SÍNTIQUE NUNES SCHULZ MORAES

**Análise da expressão da proteína pAkt em cultura de células de carcinomas
epidermóides de cabeça e pescoço tratadas com curcumina**

São Paulo

2016

SÍNTIQUE NUNES SCHULZ MORAES

**Análise da expressão da proteína pAkt em cultura de células de carcinomas
epidermóides de cabeça e pescoço tratadas com curcumina**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas para obter o título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais.

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

São Paulo

2016

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

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

Moraes, Síntique Nunes Schulz.

Análise da expressão da proteína pAkt em cultura de células de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço tratadas com curcumina / Síntique Nunes Schulz Moraes; orientador Décio dos Santos Pinto Júnior. -- São Paulo, 2016.

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

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão Corrigida

1. Carcinoma de células escamosas. 2. Via de sinalização PI3K/Akt. 3. Curcumina. I. Pinto Júnior, Décio dos Santos. II. Título.

Moraes SNS. Análise da expressão da proteína pAkt em cultura de células de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço tratadas com curcumina. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 18/03/2016

Banca Examinadora

Prof. Dr. Norberto Nobuo Sugaya

Instituição: FOUSP

Julgamento: Aprovada

Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes

Instituição: FOUSP

Julgamento: Aprovada

Profa. Dra. Renata Tucci

Instituição: UFF

Julgamento: Aprovada

Dedico esta dissertação aos meus pais Rute e Gequion que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e sustentando com palavras e orações, sempre demonstrando amor e carinho.

Dedico aos meus irmãos Suzana e Mateus pela torcida, apoio, amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior por todo o ensinamento que me transmitiu de maneira precisa e clara, visando o meu entendimento e crescimento no mundo da academia e do conhecimento. Agradeço pelas conversas das manhãs e das tardes que nos animavam, pelas vezes em que discutimos sobre o projeto e execução do mesmo, por sempre tirar nossas dúvidas e nos guiar pelo caminho correto, pelas correções e pela dedicação em nos ensinando até para a bancada. Admiro muito sua pessoa, sua inteligência, seu conhecimento e seu profissionalismo.

Aos professores da Disciplina de Patologia Oral e Maxilofacial: Profª Drª Suzana Cantanhede Orsini Machado, Profª Drª Marina Helena Cury Gallottini, Profª Drª Marília Trierveiler Martins, Profª Drª Karem Lopez Ortega, Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes e Prof. Paulo Braz pelos ensinamentos durante a rotina e durante as aulas ministradas. Me alegro muito em ter tido a honra de conhecê-los. Obrigada por cada palavra e detalhe ensinado! Aprender por meio do conhecimento que vocês adquiriram por toda a vida foi um presente enorme para mim.

A Profa. Renata Tucci que me inspirou a fazer o mestrado e me fez amar a patologia com suas maravilhosas aulas. Obrigada pelo tão grande ensinamento inicial e por fazer parte da banca. Sua presença me anima.

A Zilda, Néia, Vinícius e Fátima pela grande paciência e ajuda nos momentos de dúvida e principalmente nos momentos burocráticos do mestrado.

Aos amados Biólogos Adriana, Elisa e Juvani por todo apoio na rotina. Em especial à Adriana que nos treinou, aguentou e ensinou muito no LABITRON. Desculpe por todas as vezes que lhe incomodamos.

Um agradecimento especialíssimo para a minha companheira de faculdade e de mestrado que tanto me ajudou. Sem você este projeto ficaria inviável. Muito obrigada pelo socorro nas horas em que eu tinha que trabalhar e nos momentos em que minha saúde falhou. Obrigada por todas as contas e limpezas a mais que você fazia, pelas conversas e risadas, por compartilhar nossos medos e inseguranças por ter tanto carinho com nosso projeto. Enfim, obrigada pela companhia de todas as horas. Este será um período que vou levar para sempre comigo e tenha certeza que você sempre fará parte dele e estará na minha lembrança. Que não percamos o contato! E quem sabe ainda não sejamos companheiras de mais alguma coisa...

