ALINE CORRÊA ABRAHÃO

**Participação da Prostaglandina E2 e seus receptores na proliferação celular
do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço**

São Paulo

2009

ALINE CORRÊA ABRAHÃO

**Participação da Prostaglandina E2 e seus receptores na proliferação celular
do 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

Área de Concentração: Patologia Bucal

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

São Paulo

2009

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

Abrahão, Aline Corrêa

Participação da prostaglandina E2 e seus receptores na proliferação celular do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço / Aline Corrêa Abrahão; orientador Décio dos Santos Pinto Jr. -- São Paulo, 2009.

87p. : fig., tab.; 30 cm.

Tese (Doutorado - Área de Concentração: Patologia Bucal) -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Prostaglandina E2 – Carcinoma de células escamosas – Cabeça e Pescoço 2. Patologia Bucal

CDD 617.63

BLACK D65

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

São Paulo, ____/____/____

Assinatura:

E-mail:

FOLHA DE APROVAÇÃO

Abrahão AC. Participação da Prostaglandina E2 e seus receptores na proliferação celular do 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: / /

Banca Examinadora

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Samuel e Magali,
ao meu irmão Samuel, e
ao meu namorado Marcelo.
Estrelas que iluminam meu caminho.

*“Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!”*

Mário Quintana

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais, **Samuel** e **Magali**, meus maiores incentivadores. Em vocês me espelhei para construir minha carreira. Sempre preocupados, mas interessados no meu trabalho. Cada palavra, cada conselho, todo o carinho, a compreensão e a paciência foram essenciais para que eu enxergasse um passo a frente, avaliasse uma nova possibilidade, e estivesse sempre progredindo. A vocês meu muito obrigada por tudo. Amo vocês!

Ao meu irmão **Samuel**, indispensável. Todo apoio e carinho no tempo que passamos juntos nos EUA foram essenciais para que eu persistisse na minha jornada. Estaremos sempre juntos e unidos.

Ao meu namorado **Marcelo**, meu equilíbrio. Sempre ao meu lado incondicionalmente, quer presencialmente ou não, compartilhando minhas conquistas. Estar com você tornou-me mais forte para perseverar em meus objetivos. Estar a seu lado me faz muito feliz.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador **Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Jr.**. Aprender diagnóstico histopatológico com você contribuiu imensamente para meu crescimento profissional. Além disso, as inúmeras discussões científicas me incentivaram a adquirir mais conhecimento e a acreditar que era possível buscar o melhor para minha formação como pesquisadora. Obrigada pela amizade, pela confiança, por ter acreditado em mim e, sobretudo, por ter viabilizado a minha ida ao NIH. Espero ter conseguido provar que carioca além de ir à praia, trabalha e muito!

Ao **Dr. J. Silvio Gutkind** por me aceitar como voluntária em seu laboratório no NIH/NIDCR. Um exemplo de dedicação à pesquisa, fonte inesgotável de conhecimentos, sempre pronto a tirar todas as dúvidas, a explicar e discutir, com o máximo de detalhes, todos os experimentos. Apreendi muito com a nossa convivência diária e espero poder usar todo esse aprendizado em minha vida profissional. Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, onipresente em minha vida.

À minha família, sempre presente, acompanhando meus passos e vivendo intensamente todas as minhas conquistas. Em especial à minha tia **Nargila**, por todas as explicações ultra-rápidas de química pelo telefone, mesmo que fosse de madrugada, para que eu conferisse as diluições para o experimento do dia seguinte; e ao meu tio **José Luiz Abrahão**, exemplo de Patologista, sempre me incentivando a ir um degrau além na vida acadêmica.

À minha “família” paulista: tia **Cristina**, **Almir**, **Luisa** e **Júlia**. Obrigada pelo carinho, pela estadia, pelas caronas e por todo o suporte.

Às **Prof^a Dr^a Suzana Orsini Cantanhede de Souza** e **Prof^a Dr^a Marina Galotini Cury de Magalhães**, obrigada pelo incentivo e pelo exemplo de dedicação profissional.

Ao amigo **Prof. Dr. Fábio Dumas Nunes**, obrigada pelo incentivo à fazer doutorado na FOU SP, pela amizade, conselhos e pelo aprendizado em biologia molecular e publicações. “Cariocas” também são *hard workers*!

Aos professores da Patologia Bucal da FOU SP, **Profa. Dra. Marília Treirveiller Martins**, **Profa. Dra. Andréa Mantesso**, **Prof. Dra. Karen Lopez Ortega**, obrigada pela convivência e pelo aprendizado.

Às funcionárias da FOU SP: **Zilda**, **Néia**, **Nair**, **Bia** e **Elisa**. Sempre prontas a ajudar e tornando o ambiente de trabalho agradável.

Aos amigos do curso de Pós-graduação em Patologia Bucal da FOU SP pela amizade, companheirismo e boas risadas: **Paulo Braz**, **Renata Acay**, **Thais**, **Juliana**, **Alexandra**, **Nathalie**, **Fabiana**, **Márcio**, **Ana Cláudia**, **Brunno**, **Fernanda Yamamoto**, **Camila Chicaro**, **Felipe Sperandio**, **Felipe Daltoé**, **Juliana Noguti**, **Camila Rodini**, **Flávia**, **Katiucia**, **Luciana**, **Maria Fernanda**, **Nelise**, **Paulo Silva Santos**, **Yonara**, **Marina**, **Roberto**, **Ronald**, **Valtuir** e **Karin**.

A **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior) pelo apoio financeiro que permitiu a realização do doutorado e principalmente pela bolsa “sanduiche”.

Aos amigos **Rogério Castilho** e **Cristiane Squarize**, não tenho palavras para agradecer tudo o que vocês fizeram por mim durante minha estada no NIH. Protocolos, conselhos, dicas..... eu sempre estava interrompendo seus experimentos para tirar uma dúvida, refazer uma conta, repassar um protocolo, e vocês sempre estavam prontos para me ajudar. Espero que esse período tenha sido o início de uma grande amizade e, quem sabe, futuras colaborações.

Aos amigos NIDCR/OPCB **Jane Stieber, Sarah Swigart, Ramiro Bartolome, Atsuko Sakurai, Jose Vaque, Hiroshi Yagi, Constantinos Mikelis, Daniel Martins, May Samaan, Kantima Leelahavanichkul, Lynn Cross, Vyomesh Patel e Alfredo Molinolo**. Obrigada pelo acolhimento, amizade e aprendizado.

À amiga **Prof^a. Dr^a. Márcia Grillo Cabral** por todo o incentivo durante minha experiência como docente na UFRJ e pelo apoio para ingressar no doutorado, que foram essenciais para que eu chegasse até aqui. Obrigada por tudo, principalmente por participar do meu amadurecimento profissional.

Ao **Prof. Dr. Abel Cardoso**, obrigada pelo convívio e ensinamentos tão valiosos, pelo incentivo à carreira acadêmica, e pela indicação ao curso de doutorado.

A **Prof. Dra. Simone Lourenço** por sua dedicação e exemplo de ética profissional.

Aos professores e funcionários do Departamento de Patologia e Diagnóstico Oral da FO UFRJ: **Prof. Dr. Almiro Reis, Prof^a. Dr^a. Maria Elisa Janini, Prof^a. Dr^a. Ellen Brillhante de Albuquerque, Prof^a. Dr^a. Sandra Torres, Prof. Dr. Valdir Meirelles Jr e Prof. Dr. Arley Silva Jr**, exemplos profissionais, presentes durante toda a minha formação e que incondicionalmente me apoiaram quando precisei conciliar ser professora substituta na UFRJ e cursar os 6 primeiros meses de doutorado.

A amiga **Tatiana Robaina**, cuja amizade e nossas longas horas de conversa foram essenciais para que eu não me afastasse “do mundo”.

Aos amigos **Prof. Dr. Luiz Carlos Santiago** e **Mariana**, protesistas que implicavam com minhas células, mas exemplos na vida acadêmica. Obrigada pelo carinho.

Às amigas **Fernanda Giudice** e **Aluana dal Vechio**, sem as quais a jornada teria sido mais árdua. Obrigada por terem me ajudado nos meus primeiros passos no laboratório de Biologia Celular. Vocês foram incansáveis. O companheirismo, a

amizade, o carinho e o apoio de vocês foram muito importantes. Mesmo que agora fiquemos “geograficamente” afastadas, o nosso famoso “trio” ainda renderá bons frutos. Obrigada por tudo!

À amiga e conselheira **Érika Martins**, sempre pronta a me escutar, desde que acompanhada de um bom café ou um mate. Obrigada pela amizade, pela sinceridade, pelo companheirismo e pela confiança!

Ao amigo **Fábio Coracin**, amigo para todas as horas, para boas discussões científicas e filosóficas. Sempre pronto para ajudar, para trocar a escala da rotina, para ajudar a estudar um caso. É muito bom ter amigos como você!

À amiga **Fátima Klingbeil** pelos conselhos, pelo aprendizado com cultura de células.

À amiga **Katiuchia Sales**, sempre com sua opinião sincera, direta e marcante sobre a maioria dos assuntos, mas não menos divertida. Mesmo bem diferentes conseguimos construir uma bela amizade. Obrigada por me “abrigar” no seu sofá, pela companhia, pelas conversas e conselhos.

Ao amigo **Andrius Masedunskas**, obrigada pela amizade, companheirismo e bons momentos durante minha estada no NIH.

À amiga **Laura Emerik**, que tornou minha estada nos EUA mais divertida.

*"Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir,
mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar."*

Anatole France

RESUMO

Abrahão AC. Participação da Prostaglandina E2 e seus receptores na proliferação celular do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2009.

O carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP) representa 6ª malignidade mais comum no mundo. Para melhor entender os mecanismos envolvidos na iniciação tumoral, progressão e metástase, é necessária a elucidação dos eventos moleculares que guiam esses processos. É também importante a investigação da interação e modulação das células tumorais e seu microambiente. A participação de agentes inflamatórios no desenvolvimento e manutenção do CECP pode ser resumida na superexpressão da ciclooxigenase 2 (COX-2) e na secreção de prostaglandina E2 (PGE2) pelas células tumorais. A PGE2 ativa seus receptores EP1-4 que são ligados a proteínas G. As proteínas G ativam outras vias de sinalização responsáveis por processos celulares como proliferação e angiogênese. Embora a participação do EP2 no câncer de cólon seja bem estabelecida, o papel dos receptores de PGE2 no CECP ainda permanece incerto. Este trabalho teve como objetivo avaliar o papel da PGE2 e de seus receptores na proliferação celular em linhagens celulares de CECP, bem como a expressão dos receptores em *tissue microarrays* de CECP. Inicialmente as linhagens de CECP foram utilizadas para analisar o padrão de expressão da COX-2 e dos receptores EP1-4 por meio da técnica de western blotting. A inibição da secreção da PGE2 pelos inibidores de COX-2 foi mensurada por meio da técnica de ELISA. A expressão dos receptores EP1-3 e da COX-2 foi também avaliada por meio da imuno-histoquímica em dois diferentes *tissue microarray*. A fim de esclarecer a indução da proliferação celular pela PGE2 e de apontar um de seus receptores como responsável pelo processo, duas PGE2 sintéticas, um antagonista do EP2 e um antagonista do EP3 foram utilizados para estimular a proliferação celular. Foi realizado o bloqueio do receptor EP2 por meio da interferência de RNA. Seus efeitos sobre a proliferação foram avaliados por meio do ensaio de incorporação de timidina. Os resultados mostraram que o CECP expressa constitutivamente a COX-2, o EP1, o EP2 e o EP3; e que é capaz de secretar PGE2. Os inibidores de COX-2 inibiram a secreção de PGE2 em

baixas concentrações, mas não foram capazes de inibir a proliferação. A COX-2 e os receptores EP1-3 foram amplamente expressos nos *tissue microarrays*. Foi observada correlação entre EP1 e EP2; EP1 e EP3; e EP2 e EP3 ($p < 0,05$). Somente o EP1 mostrou correlação com a COX-2 ($p < 0,05$). A PGE2 induziu a proliferação por meio da indução da síntese de DNA nas linhagens celulares de CECp. O agonista de EP3 também induziu a síntese de DNA, sugerindo sua participação na proliferação dos CECps. Os efeitos do siRNA para EP2 sobre a síntese de DNA não foram conclusivos. As proteínas ativadas por segundos mensageiros do EP2 também não foram afetadas pelo bloqueio do mesmo. Este estudo indica três importantes achados: 1. a PGE2 é secretada por linhagens de CECp; 2. a COX-2 é superexpressa nos CECps; 3. os receptores de PGE2 são constitutivamente expressos nos CECps. No entanto, esse trabalho mostra que esta via inflamatória parece ser independente aos mecanismos indutores da proliferação nos CECps.

Palavras-Chave: Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. COX-2. Prostaglandina E2. Receptores de PGE2. Proliferação celular.

ABSTRACT

Abrahao AC. Role of Prostaglandin E2 and its receptors in head and neck squamous cell carcinoma. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2009.

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is the 6th most common malignant lesion worldwide. To better understand the mechanisms of tumor initiation, progression, and metastasis a better understanding of the molecular networks that guides these process is needed. Towards this goal, it is important to investigate the interaction and modulation of cancer cells over its surrounding microenvironment. The involvement of inflammatory agents in HNSCC development and maintenance can be resumed in the overexpression of cyclooxygenase 2 (COX-2) and secretion of prostaglandin E2 (PGE2) by tumor cells. Prostaglandin E2 activates its receptors EP1-4 which are coupled to G proteins. G protein activates other pathways responsible for cellular processes such as proliferation and angiogenesis. The participation of EP2 in colon cancer is well established however the role of PGE2 receptors in HNSCC is still poorly understood. This work aims to investigate the role of PGE2 and its receptors in cellular proliferation in HNSCC cell lines and the clinical relevant expression pattern in HNSCC tissue microarrays. HNSCC cell lines were initially used to access the expression pattern of COX-2 and EP1-4 by using western blotting technique. The ability of selective COX-2 inhibition to block PGE2 secretion was measured by ELISA antibody specific assay. Also, EP1, EP2, EP3 and COX-2 expression were evaluated by immuno-histochemistry in two different sets of HNSCC tissue microarrays. To address the question about PGE2 induced cell proliferation and which PGE2 receptor are involved in the process, two synthetic PGE2, an EP2 agonist and an EP3 agonist were used to stimulate cell proliferation. Finally, the knockdown of EP2 receptor was performed by siRNA transfection assay and its effect was evaluated in cell proliferation by radioactive thymidine incorporation assay. The results presented here shows that HNSCC constitutively express COX-2, EP1, EP2 and EP3 and that they are able to secrete PGE2. COX-2 selective inhibitors are able to suppress PGE2 secretion in lower concentrations but not to inhibit cell proliferation. Also, COX-2, EP1, EP2 and EP3 are widely expressed in HNSCC tissue

microarrays. A correlation between EP1 and EP2; EP1 and EP3; and EP2 and EP3 ($p < 0.05$) was observed. Only EP1 showed correlation with COX-2 in tissue microarrays ($p < 0.05$). PGE2 was able to induce cell proliferation as it induces DNA synthesis in HNSCC cell lines. EP3 agonist also induced DNA synthesis addressing its role in cell proliferation induction in HNSCC. The siRNA for EP2 effects in DNA synthesis was not conclusive and the downstream proteins activated by EP2 second messenger were not affected following its expression knockdown. This study indicates three important findings. First, PGE2 is secreted by HNSCC. Second, COX-2 is found to be overexpressed in HNSCC; and third, PGE2 receptors are found to be constitutively expressed in HNSCC. Most interesting, we show here that this inflammatory pathway seems to be independent of the mechanisms that induce HNSCC proliferation.

Keywords: Head and neck squamous cell carcinoma. COX-2. Prostaglandin E2. PGE2 receptors. Cell proliferation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Via de sinalização do EGFR, mostrando a interação do receptor com diversas outras vias de sinalização.	31
Figura 2.2 - Vias de sinalização ativadas e/ou influenciadas pela ativação dos GPCRs	31
Figura 2.3 – Metabolismo dos eicosanóides.....	37
Figura 2.4 - Via dos receptores de PGE2.....	37
Figura 4.1 - Graus de positividade de acordo com o percentual de células positivas a cada 100 células tumorais. A. Grau 0, demonstrando de 0 a 10% de células tumorais positivas; B. Grau 1, demonstrando de 10 a 25% de células tumorais positivas; C. Grau 2, representando de 25 a 50% de células tumorais positivas; D. Grau 3, demonstrando de 50 a 75% de células tumorais positivas; e E. representando de 75 a 100% de células tumorais positivas.....	49
Figura 5.1 - Expressão da proteína COX-2 na linhagem de queratinócito humano de boca imortalizado (NOK-SI) e nas linhagens de CECp HN13, HN12, UMSCC17, Cal27, OSCC3, HN6 e HN30. A expressão da proteína GAPDH foi utilizada como controle da expressão proteica	54
Figura 5.2 - Níveis de PGE2 secretada nas linhagens NOK-SI, HN13, HN12 e OSCC3.....	55
Figura 5.3 - Inibição da secreção de PGE2 na linhagem HN13 pelos inibidores de COX celecoxib (COX-2 seletivo) e indometacina (não-seletivo). (***) $p < 0,0001$; teste t)	56
Figura 5.4 - Curva de viabilidade celular com os inibidores de COX celecoxib (COX-2 seletivo) e indometacina (não-seletivo)	56
Figura 5.5 - A. Expressão imuno-histoquímica dos receptores EP1, EP2 e EP3, e da COX-2 nos TMAs. Aumento original de 10x; no detalhe, aumento de 40x; B. Gráfico exibindo a distribuição dos casos disponíveis para	

análise nos TMAs, de acordo com o percentual de células positivas. Os dados estão expressos em porcentagem..... 57

Figura 5.6 - **A.** Expressão imuno-histoquímica dos receptores EP1 (A.I), EP2 (A.II) e EP3 (A.III), e da COX-2 (A.IV) nos TMAs. Aumento original de 10x; no detalhe, aumento de 40x; **B.** Distribuição dos casos disponíveis para análise nos TMAs, de acordo com o percentual de células positivas. Os dados estão expressos em porcentagem..... 49

Figura 5.7 - *Heat map* Observa-se a formação de clusters correlacionando principalmente a expressão dos receptores EP1 e EP2. A escala categoriza o grau de positividade dos casos. Quanto mais próximo da cor verde, menor o percentual de células positivas. Quanto mais próximo ao vermelho, maior o percentual de células positivas..... 61

Figura 5.8 - Distribuição dos casos de acordo com a gradação histológica de Broders e o percentual de células positivas nos TMAs. 62

