydrophobic compounds. *Macromol Rapid Commun*. 2010;31(17):1516-20.

[109] Jensen LB, Griger J, Naeye B, Varkouhi AK, Raemdonck K, Schiffelers R, et al. Comparison of polymeric siRNA nanocarriers in a murine LPS-activated macrophage cell line: gene silencing, toxicity and off-target gene expression. *Pharm Res*. 2012;29(3):669-82.

[110] Haag R, Sunder A, Stumbe JF. An approach to glycerol dendrimers and pseudo - dendritic polyglycerols. *J. Am. Chem. Soc*. 2000; 122: 2954–5.

[111] De Queiroz AAA, Abraham G, Roman JS. Immobilization of a nonsL teiroidal anti-inflammatory drug onto commercial segmented polyurethane surface to improve haemocompatibility properties. *Biomaterials*, Inglaterra, 2002; 23,: 1625-38.

[112] Janderson Freitas Leite. Propriedades Hemocompatíveis do Dendrímero Bioativo de Poliglicerol Conjugado com Estreptoquinase. [dissertação]. Itajubá. Uiversidade Federal de Itajubá; 2008.

[113] Chenault H.K. (inventor), Actamax Surgical Materials LL (Assignee). Polyglycerol aldehydes. United States Patent, US 20120029149 A1, Feb. 2, 2012.

[114] Rogero SO, et al. Teste *in vitro* de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. *Materials Research*. 2003; 6(3): 317-20.

[115] Bebawy LI, Moustafa AA, Abo-Talib NF Stability-indicating methods for the determination of doxazosin mezylate and celecoxib. *J. Pharm. Biomed. Anal*. 2002; 27:779-93.

[116] Koontongkaew S. The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. *J Cancer*. 2013;4(1):66-83.

[117] Oliveira KG, von Zeidler SV, Lamas AZ, de Podestá JR, Sena A, Souza ED, et al. Relationship of inflammatory markers and pain in patients with head and neck cancer prior to anticancer therapy. *Braz J Med Biol Res*. 2014;47(7):600-4.

[118] Reiter M, Baumeister P, Hartmann M, Schwenk-Zieger S, Harréus U. Chemoprevention by celecoxib and mutagen sensitivity of cyclin d1 in patients with oropharyngeal carcinoma. *In Vivo*. 2014;28(1):49-53.

[119] Bock JM, Menon SG, Goswami PC, Sinclair LL, Bedford NS, Domann FE, et al. Relative non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) antiproliferative activity is mediated through p21-induced G1 arrest and E2F inhibition. *Mol Carcinog*. 2007;46(10):857-64.

[120] Vechio AMC. Efeito apoptótico do Celecoxib em linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de boca [tese]. Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012.

[121] Yoshino T, Kimoto A, Kobayashi S, Noguchi M, Fukunaga M, Hayashi A, et al. Pharmacological profile of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor. *Arzneimittelforschung*. 2005;55(7):394-402.

[122] Li WW, Long GX, Liu DB, Mei Q, Wang JF, Hu GY, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib suppresses invasion and migration of nasopharyngeal carcinoma cell lines through a decrease in matrix metalloproteinase-2 and -9 activity. *Pharmazie*. 2014;69(2):132-7.

[123] Alves Junior SM. Análise da expressão e mecanismos de ação da proteína COX-2 em cultura de células de carcinoma epidermóide bucal humano. [tese]. Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia, 2006.

[124] Rosas C, Sinning M, Ferreira A, Fuenzalida M, Lemus D. Celecoxib decreases growth and angiogenesis and promotes apoptosis in a tumor cell line resistant to chemotherapy. *Biol Res*. 2014;47(1):27.

[125] Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death. *Nat Cell Biol*. 2014;16(8):728-36.

[126] Curtin JF, Donovan M, Cotter TG. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J Immunol Methods*. 2002;265(1-2):49-72.

[127] Winfield LL, Payton-Stewart F. Celecoxib and Bcl-2: emerging possibilities for anticancer drug design. *Future Med Chem*. 2012;4(3):361-83.

[128] Fujii R, Imanishi Y, Shibata K, Sakai N, Sakamoto K, Shigetomi S, et al. Restoration of E-cadherin expression by selective Cox-2 inhibition and the clinical relevance of the epithelial-to-mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2014;33:40.

[129] Min JW, Kim KI, Kim HA, Kim EK, Noh WC, Jeon HB, et al. INPP4B-mediated tumor resistance is associated with modulation of glucose metabolism via hexokinase 2 regulation in laryngeal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;440(1):137-42.

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

[131] Sorolla A, Yeramian A, Valls J, Dolcet X, Bergadà L, Llombart-Cussac A, et al. Blockade of NF κ B activity by Sunitinib increases cell death in Bortezomib-treated endometrial carcinoma cells. *Mol Oncol*. 2012;6(5):530-41.

[132] Kannan RM, Nance E, Kannan S, Tomalia DA. Emerging concepts in dendrimer-based nanomedicine: from design principles to clinical applications. *J Intern Med*. 2014; doi: 10.1111/joim.12280

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

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO DO DENDRÍMERO DE POLIGLICEROL ASSOCIADO AO CELECOXIBE EM LINHAGENS CELULARES DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO.

Pesquisador: Décio dos Santos Pinto Junior

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 05782313.1.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 224.090

Data da Relatoria: 20/03/2013

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não existem riscos e benefícios diretos advindos da pesquisa, pois são utilizadas linhagens de células comerciais.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo prevê a utilização de linhagem de células comerciais já adquiridas previamente pelo pesquisador e mantidas em seu laboratório. O cronograma de execução do projeto é condizente com as etapas a serem desenvolvidas e seu início previsto para Maio de 2015

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Consta desse protocolo a declaração do pesquisador sobre a responsabilidade de guarda das linhagens de células comerciais a serem utilizadas e previamente adquiridas pelo mesmo, em decorrência de outro projeto.

Recomendações:**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O protocolo apresentado contempla os preceitos éticos desejáveis, não havendo pendências relacionadas. Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 20 de Março de 2013

Assinador por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)