A todos os meus colegas de Pós-Graduação que tive o prazer de conhecer, conversar e conviver durante estes 2 anos: Ana Maria, Bruno, Carina, Carol, Cibeles, Douglas, Daniela, Danielle, Fabi, Fernanda, Flávia, Gabi, Karin, Lara, Lourdes, Lília, Lilian, Letícia, Marina, Marcos, Nathália, Nelise, Priscila, Robson e Stéphanie. Em especial aos queridos Lara, Letícia, Fabi, Sté, Marcos, Bruno e Priscila por todas as conversas a mais que tivemos sobre rotina e sobre a vida. À querida Flavinha, que nos auxiliou muito na execução das técnicas e nas dúvidas de western-blotting e à queridíssima Fabi que não nos deixava sozinha em nada, principalmente nas rotinas

do LABITRON e nas manhãs, tardes e noites de western-blotting. Vocês ficarão para sempre em minha memória.

A minha família que ligava, se importava e mesmo à distância, esteve presente em todos os momentos. Mesmo quando eu achava que não teria jeito, vocês sempre me davam uma palavra e apoio para que eu pudesse ter forças e sabedoria para prosseguir, confiando sempre na vontade de Deus. Obrigada pelo amor e por querer o meu bem!

Aos meus amigos que me suportaram e aguentaram nos momentos de tristeza por alguma coisa não ter ido bem e nos momentos de desespero e estresse. Obrigada por todo amor e carinho. Um agradecimento muito especial à Beatriz que foi uma irmã e me ajudou e socorreu em cada e-mail, dúvida e ajuda que eu precisava. Obrigada pelo carinho!

A minha gerente Lilian que intercedeu por mim para fazer os ajustes necessários no trabalho a fim de que eu pudesse terminar o mestrado.

Aos funcionários da USP, cada um com sua particularidade estava sempre disposto a nos servir e nos ajudar. Em cada dúvida, na limpeza, na recepção. Obrigada!

E agradeço, sobretudo, a Deus! Que me proporcionou o fôlego da vida todos os dias, que sempre ouviu minhas orações, que tirou meus medos, que me deu coragem para prosseguir, que me deu ânimo a cada dia, que me ajudou em cada experimento novo, que me deu sabedoria para preparar trabalhos e aulas, que tirou

o meu nervosismo, que me deu sua calma que excede todo entendimento, que me tirou o sono quando eu pedi e que sempre demonstrou amor! Obrigada Deus! Sem você, eu nada seria...

*“O que não dá prazer não dá proveito. Em resumo, senhor,
estude apenas o que lhe agradar. ”*

William Shakespeare

“O cavalo prepara-se para o dia da batalha; mas do Senhor vem a vitória”.

Provérbios 21:31

*“A paciência é a mais heroica das virtudes, justamente por não ter
nenhuma aparência heroica”.*

Giacomo Leopardi

RESUMO

Moraes SNS. Análise da expressão da proteína pAkt em cultura de células de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço tratadas com curcumina [dissertação] São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Versão Corrigida.

Diversas alterações genéticas estão associadas à patogênese do carcinoma epidermoide (CE), neoplasia maligna mais comum de cabeça e pescoço. Algumas dessas alterações comprometem proteínas pertencentes à via de sinalização do Akt, envolvida em diferentes fenômenos celulares. Este trabalho teve como objetivo estudar a expressão da proteína pAkt em linhagens celulares de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, de forma a verificar possíveis alterações na transcrição dessa molécula em células de CE tratadas com Curcumina. Foram utilizadas duas linhagens celulares de CE de cabeça e pescoço (FaDu e SCC9) e uma linhagem de queratinócitos normais (HaCat) divididas em dois grupos: a. Grupo controle não tratado; b. Células tratadas com Curcumina. A proliferação celular foi monitorada através do teste de viabilidade celular e a análise da expressão de proteína foi realizada através da técnica do Western Blotting que revelou supressão do pAkt na linhagem celular SCC9 nos tempos de 24 e 48 horas. Desta forma, conclui-se que a Curcumina na via do Akt em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço tem importante ação supressora do gene pAkt.