Figura 5.9 - Indução da síntese de DNA pela PGE2 e dmPGE2 através de ensaio de Timidina tritiada, **A.** Indução significativa da síntese de DNA pela dmPGE2 na linhagem NOK-SI; **B.** indução significativa da síntese de DNA tanto pela PGE2 quanto pela dmPGE2 na linhagem HN13; **C.** Indução significativa da síntese de DNA na linhagem HN12 apenas pela dmPGE2; **D.** Indução significativa da síntese de DNA tanto pela PGE2 quanto pela dmPGE2 na linhagem OSCC3. (*p<0,05; **p<0,01)..... 64

Figura 5.10 - Indução da síntese de DNA pelo agonista do receptor EP2 (Butaprost) e pelo agonista do receptor EP3 (Sulprostone) através de ensaio de timidina tritiada, **A.** Indução significativa da síntese de DNA pelo Sulprostone na linhagem NOK-SI; **B.** indução significativa da síntese de DNA pelos agonistas de ambos os receptores EP2 e EP3; **C.** Indução significativa da síntese de DNA na linhagem HN12 pelo Butaprost; **D.** Indução significativa da síntese de DNA pelo Sulprostone (EP3) e redução da síntese pela ação do Butaprost (EP2) na linhagem OSCC3. (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001) 65

Figura 5.11 - Avaliação da eficiência do siRNA para o receptor EP2. Observa-se discreta redução da expressão do receptor nas linhagens HN13 e OSCC3, mas não nas linhagens NOK-SI e HN12..... 65

Figura 5.12 - Avaliação dos efeitos biológicos do siRNA para o receptor EP2 sobre a síntese de DNA nas linhagens NOK-SI, HN13, HN12 e OSCC3, estimuladas ou não com dmPGE2. Não foram observadas alterações

significativas sobre a síntese de DNA em nenhuma das quatro linhagens. 67

Figura 5.13 - Avaliação da ação do siRNA para o receptor EP2 na expressão de proteínas relacionadas à via de sinalização das proteínas G nas linhagens NOK-SI e HN13. Não foram observadas diferenças significativas na expressão das proteínas Akt, c-Fos, c-Jun, Erk e S6 após os a interferência de RNA e após estímulo com dmPGE2 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Plasmídeos utilizados para superexpressão gênica nas células HEK 293T	45
Tabela 4.2 - Anticorpos utilizados para as reações de <i>western blotting</i>	46
Tabela 4.3 - Anticorpos utilizados para as reações de imuno-histoquímica	48
Tabela 4.4 - Sistema de gradação utilizado para os TMAs (Molinolo et al. 2007)	48
Tabela 5.1 - Expressão imuno-histoquímica dos receptores de PGE2 (EP1, EP2 e EP3) e da COX-2 nos TMAs e divisão de acordo com o número de células positivas.....	58
Tabela 5.2 - Classificação dos TMAs de acordo com a gradação de Broders e número de células positivas	60
Tabela 5.3 - Correlação de Spearman entre os anticorpos utilizados nos TMAs	60

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

Akt	Proteína quinase B
BD	Bem diferenciado
cAMP	Monofosfato de adenosine cíclico (do inglês <i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
CECP	Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço
DNA	Ácido desoxirribonucléico (do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
EGF	Fator de crescimento epidérmico (do inglês <i>epidermal growth factor</i>)
EGFR	Receptor de EGF (do inglês <i>epidermal growth factor receptor</i>)
ENA-78	Proteína epitelial 78 ativadora de neutrófilos (do inglês <i>epithelial neutrophil-activating protein 78</i>)
EP1	Receptor 1 de prostaglandina E2
EP2	Receptor 2 de prostaglandina E2
EP3	Receptor 3 de prostaglandina E2
EP4	Receptor 4 de prostaglandina E2
GDP	Di-fosfato de guanosina (do inglês <i>guanosine di-phosphate</i>)
GPCR	Receptores ligados à Proteína G (do inglês <i>G protein coupled receptor</i>)
GTP	Tri-fosfato de guanosina (do inglês <i>guanosine tri-phosphate</i>)
IL-8	Interleucina 8
INCA	Instituto Nacional do Câncer
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível (do inglês <i>inducible nitric oxide synthase</i>)
IP3	Inositol tri-fosfato (do inglês <i>inositol triphosphate</i>)
JAK	Quinase Jnaus (do inglês <i>Janus kinase</i>)
JNK	Quinase c-Jun-N-terminal (do inglês <i>c-Jun-N-terminal kinase</i>)
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos (do inglês <i>mitogen activated protein kinases</i>)
MD	Moderadamente diferenciado
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos (do inglês <i>mammalian target of rapamycin</i>)
PD	Pouco diferenciado
PGE2	Prostaglandina E2

PI3K	Quinase inositol tri-fosfato (do inglês <i>phosphatidil inositol 3 kinase</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês <i>Ribonucleic acid</i>)
ROS	Radicais livres reativas ao oxigênio (do inglês <i>reactive oxygen species</i>)
siRNA	Interferência de RNA (do Inglês <i>small interference RNA</i>)
STAT	Transdutores de sinal e ativadores de transcrição (do inglês <i>signal transducers and activators of transcription</i>)
TCA	Ácido tricloroacético (do inglês <i>Trichloroacetic acid</i>)
TMA	do inglês <i>tissue microarray</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa (do inglês <i>tumor necrosis factor alpha</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 REVISÃO DA LITERATURA	27
2.1 CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA DE PESCOÇO	27
2.2 ALTERAÇÕES MOLECULARES ENCONTRADAS NO CECp	28
2.3 CORRELAÇÃO ENTRE A INFLAMAÇÃO E O CÂNCER	32
2.4 PROSTAGLANDINA E ₂ (PGE ₂), RECEPTORES DE PGE ₂ (EPs) E CICLOXIGENASE 2 (COX-2)	35
2.5 PARTICIPAÇÃO DA PGE ₂ , EPs, COX-2 E INIBIDORES DE COX-2 NO CÂNCER	38
3 PROPOSIÇÃO	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 CULTIVO CELULAR	42
4.2 IDENTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES DE PGE ₂	43
4.2.1 Western Blotting	43
4.2.1.1 Lise de proteínas	43
4.2.1.2 Estabelecimento de células a serem usadas como controle positivo	43
4.2.1.3 Reação de <i>western blotting</i>	45
4.2.2 Imuno-histoquímica	47
4.3 SECREÇÃO DE PGE ₂	50
4.4 VIABILIDADE CELULAR	51
4.5 SÍNTESE DE DNA	52
4.6 INTERFERÊNCIA DE DNA	53
5 RESULTADOS	54
5.1 COX-2, PGE ₂ E INIBIDORES DE COX-2	54
5.2 EXPRESSÃO DOS RECEPTORES DE PGE ₂	56
5.3 INDUÇÃO DA SÍNTESE DE DNA PELA PGE ₂ E dmPGE ₂	62
5.4 INDUÇÃO DA SÍNTESE DE DNA PELOS AGONISTAS DO RECEPTOR EP ₂ (BUTAPROST) E EP ₃ (SULPROSTONE)	63
5.5 EFEITO DA INTERFERÊNCIA DE RNA SOBRE O RECEPTOR EP ₂	66
5.5.1 Eficiência da interferência de RNA sobre o receptor EP₂	66
5.5.2 Efeitos biológicos da interferência de RNA	66

5.5.3 Efeito do siRNA para o receptor EP2 sobre a expressão de proteínas reguladas pelas proteínas G.....	67
6 DISCUSSÃO	69
7 CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS	80
ANEXO A	85

1 INTRODUÇÃO

O câncer se origina a partir do acúmulo de defeitos genéticos e epigenéticos e da expansão clonal de populações celulares selecionadas, sendo o descontrole na proliferação celular uma de suas características mais marcantes (Molinolo et al., 2009).

O papel da inflamação no CECP tem sido estudado extensivamente no seu aspecto molecular, mas muitos questionamentos ainda permanecem sem resposta. A desregulação da resposta inflamatória no câncer perpetua o fenótipo maligno (Wang et al., 2009).

O entendimento das vias inflamatórias relacionadas ao câncer poderá permitir o desenvolvimento de terapias conjuntas (Mantovani et al., 2008). Os anti-inflamatórios não-esteroidais (NSAIDs) além de ação anti-inflamatória, apresentam propriedades anti-neoplásicas, reduzindo o risco de câncer de cólon, induzindo a regressão de câncer de mama e dos carcinoma epidermóide de pele e reduzindo o crescimento dos carcinomas de cabeça e pescoço (Gallo et al., 2002)

Níveis elevados de prostaglandina E2 (PGE2) têm sido encontrados nos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço (CECP) (Gallo et al., 2002; Wang et al., 2009). A PGE2 promove o crescimento, inibe a apoptose, aumenta a produção de fatores angiogênicos e promove a invasividade e o crescimento metastático (Wang et al., 2009). A ciclooxigenase 2 (COX-2), uma das isoformas da enzima ciclooxigenase, responsável pela síntese das prostaglandinas, é encontrada superexpressa na inflamação, em lesões cancerizáveis e nos tumores. A superexpressão de COX-2 em células tumorais é observada junto com níveis aumentados de PGE2. A expressão da COX-2 nos CECPs tem valor prognóstico. Além disso, o uso de inibidores seletivos de COX-2 tem a capacidade de inibir o CECP e aumentar a efetividade do tratamento radioterápico *in vitro* (Wang et al., 2009).

A PGE2 atua através da ativação de seus receptores específicos, EP1, EP2, EP3 e EP4 (Sugimoto; Narumiya, 2007). Tais receptores são acoplados a proteínas G, que atuam como segundos mensageiros na ativação de outras vias de sinalização responsáveis por diversos processos celulares como a proliferação e a angiogênese (Dorsam; Gutkind, 2007; Sugimoto; Narumiya, 2007). Cada receptor é

associado à um tipo específico de proteína G. Os receptores EP2 e EP4 atuam via proteína $G_{\alpha s}$ aumentando os níveis de cAMP (Dorsam; Gutkind, 2007). Além disso, ativam a via da β -catenina e do PI3K/Akt (Castellone et al., 2005). O EP3 possui diferentes isoformas, mas caracteristicamente atua via proteína $G_{\alpha q}$ reduzindo os níveis de cAMP (Sugimoto; Narumiya, 2007). Recentemente foi demonstrado por Hoshikawa et al. (2009) que a inibição do receptor EP3 por um antagonista específico levou à redução da proliferação celular em células derivadas de carcinoma epidermóide oral, sugerindo sua participação na patogênese desta lesão (Hoshikawa et al., 2009). Entretanto, a real função dos receptores de PGE2 no CECP ainda não foi estabelecida.

Este trabalho teve o objetivo de elucidar a participação da PGE2 e de seus receptores no carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. Para isso foram utilizadas linhagens celulares de CECP e *tissue microarrays* (TMAs) de CECP. Foi analisada a expressão da COX-2 e dos receptores de PGE2 tanto nas linhagens de CECP por western blotting, quando por imuno-histoquímica, nos TMAs. Foram feitas mensurações dos níveis de PGE2 secretada pelas linhagens de CECP. Foram também analisados os efeitos de dois inibidores de COX-2, o celecoxib e a indometacina, sobre a secreção de PGE2 e sobre a viabilidade celular. Por fim, com objetivo de avaliar a participação da PGE2 e de seus receptores na proliferação celular do CECP, foi realizada análise da síntese de DNA pelo ensaio de incorporação de timidina.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO

Os cânceres de cabeça e pescoço incluem as lesões malignas originadas na cavidade oral, na orofaringe, na hipofaringe e na laringe (Davies; Welch, 2006; Haddad; Shin, 2008; Conway et al., 2009; Marron et al., 2009). De todas as lesões malignas que acometem essas localizações o carcinoma epidermóide é a mais comum (Davies; Welch, 2006; Haddad; Shin, 2008; Scully; Bagan, 2009). O CECP é o 6º tipo de câncer mais comum no mundo, sendo observados anualmente mais de 550.000 novos casos e aproximadamente 300.000 mortes (Davies; Welch, 2006; Haddad; Shin, 2008; Conway et al., 2009; Marron et al., 2009; Molinolo et al., 2009). Considerando somente os carcinomas de cavidade oral, dados recentes indicam que a estimativa de novos casos em homens nos próximos cinco anos será de aproximadamente 185 830 casos nos países desenvolvidos de 280.853 nos menos desenvolvidos (Curado; Hashibe, 2009).

No Brasil estima-se que, em 2010, o número de novos casos anuais seja da ordem de 15 milhões. (INCA, 2009).

As estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o ano de 2010, válidas também para o ano de 2011, apontam que ocorrerão 489.270 casos novos de câncer, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo. Destes, o câncer de cavidade oral será o 7º tipo mais incidente (INCA, 2009). A expectativa para o ano de 2010 é de aproximadamente 14 mil casos, ainda sendo mais incidente no sexo masculino (INCA, 2009). Nos Estados Unidos da América, a estimativa de casos de câncer de cavidade oral para o ano de 2008 era de e 22.900 casos, sendo também mais prevalente em homens (Curado; Hashibe, 2009).

Apesar dos avanços no campo terapêutico para os cânceres de uma maneira geral, os índices de sobrevida para o CECP em 5 anos ainda permanecem baixos (Conway et al., 2009; Molinolo et al., 2009). Tais índices, geralmente são consequência do fato de grande parte dos pacientes já se apresentar para tratamento com lesões em estágio avançado. Além disso, a falta de marcadores diagnósticos bem estabelecidos para a detecção precoce e a falha na resposta ao

tratamento também contribuem para a baixa taxa de sobrevida (Molinolo et al., 2009).

O uso de tabaco e o consumo de álcool são fatores de risco consagrados para o carcinoma de cabeça e pescoço, bem como o hábito de mascar betel (Curado; Hashibe, 2009; Marron et al., 2009; Molinolo et al., 2009; Scully; Bagan, 2009). O HPV também é apontado como fator de risco (Curado; Hashibe, 2009; Scully; Bagan, 2009). No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos que levam ao desenvolvimento e à progressão tumoral dos CECP, fato este que pode contribuir para o pobre prognóstico dessa lesão (Molinolo et al., 2009).

2.2 ALTERAÇÕES MOLECULARES ENCONTRADAS NO CECP

O CECP é caracterizado por uma heterogeneidade clínica, patológica e biológica (Haddad; Shin, 2008). Acredita-se que a evolução e a progressão do CECP resultem de sucessivas alterações celulares e moleculares (Haddad; Shin, 2008). Tais alterações sugerem um modelo de progressão tumoral onde o CECP se originaria a partir da transformação maligna e progressão das lesões pré-malignas (Haddad; Shin, 2008).

Nesse contexto, o conhecimento dos mecanismos básicos que controlam as funções celulares como, por exemplo, a proliferação, possibilita o melhor entendimento das alterações biológicas que levam ao câncer (Molinolo et al., 2009). A maioria dos cânceres é originada a partir de uma expansão clonal e crescimento descontrolado de uma única célula tronco ou de células que readquiriram a capacidade proliferativa. Em geral, as células normais proliferam somente quando necessário, como resultado de um equilíbrio entre fatores indutores e inibidores do crescimento influenciados por células adjacentes e fatores circulantes. Tais células crescem de forma descontrolada e ao longo do tempo escapam da senescência e da morte celular programada, tornando-se imortais (Molinolo et al., 2009). Além disso, há um aumento do suprimento de oxigênio e de nutrientes, com consequente indução da angiogênese e aquisição de capacidade de expansão e de metástase (Molinolo et al., 2009).

Essas alterações no comportamento celular, que vão da perda de controle sobre a proliferação até a aquisição do fenótipo maligno, são resultado do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas nos oncogenes e nos genes supressores tumorais, que exercem um importante papel na iniciação e progressão tumoral (Molinolo et al., 2009). Enquanto os oncogenes promovem a proliferação celular quando ativados, os genes supressores tumorais inibem o crescimento celular e contribuem para a carcinogênese quando inativados por mutações ou por eventos genéticos e/ou epigenéticos. Diversos eventos de ativação e inativação devem ocorrer nos oncogenes e nos genes supressores tumorais para a iniciação e progressão de diversos tipos de câncer. Tais eventos ocorrem em múltiplas etapas no CECP e, desse modo, se marcadores moleculares pudessem ser apontados como indicadores dos estágios precoces e tardios, seria possível a identificação de indivíduos com lesões pré-malignas propensas a transformação maligna. Além disso, a identificação de tais marcadores possibilitaria o monitoramento das recorrências de CECP, bem como possibilitariam a avaliação da eficácia de novos agentes terapêuticos, tendo importante implicação para o diagnóstico precoce, a terapia e o prognóstico dos pacientes portadores de CECP (Molinolo et al., 2009).

No CECP a progressão tumoral envolve alterações genéticas que levam à displasia epitelial (9p21, 3p21, 17p13), ao carcinoma *in situ* (11q13, 13q21, 14q31) e aos tumores invasivos (4q26–28, 6p, 8p, 8q). Diversos genes supressores tumorais contribuem para o CECP, como o p16 e o p14ARF (9p21), responsáveis pelo controle da fase G1 do ciclo celular, APC (5q21–22) e P53 (17p13). Dentre esses, a perda cromossômica da região 9p21 é encontrada em 70–80% das lesões displásicas da mucosa oral e, junto com a inativação dos genes p16 e 14ARF pela hipermetilação da região promotora, representa um dos eventos mais precoces e mais freqüentes da progressão do CECP (Molinolo et al., 2009).

A desregulação de diversas vias de sinalização responsáveis pela comunicação inter e intra-celular contribuem para a aquisição do fenótipo maligno no CECP. Dessa forma, um dos grandes desafios é desvendar quais eventos moleculares direcionam a progressão tumoral do CECP *in vivo*. Alterações em inúmeros produtos gênicos que podem contribuir para a conversão do epitélio normal para o fenótipo maligno já foram identificadas, com a expectativa de contribuir para a identificação de novos marcadores biológicos de desenvolvimento e

progressão tumoral, bem como para a descoberta de drogas preventivas e terapêuticas.

Um dos oncogenes mais estudados no CECP é o receptor de fator de crescimento epidérmico (Thomas et al.), que geralmente está desregulado e superexpresso, e é relacionado à um pior prognóstico nos CECPs (Molinolo et al., 2007; Scully; Bagan, 2009). O EGFR é uma proteína transmembrana com atividade tirsino-quinase que regula o crescimento celular em resposta à seus ligantes, como o EGF (fator de crescimento epidérmico) e o TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) (Haddad; Shin, 2008; Scully; Bagan, 2009). A ação dos ligantes sobre o EGFR leva à sua dimerização, que ativa diversas vias de sinalização reguladas pelo EGFR (figura 2.1) como a via PI3K/Akt/mTOR (quinase fosfatidil-inositol-3/proteína-quinase B/*mammalian target of rapamycin*), Ras/Raf/MAPK (proteína-quinases ativadas por mitógenos), JNK (quinase c-Jun-N-terminal), JAK/STAT (quinase Janus/transdutores de sinal e ativadores de transcrição), que contribuem para o crescimento tumoral e o potencial metastático do CECP e representam potenciais alvos terapêuticos (Haddad; Shin, 2008; Molinolo et al., 2009). Tais vias são responsáveis pela ativação de diversos fatores de transcrição como c-Jun, c-Fos e c-Myc, que regulam a expressão gênica, suportando a progressão do ciclo celular, a proliferação celular, a invasão, a angiogênese e a metástase (Haddad; Shin, 2008; Molinolo et al., 2009).

Outro grupo de receptores, os GPCRs (receptores ligados à proteínas G), induzem a clivagem de fatores de crescimento semelhantes ao EGF e levam à transativação do EGFR e à ativação de vias relacionadas ao EGF nas células tumorais, sugerindo que essa interação GPCRs pode ter importante papel no desenvolvimento e progressão do CECP, bem com de outros cânceres humanos (Dorsam; Gutkind, 2007; Molinolo et al., 2009) (Figura 2.2)

Figura 2.1 - Via de sinalização do EGFR, mostrando a interação do receptor com diversas outras vias de sinalização

Fonte: (Haddad; Shin, 2008))

Figura 2.2 - Vias de sinalização ativadas e/ou influenciadas pela ativação dos GPCRs.

Fonte: www.sabbiosciences.com; Acesso em 11/12/2009.

2.3 CORRELAÇÃO ENTRE INFLAMAÇÃO E CÂNCER

Em 1863, Rudolf Virchow propôs que a inflamação crônica estava relacionada à carcinogênese quando observou a presença de leucócitos em tecidos tumorais (Kundu; Surh, 2008; Porta et al., 2009). A observação da presença de células inflamatórias em espécimes de biópsias de tumores levou, desde o início do século 19, à associação entre inflamação e tumor, à realização de diversos estudos que embasavam tal teoria (Mantovani et al., 2008; Porta et al., 2009). Entretanto, só recentemente estudos explorando essa conexão vieram à tona novamente. Diversas análises, desde estudos epidemiológicos com pacientes até estudos moleculares com camundongos transgênicos, comprovam a estreita ligação existente entre o câncer e a inflamação (Mantovani et al., 2008). Nesse ínterim, o tratamento com anti-inflamatórios não-esteroidais mostraram um decréscimo tanto na incidência quanto nos índices de mortalidade de inúmeros tipos de tumores (Mantovani et al., 2008). Os marcadores relacionados à inflamação incluem a presença de células inflamatórias e de mediadores da inflamação, como citocinas e prostaglandinas, nos tumores e na angiogênese (Mantovani et al., 2008). Tais marcadores são observados da mesma forma que são observados na resposta inflamatória crônica e na reparação tecidual. Entretanto, as células inflamatórias estão presentes no microambiente de forma independente, levando ou não ao desenvolvimento tumoral (Mantovani et al., 2008).

As neoplasias malignas progridem em indivíduos imunocompetentes por escaparem do sistema imune. Tal fato é atribuído à inabilidade das células imunes de produzir uma resposta antitumoral ou à inibição das funções imunológicas pelos fatores derivados do tumor. O primeiro representa uma tolerância ao organismo que reconhece os antígenos tumorais como “próprios” e permite a iniciação tumoral em um microambiente imunologicamente competente (Whiteside, 2009). O último sugere que a neoplasia possa interferir ativamente no sistema imune do hospedeiro. A imunossupressão inicia-se com o desenvolvimento tumoral e atinge seu pico com o estabelecimento das metástases (Whiteside, 2009). No entanto, essa imunossupressão induzida não é uma imunodeficiência clássica, mas sim uma inibição agressiva às células imunes responsáveis pela resposta anti-tumoral (Whiteside, 2009).

Os tumores da cavidade oral, incluídos dentro dos CECP, desenvolvem-se dentro de um microambiente rico em células responsáveis pela resposta imune, já que a mucosa oral é constantemente exposta à agentes ambientais e à carcinógenos que podem promover a carcinogênese (Whiteside, 2009). No entanto, o papel da inflamação na carcinogênese oral ainda não é tão bem estabelecido quanto, por exemplo, para o câncer de cólon (Whiteside, 2009).

Acredita-se que a conexão entre o câncer e a inflamação seja estabelecida através de duas vias: uma extrínseca, regulada pelas condições inflamatórias que predispõe ao câncer, e uma intrínseca, regulada por alterações genéticas que causam tanto a inflamação quanto as neoplasias e que envolve a ativação de alguns oncogenes (Mantovani et al., 2008; Porta et al., 2009). Isso levou a questionamentos sobre como os eventos genéticos que causariam as neoplasias malignas seriam responsáveis por originar o ambiente inflamatório. (Mantovani et al., 2008)

A presença de células inflamatórias e de mediadores inflamatórios nos tecidos tumorais, no remodelamento tecidual e na angiogênese de forma similar ao observado na resposta inflamatória crônica e no reparo tecidual são características marcantes de muitos, senão todos, os tumores (Porta et al., 2009). Embora essas células possuam a habilidade de prevenir o estabelecimento e a expansão tumoral, evidências indicam que em lesões malignas estabelecidas as células inflamatórias adquirem funções de suporte ao crescimento e disseminação tumoral. A mudança fenotípica durante o desenvolvimento tumoral pode depender funcionalmente das células inflamatórias. Em resposta aos diferentes sinais do microambiente os macrófagos podem expressar distintos programas funcionais, mas até o momento ainda não se sabe como realmente essa sinalização funciona (Porta et al., 2009).

A inflamação crônica representa uma das maiores bases patológicas para o desenvolvimento tumoral. Embora atue como um mecanismo de defesa do hospedeiro contra a infecção ou a injúria e seja, geralmente, um processo auto-limitante, a resolução inadequada da resposta inflamatória leva à diversas desordens crônicas associadas ao câncer (Porta et al., 2009).

Tanto nas células tumorais quanto nas células inflamatórias o NF- κ B ativa a expressão de genes responsáveis pela expressão de citocinas inflamatórias, moléculas de adesão, enzimas da via de síntese das prostaglandinas como a COX-2, óxido nítrico sintase (NOS2) e fatores angiogênicos. (Mantovani et al., 2008)

A inflamação crônica está envolvida em todos os estágios de carcinogênese. A inflamação persistente leva à produção de inúmeros radicais livres ricos em oxigênio (ROS – *reactive oxygen species*) que causam instabilidade genômica e consequentemente danos ao DNA, podendo levar ao câncer. As células tumorais proliferantes, as células estromais circundantes e as células tumorais inflamatórias infiltrantes (células imunes) criam um microambiente onde diversos mediadores pró-inflamatórios participam de uma complexa via de sinalização que facilita o extravasamento de células tumorais pelo estroma, possibilitando a progressão tumoral. A inflamação atua regulando a promoção e a progressão tumoral por diversos mecanismos, incluindo alterações no ciclo celular e na proliferação celular, evasão da apoptose e estímulo à angiogênese. Dentre as principais moléculas envolvidas no eixo inflamação-câncer estão as citocinas, as quimiocinas, a COX-2, as prostaglandinas, os receptores de PGE2 (EP1-4), iNOS (óxido nítrico sintase induzível) e o NFκB (Kundu; Surh, 2008; Mantovani et al., 2008). As vias de sinalização das citocinas são iniciadas pela ligação das mesmas à receptores específicos, seguidas pela ativações de quinases intracelulares como a JAK, a PI3K/Akt, a IKK e as MAPKs, com subsequente ativação de fatores de transcrição, principalmente STAT, NF-κB, and AP-1 (c-Jun/c-Fos) (Kundu; Surh, 2008; Mantovani et al., 2008).

Citocinas inflamatórias, como a IL1 e o VEGF, promovem a expressão de COX-2, a qual desencadeia a angiogênese, provavelmente mediada pela ativação PGE2-dependente do NFκB, através dos receptores EP1-4, o que, consequentemente, leva à expressão e liberação de IL-8 (interleucina 8) e ENA-78 (ativador neutrofílico derivado do epitélio). A PGE2 também ativa a via de sinalização da ERK, levando à *upregulation* do VEGF, criando assim um *feedback* positivo entre a PGE2 e o VEGF (Figura 2.2). Juntos esses achados sugerem que o processo inflamatório e a expressão de COX-2, características comuns à maioria dos cânceres, podem resultar na secreção de PGE2 e na ativação do receptor EP2 e na via de sinalização do NFκB, levando à liberação de citocinas pró-angiogênicas pelas células tumorais e estromais.(Dorsam; Gutkind, 2007)

2.4 PROSTAGLANDINA E2 (PGE2), RECEPTORES DE PGE2 (EPs) e CICLOXIGENASE 2 (COX-2)

Quando as células são estimuladas por diversos estímulos fisiológicos e/ou patológicos, o ácido aracdônico, presente membrana extracelular fosfolipídica, é clivado pela ação das fosfolipases, principalmente a fosfolipase A2, e convertido em prostanóides pela ação das ciclooxigenases e/ou em leucotrienos pela ação da lipooxigenase (Matsuoka; Narumiya, 2007; Greenhough et al., 2009). Prostanóides são eicosanóides, ácidos graxos de 20 carbonos, e incluem as prostaglandinas (PGs) e os tromboxanos (Matsuoka; Narumiya, 2007). De acordo com o estímulo, a ação da cicloxigenase é realizada por uma de suas duas isoformas, a cicloxigenase 1 (COX-1) e a cicloxigenase 2 (COX-2) (Yu et al., 2008; Greenhough et al., 2009). Enquanto a COX-1 é constitutivamente expressa na grande maioria dos tecidos e tem sido associada às funções fisiológicas, a COX-2 é um produto gênico da resposta rápida e imediata, em geral ausente na maioria das células, mas com expressão altamente induzida em resposta à estímulos inflamatórios, à fatores de crescimento e à estímulos tumorigênicos (Yu et al., 2008).

A ação das cicloxigenases leva à conversão do ácido aracdônico em PGH2 (Figura 2.3), altamente instável, que rapidamente é metabolizada pelas prostaglandinas sintases e convertida em prostaglandina E2 (PGE2), prostaglandina D2 (PGD2), prostaglandina F2 α (PGF2 α), prostaglandina I2 (prostaciclina) ou tromboxano A2 (TXA2) (Figura 2.2) (Greenhough et al., 2009).

A função pró-inflamatória da PGE2 nas células ocorre através de receptores específicos de membrana denominados EP1, EP2, EP3 e EP4, que são receptores acoplados à proteínas G (GPCRs) (Fulton; Ma; Kundu, 2006; Dorsam; Gutkind, 2007; Fortier et al., 2008; Kundu; Surh, 2008; Greenhough et al., 2009) (Figura 2.2). Proteínas G são proteínas transmembrana envolvidas na transdução de sinais celulares que possuem sua porção central composta por 7 α -hélices transmembrana (Dorsam; Gutkind, 2007). Quando ativadas, expõe seus sítios intracelulares, que interagem com a estrutura hetero-trimérica da proteína formada pelas subunidades α , β e γ (Castellone; Teramoto; Gutkind, 2006; Dorsam; Gutkind, 2007). São assim denominadas por ativarem moléculas *downstream* através da ligação com uma guanossina difosfato inativa (GDP) e outra com uma guanossina trifosfato ativa (GTP),

levando à produção de cAMP (monofosfato de adenosina cíclico), dentre outras proteínas (Dorsam; Gutkind, 2007). As alterações na via de sinalização mediadas por esses receptores em geral são analisadas a partir de alterações em segundos mensageiros como o cAMP e os níveis de cálcio (Ca^{2+}). (Sugimoto; Narumiya, 2007)

Os receptores de PGE2 ativam diferentes tipos de proteínas G podendo ligar-se a mais de um tipo de proteína G e também a outras vias de sinalização (Hatae; Sugimoto; Ichikawa, 2002; Castellone et al., 2005; Sugimoto; Narumiya, 2007). Apesar de ainda não bem definido pela literatura, o receptor EP1 liga-se à proteína $G_{\alpha q}$ que promove a mobilização de cálcio e a ativação da proteína PKC (proteína quinase C), envolvida na transdução de sinais (Dorsam; Gutkind, 2007; Sugimoto; Narumiya, 2007; Kundu; Surh, 2008). Os receptores EP2 e EP4 ligam-se à proteína $G_{\alpha s}$, e regulam o aumento os níveis de AMPc (Dorsam; Gutkind, 2007; Sugimoto; Narumiya, 2007). O receptor EP4 pode ainda ativar a via da proteína PI3K (quinase fosfatidil inositol 3), via ligação com a proteína $G_{\alpha i}$ (Sugimoto; Narumiya, 2007). Os receptores EP2 e EP4 desempenham um papel proeminente no câncer de cólon. Estudos sugerem que no câncer de cólon a PGE2 estimule também a via da β -catenina através do receptor EP2 (Castellone et al., 2005; Dorsam; Gutkind, 2007). O receptor EP3 apresenta três isoformas, com diferenças na região c-teriminal e geradas por *splicing* alternativo: EP3 α , EP3 β , EP3 γ (Hatae; Sugimoto; Ichikawa, 2002; Sugimoto; Narumiya, 2007). As isoformas do receptor EP3 ligam-se a diferentes proteínas G e é relatada a ação de cada uma das isoformas em dois diferentes tipos de proteínas G. Em geral, as três isoformas ligam-se à proteína $G_{\alpha i}$, e reduzem os níveis de cAMP, atuam sobre a IP3 (inositol trifosfato) e aumentam os níveis de cálcio. As isoformas EP3 α e EP3 β também se ligam à $G_{\alpha 12}$ pela qual ativam a via de sinalização da proteína Rho. A isoforma EP3 γ liga-se também à proteína $G_{\alpha s}$ e aumentam os níveis de cAMP (Hatae; Sugimoto; Ichikawa, 2002; Sugimoto; Narumiya, 2007) (Figura 2.4).

Figura 2.3 - Metabolismo dos eicosanóides.

(Fonte: http://www.biocarta.com/pathfiles/h_eicosanoidPathway.asp, acessado em 23/11/2009)

Figura 2.4 - Via dos receptores de PGE2.

Adaptado de: (Fortier et al., 2008))

2.5 PARTICIPAÇÃO DA PGE₂, EPs, COX-2 E INIBIDORES DE COX-2 NO CÂNCER

A COX-2 é considerada um ponto em comum entre a inflamação e o câncer. Em resposta a vários estímulos externos, como as citocinas pró-inflamatórias, os lipopolissacarídeos bacterianos, radiação ultravioleta e ROS, a expressão da COX-2 é elevada de forma transiente. Níveis elevados de COX-2 levam à proliferação celular, à supressão da apoptose, e à indução da angiogênese e da metástase, ações que contam para sua função oncogênica (Kundu; Surh, 2008).

A indução aberrante de COX-2 tem sido relacionada à patogênese de diversas malignidades. Camundongos geneticamente modificados que superexpressam a COX-2 nas glândulas mamárias, na pele e no estômago são mais propensos a desenvolver neoplasias malignas nos referidos órgãos, enquanto camundongos *knockout*¹ para COX-2 são menos suscetíveis ao desenvolvimento de neoplasias malignas no intestino, de papilomas na pele e de neoplasias malignas na mama. Tanto o uso de inibidores seletivos da COX-2, como o celecoxib e a inativação funcional da COX-2 em camundongos *knockout* para o gene APC (*adenomatous polyposis coli*), um modelo animal para a polipose adenomatosa, reduziram o número e o tamanho dos pólipos intestinais, corroborando a associação entre a superexpressão de COX-2 e a carcinogênese. O mesmo também foi observado em modelos de carcinogênese de pele induzida por luz ultravioleta. Além disso, a inibição da COX-2 por celecoxib retarda, em ratos, a progressão da inflamação esofágica para a metaplasia esofágica e adenocarcinoma. A participação da COX-2 nos estágios iniciais da carcinogênese esofágica é bem evidente, onde a expressão da COX-2 é elevada durante os estágios de displasia e carcinoma *in situ*, e no carcinoma epidermóide invasivo. A supressão da expressão da COX-2 tanto por meios farmacológicos quanto por RNA de interferência leva na redução da produção de PGE₂ e na reduzida tumorigênese em camundongos *nude*² (Kundu; Surh, 2008).

A superexpressão da COX-2 e a ativação dos receptores EP₂ e EP₄ pela PGE₂ secretada tanto pelas células tumorais quanto pelas células estromais

¹ Camundongo modificado geneticamente em que um gene específico foi deletado.

² Camundongos atímicos, desprovidos de resposta imune.

contribui para o crescimento aberrante, para a angiogênese e para o potencial metastático de muitos dos mais prevalentes cânceres, incluindo o câncer de mama, o carcinoma de pulmão de células não-pequenas e o CECP (Dorsam; Gutkind, 2007).

Diversos estudos demonstraram que a PGE2 é capaz de promover a carcinogênese na pele e no cólon em camundongos (Kundu; Surh, 2008). Níveis elevados de PGE2 são observados em diversos tipos de cânceres humanos, incluindo o CECP (Camacho et al., 2008; Kundu; Surh, 2008). A PGE2 promove a proliferação, a angiogênese associada ao tumor, inibe a morte celular, favorecendo o crescimento tumoral, inibe a resposta imune anti-tumoral e modula a invasão tumoral contribuindo para o processo de metástase (Camacho et al., 2008; Kundu; Surh, 2008). A administração intraperitoneal de PGE2 em ratos leva à formação de adenocarcinomas no cólon, aumentando a proliferação celular e suprimindo a apoptose. Em camundongos transgênicos com superexpressão no gene APC, sabidamente envolvido no câncer de cólon, mostram aumento no número de adenomas intestinais. Além disso, nos mesmos ratos, a administração de PGE2 bloqueou os efeitos da regressão dos adenomas promovida por anti-inflamatórios não esteroidais. A inativação funcional ou a perda da PDGH, enzima que degrada PGE2, é correlacionada ao aumento da tumorigênese em diversos órgãos, incluindo o cólon, os pulmões e a bexiga. O papel da PGE2 na carcinogênese tem sido corroborado por diversos estudos com camundongos com deleção dos receptores EP1-4 (Kundu; Surh, 2008).