Palavras-chave: Carcinoma epidermoide. Via de sinalização PI3K/Akt. Curcumina.

ABSTRACT

Moraes SNS. Analysis of pAkt protein expression in squamous carcinoma cell culture of head and neck treated with curcumin [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Versão corrected.

Several genetic alterations are associated with the pathogenesis of squamous cell carcinoma (SCC), the most common malignant neoplasm of the head and neck. Some of these changes compromise the proteins belonging to the Akt signaling pathway, involved in various cellular phenomena. The objective of this study to explores the expression of the pAkt protein in cell lines of the squamous cell carcinomas of the head and neck to verify possible changes in the transcription of this molecule in EC cells treated with curcumin. The study used two cell lines of EC head and neck (FaDu and SCC9) and a normal line of keratinocytes (HaCat), split into two groups: A. the controlled group, untreated; B. Cells treated with curcumin. The cell proliferation it was observed by cell viability test and analysis of protein expression performed through Western blotting technique revealed suppression of pAkt in SCC9 cell line at 24 and 48 hours. Thus, it is concluded that the Curcumin on the path of Akt in squamous cell carcinoma of the head and neck has a significant suppressive effect of gene Akt.

Keywords: Squamous cell carcinoma. Signaling pathway PI3K/Akt. Curcumin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 2.1 - Incidência e mortalidade por câncer no mundo com ênfase para câncer de lábio e cavidade oral	34
Quadro 2.2 - Sobrevida em cinco anos em relação ao estadiamento e localização dos tumores em cavidade oral	38
Gráfico 5.1 - Resultados obtidos no teste de viabilidade celular (MTS) para os grupos controle e curcumina da linhagem celular FaDu, durante um período de crescimento celular de 2 dias.....	59
Gráfico 5.2 - Resultados obtidos no teste de viabilidade celular (MTS) para os grupos controle e curcumina da linhagem celular HaCat, durante um período de crescimento celular de 2 dias.....	60
Gráfico 5.3 - Resultados obtidos no teste de viabilidade celular (MTS) para os grupos controle e curcumina da linhagem celular SCC9, durante um período de crescimento celular de 2 dias.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1-	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma	35
Tabela 4.1-	Origem das linhagens celulares utilizadas no cultivo celular.....	53
Tabela 4.2-	Características dos Anticorpos utilizados nas reações de western-blotting.....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Representação esquemática das regiões anatômicas da cavidade oral	31
Figura 2.2 - Número estimado de novos casos de câncer no mundo em 2012	33
Figura 2.3 - Número estimado de novos casos e mortes por câncer em todo o mundo segundo o sexo e nível de desenvolvimento econômico em 2012. *Excluindo os cânceres de pele não-melanoma	33
Figura 2.4 - Representação esquemática da dinâmica do câncer	37
Figura 2.5 - Representação esquemática da via de sinalização do Akt e genes associados.....	41
Figura 2.6- Efeito da curcumina nas doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, pulmonares, metabólicas, neoplásicas e autoimunes.....	46
Figura 2.7 - Alvos moleculares da Curcumina.....	49
Figura 5.1 - Aspecto celular antes da extração e quantificação de proteínas da linhagem FaDu.....	62
Figura 5.2 - Aspecto celular antes da extração e quantificação de proteínas da linhagem HaCat.....	62
Figura 5.3 - Aspecto celular antes da extração e quantificação de proteínas da linhagem SCC9.....	63
Figura 5.4 - HaCat – Padrão de expressão da proteína pAkt nos grupos controle e curcumina de 24 e 48 horas obtidas a partir da técnica de western-blotting.....	64
Figura 5.5 - SCC9 – Padrão de expressão da proteína pAkt nos grupos controle e curcumina de 24 e 48 horas obtidas a partir da técnica de western-blotting.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt	Sinônimo de PKB – Proteína quinase B
ARRB2	<i>Protein Coding gene - Arrestin, Beta 2</i>
ATL	<i>Adult T-cell leukemia</i>
BER	<i>Base excision repair</i>
BCA	Reagente do <i>BCA Protein Assay Kit</i>
BSA	Albumina Sérica Bovina
CD1	Ciclina D1
CDK2	<i>Cyclin Dependent Kinase 2</i>
CE	Carcinoma epidermoide
CECP	Carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DMEM-F12	Meio Eagle Modificado por Dulbecco + Nutriente Mixture HAM F12
DMSO	Dimetil Sulfóxido
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FaDu	Linhagem celular derivada de carcinoma de faringe
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
GSH	Glutathione
G1/S	Ciclo celular – G1: Síntese proteica / S: Síntese de DNA.
HaCat	Linhagem celular de queratinócitos
HCl	Ácido clorídrico

HPV	Vírus Papiloma Humano
IκB	Inibidor de Kappa B
IKK	IκB quinase
IMC	Índice de massa corpórea
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JAK	Janus quinase
JAK-STAT	<i>Signaling pathway</i>
kDa	KiloDalton
KITBCA	Pierce BCA Protein Assay Kit
LABITRON	Laboratório de Biologia de Células Tronco em Odontologia
mA	MiliAmpere
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
Mm	MiliMolar
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MTS	<i>Cell viability assay</i>
MUTYH	<i>MutY DNA glycosylase</i>
nm	Nanômetro
NF-κB	Fator Nuclear Kappa B
OMS	Organização Mundial da Saúde
pAkt	Anticorpo phospho Akt
PBSA	Solução fosfato-salina, sem cálcio e magnésio, Ph 7.2
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PDK – 1	Fosfatidilinositol kinase-dependente 1
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase

PIP2	Fosfotidilinositol 4,5-bifosfato
PIP3	Fosfotidilinositol 3,4,5-trifosfato
PKB	Proteína quinase B
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i> – Inibidor de protease
PTK2	<i>Protein tyrosine kinase 2</i>
PTEN	Fosfatase homóloga a tensina
P100	Placa de Petri
RIPA	Tampão de lise
Rpm	Rotações por minuto
SCC9	Linhagem celular derivada de carcinoma de boca.
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
Ser	Serina
SFB	Soro Fetal Bovino
STAT	<i>Signal Transducer and Activator Transcription</i>
TBST	<i>Tris-Buffered Saline and Tween 20</i>
Thr	Treonina
TMN	Sistema de classificação do câncer por estadiamento (Tumor primário, linfonodo e metástase)
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UICC	União internacional contra o câncer
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
2 REVISÃO DA LITERATURA	31
2.1 CARCINOMA EPIDERMÓIDE	31
2.1.1 Epidemiologia	32
2.1.2 Etiologia	35
2.1.3 Carcinogênese	36
2.1.4 Tratamento	37
2.1.5 Prognóstico	38
2.2 ESTUDO DA VIA DE SINALIZAÇÃO	38
2.2.1 Akt	40
2.2.2 NF- κ B	42
2.2.3 I κ B	43
2.2.4 Ciclina D1	44
2.2.5 mTOR	45
2.3 SUBSTÂNCIA UTILIZADA PARA TRATAMENTO DA CÉLULA	46
2.3.1 Curcumina	46
3 PROPOSIÇÃO	51
4 MATERIAL E MÉTODOS	53
4.1 MATERIAL	53
4.2 MÉTODOS	54
4.2.1 Cultivo celular	54
4.2.2 Teste de Viabilidade Celular	55
4.2.3 Extração e quantificação de proteínas	56
4.2.4 Western-blotting	57
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR E EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	59
5.2 WESTERN-BLOTTING	63
5.2.1 HaCat	64
5.2.2 SCC9	64