Em 1995, Snyderman et al. avaliaram os níveis de PGE2 em espécimes de CECP removidos de pacientes submetidos à cirurgia como tratamento para o CECP. Os autores compararam os níveis de PGE2 no tecido tumoral, na mucosa normal adjacente e nos linfonodos tanto positivos quanto negativos para metástases, e mostraram não haver diferenças estatisticamente significativas nos níveis de PGE2 entre os tecidos tumorais e a mucosa normal (Snyderman et al., 1995). Em 2004, Camacho et al. analisaram a expressão relativa do mRNA (RNA mensageiro) dos receptores de PGE2, da COX-1 e da COX-2 em fragmentos de CECP. A comparação do CECP com a mucosa normal mostrou haver maiores níveis de COX-2, EP1, EP3 e EP4 nos tumores quando comparados à mucosa normal. O receptor EP2 e a COX-1 não mostraram diferenças significativas entre os tecidos tumorais analisados e a mucosa normal (Camacho et al., 2008).

Em 2002, Gallo et al. avaliaram os níveis de PGE2 secretada nos CECPs em diferentes áreas tumorais e mostraram haver maiores níveis de PGE2 em pacientes com metástases quando comparados com pacientes sem metástases. Também mostraram que pacientes com elevados níveis de PGE2 secretada na margem tumoral apresentaram elevado índice de recorrência e menor sobrevida, quando comparados com pacientes com baixos níveis de PGE2 secretada na mesma localização (Gallo et al., 2002).

Inúmeros trabalhos mostram por diferentes análises que a COX-2 é superexpressa nos CECP, incluindo os carcinomas de cavidade oral (Chan et al., 1999; Gallo et al., 2001; Gallo et al., 2002; Molinolo et al., 2007; Weber et al., 2007; Soland et al., 2008). Estudos têm relacionado a COX-2 ao prognóstico dos CECPs. Gallo et al. em 2002 mostraram que a superexpressão da COX-2 em CECPs estava relacionada à tumores mais agressivos e em estágios avançados. Complementando esses resultados, os autores mostraram por análise de sobrevivência que pacientes com baixo percentual de células tumorais positivas para COX-2 apresentaram melhor prognóstico do que os com superexpressão da mesma (Gallo et al., 2002).

Soland et al em 2008 relataram a expressão da COX-2 tanto nas células tumorais de CECP quanto nas células estromais. Os autores correlacionaram a expressão da COX-2 com a expressão da proteína Erk1/2, e relataram haver uma correlação entre a expressão de ambas na região de frente invasivo. Relataram ainda que a COX-2 não teve correlação com as taxas de sobrevida dos pacientes num período de 5 anos.

Em 2009 Hoshikawa et al. demonstraram por meio de PCR quantitativo a presença de níveis elevados de mRNA de COX-2 em peças cirúrgicas e em duas linhagens celulares de CECP. Mostraram também que as linhagens celulares secretavam PGE2. Também analisaram os níveis de mRNA dos receptores de PGE2, e mostraram que grande parte dos casos apresentava níveis detectáveis de mRNA dos receptores EP3 e EP4. Níveis detectáveis de mRNA dos receptores EP1 e EP2 foram encontrados em pouco menos da metade dos casos analisados. O mesmo padrão foi observado para as linhagens celulares de CECP, com baixos níveis de mRNA dos receptores EP1 e EP2. No mesmo trabalho os autores demonstraram que tanto os inibidores de COX-2 quanto uma droga antagonista do receptor EP3 inibem o crescimento celular de forma dose-dependente, mas essa inibição é menos eficaz para o antagonista do EP3. No entanto, somente o inibidor

de COX-2 reduziu significativamente os níveis de PGE2 secretada pelas células de CECp (Hoshikawa et al., 2009).

Recentemente, Husvik et al (2009) mostraram que linhagens celulares de CECp expressam, constitutivamente, variados níveis protéicos e de mRNA de COX-2. Independente dos níveis de COX-2, todas as linhagens mostraram aumento nos níveis de expressão da COX-2 quando estimuladas com EGF. Este estudo mostrou ainda que a secreção de PGE2 nas linhagens de CECp é dependente da COX-2 e é aumentada quando estimulada pelo EGF. Essa dependência foi demonstrada com a inibição da secreção de PGE2 frente à interferência de RNA para a COX-2 (Husvik et al., 2009).

O tratamento com NSAIDs que inibem a COX-1 e/ou a COX-2 pode reduzir o risco e a incidência de alguns cânceres. Atualmente acredita-se que a superexpressão de COX-2 e a inflamação crônica desempenhem um importante papel no desenvolvimento tumoral. Por exemplo, a inibição da COX-2 reduz o número e o tamanho de adenomas em pacientes com mutação no gene supressor tumoral APC, que possuem maior propensão ao desenvolvimento de câncer de cólon. A inibição da COX-2 pelos NSAIDs pode representar uma efetiva estratégia quimiopreventiva para o câncer de cólon em indivíduos saudáveis, embora os efeitos colaterais desses agentes devam ser considerados (Dorsam; Gutkind, 2007).

Inúmeros estudos clínicos tentam comprovar a efetividade da inibição da COX-2 como uma terapia adjuvante tanto para cânceres em estágio precoce quanto em estágio tardio (Dorsam; Gutkind, 2007). A correlação entre os NSAIDs e o câncer de cólon tem sido amplamente relatada, mostrando que pacientes que usam NSAIDs por um período prolongado apresentam regressão de pólipos no cólon (Mohan; Epstein, 2003; Castellone et al., 2005).

Os inibidores de COX-2 reduzem a produção de prostaglandinas e outros eicosanóides, aumentam a apoptose, reduzem a angiogênese, a metástase e inibem o crescimento celular e a proliferação (Mohan; Epstein, 2003). Tanto em estudos com animais quanto em estudos clínicos, o celecoxib, um inibidor seletivo da COX-2, mostrou ser capaz de reduzir significativamente o número de pólipos intestinais em pacientes com adenopoliptose familiar e de reduzir a incidência, o número e o tamanho de adenocarcinomas em ratos (Mohan; Epstein, 2003).

As propriedades antineoplásicas do celecoxib são atribuídas à sua habilidade de inibir a COX-2 diretamente ligando-se ao seu sítio ativo. Entretanto,

outros estudos sugerem que o celecoxib atue por mecanismos independentes à COX-2, como a inibição da ativação do Akt (Lev-Ari et al., 2007).

Os mecanismos pelos quais os NSAIDs interferem com o crescimento tumoral ainda não foram totalmente elucidados, mas pode envolver o bloqueio da atividade das COXs, suprimindo a produção de prostaglandinas e assim afetando a proliferação celular, a apoptose e a resposta imune (Gallo et al., 2002). Os NSAIDs podem ainda modular a expressão de componentes da via de sinalização dos prostanóides (Fujino et al., 2007). Fujino et al. Em 2007 demonstraram que a indometacina, um inibidor não seletivo de COX, é capaz de reduzir a formação de cAMP induzida pela PGE2 e reduziu a expressão de mRNA e do receptor EP2 em células de carcinoma de cólon. No entanto, a indometacina não foi capaz de reduzir os níveis de mRNA dos receptores EP3 e EP4 (Fujino et al., 2007).

Liu et al (2008) em estudo *in vivo* com pacientes com carcinoma de esôfago demonstraram haver uma modulação da via do NFκB por um inibidor seletivo de COX-2. Neste estudo foi demonstrada ainda a redução dos níveis de mRNA e de proteína COX-2 após o uso do inibidor seletivo de COX-2. Relataram ainda não haver inibição da proliferação celular, e um discreto aumento no número de células apoptóticas nos tumores de pacientes tratados com o NSAID (Liu et al., 2008).

Em CECP, tanto os inibidores seletivos quanto os não seletivos para COX-2 foram demonstrados como inibidores da secreção de PGE2 em linhagens celulares de CECP (Husvik et al., 2009).

Devido às complicações cardiovasculares causadas pelos inibidores seletivos de COX-2, a inibição direta das proteínas G ligadas aos receptores de PGE2 pode servir como uma alternativa à inibição da COX-2 como um meio de prevenção e tratamento do câncer (Dorsam; Gutkind, 2007). O bloqueio farmacológico desses receptores por antagonistas específicos diminui a formação de pólipos intestinais em camundongos com o gene APC superexpresso (Kundu; Surh, 2008).

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo teve como objetivos:

1. Avaliar a expressão da proteína COX-2 em 6 linhagens celulares de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (HN13, HN12, UMSCC17B, CAL27, OSCC3, HN6 e HN30) e em uma linhagem de queratinócito normal de boca imortalizado (NOK-SI).
2. Avaliar a secreção de PGE2 em três linhagens de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (HN13, HN12 e OSCC3) e na linhagem de queratinócito normal de boca imortalizado (NOK-SI).
3. Avaliar a ação dos inibidores de COX-2 celecoxib e indometacina na inibição da secreção de PGE2 em duas linhagens de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (HN13 e OSCC3).
4. Avaliar a expressão dos receptores de PGE2, EP1, EP2, EP3 e EP4, em 6 linhagens celulares de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (HN13, HN12, UMSCC17B, CAL27, OSCC3, HN6 e HN30) e em uma linhagem de queratinócito normal de boca imortalizado (NOK-SI).
5. Avaliar, por meio da técnica de imuno-histoquímica, a expressão da COX-2 e dos receptores de PGE2 EP1, EP2 e EP3, em fragmentos de biópsia de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.
6. Avaliar a ação da PGE2 na indução da proliferação celular em três linhagens de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (HN13, HN12 e OSCC3) e na linhagem de queratinócito normal de boca imortalizado (NOK-SI).
7. Avaliar a ação dos agonistas dos receptores EP2 (Butaprost) e EP3 (Sulprostone) na indução da proliferação celular em três linhagens de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (HN13, HN12 e OSCC3) e na linhagem de queratinócito normal de boca imortalizado (NOK-SI).
8. Avaliar o bloqueio do receptor EP2 através da técnica de interferência de RNA e sua influência no processo de proliferação celular.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório de Biologia Celular da Faculdade de Odontologia da USP, São Paulo, SP, Brasil e no National Institutes of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA.

4.1 CULTIVO CELULAR

Para o desenvolvimento desta tese foram usadas as seguintes linhagens celulares de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP): HN6, HN12, HN13, HN30, OSCC3, UMSCC17B, e Cal27 e como controle foi utilizada a linhagem de queratinócito humano de boca espontaneamente imortalizado NOK-SI. Todas as linhagens celulares foram cultivadas em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium – Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS – Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), em placas de cultura de 10cm de diâmetro. As linhagens celulares foram mantidas em incubadoras sob níveis controlados de temperatura (37°C), umidade, e concentração de CO₂. As células foram mantidas em semi-confluência não excedendo 70% de cobertura da área total das placas de cultura. Para o subcultivo, as células foram submetidas a lavagens com solução tampão fosfato-salina livre de cálcio e magnésio (Dubelco's Phosphate Buffered Solution – Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), e tripsinizadas usando uma solução contendo 0,5g de tripsina e 0,2g de EDTA (Trypsin EDTA solution - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Após o destacamento das células das placas, foi adicionado meio DMEM contendo FBS sobre as mesmas em suspensão para inativar a tripsina, seguido de centrifugação a 3.000 RPM por 10min. Após a centrifugação, a fase líquida foi removida e o precipitado celular ressuspensionado em novo meio de cultura. As células em suspensão foram plaqueadas em novas placas de cultura para o subcultivo ou para experimentos.

4.2 IDENTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES DE PGE2

4.2.1 *Western Blotting*

4.2.1.1 Lise de proteínas

As linhagens celulares HN6, HN12, HN13, HN30, OSCC3, UMSCC17B, NOK-SI e Cal27 foram plaqueadas em placas de 10cm à 70% de confluência. Após 24h de privação de FBS, as mesmas foram lisadas com tampão de lise de proteínas (0.2M Tris pH 7.5 (Quality Biological, Inc - Gaithersburg, MD); 0.7M SDS20% (Quality Biological, Inc - Gaithersburg, MD, USA); 14.3M 2-Betamercaptoetanol (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), raspadas das placas de cultura, coletadas em tubos de 1,5ml, sonicadas (Microson™ Ultrasonic cell Disruptor - Misonix, Farmingdale, NY, USA) e armazenadas à -80°C.

4.2.1.2 Estabelecimento de células a serem usadas como controle positivo

Os DNAs dos receptores EP1, EP2 e EP3 a serem usados como controles positivos da expressão dos receptores de prostaglandina EP1, EP2, EP3 e EP4 foram adquiridos do UMR cDNA Resource Center (University of Missouri-Rolla, Rolla, MO, USA; Tabela 4.1). O DNA do receptor EP4 e o vetor controle ligado à proteína fluorescente EGFP (*Enhanced Green Fluorescence Protein*) foram gentilmente cedidos pelo Dr. J. Silvio Gutkind (Oral and Pharyngeal Cancer Branch, National Institutes of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health; Tabela 4.1). As características dos referidos DNAs estão na tabela 4.1. Com o intuito de alcançar quantias suficientes de DNA para a transfecção de células, bactérias supercompetentes foram usadas para replicar os vetores contendo os DNAs de interesse. Para isso, três microlitros de DNA foram misturados à 50µl de bactéria competente *E. coli*, e incubados em gelo por 30 min. Posteriormente a mistura foi

aquecida a 42°C em banho-maria por 45 segundos e imediatamente resfriada em gelo por 2 min. Trezentos microlitros de meio S.O.C (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) foi então adicionado à mistura. Cinquenta microlitros foram espalhados em placas de agar (1,5% agar (Bacto™ Agar, BD Bioscience, San Jose, CA, USA) em meio LB Broth (Lauria-Bertani Broth - Quality Biological, Inc, Gaithersburg, MD, USA), com 1% de ampicilina (100µg/ml - Research Products International Corps., Mount Prospect, IL, USA), e incubados à 37°C por 18h com a placa invertida. O restante foi acrescido de glicerol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e congelado à -20°C. As colônias resultantes foram picadas/selecionadas e colocadas para crescer em meio LB Broth com 1% de ampicilina em tubos de 15ml, por 18 h à 37°C, sob agitação. Após esse período, os tubos foram centrifugados à 3200Xg por 15 minutos à 4°C (Allegra™ 6R Centrifuge - Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) e o precipitado bacteriano ressuspensionado em 200µl de solução de ressuspensão do kit GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), de acordo com as recomendações do fabricante.

Brevemente, ao precipitado homogeneizado foi adicionado solução de lise e os tubos foram invertidos até que a mistura ficasse clara e viscosa. Após 5min de incubação, foi adicionada solução neutralizante. Os tubos foram novamente invertidos e centrifugados por 10min à 20800Xg (Centrifuge 5417C, Eppendorf, Westbury, NY, USA). O sobrenadante foi transferido para colunas previamente preparadas e centrifugado por 1min à 20800Xg. As colunas então foram lavadas com solução de lavagem e novamente centrifugadas. Após o descarte do líquido, as colunas foram novamente centrifugadas e transferidas para um novo tubo coletor. A cada coluna adicionou-se água ultra pura para eluição do DNA. As colunas foram novamente centrifugadas (1min, 120800Xg), e o DNA eluído foi coletado, quantificado com Nanodrop (ND-100 Spectrophotometer - Thermo Scientific, Lafayette, CO - USA) e estocado a -20°C para uso futuro.

Células HEK293T (ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de solução antibiótica antimicótica. Vinte mil células foram plaqueadas em poços de placas de 6 poços. Três microgramas de DNA foram diluídos em DMEM livre de qualquer aditivo, e misturados à Polyfect Transfection Reagent (Quiagen - Valencia, CA, USA), segundo as recomendações do fabricante, e incubados por 10min. Após incubação, a mistura foi adicionada às células previamente plaqueadas, perfazendo um volume

final de um mililitro por poço. Após 6h, foi acrescentado meio de cultura para um volume de 2,5ml e as células foram deixadas em cultura por 3 dias. No terceiro dia, as células foram lisadas com tampão de lise de proteínas, conforme descrito anteriormente e armazenadas à -80°C.

Tabela 4.1 - Plasmídeos utilizados para superexpressão gênica nas células HEK 293T

Gene	Vetor	Clone	Resistência	Promotor	SR* 5'	SR* 3'	Tamanho do inserto
Prostaglandin E2 receptor 1 (subtype EP1) (PTGER1)	pcDNA3.1	PER010000	Ampicilina	CMV	EcoRI	XhoI	1290bp
Prostaglandin E2 receptor 2 (subtype EP2) (PTGER2) 3xHA-tagged (N-terminus)	pcDNA3.1	PER02TN00	Ampicilina	CMV	KpnI	XhoI	1161bp
Prostaglandin E2 receptor 3 (subtype EP3) (isoform VI) (PTGER3)	pcDNA3.1	PER3VI0000	Ampicilina	CMV	EcoRI	XhoI	1182bp
Prostaglandin E2 receptor 4 (subtype E4) (PTGER4)	pcDNA3.1	pcDNAIII-EP4	Ampicilina	CMV	-**	-	-
EGFP	pCEFL	pCEFL-EGFP	Ampicilina	-	Bgl II	Bgl II	-

*SR= Sítio de Restrição, ** informação não disponível

4.2.1.3 Reação de *Western Blotting*

De 30 à 40µg de proteína foram misturados à solução tampão de amostras e submetidas à eletroforese em gel de Bis-acrilamida (10 a 15%) em solução tampão Tris-glicina a 1% (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Os géis foram preparados com Protogel® (30% (w/v) Acrylamide; 0.8% (w/v) Bis-acrylamide stock solution (37.5:1); Protein and Sequencher Electrophoretic grade (gas stabilized) – National Diagnostics, Atlanta, GA, USA), conforme as recomendações do fabricante. Como marcador de peso molecular foi utilizado SeeBlue®Plus 2 Prestained Standard (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Após a eletroforese, as proteínas do gel foram transferidas, por transferência úmida (tampão Tris-glicina, metanol e água), para uma membrana de PVDF (Immobilion-P - Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) à 90V por 90min, à 4°C. A membrana então foi bloqueada com solução de leite desnatado à 5% em TBS-T (TBS pH 7,4 (Quality Biological, Inc, Gaithersburg, MD, USA) e 0,5% de

Tween 20 (Sigma Adrich, St. Louis, MO, USA) por 45 min sob agitação e incubadas por 18 h à 4°C, sob agitação, com o anticorpo primário (Tabela 4.2), diluído em solução de leite desnatado à 5% em TBS-T ou em solução de BSA (Albumin, Bovine Serum, Cohn Fraction V, pH7 - US Biological, Swampscott, MA, USA) à 5% em TBS-T, de acordo com as especificações de cada anticorpo. Seguiram-se então três lavagens de 5 min cada com TBS-T, sob agitação, e incubação do anti-corpo secundário (Tabela 4.2), diluído na mesma solução utilizada para o anticorpo primário, por 45min, sob agitação. Por fim, a membrana foi novamente submetida à três lavagens de 5 min cada em TBS-T sob agitação e revelada com SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, USA) ou Immobilon™ Western Chemiluminescent AP Substrate (Millipore, Billerica, MA, USA) em filme para autoradiografia Kodak BioMax XAR (Carestream Health, INC., Rochester, NY, USA). Os filmes foram revelados em processadora automática (Kodak X-Omat 2000).