6 CONCLUSÕES 69

REFERÊNCIAS 71

ANEXO A 81

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermoide (CE) é a neoplasia maligna de origem epitelial mais incidente na região de cabeça e pescoço (trato aero digestivo superior), sendo considerada uma das dez neoplasias mais frequentes em homens de países em desenvolvimento. O que se procura atualmente é um diagnóstico precoce com consequente melhoria do prognóstico do paciente, posto que a mortalidade pelo carcinoma epidermoide ainda é bem elevada (Torre et al., 2015). O CE de boca é uma lesão letal em mais de 50% dos casos em todo o mundo. Quando não leva à morte, seu tratamento é mutilador e leva os pacientes a viverem com uma péssima qualidade de vida (Scully; Bagan 2009; Warnakulasuriya, 2009).

A carcinogênese não é um processo abrupto. Para que ocorra a formação de um tumor visível, é necessário que o tecido epitelial passe por uma série de estágios, sendo eles: iniciação, promoção e progressão. É preciso considerar que este processo pode levar anos. Estes estágios compreendem alterações genéticas e epigenéticas que culminarão em uma expansão clonal final, estabelecendo o câncer. A expansão clonal é o nome dado à proliferação descontrolada e irreversível com uma taxa proliferativa ilimitada das células geneticamente alteradas (Scully; Bagan, 2009).

Muitas são as vias de sinalização envolvidas na carcinogênese e, nos últimos anos, inúmeros trabalhos foram realizados para tentar elucidar quais genes estão envolvidos em processos cruciais do desenvolvimento do câncer, os quais incluem proliferação celular, inibição da apoptose, angiogênese, adesão celular, dentre outros (Reagan-Shaw; Ahmad, 2006; Squarize et al., 2006; Bernal et al., 2007; Fujimura et al., 2007; Pontes et al., 2009; Abrahao et al., 2010; Giudice et al., 2011; Silva et al., 2012; Sperandio et al., 2012; Abrahao et al., 2013; Pontes et al., 2013).

Acredita-se que a resposta das vias muda a cada novo estímulo ou bloqueio. Desta forma, o estudo das vias de sinalização é fundamental para uma melhor compreensão dos processos da carcinogênese.

O gene Akt é uma serina/treonina quinase de 59 kDa. Diversos fatores de crescimento podem estimular este gene levando à sua ativação. Este gene é central na via de sinalização PI3K/Akt que regula funções celulares normais e fundamentais como: crescimento celular, proliferação, sobrevivência celular e movimentos,

processos estes que também são importantes na oncogênese. Quando desregulada, esta via de sinalização participa de doenças metabólicas, desenvolvimento de neoplasias e resposta celular frente a muitos agentes terapêuticos (Ždychová, Komers, 2005; Pang et al., 2007; Zhang et al., 2007).

É essencial compreender o que ocorre na via de sinalização do Akt devido ao seu importante papel na carcinogênese. A via do Akt é uma via central que compreende genes como o I κ B, NF- κ B, mTOR, CD1 (proteína envolvida com o ciclo celular) entre outros. Estes genes regulam funções vitais de uma célula e quando estão mutados levam ao descontrole que confere ao câncer a capacidade de ser “imortal”.

Atualmente, a curcumina tem sido amplamente citada como um potencial agente terapêutico que pode desempenhar um papel de supressão da proliferação celular, invasão e metástase com a regulação da expressão de genes alvo (Chen et al., 2008; Saha et al., 2010; Zhao et al., 2015). Adicionalmente aos potenciais da curcumina, encontram-se a indução da apoptose, supressão da angiogênese, ação anti-inflamatória, antimicrobiana e antioxidante que atuam em doenças de origens distintas e são relatadas por inúmeros autores na literatura no decorrer dos últimos anos (Mohan et al., 2000; Bush et al., 2001; Jang et al., 2001; Mukhopadhyay et al., 2001; Anto et al., 2002; Aggarwal et al., 2004; Sandur et al., 2007; Anand et al., 2008; Kunnumakkara et al., 2008; Aggarwal; Sung, 2009; Shureiqi; Baron, 2011; Masuelli et al., 2014).

Além disso, a curcumina tem influência na via do Akt em diversos cânceres (Bush et al., 2001; Bharti et al., 2003; Aggarwal et al., 2004; Tomita et al., 2006; Sandur et al., 2007; Bimonte et al., 2013; Zhao et al., 2015).

Sabendo disso, as pesquisas têm como alvo descobrir um agente terapêutico capaz de inibir o processo de evolução do câncer e igualmente proporcionar ao paciente melhor qualidade de vida.

Este projeto incluiu o estudo da curcumina - substância que vem sendo estudada como importante agente terapêutico contra o câncer - na linha de pesquisa em carcinogênese, da Disciplina de Patologia Bucal da FOU SP.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CARCINOMA EPIDERMÓIDE

A cavidade oral estende-se desde a junção da pele com o vermelhão do lábio até a linha que divide o palato duro do palato mole. O limite inferior da boca são as papilas circunvaladas da língua. Como pode ser observado na figura 2.1, seus sítios específicos são: lábios, mucosa bucal, gengivas, assoalho bucal, dois terços anteriores da língua, trígono retromolar e palato duro (INCA, 2015).

Figura 2.1 - Representação esquemática das regiões anatômicas da cavidade oral

© 2012 Terese Winslow LLC
U.S. Govt. has certain rights

Fonte: National Cancer Institute at National Institutes of Health, 2015.

De todas as neoplasias malignas, o carcinoma epidermoide (CE) da cavidade oral apresenta cerca de 2% de incidência. Na região da cabeça e pescoço, é a neoplasia maligna mais comum, com 47% de ocorrência. Desses, 90% dos casos incidem sobre a cavidade oral (Franceschi et al., 2000; Calabrese et al., 2006; Tsantoulis et al., 2007). A OMS agrupa o carcinoma epidermoide de lábio e cavidade oral na mesma classificação (WHO, 2015). Porém, deve-se considerar que os

fatores etiológicos, incidência global, comportamento clínico e prognóstico entre o CE de lábio e o CE de boca são distintos e estão consolidados na literatura. Ao contrário do que ocorre no CE de boca, o CE de lábio geralmente acomete pessoas de pele clara, considera como principal etiologia a radiação ultravioleta e seu prognóstico é mais favorável em comparação ao carcinoma epidermoide intrabucal (Moore et al., 1999; Scully, Bagan, 2009; INCA, 2015).

2.1.1 Epidemiologia

As neoplasias malignas representam grande parte das taxas de incidência e mortalidade no Brasil e no mundo. Estimou-se que em 2012 haveriam 14.1 milhões de novos casos e 8.2 milhões de mortes causadas por câncer em todo o mundo (Figura 2.2). Os resultados divulgados pelo Global Cancer Statistics, 2012 (Torre et al., 2015) expõem as dez neoplasias malignas que causam maior morbidade e mortalidade no mundo. Dentre os resultados, o câncer de lábio e cavidade oral é o 8º de incidência e o 10º de mortalidade em homens nos países em desenvolvimento. (Figura 2.3). Os demais valores de incidência e mortalidade por câncer no mundo divulgados pelo Global Cancer Statistics em 2002 e 2008 podem ser visualizados no quadro 2.1.