4.2.2 Imuno-histoquímica

Dois tipos diferentes de *Tissue Micro Arrays* (TMA), um contendo 226 e o outro, 236 amostras de CECP foram previamente preparados e gentilmente cedidos por Dr. Alfredo Molinolo e Dr. J. Silvio Gutkind (Oral and Pharyngeal Cancer Branch, National Institute of Dental Research, National Institutes of Health) (Molinolo et al., 2007).

Inicialmente os cortes foram mantidos em estufa à 60°C por 30 min. Após este período foram realizados três banhos, de 15min cada, em *SafeClear* (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA), 6 banhos de 5min em concentrações decrescentes de etanol (100%, 85% e 70%) (Sigma Adrich, St. Louis, MO, USA) e por fim um último banho de 5min em água destilada. Os cortes foram submetidos à recuperação antigênica com tampão citrato em microondas (dois minutos à potência máxima e 18min à potência mínima). Após atingirem a temperatura ambiente, foram lavados em água destilada por 5min e submetidos à bloqueio da peroxidase endógena, realizado com dois banhos de 15min em peróxido de hidrogênio 30% (Fisher

Scientific, Pittsburgh, PA, USA) diluído em metanol (Mallinckrodt Chemicals, Phillipsburg, NJ, USA). A solução foi trocada a cada banho. Seguiram-se duas lavagens com PBS por 5min cada e bloqueio de sítios inespecíficos com solução de BSA a 3%, diluído em PBS, por 1h à temperatura ambiente. Após o bloqueio, os cortes foram incubados com o anticorpo primário (Tabela 4.3), diluído em solução de bloqueio, *overnight* (18h) em câmara úmida, à 4°C. Os cortes foram lavados com PBS e incubados por 30min, em câmara úmida e à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário (Tabela 4.3), também diluído na solução de bloqueio. Novamente seguiram-se três lavagens com PBS e os cortes foram incubados com VECTASTAIN Elite ABC Kit Standard (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA), diluído em água ultra pura, por 30min, em câmara úmida à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS, os cortes foram revelados com diaminobenzidina (Fast Dab - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), contra corados com Hematoxilina de Mayer modificada (Hematoxylin QS - Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA), desidratados em banhos crescentes de álcool, clarificados em *safe clear*, e montados com Permount® (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA). As lâminas foram analisadas à microscopia óptica de luz.

As reações foram inicialmente otimizadas utilizando-se cortes de rim humano como controle positivo, seguido por reações com cortes de CECP, gentilmente cedidos pelo Dr. Alfredo Molinolo. Por fim a reação foi realizada nos TMAs.

Cada TMA foi capturado com ScanScope CS System (Aperio Technologies, Inc., Vista, CA) em aumento de 40x, para análise de cada tumor individualmente. Em cada tumor com marcação positiva, foi realizada contagem do número de células positivas a cada 100 células tumorais. Para análise estatística, foi utilizada uma escala de positividade, conforme descrito na tabela 4.4 e representado na figura 4.1.

Tabela 4.2 - Anticorpos utilizados para as reações de *western blotting*

Anticorpo	Clone	Tamanho	Origem	Diluição		Companhia
Anti EP1	101740*	42 kDa	Coelho, policlonal	1:500	0.15 µg/ml	Cayman Chemicals, Ann Harbor, MI, USA
Anti EP2	101750*	52 kDa	Coelho, policlonal	1:500	0.2 µg/ml	Cayman Chemicals, Ann Harbor, MI, USA
Anti EP3	H-200	62 kDa	Coelho, policlonal	1:250	0.8 µg/ml	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA
Anti EP4 (c-term)	101775*	65 KDa	Coelho, policlonal	1:500	0.2 µg/ml	Cayman Chemicals, Ann Harbor, MI, USA
Anti COX-2	33/Cox-2	70 kDa	Camundongo, monoclonal	1:250	1 µg/ml	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
Anti p-Akt ^{Ser473}	9272*	60 KDa	Coelho, policlonal	1:750	-	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
Anti Akt	9271*	60 KDa	Coelho, policlonal	1:1000	-	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
Anti P-p44/42 MAPK (Erk1/2) ^{Thr202/Tyr204}	20G11 *	42/44 KDa	Coelho, monoclonal	1:1000	-	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
Anti ERK2	C14	42/44 KDa	Coelho, policlonal	1:1000	0.2 µg/ml	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA
Anti Fos (9F6)	2250*	62 KDa	Coelho, monoclonal	1:1000	-	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
Anti p-c-Jun ^{Ser73}	9164*	48 KDa	Coelho, policlonal	1:1000	-	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
Anti c-Jun (N)	sc-45*	39 KDa	Coelho, policlonal	1:250	0.2 µg/ml	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA
Anti p-S6 Ribosomal Protein ^{Ser240/244}	2215*	32 KDa	Coelho, policlonal	1:750	-	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
Anti S6 Ribossomal protein	5G10 (2217*)	32 KDa	Coelho, policlonal	1:1000	-	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
Anti GAPDH	FL-335	37 kDa	Coelho, policlonal	1:1000	0.2 µg/ml	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA
Anti rabbit HRP	-	-	Ovelha	1:4000	0.025 µg/ml	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA
Anti mouse HRP	-	-	Ovelha	1:3000	0.033 µg/ml	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA

*número de catálogo

Tabela 4.3 - Anticorpos utilizados para as reações de imuno-histoquímica

Anticorpo	Origem	Clone	Localização	Diluição		Companhia
Anti-EP1	Coelho, Policlonal	-	Citoplasma	1:100	0.75 µg/ml	Cayman Chemicals, Ann Harbor, MI, USA
Anti-EP2	Coelho, Policlonal	-	Citoplasma	1:100	1 µg/ml	Cayman Chemicals, Ann Harbor, MI, USA
Anti-EP3	Coelho, Policlonal	H-200	Citoplasma	1:100	2 µg/ml	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA
Anti-COX-2	Camundongo, monoclonal	33/Cox-2	Citoplasma	1:100	2.5 µg/ml	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
Biotinylated Anti-Rabbit IgG (H+L)	Ovelha	-	-	1:400	3.75 µg/ml	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
Biotinylated Anti-Mouse IgG (H+L)	Ovelha	-	-	1:400	3.75 µg/ml	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA

Foi também utilizada a gradação de Broders para a classificação dos tumores em bem diferenciados (BD), moderadamente diferenciados (MD) e pouco diferenciados (PD), previamente realizada por Molinolo et al., (2007). Os dados foram submetidos a mais uma análise com o programa Gene Cluster 3.0 (Eisen et al., 1998), que agrupou os casos positivos em *clusters* de acordo com o percentual de células positivas e a correlação entre os anticorpos. Tal análise gerou um *heat map* pelo qual foi analisada a distribuição dos *clusters*.

Tabela 4.4 - Sistema de gradação utilizado para os TMAs.

Fonte: (Molinolo et al., 2007)

Grau	Critério
0	até 10% de células positivas
1	de 10 a 25% de células positivas
2	de 25 a 50% de células positivas
3	de 50 a 75% de células positivas
4	de 75 a 100% de células positivas

Os resultados foram submetidos à análise estatística, por meio do programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Foi utilizada a correlação de Spearman para comparar os anticorpos dois a dois. Foi realizada também a comparação entre as três gradações histológicas para um mesmo anticorpo, por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, onde as 3 gradações foram comparadas entre si. Concomitantemente foi realizado o pós-teste de Dunn para comparações múltiplas duas a duas. Por fim os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Mann Whitney. Os testes foram realizados num intervalo de confiança de 95%.

Figura 4.1 - Graus de positividade de acordo com o percentual de células positivas a cada 100 células tumorais. **A.** Grau 0, demonstrando de 0 a 10% de células tumorais positivas; **B.** Grau 1, demonstrando de 10 a 25% de células tumorais positivas; **C.** Grau 2, representando de 25 a 50% de células tumorais positivas; **D.** Grau 3, demonstrando de 50 a 75% de células tumorais positivas; e **E.** Grau 4, representando de 75 a 100% de células tumorais positivas. Imuno-marcações para o receptor EP3; aumento original 10x.

4.3 SECREÇÃO DE PGE2

Um milhão de células foram plaqueadas em placas de 10cm de diâmetro. Após 24 h, o meio foi substituído por 3ml de DMEM livre de FBS e acrescido de 1% HEPES (1M hepes Buffer ph 7.3 - Quality Biological, Inc - Gaithersburg, MD) e 1% de solução antibiótica-antimicótica, por placa. Após 24h, o meio foi coletado, centrifugado à 3200Xg por 5min e armazenado à -80°C.

Para quantificação da PGE2 secretada pelas células foi utilizado o kit Prostaglandin E2 EIA Kit – Monoclonal (Cayman Chemicals, Ann Harbor, MI, USA), que utiliza placa de 96 poços revestida com anticorpo anti-IgG (Goat polyclonal anti-

mouse IgG). A partir da PGE2 fornecida pelo kit, foi realizada uma curva padrão. A PGE2 foi reconstituída em solução tampão, também fornecida pelo kit, a uma concentração final de 10ng/ml. A curva padrão foi preparada a partir de diluições seriadas da solução estoque de PGE2 em DMEM acrescido de 1% HEPES e 1% de solução antibiótica-antimicótica, obtendo-se 8 diferentes concentrações: 1000pg/ml, 500pg/ml, 250pg/ml, 125pg/ml, 62,5pg/ml, 31,3pg/ml, 15,6 pg/ml, 7,8 pg/ml. Os resultados foram transformados em logaritmos para constituir uma curva padrão a ser usada na determinação da concentração PGE2 nas amostras. Devido à importância de se determinar a correta concentração de PGE2, este processo foi repetido cada vez que a reação foi realizada.

Para a realização do experimento foram utilizados, além dos padrões, dois poços vazios (branco), dois poços sem amostra (NSB), três poços representando atividade mínima de PGE2 (B_0) e um poço de atividade total de PGE2 (TA). Os dois poços “branco” foram deixados vazios até o final da reação. Os poços NSB foram preenchidos com DMEM (1% HEPES, 1% de solução antibiótica-antimicótica) e PGE2 AChE Tracer (Acetilcolinesterase conjugada a PGE2). Os poços B_0 foram preenchidos com DMEM (1% HEPES, 1% de solução antibiótica-antimicótica), PGE2 AChE Tracer e anticorpo monoclonal anti-PGE2. Os poços da curva padrão e das amostras foram preenchidos com PGE2 padrão ou amostra, PGE2 AChE Tracer e anti-corpo monoclonal anti-PGE2. O poço TA foi mantido vazio até o momento da revelação. A placa foi recoberta e incubada por 18h à 4°C. A reação baseia-se na competição entre AChE conjugada à PGE2 e a PGE2 livre nas amostras pelo anticorpo anti-PGE2. Após lavagem com solução tampão de lavagem fornecida pelo kit, os poços foram revelados com a adição de reagente de Ellman (acetilcolina e ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)) e PGE2 AChE Tracer foi adicionada ao poço TA. A placa foi novamente selada, protegida da luz, e incubada por 90min sob agitação. A revelação baseia-se na reação da AchE com o reagente de Ellman's, que produz ácido 5-tio-2-nitrobenzóico, de coloração amarela. Quanto mais amarelo o poço, menor a quantidade de prostaglandina presente na amostra. A revelação foi feita em leitora de placa de 96 poços (VICTOR3 V 1420 multilabel plate counter - Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) a 405nm.

Para o cálculo da PGE2 secretada, inicialmente foi realizada a média das leituras dos poços NSB e B_0 . Os valores foram subtraídos, a fim de se obter um valor corrigido da leitura. O mesmo foi feito para os valores da curva padrão e das

amostras. Para confecção da curva padrão foi calculada a porcentagem, dividindo-se a média do valor da leitura dos padrões ou das amostras pela média da leitura dos poços B_0 ($\%B/B_0$), e construído um gráfico logarítmico, com o uso do programa GraphPad Prism 5. O cálculo da concentração de PGE2 em cada amostra foi feito, colocando-se os valores da leitura na curva padrão e posteriormente transformando os valores logarítmicos. As concentrações foram comparadas com o controle, por meio do teste One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas dos tratamentos com o controle.

4.4 VIABILIDADE CELULAR

A ação biológica dos inibidores de COX foi avaliada a partir da quantidade de células viáveis pós-tratamento. Para tal, foram utilizados dois inibidores de COX: Celecoxib (Pfizer), inibidor seletivo de COX-2, e Indometacina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). O Celecoxib foi diluído em Dimetil Sulfóxido (DMSO - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) a uma concentração estoque de 50mM, e a Indometacina diluída em etanol 100%, também à 50mM. Diluições seriadas com os mesmos veículos foram realizadas para que concentrações menores das drogas pudessem ser utilizadas.

Oito mil células foram plaqueadas, em quadruplicata, em placa de 96 poços. Após aderirem à placa, as células foram privadas de FBS por 24h e posteriormente tratadas com diferentes concentrações de Celecoxib e Indometacina (1; 2,5; 5; 10; e 50 μ M) por 24h. Após esse período, adicionou-se MTS (CellTiter 96[®] AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay – Promega, Madison, WI, USA) em cada poço, seguindo-se incubação por 180min em estufa a 37°C/0,5% CO₂. A reação de MTS baseia-se na conversão do sal tetrazolium por NADH ou NADPH, produzido por células viáveis, em sal formazam que torna o meio azulado. Desse modo, o número de células viáveis será diretamente relacionado com a formação de sais formazam e com a intensidade da cor azul. A leitura da densidade óptica foi realizada em leitor de Elisa (VICTOR3 V 1420 multilabel plate counter - Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) usando filtro de 490nm. Os resultados foram plotados em gráfico linear com o uso do programa GraphPad Prism 5.

4.5 SÍNTESE DE DNA

Para o estímulo da síntese de DNA as células foram tratadas com PGE₂, dmPGE₂ (16,16- Dimetil Prostaglandina E₂), Butaprost (agonista específico para o receptor EP₂) e Sulprostone (agonista específico para o receptor EP₃) (Cayman Chemicals, Ann Harbor, MI, USA). Todos os reagentes foram reconstituídos em etanol 100% à concentração de 10mM. As diluições subsequentes foram também realizadas no mesmo veículo.

Vinte mil células foram plaqueadas em placas de 24 poços, e privadas de soro por 48h. Posteriormente as mesmas foram estimuladas com diferentes concentrações (escala logarítmica) de PGE₂, dmPGE₂, Butaprost e Sulprostone por 24h. Após 20h foi adicionado ao meio 0.5μCi de timidina tritiada (³H-TdR) (Thymidine, [methyl-³H] - aqueous solution - Perkin Elmer, Boston, MA, USA), seguindo-se incubação por mais 4h em estufa a 37°C/0,5% CO₂. As células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas por 10min com ácido tricloroacético (TCA) a 10% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) em gelo. Por conseguinte, as células foram novamente lavadas com TCA 10% por 5min e então lisadas com solução de hidróxido de sódio (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) à 0.3N por 1h à 37°C. Trezentos microlitros do lisado homogeneizado foram transferidos para tubos de cintilação contendo 4.7ml de líquido cintilador (CytoScint™ Liquid Scintillation Fluid, MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA). A leitura da incorporação de ³H-TdR ao DNA foi realizada em luminômetro LS 6000IC Liquid Scintillation Counter (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).

O experimento foi realizado em quadruplicata, tendo sido respeitadas todas as normas de segurança para a manipulação e descarte de material radioativo (sólido e líquido). Os resultados foram submetidos à análise estatística, por meio do teste t, onde os estímulos em suas diferentes concentrações foram comparados com o controle, num intervalo de confiança de 95%. Os testes foram realizados com o programa GraphPad Prism 5.

4.6 INTERFERÊNCIA DE RNA (siRNA)

A técnica da interferência de RNA (siRNA) foi utilizada para silenciar a expressão protéica do receptor 2 da PGE2 (EP2). Utilizou-se o siRNA ON-TARGET plus SMART pool siRNA L-005712-00-0005, Human PTGER2 (Dharmacon, Inc - Thermo Scientific., Lafayette, CO, USA), que foi ressuspendido a uma concentração estoque de 20 μ M e armazenado à -20°C. Como controle negativo da reação utilizou-se o AllStars Negative Control siRNA (Quiagen - Valencia, CA, USA).

As reações foram otimizadas em placas de 6 poços, onde cem mil células foram plaqueadas em cada poço. Após 24h, as células foram transfectadas com 100nM de siRNA ou do controle negativo AllStars. A transfecção foi realizada com o agente de transfecção HiPerFect (Quiagen - Valencia, CA, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Após 24 h, o meio foi substituído por DMEM suplementado com FBS, no qual as células permaneceram incubadas por mais 24h. Após esse período, foi coletado o lisado celular, cujas proteínas foram submetidas a western blotting para análise da eficiência do silenciamento.

O silenciamento gênico foi também utilizado para análise de síntese de DNA com ³H-TdR. Os procedimentos foram realizados conforme previamente descritos, porém em placa de 24 poços. As células transfectadas foram ainda suprimidas de FBS por 24h e posteriormente tratadas com dmPGE2 (3 μ M) por mais 24h. Por fim foi analisada a síntese de DNA, conforme descrito anteriormente no item 4.2.1.1.

5 RESULTADOS

5.1 COX-2, PGE2 E INIBIDORES DE COX-2

A expressão da COX-2 foi detectada tanto por western blotting nas linhagens de CECP quanto pela imuno-histoquímica nos TMAs. A expressão da proteína foi detectada nas linhagens NOK-SI, HN13, Cal27, UMSCC17B, e OSCC3, mas não nas linhagens HN12 e HN6 (Figura 5.1). Na linhagem HN30 foram observados baixos níveis de COX-2. Por meio da imuno-histoquímica, a proteína COX-2 foi amplamente detectada nos TMAs (Figura 5.6), onde dos 248 casos de CECP disponíveis para análise, 214 (86%) foram positivos (Figura 5.1) e 34 (14%) negativos. Analisando os TMAs, observou-se ainda que 41 casos (16%) foram graduados como 1 (10 a 25% de células positivas), 79 (32%) como 2 (25 a 50% de células positivas), 70 (28%) como 3 (50 a 75% de células positivas) e 24 (10%) como 4 (75 a 100% de células positivas), conforme demonstrado na tabela 5.1. De acordo com a gradação de Broders, 88 (36%) casos eram bem diferenciados, 87 (35%) moderadamente diferenciados, 65 (26%) pouco diferenciados e 8 (3%) não receberam gradação histológica. A distribuição dos casos de acordo com a quantidade de células positivas mostrou que a maioria dos casos se concentrou entre os grupos 2 (25 a 50% de células positivas) e 3 (50 a 75% de células positivas), conforme demonstrado na tabela 5.2. A distribuição dos casos de acordo com o número de células positivas e a gradação histológica está descrita na tabela 5.1.

Figura 5.1 - Expressão da proteína COX-2 na linhagem de queratinócito humano de boca imortalizado (NOK-SI) e nas linhagens de CECP HN13, HN12, UMSCC17, Cal27, OSCC3, HN6 e HN30. A expressão da proteína GAPDH foi utilizada como controle da expressão protéica.

Com base nesses resultados, investigou-se a quantidade de PGE2 secretada pelas células, por meio da análise dos níveis da mesma secretada no meio de cultura. Corroborando os achados do *western blotting*, as linhagens HN13 e OSCC3 apresentaram elevados níveis de PGE2 secretada (817pg/10⁶ células e 2828pg/10⁶ células, respectivamente; Figura 5.2). A linhagem HN12 apresentou baixos níveis de PGE2 (255.5pg/10⁶ células; Figura 5.2), bem como a linhagem de queratinócito normal imortalizado NOK-SI (229pg/10⁶ células; Figura 5.2). Por conseguinte, foi testada a eficácia dos inibidores de COX nessas quatro linhagens. As linhagens HN13 e OSCC3 mostraram uma grande inibição da secreção de PGE2 quando tratadas tanto com celecoxib quanto com Indometacina nas concentrações 1μM e 10μM por 24h (Figura 5.3). Tal redução foi estatisticamente significativa (p<0,001). No entanto, quando avaliada a viabilidade celular destas mesmas duas linhagens e também das linhagens NOK-SI e HN12, não só essas duas dosagens inicialmente testadas, mas também outras (2,5μM; 5μM) mostraram não ter ação biológica sobre as células, para ambas as drogas. A partir da dosagem 10μM observou-se uma diminuição no número de células viáveis. O tratamento com celecoxib à 50μM levou à morte de 95% das células, independente da linhagem analisada. Na mesma concentração a Indometacina continuou sem efeitos biológicos significativos sobre as células (Figura 5.4).

Figura 5.2 - Níveis de PGE2 secretada nas linhagens NOK-SI, HN13, HN12 e OSCC3.

Figura 5.3 - Inibição da secreção de PGE2 na linhagem HN13 pelos inibidores de COX celecoxib (COX-2 seletivo) e indometacina (não-seletivo). (***) $p < 0,0001$

Figura 5.4 - Curva de viabilidade celular com os inibidores de COX: celecoxib (COX-2 seletivo) e indometacina (não-seletivo).

5.2 EXPRESSÃO DOS RECEPTORES DE PGE2

A expressão de três dos receptores de PGE2, EP1, EP2 e EP3 foi identificada em algumas das linhagens de CCEP e no queratinócito normal de boca espontaneamente imortalizado (Figura 5.5) por *western blotting*. Nenhuma das linhagens celulares analisadas expressou o receptor EP4. Uma grande expressão do receptor EP1 foi identificada nas linhagens OSCC3 e UMSCC17B, sendo este também expresso nas linhagens NOK-SI, HN13 e Cal27. O receptor EP2 somente não se apresentou expresso na linhagem HN30, enquanto o receptor EP3 não se

mostrou expresso somente na linhagem UMSCC17B por *western blotting*. Diante desses resultados, optou-se por analisar apenas as linhagens NOK-SI, HN13, HN12 e OSCC3 nos experimentos seguintes.

Figura 5.5 - Expressão dos receptores de PGE2 EP1, EP2, EP3 e EP4 por *western blotting*. Células HEK-293T transfectadas com os DNAs dos respectivos receptores foram utilizadas como controle positivo da reação. A expressão da proteína GAPDH foi utilizada como controle da expressão protéica.

Duzentos e noventa e sete casos estavam disponíveis para análise do receptor EP1, 288 para o receptor EP2 e 289 para o EP3 (Figura 5.6). A expressão do receptor EP4 não foi avaliada por imuno-histoquímica. Para o receptor EP1, 39 (13%) casos foram negativos e 288 (87%) positivos. A contagem do número de células positivas a cada 100 células tumorais levou mostrou que 41 casos (14%) apresentavam de 10 a 25% de células positivas (1), 63 (21%) casos de 25 a 50% de células positivas (2), 72 (24%) casos de 50 a 75% de células positivas (3) e 82 (28%) casos de 75 a 100% de células positivas (4), conforme demonstrado na tabela 5.1. Dos 288 casos analisados para o receptor EP2, 11 (4%) foram negativos e 277 (96%) positivos. A gradação dos casos positivos de acordo com o número de células positivas mostrou que 20 casos (7%) foram classificados como 1, 41 casos (14%) como 2, 96 casos (33%) como 3, e 120 casos (42%) como 4. Duzentos e oitenta e nove casos (94%) foram positivos para o receptor EP3 e 17 (6%) negativos. Dos

casos positivos, 41 casos (14%) foram classificados como 1, 43 casos (15%) como 2, 82 casos (28%) como 3 e 106 casos (37%) como 4, conforme representado na tabela 5.1 e na figura 5.6.

Tabela 5.1 - Expressão imuno-histoquímica dos receptores de PGE2 (EP1, EP2 e EP3) e da COX-2 nos TMAs e divisão de acordo com o número de células positivas.

	EP1	EP2	EP3	COX-2
0	39 (13%)*	11 (4%)	17 (6%)	34 (14%)
1	41 (14%)	20 (7%)	41 (14%)	41 (16%)
2	64 (21%)	41 (14%)	43 (15%)	79 (32%)
3	75 (24%)	96 (33%)	82 (28%)	70 (28%)
4	93 (28%)	120 (42%)	106 (37%)	24 (10%)
Total	297	288	289	248

*Valor percentual de acordo com o número total de casos.

Os casos foram ainda graduados de acordo com a classificação de Broders, conforme apresentado na tabela 5.2. A maioria dos casos positivos para EP1, EP2 e EP3 foi classificada como BD ou MD (106 (37%) casos BD e 111 casos (38%) cada para o receptor EP1; 100 (36%) casos BD e 110 casos (39%) MD para o receptor EP2; e 102 casos (36%) BD e 112 casos (40%) MD para o receptor EP3). Em cada gradação histológica foi realizada ainda a divisão dos casos de acordo com o número de células positivas, o que permitiu avaliar que para o receptor EP1 28% dos casos BD apresentavam de 50 a 75% de células positivas e que 31% dos casos MD e 29% dos casos PD apresentavam de 75 a 100% de células positivas. Para o receptor EP2, 34% dos casos BD (34 casos), 46% dos casos MD (51 casos) e 46% dos casos PD (33 casos) apresentavam de 75 a 100% de células positivas. Da mesma forma, para o receptor EP3 a maioria dos casos apresentou de 75 a 100% de células positivas para os casos BD e MD (31 casos (35%) BD e 50 casos (45%) MD). A maioria dos casos PD apresentou de 50 a 75% de células positivas (24 casos (35%)), conforme descrito na tabela 5.2.

Figura 5.6 - **A.** Expressão imuno-histoquímica dos receptores EP1 (A.I), EP2 (A.II) e EP3 (A.III), e da COX-2 (A.IV) nos TMAs. Aumento original de 10x; no detalhe, aumento de 40x; **B.**Gráfico exibindo a distribuição dos casos disponíveis para análise nos TMAs, de acordo com o percentual de células positivas. Os dados estão expressos em porcentagem

Tabela 5.2 - Classificação dos TMAs de acordo com a gradação de Broders e número de células positivas.

	EP1			EP2			EP3			COX-2		
	BD	MD	PD	BD	MD	PD	BD	MD	PD	BD	MD	PD
0	16 (15%)**	14 (13%)	8 (11%)	3 (3%)	4 (4%)	4 (6%)	3 (3%)	7 (6%)	7 (10%)	15 (17%)	10 (11%)	9 (14%)
1	9 (8%)	18 (16%)	13 (18%)	9 (9%)	5 (5%)	6 (8%)	16 (16%)	15 (13%)	10 (15%)	13 (15%)	17 (20%)	9 (14%)
2	28 (27%)	20 (18%)	15 (21%)	20 (20%)	13 (12%)	7 (10%)	21 (21%)	14 (13%)	7 (10%)	28 (32%)	25 (29%)	22 (34%)
3	30 (28%)	25 (22%)	15 (21%)	34 (34%)	37 (33%)	21 (30%)	29 (28%)	26 (23%)	24 (35%)	31 (35%)	23 (26%)	14 (21%)
4	23 (22%)	34 (31%)	21 (29%)	34 (34%)	51 (46%)	33 (46%)	33 (32%)	50 (45%)	20 (30%)	1 (1%)	12 (14%)	11 (17%)
Total	106	111	72	100	110	71	102	112	68	88	87	65
*	(37%)	(38%)	(25%)	(36%)	(39%)	(25%)	(36%)	(40%)	(24%)	(37%)	(36%)	(27%)

BD: Bem Diferenciado; MD: Moderadamente diferenciado; PD: Pouco Diferenciado.

* 8 casos não foram classificados para o receptor EP1 e para COX-2; 7 casos não foram classificados para os receptores EP2 e EP3.

** Porcentagem sobre o número total de casos por gradação histológica.

A análise estatística mostrou haver uma forte correlação entre os anticorpos EP1 e EP2 ($p < 0,0001$, coeficiente de Spearman (r) = 0,3180, número de pares (n) = 278), e entre EP1 e EP3 ($p < 0,0001$, r = 0,3893, n = 280). Também foi observado correlação estatisticamente significativa entre os anticorpos EP1 e COX-2 (p = 0,0264, r = -0,1664, n = 178), e entre EP2 e EP3 (p = 0,0126, r = 0,1505, n = 274). Não foi observada correlação entre as imuno-marcações positivas entre os anticorpos EP2 e COX-2 (p = 0,0504, r = -0,1460, n = 180), e entre EP3 e COX-2 (p = 0,1702, r = 0,1024, n = 181), conforme demonstrado na tabela 5.3 a seguir.

Tabela 5.3 - Correlação de Spearman entre os anticorpos utilizados nos TMAs

	EP1	EP2	EP3	COX-2
EP1	-	$n = 278$ $p < 0,0001^{***}$	$n = 280$ $p < 0,0001^{***}$	$n = 178$ $p = 0,0264^*$
EP2	-	-	$n = 274$ $p = 0,0126^*$	$n = 180$ $p = 0,0504$
EP3	-	-	-	$n = 181$ $p = 0,1702$

* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; n = número de pares

A análise realizada através do *heat map* (Figura 5.6) mostrou *clusters* com os que apresentaram um maior percentual de células positivas para os receptores EP1 e EP3, incluindo poucos casos positivos para EP2. Confirmando a correlação

anteriormente observada, não foram formados clusters com casos positivos para COX-2.

Figura 5.7 - *Heat map*. Observa-se a formação de clusters correlacionando principalmente a expressão dos receptores EP1 e EP2. A escala categoriza o grau de positividade dos casos. Quanto mais próximo da cor verde, menor o percentual de células positivas. Quanto mais próximo ao vermelho, maior o percentual de células positivas

Foi realizada comparação entre as gradações histológicas, para cada anticorpo, considerando-se a porcentagem de células positivas para cada grau histológico. O teste de Kruskal-Wallis mostrou não haver diferenças entre os graus

histológicos para os quatro marcadores analisados, conforme demonstrado na figura 5.8. A análise pós-teste através do teste de Dunn mostrou não haver diferenças entre os pares analisados (BD x MD, BD X PD e MD x PD). A comparação dos pares dois a dois pelo teste de Mann Whitney mostrou diferença estatisticamente significativa apenas para entre os casos BD e MD para o anticorpo EP2 ($p=0,035$).

Figura 5.8 - Distribuição dos casos de acordo com a gradação histológica de Broders e o percentual de células positivas nos TMAs.

5.3 INDUÇÃO DA SÍNTESE DE DNA POR PGE2 e dmPGE2

Tanto a PGE2 quanto a dmPGE2 foram capazes de induzir a síntese de DNA em quatro linhagens celulares analisadas: NOK-SI, HN13, HN12 e OSCC3, tendo sido a dmPGE2 mais eficaz (Figura 5.8). A PGE2 estimulou a síntese de DNA de forma estatisticamente significativa apenas nas linhagens HN13 e OSCC3, tanto na concentração 3 μ M ($p<0,001$ para ambas as linhagens) quanto em 10 μ M ($p<0,05$), sendo a primeira concentração mais eficaz do que a última. Nas linhagens NOK-SI e HN12 não houve indução significativa da síntese de DNA pela PGE2 em nenhuma das concentrações testadas. A dmPGE2 mostrou-se mais eficaz na indução da síntese de DNA tendo em vista ter sido capaz de estimular significativamente todas

as quatro linhagens analisadas, havendo no entanto variação de concentrações ideais de acordo com a linhagem analisada. Para a linhagem NOK-SI houve indução significativa nas três concentrações testadas (1 μ M, $p<0,05$; 3 μ M e 10 μ M, $p<0,01$). Na linhagem HN13 a indução só foi significativa nas concentrações 1 μ M ($p<0,05$) e 3 μ M ($p<0,01$). Para a linhagem HN12, a indução da síntese de DNA pela dmPGE2 só foi significativa na concentração 10 μ M ($p<0,05$), enquanto na linhagem OSCC3, somente na concentração 3 μ M ($p<0,05$).

5.4 INDUÇÃO DA SÍNTESE DE DNA PELOS AGONISTAS DOS RECEPTORES EP2 (BUTAPROST) E EP3 (SULPROSTONE)

Os agonistas dos receptores tiveram ações distintas. O Sulprostone foi mais eficaz na indução da síntese de DNA do que o Butaprost, indicando uma maior participação do receptor EP3 neste processo do que o EP2 (Figura 5.7). A linhagem NOK-SI não teve a síntese de DNA induzida pelo Butaprost, mas sim uma indução estatisticamente significativa pelo Sulprostone, em todas as concentrações testadas (1 e 10 μ M, $p<0,05$; e 3 μ M, $p<0,01$), sugerindo uma maior participação do receptor EP3 nesse processo. Na linhagem HN13 houve uma indução estatisticamente significativa da síntese de DNA pelo Butaprost na concentração 3 μ M ($p<0,05$) e pelo Sulprostone na concentração 10 μ M ($p<0,05$), sugerindo que ambos os receptores podem estar envolvidos no estímulo à síntese de DNA. Na linhagem HN12 o Butaprost se mostrou mais eficaz, sendo estatisticamente significativo nas concentrações 1 e 3 μ M, e o Sulprostone apenas na concentração 3 μ M, sugerindo que o receptor EP2 possa ser o responsável pelo processo proliferativo nessa linhagem. O Butaprost reduziu drasticamente a síntese de DNA tanto na linhagem HN13 quanto na linhagem HN12 na concentração 10 μ M ($p<0,01$). Do mesmo modo, na linhagem OSCC3, o Butaprost reduziu a síntese de DNA nas três concentrações utilizadas (1 e 3 μ M, $p<0,05$; 10 μ M, $p<0,01$), enquanto o Sulprostone induziu o processo de síntese nas concentrações 3 μ M ($p<0,01$) e 10 μ M ($p<0,05$), sugerindo fortemente que o receptor EP3 esteja encarregado da indução desse processo nesta linhagem.

Figura 5.9 - Indução da síntese de DNA pela PGE2 e dmPGE2 através de ensaio de Timidina tritiada, **A.** Indução significativa da síntese de DNA pela dmPGE2 na linhagem NOK-SI; **B.** indução significativa da síntese de DNA tanto pela PGE2 quanto pela dmPGE2 na linhagem HN13; **C.** Indução significativa da síntese de DNA na linhagem HN12 apenas pela dmPGE2; **D.** Indução significativa da síntese de DNA tanto pela PGE2 quanto pela dmPGE2 na linhagem OSCC3. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

Figura 5.10 - Indução da síntese de DNA pelo agonista do receptor EP2 (Butaprost) e pelo agonista do receptor EP3 (Sulprostone) através de ensaio de Timidina tritiada, **A.** Indução significativa da síntese de DNA pelo Sulprostone na linhagem NOK-SI; **B.** indução significativa da síntese de DNA pelos agonistas de mambos os receptores EP2 e EP3; **C.** Indução significativa da síntese de DNA na linhagem HN12 pelo Butaprost; **D.** Indução significativa da síntese de DNA pelo Sulprostone (EP3) e redução da síntese pela ação do Butaprost (EP2) na linhagem OSCC3. (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001)

5.5 EFEITO DA INTERFERÊNCIA DE RNA SOBRE O RECEPTOR EP2

5.5.1 Eficiência da interferência de RNA sobre o receptor EP2

Após a transfecção das linhagens celulares NOKSI, HN13, HN12 e OSCC3 avaliou-se o efeito do siRNA para o receptor EP2 através da técnica de *western blotting*, com o intuito de verificar a redução na expressão protéica do receptor. As linhagens HN13 e OSCC3 mostraram uma discreta redução da expressão do receptor após 48 h. Entretanto o mesmo não pode ser observado para as linhagens NOK-SI e HN12, conforme observado na figura 5.11.

Figura 5.11 - Avaliação da eficiência do siRNA para o receptor EP2. Observa-se discreta redução da expressão do receptor nas linhagens HN13 e OSCC3, mas não nas linhagens NOK-SI e HN12.

5.5.2 Efeito biológico da interferência de RNA

Mesmo não sendo observada uma grande redução da expressão do receptor EP2, foi avaliado o efeito biológico da interferência de RNA sobre a síntese de DNA, através da incorporação de ^3H -TdR, para que os resultados obtidos pela adição dos agonistas para EP2 e EP3 fossem validados. Em conjunto avaliou-se os efeitos da indução da síntese de DNA pela dmPGE2 sobre as células transfectadas.

A análise dos resultados mostrou que para todas as quatro linhagens analisadas a indução de síntese de DNA pela PGE2 sobre as células transfectadas com o controle negativo foi o mesmo observado nas células não transfectadas, conforme demonstrado nos gráficos da figura 5.12.