Figura 2.2 - Número estimado de novos casos de câncer no mundo em 2012

Fonte: Torre et al., 2015, p. 89

Figura 2.3 - Número estimado de novos casos e mortes por câncer em todo o mundo segundo o sexo e nível de desenvolvimento econômico em 2012. *Excluindo os cânceres de pele não-melanoma

Fonte: Torre et al., 2015, p. 90

Quadro 2.1 - Incidência e mortalidade por câncer no mundo com ênfase para câncer de lábio e cavidade oral.

INCIDÊNCIA E MORTALIDADE POR CâNCER NO MUNDO						
	Novos Casos no Mundo	Mortalidade no Mundo	Novos Casos de Câncer de Lábio e Cavidade Oral	Mortalidade por Câncer de Lábio e Cavidade Oral	Posição entre as 10 neoplasias malignas mais comuns no mundo – incidência	Posição entre as 10 neoplasias malignas mais comuns no mundo – mortalidade
2002	10.9 milhões	6.7 milhões	274.000	127.000	-	-
2008	12.7 milhões	7.6 milhões	263.900	128.000	9º em homens - países em desenvolvimento	10º em homens - países em desenvolvimento
2012	14.1 milhões	8.2 milhões	300.400	145.400	8º em homens - países em desenvolvimento	10º em homens - países em desenvolvimento

Fonte: Parkin et al., 2005, p. 78; Jemal et al., 2011, p. 83; Torre et al., 2015, p. 89

No Brasil, a prevalência de câncer em 2014/2015 ainda revela que a prevenção precisa ser inculcada no pensamento da população para que estes números diminuam em um futuro próximo. No período compreendido entre 2011 e 2015, o Ministério da Saúde adotou como objetivos estratégicos para controle do câncer ações para redução do tabagismo e ampliação do acesso, diagnóstico e tratamento do câncer em tempo oportuno. Entre as principais medidas que visam a diminuição da incidência do câncer, há destaque para ações preventivas que diminuem os cânceres de pulmão, estômago e intestino, colo do útero e fígado. Estas medidas são, respectivamente, o controle do tabagismo, a orientação para uma alimentação saudável e a vacinação contra o HPV e contra a Hepatite. Deve-se ressaltar que embora o controle ao tabagismo seja uma medida direta para diminuir o câncer de pulmão, sua prática implica na redução da incidência do câncer da cavidade oral, uma vez que o tabagismo crônico é um dos seus fatores etiológicos comprovados (INCA, 2015; Torre et al., 2015).

A tabela abaixo (tabela 2.1) mostra a estimativa de novos casos de câncer para o ano de 2014, válida também para o ano de 2015. A estimativa elenca os 10 tipos de câncer mais incidentes segundo o sexo feminino e masculino. Dentre as 10 neoplasias malignas que mais acometem os homens, o câncer da cavidade oral ocupa o 5º lugar, com cerca de 11.280 novos casos.

Tabela 2.1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma

Localização primária	casos	%	Homens	Mulheres	Localização primária	casos	%
Próstata	68.800	22,8%			Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%			Cólon e Reto	17.530	6,4%
Cólon e Reto	15.070	5,0%			Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%			Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%			Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%			Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%			Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%			Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%			Leucemias	4.320	1,6%

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Fonte: INCA, 2015

2.1.2 Etiologia

A etiologia do CE é muito variada, não existindo um único fator causador definido ou aceito. Sua patogênese é claramente multifatorial, envolvendo fatores extrínsecos, como fumo, ingestão crônica de bebidas alcoólicas e radiação solar. Ressalta-se o efeito sinérgico quando se associa o fumo e a ingestão crônica de bebidas alcoólicas (Franceschi et al., 2000; Torre et al., 2015). Para os países ocidentais e de alta renda, os fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento do CE são o álcool e o tabaco. Nos países asiáticos, o uso de tabaco sem fumaça, como por exemplo, gutkha e betel quid são responsáveis por grande parcela dos casos (Tsantoulis et al., 2007; Scully, Bagan, 2009).