Apesar de ter sido observado aumento da síntese de DNA na linhagem NOK-SI transfectada com siRNA para EP2, tal resultado não foi suficiente para comprovar que nesta linhagem o receptor EP2 não está diretamente relacionado à indução da proliferação de DNA. Nas linhagens HN13, HN12 e OSCC3 o siRNA mostrou não interferir significativamente sobre a proliferação celular. Como mesmo padrão observado nas células com controle negativo foi observado nas células com siRNA, os resultados foram interpretados como não significativos, indicando que o siRNA além de não reduzir significativamente a síntese protéica do receptor, não interferiu na síntese de DNA.

5.5.3 Efeito do siRNA para o receptor EP2 sobre proteínas reguladas por proteínas G

A ação do siRNA sobre a expressão das proteínas Akt, ERK, c-Fos, c-Jun e S6 foi analisada nas linhagens celulares NOK-SI e HN13. Conforme a figura 5.13, não foram observadas alterações significativas sobre a expressão das proteínas quando comparadas com as proteínas das células controle. O estímulo com dmPGE2 também não provocou alterações significativas na expressão das proteínas p-Akt, p-erk, fos, p-c-jun e p-S6 quando comparadas com as células não estimuladas tanto nas células com siRNA quanto nas células controle.

Figura 5.12 - Avaliação dos efeitos biológicos do siRNA para o receptor EP2 sobre a síntese de DNA nas linhagens NOK-SI, HN13, HN12 e OSCC3, estimuladas ou não com dmPGE2. Não foram observadas alterações significativas sobre a síntese de DNA em nenhuma das quatro linhagens

Figura 5.13 - Avaliação da ação do siRNA para o receptor EP2 na expressão de proteínas relacionadas à via de sinalização das proteínas G nas linhagens NOK-SI e HN13. Não foram observadas diferenças significativas na expressão das proteínas Akt, c-Fos, c-Jun, Erk e S6 após os a interferência de RNA e após estímulo com dmPGE2

6 DISCUSSÃO

A elucidação dos componentes de via de sinalização da prostaglandina E₂, bem como suas funções tanto em condições fisiológicas quanto patológicas vêm sendo um frequente alvo de investigação desde que se provou que a enzima prostaglandina sintase, conhecida como COX (ciclooxigenase) era um alvo de inibição de anti-inflamatórios não-esteroidais (Greenhough et al., 2009). Ações anti-inflamatórias dos prostanóides são observadas tipicamente na resposta alérgica e inflamatória e são usualmente reguladas por outros prostanóides que possuem ação pró-inflamatória. Isso pode explicar porque os anti-inflamatórios não esteroidais não possuem efeitos na resposta alérgica (Greenhough et al., 2009). Um exemplo é o antagonismo existente entre a PGD₂-DP e a via PGE₂-EP₃ na asma, ambos presentes no epitélio respiratório. A ativação do receptor EP₃ suprime genes relacionados à alergia (Greenhough et al., 2009).

Assim como outros prostanóides, a PGE₂ pode modular diversas etapas do processo inflamatório e coordenar todo o processo tanto na direção pro-inflamatória quanto anti-inflamatória. (Molinolo et al., 2007; Sugimoto; Narumiya, 2007)

Até o momento ainda não se sabe o quanto a inflamação é suficiente para o desenvolvimento do câncer, ou seja, se ela pode causar uma neoplasia na ausência de um agente carcinógeno externo (Dorsam; Gutkind, 2007). Em alguns processos neoplásicos como o câncer de cólon, o papel da PGE₂ e da ativação dos receptores EP₂ e EP₄ é bem estabelecido, bem como a importância do uso dos NSAIDs de forma preventiva ao desenvolvimento do carcinoma (Dorsan, 2007).

A importância da PGE₂ bem como de seus receptores no CECP permanece incerta, já que investigações sobre o mecanismo de ação dos mesmos não mostram, até o momento, resultados conclusivos sobre o papel desses receptores no CECP (Dorsam; Gutkind, 2007).

Para avaliar a via da PGE₂ no CECP e qual seu papel na proliferação e progressão tumoral, inicialmente foi avaliado a expressão protéica da COX-2, enzima responsável pela síntese das prostaglandinas, tanto nas linhagens de CECP quanto nos TMAs. Os resultados mostraram que, pela técnica de *western blotting*, nem todas as linhagens expressavam COX-2. Tal variação de expressão também foi recentemente relatada por Husvik et al. (2009) em linhagens originadas de

carcinoma epidermóide oral. Em 2008 Camacho et al. avaliaram os níveis de mRNA da COX-2 em fragmentos de biópsia de pacientes com CECP e relataram maiores níveis de mRNA da COX-2 nos tecidos tumorais em comparação à mucosa normal, suportando os resultados observados em células em cultura.

A expressão imuno-histoquímica da COX-2 nos TMAs foi observada em 86% dos casos. A superexpressão da COX-2 tem sido amplamente relacionada ao prognóstico em diversos cânceres, incluindo o CECP (Gallo et al., 2002; Itoh et al., 2003; Molinolo et al., 2007; Saba et al., 2009). Em 2002, Gallo et al. demonstraram a superexpressão de COX-2 em CECPs, onde 71% dos casos avaliados foram positivos. Relataram ainda uma tendência para a expressão da COX-2 em tumores em estágios avançados e histologicamente classificados como pouco diferenciados (Gallo et al., 2002). Em contrapartida, no presente estudo foi observada uma tendência a redução do número de casos positivos nos casos classificados histologicamente como PD. Itoh et al (2003) identificaram a superexpressão de COX-2 em carcinomas epidermóides de cavidade oral e demonstraram correlação direta entre a expressão da COX-2, o envolvimento de linfonodos e as recorrências do carcinoma. Em recente estudo, Saba et al. (2009) mostraram uma redução da COX-2 durante a progressão do CECP, com diferentes padrões de expressão entre as lesões cancerizáveis e o carcinoma invasivo. Entretanto, tal fato não foi observado no presente trabalho, pois diferenças estatisticamente significativas não foram encontradas na comparação entre a COX-2 e os graus histológicos de diferenciação tumoral ($p > 0,05$) e ainda lesões cancerizáveis não foram incluídas na amostra analisada.

A observação da expressão da COX-2 tanto nos tecidos tumorais quanto nas linhagens celulares de CECP sugeriu que a PGE2 estivesse sendo produzida e secretada nas células em cultura. A PGE2 poderia assim atuar de modo autócrino, influenciando a proliferação celular. Desse modo, foi avaliada a secreção de PGE2 em três linhagens celulares de CECP, com padrões diferentes de expressão da COX-2 e na linhagem de queratinócito normal de boca imortalizado. A linhagem OSCC3 exibiu os maiores níveis de PGE2 secretada, seguida por níveis mais baixos de PGE2 secretados pela linhagem HN13. A linhagem HN12 apresentou níveis baixos de PGE2, muito semelhantes aos níveis da linhagem de queratinócito normal NOK-SI. Tais resultados corroboram os achados prévios da expressão protéica de COX-2 por *western blotting*, no qual a OSCC3 e a HN13 exibiram expressão da

COX-2 e a HN12 não. A linhagem NOK-SI possui COX-2 constitutivamente expressa, mas níveis baixos de PGE₂, sugerido que apesar de expressa a COX-2 provavelmente não está constitutivamente ativa.

Em 2002, Gallo et al. relataram uma maior secreção da PGE₂ nos CECP do que na mucosa normal. Os autores compararam ainda diferentes áreas tumorais e mostraram que na área de frente invasivo os níveis eram maiores do que os da região central do tumor, e que os níveis de PGE₂ eram maiores em pacientes com linfonodos positivos, sugerindo a participação da PGE₂ nos processos de proliferação, invasão e metástase (Gallo et al., 2002). Em contrapartida, Schoun et al. em 2005 encontraram níveis maiores de PGE₂ secretada na mucosa adjacente ao tumor, sugerindo sua participação na progressão tumoral (Schoun et al., 2005). Em 2009 Hoshikawa et al. avaliaram os níveis de PGE₂ secretada e os níveis de mRNA de COX-2 em duas linhagens celulares de carcinoma epidermóide de boca. Os autores relataram a associação entre os níveis de mRNA de COX-2 e os níveis de PGE₂ secretada pelas linhagens analisadas (Hoshikawa et al., 2009). Apesar de não ter sido feita análise protéica da COX-2, os resultados apresentados por Hoshikawa et al. corroboram os resultados encontrados no presente estudo.

Tanto a expressão da COX-2 quanto a secreção de PGE₂ pelas células tumorais remetem à importância da inibição da COX-2 como uma importante estratégia para a quimioprevenção do CECP (Saba et al., 2009). Os inibidores seletivos e não seletivos da COX-2 têm sido avaliados quanto às suas propriedades anti-tumorais para diversos tipos de cânceres, incluindo o CECP. A ação dos NSAIDs COX-2 seletivos na quimioprevenção e no tratamento adjuvante do carcinoma de cólon é bem estabelecida (Castellone; Teramoto; Gutkind, 2006). No entanto, pouco se sabe a respeito dos mecanismos de ação e sobre quais vias tais drogas atuam nas células tumorais (Castellone; Teramoto; Gutkind, 2006). Estudos mostram que nos CECP doses elevadas de NSAIDs são capazes de atuar em algumas vias de sinalização celular, como a via do NFκB, reduzindo a expressão de proteínas que regulam importantes funções intracelulares e também reduzem a proliferação celular (Hoshikawa et al., 2009). No entanto, tais estudos ainda não são conclusivos e usam doses acima das terapêuticas. A máxima dose sérica de NSAIDs alcançada é de 10μM, enquanto os estudos relatam doses variando até 100μM.

A inibição da PGE2 pelos NSAIDs é alcançada com baixas doses (Lev-Ari et al., 2007). Lev-Ari et al (2007) demonstraram, em células de cólon, que doses tão baixas quanto 1µM ou menos são eficazes no bloqueio à PGE2. No presente estudo, as duas linhagens que secretam PGE2, HN13 e OSCC3, foram tratadas com dois NSAIDs: um seletivo para COX-2, o celecoxib, e outro não seletivo, a indometacina. Ambos foram testados em baixas concentrações 1µM e 10µM, as quais mostraram uma grande eficácia na inibição da PGE2. Trabalhos propõem que a PGE2 participe do processo de indução à proliferação celular. No entanto, a inibição da proliferação não foi observada quando baixas doses capazes de inibir a PGE2 foram aplicadas. A redução do número de células viáveis só começou a ser observada quando dosagens elevadas dos NSAIDs foram aplicadas, mostrando assim que baixas doses de NSAIDs são eficazes no bloqueio à PGE2, mas não possuem funções biológicas sobre as células de CECP. Liu et al. (2008) demonstraram que os NSAIDs são capazes de influenciar diversas vias de sinalização celular envolvidas no CECP, como a via do NFkB, relacionada à síntese da COX-2. Entretanto, as concentrações utilizadas não são compatíveis com os níveis séricos terapêuticos observados normalmente em um paciente em tratamento. Os resultados do presente estudo mostraram que mesmo em concentrações mínimas de NSAIDs são capazes de inibir a síntese de PGE2. Entretanto, em tais concentrações esses medicamentos não possuem efeitos biológicos, pois não alteram o número de células viáveis observados 24 h após o tratamento. Sendo assim, tais drogas provavelmente não são as melhores escolhas como adjuvantes terapêuticos no CECP.

Para que a PGE2 atue sobre as células, é necessária a presença de seus receptores específicos. Desse modo, a análise da presença dos receptores de PGE2 foi realizada pela técnica de *western blotting*, utilizando células com os respectivos DNAs superexpressos como controle positivo da reação. A expressão do receptor EP4 não foi observada em nenhuma das linhagens de CECP utilizadas, sugerindo que este não possui atividade neste tipo de lesão. O receptor EP1 mostrou-se expresso em quatro das 7 linhagens de CECP analisadas, enquanto os receptores EP2 e EP3 em 6 das 7 linhagens, sugerindo uma participação maior de ambos no CECP. A linhagem de queratinócito imortalizado NOK-SI mostrou a expressão dos três receptores. Foi observado ainda que uma mesma linhagem de CECP apresentou pelo menos dois tipos de receptores expressos, como por exemplo a HN13 e a HN12 que expressaram EP2 e EP3; e a OSCC3 que expressou os três

receptores. De forma diferente ao carcinoma de cólon, os receptores apontados como tendo significativo papel prognóstico no CECP são o EP1 e o EP3. O EP2 também é encontrado nos CECP, embora, mesmo que ainda não demonstrado, aparente não executar as mesmas funções que no carcinoma de cólon (Castellone et al., 2005; Hoshikawa et al., 2009).

A análise imuno-histoquímica dos TMAs mostrou que em um mesmo caso de CECP foi possível observar a expressão positiva de pelo menos dois dos três receptores de PGE2. Essa correlação dos anticorpos entre si foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Comparando o percentual de células positivas para cada receptor foi observado que, para os três receptores, a maioria dos casos apresentou de 50 a 75% de células positivas, mostrando que a maioria das células de CECP possui os receptores expressos. A relação da expressão os receptores com a agressividade tumoral só pode ser realizada através da gradação histológica de Broders, já que os TMAs foram construídos com fragmentos de biópsias, os quais foram previamente graduados por Molinolo et al. (2007). Outras gradações mais confiáveis como a gradação de Bryne (Bryne et al., 1989; Bryne et al., 1991), que gradua os tumores de acordo com o fronte de invasão, não pode se realizada já que não se dispunha das peças cirúrgicas para análise. Apenas 25% dos casos (72 casos) classificados como PD fora, positivos para o receptor EP1, 25% (71 casos) para o receptor EP2 e 27% (65 casos) para p receptor EP3. Comparando as gradações histológicas entre si não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$) para os três receptores. Só foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre o número de casos positivos graduados como BD e MD para o receptor EP2, com maior numero de casos MD. Comparando a gradação histológica com o percentual de células positivas foi observado que para os três receptores, a maioria dos casos PD foram classificados como grau 3 ou 4.

A comparação da expressão dos receptores com a da COX-2 mostrou que a maioria dos casos positivos para COX-2 apresentavam de 25 a 50% de células tumorais marcadas, enquanto para os receptores EP1, EP2 e EP3, a maioria dos casos apresentaram de 75 a 100% das células marcadas. Além disso, grande parte dos casos positivos pra COX-2 graduados histologicamente como PD apresentavam poucas células tumorais positivas (grau 2), enquanto para os receptores foi observado um maior número de células positivas (graus 3 e 4) nos casos PD. Tal fato sugere que a COX-2 possa estar mais expressa nos casos menos agressivos,

enquanto os receptores, nos casos mais agressivos. Tal fato é suportado pelo achado de que não foi encontrada correlação entre os casos positivos para COX-2 e os casos positivos para os receptores EP2 e EP3 ($P > 0,05$). Somente foi observada correlação entre os casos positivos para o receptor EP1 e a COX-2 ($P < 0,05$), e entre os três receptores entre si ($p < 0,05$). Tal fato fica claro no *heat map* que não mostrou a formação de clusters com a COX-2.

A PGE2 é secretada em maiores quantidades pelas células inflamatórias presentes no microambiente tumoral, executando uma função parácrina sobre as células tumorais (Greenhough et al., 2009; Wang et al., 2009). A expressão dos receptores EP1, EP2 e EP3 em linhagens celulares sugere que a secreção de PGE2 pelas células tumorais também atue na ativação dos mesmos, executando função autócrina. A mensuração da PGE2 secretada mostrou níveis elevados da mesma nas linhagens HN13 e OSCC3, e baixos níveis na linhagem HN12. No entanto, todas as três linhagens apresentaram os receptores expressos, sugerindo que a função autócrina da PGE2 possa ocorrer somente em algumas lesões, ou que não esteja relacionada ao processo de manutenção e proliferação tumoral. Além disso, não deve ser descartada a hipótese de que esses receptores, embora expressos, não estejam ativos.

A função parácrina da PGE2 foi analisada através da adição de PGE2 sintética às células em cultura, com a leitura final de sua influência no processo de proliferação celular. As linhagens estudadas apresentaram um discreto, embora significativo ($p < 0,05$), aumento da proliferação quando estimuladas tanto com PGE2 quanto com dmPGE2, embora a PGE2 só tenha induzido a proliferação nas linhagens HN13 e OSCC3, enquanto a dmPGE2 agiu sobre as três linhagens de CECP (HN13, HN12 e OSCC3) e no queratinócito normal de boca imortalizado (NOK-SI). Em 2006, Thomas et al. demonstraram que a PGE2 induzia a proliferação celular em linhagens de CECP. Relataram ainda que essa indução é dependente do EGFR (Thomas et al., 2006).

Para a indução da proliferação pela PGE2 é necessária a ativação um de seus receptores (Dorsam; Gutkind, 2007). As linhagens de CECP utilizadas, HN13, HN12 e OSCC3 possuem os receptores EP2 e EP3 constitutivamente expressos. Desse modo para saber qual receptor realmente seria o responsável por estimular a proliferação foram utilizados agonistas específicos para cada um deles. Foi observada uma maior associação do receptor EP3 com o processo proliferativo nos

CECPs, já que o sulprostone (agonista específico de EP3) promoveu um aumento significativo na proliferação celular nas linhagens HN13, HN12, OSCC3 e NOK-SI. Tal achado confirma observações de trabalhos anteriores como o de Hoshikawa et al. (2009) que mostraram a inibição da proliferação de células de carcinoma epidermóide oral por um antagonista específico de EP3.

Entretanto técnicas mais específicas são necessárias para comprovar qual receptor é responsável pela indução da proliferação no CECP. O bloqueio dos receptores de PGE2 pela técnica de interferência de RNA (siRNA) não é amplamente usada. Estudos tanto com CECP quanto com outros tipos de carcinoma utilizam antagonistas para o bloqueio das funções dos receptores (Jain et al., 2008; Hoshikawa et al., 2009; Kuo et al., 2009). Poucos são os trabalhos que mostram o bloqueio dos receptores por siRNA (Jain et al., 2008; O'Callaghan et al., 2008; Banu et al., 2009), e, até a presente data, nenhum trabalho com CECP foi publicado. Em 2008, O'Callaghan et al. mostraram, em células de câncer de cólon, o bloqueio dos receptores EP1, EP2 e EP4 por meio de siRNA e demonstraram que os mesmos reduziram os níveis de mRNA do Fas-L, mas não causaram alterações significativas na sua expressão protéica. Ainda em 2008, Jain et al. mostraram uma discreta redução da expressão do receptor EP2 através de siRNA em células de câncer de próstata. Entretanto, os autores não demonstraram efeitos biológicos significativos do bloqueio com o siRNA. Resultados significativos foram somente alcançados como uso de um inibidor específico de EP2, o qual interferiu na proliferação e na migração celular (Jain et al., 2008). Recentemente, Banu et al. (2009) demonstraram que a inibição do receptor EP2 por siRNA em células de endométrio foi capaz de induzir a apoptose. O bloqueio do receptor EP3 por siRNA ainda não foi demonstrado na literatura.

No presente trabalho o bloqueio do receptor de EP2 através de siRNA mostrou uma discreta diminuição na expressão do EP2 nas linhagens HN13 e OSCC3. Não foram observadas alterações nas linhagens HN12 e NOK-SI. Quando as células foram transfectadas com o siRNA e posteriormente estimuladas com dmPGE2, não foram observadas diferenças significativas sobre a proliferação em comparação com as células controle, sugerindo tanto uma baixa eficiência no bloqueio do receptor, conforme anteriormente observado por *western blotting*, quanto uma não relação do receptor EP2 com o processo proliferativo no CECP. A falha na inibição do receptor EP2 pode ter ocorrido por uma série de fatores que

incluem o fato de os receptores de PGE2 serem GPCRs, que são proteínas transmembrana constituídas por 7 α -hélices transmembrana, que os torna proteínas muito estáveis na membrana celular (Dorsam; Gutkind, 2007). Desse modo, conforme demonstrado por O'Callagan et al. (2008), o siRNA para EP2 reduz significativamente os níveis de mRNA do receptor, mas não tem efeitos significativos sobre a expressão protéica.

A ativação dos receptores de PGE2 leva à ativação das proteínas G acopladas aos mesmos, que podem ativar diversas vias de sinalização envolvidas nos processos de sobrevivência e proliferação tumoral (Dorsam; Gutkind, 2007). Segundo Husvik et al (2009), a ativação do EGF induz a síntese de COX-2 e consequentemente aumenta a produção de PGE2 em linhagens de carcinoma epidermóide oral. A PGE2 pode ainda amplificar a ativação do EGF, pois promove a transativação do EGFR (Husvik et al., 2009). Em carcinomas de cólon a transativação do EGFR induzida pela PGE2 pode também levar ao acúmulo de células T, o que pode inibir a resposta imune ao câncer (Husvik; Bryne; Halstensen, 2009). A elucidação das vias de sinalização utilizadas na produção de PGE2 dependente da COX-2 e induzida pelo EGF pode identificar vias de sinalização câncer-específicas, que poderiam ser potenciais alvos de ação terapêutica (Husvik; Bryne; Halstensen, 2009). No CECP a PGE2 pode induzir a atividade da MAPK. Entretanto, pouco se sabe sobre outras vias induzidas pela PGE2 no CECP (Husvik; Bryne; Halstensen, 2009). Nos CECP, incluindo os carcinomas epidermóides orais, via da MAPK está frequentemente ativada, sendo observada superexpressão das proteínas ERK1/2 (Aguzzi et al., 2009).

Em 2008, Jain et al. demonstraram que a PGE2 é capaz de ativar a via do Akt em células endoteliais (HUVEC), e que a inibição do receptor EP2 por seu antagonista específico é capaz de reverter essa ativação. A PGE2 também é capaz de ativar o complexo AP-1 (c-Jun/c-Fos) em linhagens de câncer de próstata (Jain et al., 2008). Em câncer de cólon a PGE2 ativa a via da β -catenina através do receptor EP2 (Castellone et al., 2005). De acordo com Castellone et al (2005) a ativação do receptor EP2 pela PGE2 ativa a proteína G acoplada ao mesmo. A subunidade $G_{\alpha s}$ ativa a via da β -catenina, enquanto a subunidade $G_{\beta\gamma}$ ativa a via PI3k/Akt (Castellone et al., 2005).

As proteínas Fos e Jun constituem o fator de transcrição AP-1, que regula a transcrição de genes alvo positivamente ou negativamente (de Sousa et al., 2002).

Frente à diferentes estímulos, como os fatores de crescimento, a expressão das proteínas c-Fos e c-Jun é rapidamente induzida de modo transiente (de Sousa et al., 2002). A ativação oncológica de diversas vias de transdução de sinais pode resultar na atividade aumentada do AP-1. Em 2002, de Sousa et al. demonstraram a superexpressão de c-Jun e c-Fos em fragmentos de biópsia de mucosa normal e de carcinoma epidermóide oral, sugerindo sua participação na carcinogênese oral.

A interrelação entre essas vias e a PGE2 ainda não foi explorada para o CECP. No presente estudo foi avaliada a influência da PGE2 sobre a ativação das proteínas Akt, Erk, c-Jun, c-Fos e S6 na linhagem HN13 e na linhagem de queratinócito normal imortalizado NOK-SI. Na linhagem NOK-SI não foram observadas alterações na expressão das proteínas, o mesmo sendo ocorrendo para a linhagem HN13. Quando submetidas à siRNA para o receptor EP2 e estimuladas com dmPGE2 também não foram notadas diferenças na expressão das proteínas, quando comparadas com a expressão das mesmas em células não estimuladas. Tal observação sugere que a PGE2 não interfere nas vias das proteínas Akt, Erk, c-Jun, c-Fos e S6 no CECP, e que o receptor EP2 não está envolvido na regulação das mesmas.

7 CONCLUSÕES

1. A expressão da proteína COX-2 foi observada em 5 linhagens celulares de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço HN13, UMSCC17B, CAL27, OSCC3 e HN30; e na linhagem de queratinócito normal de boca imortalizado (NOK-SI).
2. Duas linhagens de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, HN13 e OSCC3, apresentaram elevados níveis de PGE2 secretada, enquanto níveis reduzidos de PGE2 foram observados na linhagem de CECP HN12 e no queratinócito normal de boca imortalizado (NOK-SI).
3. Baixas doses (1 μ M e 10 μ 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 μ M).
4. Quatro das 7 linhagens de CECP (HN13, UMSCC17B, Cal27 e OSCC3) apresentaram expressão do receptor EP1. A expressão dos receptores EP2 e EP3 foi observada em 6 das 7 linhagens de CECP. O receptor EP2 foi identificado nas linhagens HN13, HN12, UMSCC17B, Cal27, OSCC3 e HN6, enquanto o receptor EP3 nas linhagens HN13, HN12, Cal27, OSCC3, HN6 e HN30. A expressão do receptor EP4 não foi identificada em nenhuma das 7 linhagens de CECP.
5. A análise imuno-histoquímica mostrou que a maioria dos casos de CECP dos *tissue microarrays* foram positivos para COX-2 e para os receptores EP1, EP2 e EP3.
6. Tanto a PGE2 quanto a dmPGE2 induziram a proliferação celular. A PGE2 induziu a proliferação em duas das três linhagens de CECP (HN13 e OSCC3) e no queratinócito normal de boca imortalizado (NOK-SI), enquanto a dmPGE induziu a proliferação nas três linhagens de CECP (HN13, HN12 e OSCC3) e no queratinócito normal de boca imortalizado (NOK-SI).

7. O agonista do receptor EP2 (Butaprost) induziu a proliferação celular nas linhagens HN13 e HN12, enquanto o agonista do receptor EP3 (Sulprostone) induziu a proliferação celular nas três linhagens de CECp (HN13, HN12 e OSCC3) e no queratinócito normal de boca imortalizado (NOK-SI).
8. O bloqueio do receptor EP2, realizado por meio da técnica de interferência de RNA, mostrou apenas uma discreta inibição do receptor nas linhagens HN13 e OSCC3, não reduziu a proliferação celular e não influenciou a expressão das proteínas de vias relacionadas à proteína G associada ao EP2.

REFERÊNCIAS³

Aguzzi A, Maggioni D, Nicolini G, Tredici G, Gaini RM, Garavello W. MAP kinase modulation in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Anticancer Res.* 2009 Jan;29(1):303-8.

Banu SK, Lee J, Speights VO, Jr., Starzinski-Powitz A, Arosh JA. Selective inhibition of prostaglandin E2 receptors EP2 and EP4 induces apoptosis of human endometriotic cells through suppression of ERK1/2, AKT, NFkappaB, and beta-catenin pathways and activation of intrinsic apoptotic mechanisms. *Mol Endocrinol.* 2009 Aug;23(8):1291-305.

Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 1989 Sep;18(8):432-7.

Bryne M, Nielsen K, Koppang HS, Dabelsteen E. Reproducibility of two malignancy grading systems with reportedly prognostic value for oral cancer patients. *J Oral Pathol Med.* 1991 Sep;20(8):369-72.

Camacho M, Leon X, Fernandez-Figueras MT, Quer M, Vila L. Prostaglandin E(2) pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2008 Sep;30(9):1175-81.

Castellone MD, Teramoto H, Gutkind JS. Cyclooxygenase-2 and colorectal cancer chemoprevention: the beta-catenin connection. *Cancer Res.* 2006 Dec 1;66(23):11085-8.

Castellone MD, Teramoto H, Williams BO, Druey KM, Gutkind JS. Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis. *Science.* 2005 Dec 2;310(5753):1504-10.

Chan G, Boyle JO, Yang EK, Zhang F, Sacks PG, Shah JP, et al. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res.* 1999 Mar 1;59(5):991-4.

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 Sep;45(9):743-6.

Curado MP, Hashibe M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol.* 2009 May;21(3):194-200.

³ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Davies L, Welch HG. Epidemiology of head and neck cancer in the United States. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006 Sep;135(3):451-7.

de Sousa SO, Mesquita RA, Pinto DS, Jr., Gutkind S. Immunolocalization of c-Fos and c-Jun in human oral mucosa and in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2002 Feb;31(2):78-81.

Dorsam RT, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007 Feb;7(2):79-94.

Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Dec 8;95(25):14863-8.

Fortier MA, Krishnaswamy K, Danyod G, Boucher-Kovalik S, Chapdalaine P. A postgenomic integrated view of prostaglandins in reproduction: implications for other body systems. *J Physiol Pharmacol*. 2008 Aug;59 Suppl 1:65-89.

Fujino H, Chen XB, Regan JW, Murayama T. Indomethacin decreases EP2 prostanoid receptor expression in colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Aug 3;359(3):568-73.

Fulton AM, Ma X, Kundu N. Targeting prostaglandin E EP receptors to inhibit metastasis. *Cancer Res*. 2006 Oct 15;66(20):9794-7.

Gallo O, Franchi A, Magnelli L, Sardi I, Vannacci A, Boddi V, et al. Cyclooxygenase-2 pathway correlates with VEGF expression in head and neck cancer. Implications for tumor angiogenesis and metastasis. *Neoplasia*. 2001 Jan-Feb;3(1):53-61.

Gallo O, Masini E, Bianchi B, Bruschini L, Paglierani M, Franchi A. Prognostic significance of cyclooxygenase-2 pathway and angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. *Hum Pathol*. 2002 Jul;33(7):708-14.

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 Mar;30(3):377-86.

Haddad RI, Shin DM. Recent advances in head and neck cancer. *N Engl J Med*. 2008 Sep 11;359(11):1143-54.

Hatae N, Sugimoto Y, Ichikawa A. Prostaglandin receptors: advances in the study of EP3 receptor signaling. *J Biochem*. 2002 Jun;131(6):781-4.

Hoshikawa H, Goto R, Mori T, Mitani T, Mori N. Expression of prostaglandin E2 receptors in oral squamous cell carcinomas and growth inhibitory effects of an EP3 selective antagonist, ONO-AE3-240. *Int J Oncol*. 2009 Mar;34(3):847-52.

Husvik C, Bryne M, Halstensen TS. Epidermal growth factor-induced cyclooxygenase-2 expression in oral squamous cell carcinoma cell lines is mediated

through extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 but is Src and nuclear factor-kappa B independent. *Eur J Oral Sci.* 2009 Oct;117(5):528-35.

Husvik C, Khuu C, Bryne M, Halstensen TS. PGE2 production in oral cancer cell lines is COX-2-dependent. *J Dent Res.* 2009 Feb;88(2):164-9.

INCA. Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil [Digital]. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer; 2007.

INCA. Estimativas 2010: incidência de Câncer no Brasil [Digital]. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer; 2009.

Itoh S, Matsui K, Furuta I, Takano Y. Immunohistochemical study on overexpression of cyclooxygenase-2 in squamous cell carcinoma of the oral cavity: its importance as a prognostic predictor. *Oral Oncol.* 2003 Dec;39(8):829-35.

Jain S, Chakraborty G, Raja R, Kale S, Kundu GC. Prostaglandin E2 regulates tumor angiogenesis in prostate cancer. *Cancer Res.* 2008 Oct 1;68(19):7750-9.

Kundu JK, Surh YJ. Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutat Res.* 2008 Jul-Aug;659(1-2):15-30.

Kuo KT, Wang HW, Chou TY, Hsu WH, Hsu HS, Lin CH, et al. Prognostic role of PGE2 receptor EP2 in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2009 Feb;16(2):352-60.

Lev-Ari S, Kazanov D, Liberman E, Ben-Yosef R, Arber N. Down-regulation of PGE2 by physiologic levels of celecoxib is not sufficient to induce apoptosis or inhibit cell proliferation in human colon carcinoma cell lines. *Dig Dis Sci.* 2007 Apr;52(4):1128-33.

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 Apr 1;122(7):1639-44.

Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature.* 2008 Jul 24;454(7203):436-44.

Marron M, Boffetta P, Zhang ZF, Zaridze D, Wunsch-Filho V, Winn DM, et al. Cessation of alcohol drinking, tobacco smoking and the reversal of head and neck cancer risk. *Int J Epidemiol.* 2009 Oct 5. [Epub ahead of print]

Matsuoka T, Narumiya S. Prostaglandin receptor signaling in disease. *ScientificWorldJournal.* 2007;7:1329-47.

Mohan S, Epstein JB. Carcinogenesis and cyclooxygenase: the potential role of COX-2 inhibition in upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol.* 2003 Sep;39(6):537-46.

Molinolo AA, Amornphimoltham P, Squarize CH, Castilho RM, Patel V, Gutkind JS. Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. *Oral Oncol*. 2009 Apr-May;45(4-5):324-34.

Molinolo AA, Hewitt SM, Amornphimoltham P, Keelawat S, Rangdaeng S, Meneses Garcia A, et al. Dissecting the Akt/mammalian target of rapamycin signaling network: emerging results from the head and neck cancer tissue array initiative. *Clin Cancer Res*. 2007 Sep 1;13(17):4964-73.

O'Callaghan G, Kelly J, Shanahan F, Houston A. Prostaglandin E2 stimulates Fas ligand expression via the EP1 receptor in colon cancer cells. *Br J Cancer*. 2008 Aug 5;99(3):502-12.

Porta C, Larghi P, Rimoldi M, Grazia Totaro M, Allavena P, Mantovani A, et al. Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer. *Immunobiology*. 2009;214(9-10):761-77.

Saba NF, Choi M, Muller S, Shin HJ, Tighiouart M, Papadimitrakopoulou VA, et al. Role of cyclooxygenase-2 in tumor progression and survival of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Prev Res (Phila Pa)*. 2009 Sep;2(9):823-9.

Schuon R, Brieger J, Franke RL, Jakob R, Mann WJ. Increased PGE2 levels in nonmalignant mucosa adjacent to squamous cell carcinoma of the head and neck. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 2005;67(2):96-100.

Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Dis*. 2009 Sep;15(6):388-99.

Snyderman CH, Milanovich M, Wagner RL, Johnson JT. Prognostic significance of prostaglandin E2 production in fresh tissues of head and neck cancer patients. *Head Neck*. 1995 Mar-Apr;17(2):108-13.

Soland TM, Husvik C, Koppang HS, Boysen M, Sandvik L, Clausen OP, et al. A study of phosphorylated ERK1/2 and COX-2 in early stage (T1-T2) oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med*. 2008 Oct;37(9):535-42.

Sugimoto Y, Narumiya S. Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem*. 2007 Apr 20;282(16):11613-7.

Thomas SM, Bhola NE, Zhang Q, Contrucci SC, Wentzel AL, Freilino ML, et al. Cross-talk between G protein-coupled receptor and epidermal growth factor receptor signaling pathways contributes to growth and invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2006 Dec 15;66(24):11831-9.

Wang F, Arun P, Friedman J, Chen Z, Van Waes C. Current and potential inflammation targeted therapies in head and neck cancer. *Curr Opin Pharmacol*. 2009 Aug;9(4):389-95.

Weber A, Hengge UR, Stricker I, Tischoff I, Markwart A, Anhalt K, et al. Protein microarrays for the detection of biomarkers in head and neck squamous cell carcinomas. *Hum Pathol.* 2007 Feb;38(2):228-38.

Whiteside TL. Tricks tumors use to escape from immune control. *Oral Oncol.* 2009 Oct;45(10):e119-23.

Yu L, Wu WK, Li ZJ, Wong HP, Tai EK, Li HT, et al. E series of prostaglandin receptor 2-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase/activator protein-1 signaling is required for the mitogenic action of prostaglandin E2 in esophageal squamous-cell carcinoma. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008 Oct;327(1):258-67.

ANEXO A – Parecer da aprovação da pesquisa pelo National Institute of Health

DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES

Public Health Service

National Institutes of Health
National Institute of Dental
and Craniofacial Research
Bethesda, Maryland 20892

Building: 30

Room: 211

Tel: (301) 496-6259

FAX: (301) 4020823

e-mail: sg39V@nih.gov<http://www.nidcr.nih.gov/Research/NIDCRLaboratories/OralPharyngeal/SilvioGutkind.htm>

November 20, 2009

TO WHOM IT MAY CONCERN:

I am writing this letter to acknowledge that Dr. Aline Corrêa Abrahão worked for seven months at the Oral and Pharyngeal Cancer Branch located within the National Institute of Dental and Craniofacial Research (NIDCR) at the National Institutes of Health (NIH) in Bethesda, Maryland USA. During this period, Dr. Abrahão worked in my laboratory under my direct supervision. In here, she received advanced training in multiple state-of-the-art molecular biology and cellular biology techniques, with the goal of analyzing the participation of the pro-inflammatory mediator prostaglandin E2 and its receptors in the biology of the Head and Neck Squamous Cell Carcinomas (HNSCC). The cell lines used in this work are available in my laboratory and all the work developed at the National Institute of Dental and Craniofacial Research followed the guidelines determined by the National Institutes of Health that regulates these activities, ranging from animal work, to manipulation of recombinant DNA and the use of human derived cell lines. Dr. Abrahão was supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Ensino Superior) with a PDEE scholarship (BEX 0557-09-4) and by the Intramural Research Program of the NIH, NIDCR.

Please, do not hesitate to contact me by e-mail or at 301-496 6259 (office), should you have any questions.

Sincerely,

A handwritten signature in black ink, which appears to read "J. Silvio Gutkind", is written over a horizontal line.

J. Silvio Gutkind, Ph.D.
Chief, Oral and Pharyngeal Cancer Branch
National Institute of Dental and Craniofacial Research
National Institutes of Health