Acredita-se atualmente que o desenvolvimento do CE é um processo de várias etapas, no qual inúmeros fatores externos e alterações genéticas podem estar envolvidos (Tsantoulis et al., 2007).

2.1.3 Carcinogênese

A carcinogênese é entendida como resultado de um acúmulo de alterações gênicas que se processam ao longo das múltiplas gerações de um clone celular e geram progressivamente características fenotípicas particulares, culminando na manifestação completa do fenótipo neoplásico (Gormally et al., 2007; Mimeault et al., 2007; Oakley; Van Zant, 2007).

O processo da carcinogênese não é abrupto, envolve alterações genéticas e epigenéticas durante todos os estágios da carcinogênese, a saber: iniciação, promoção e progressão. Para que uma célula seja mutada e, portanto, seja iniciada, deve haver um dano genético não letal que ocorre por ação de agentes carcinogênicos ou de forma espontânea. Neste estágio, há alteração do genoma celular. Nos estágios seguintes há ativação dos proto-oncogenes, inibição dos genes supressores de tumor, inibição dos genes de reparo do DNA, inibição dos genes pró-apoptóticos e ativação dos genes antiapoptóticos. O estágio da promoção transformará lentamente a célula iniciada em célula maligna e promoverá a sua proliferação. Nos últimos estágios (promoção e progressão), há uma rápida e descontrolada proliferação de células geneticamente instáveis e heterogêneas, com acúmulo de mutações e formação de subclones (Scully; Bagan, 2009; INCA, 2015).

Durante o desenvolvimento do câncer, as células neoplásicas adquirem um número de características fenotípicas que as levam à uma proliferação rápida, descontrolada e ilimitada. Esta proliferação ilimitada pode levar à invasão dos tecidos vizinhos e, conseqüentemente, levar a metástases regionais e a locais secundários, como visto na figura 2.4. (Hanahan; Weinberg, 2000).

Figura 2.4 - Representação esquemática da dinâmica do câncer

Fonte: Barcellos-Hoff et al., 2013, p 512

“ Uma descrição a partir de células locais ou sistêmicas que, inicialmente, melhoram a sobrevivência das células e, em seguida, promovem a malignidade como a expansão e o amadurecimento no microambiente tumoral. Esta expansão é capaz de iniciar novos microambientes, tais como um nicho pré-metastático a uma certa distância. Citocinas específicas, tais como fator transformador de crescimento- β , interleucina 6 e derivados do estroma fator 1, podem ser produzidas por células derivadas da medula óssea, fibroblastos associados ao câncer (CAFS) ou células tumorais, e parecem apoiar a expansão e maturação. IMC, células mieloides imaturas. ”

2.1.4 Tratamento

Quando o carcinoma epidermoide é diagnosticado em fases iniciais (restrito ao seu local de origem), o tratamento normalmente é realizado em uma única modalidade: cirurgia ou radioterapia, sendo a cirurgia o tratamento mais utilizado para câncer na cavidade oral. Entretanto, se diagnosticado tardiamente, o tratamento é cirúrgico e radioterápico. Em alguns casos a quimioterapia é empregada como técnica adjuvante. A escolha do tratamento dependerá da

localização, alterações funcionais advindas do tratamento e estadiamento do tumor (Belcher et al., 2014; INCA, 2015).

2.1.5 Prognóstico

A União Internacional Contra o Câncer (UICC) preconiza o uso do Sistema TNM de classificação dos tumores malignos para estadiamento das lesões. Este sistema leva em conta a extensão e características do tumor primário (T), as características do sistema linfático ao redor do tumor (N) e a presença ou ausência de metástases a distância (M). O prognóstico e sobrevida dos pacientes com CE depende do estadiamento no sistema TNM e da área comprometida em cavidade oral. Lesões iniciais e em regiões anteriores possuem melhor prognóstico que as mais posteriores e avançadas (INCA, 2015). Observe no quadro 2.2:

Quadro 2.2 - Sobrevida em cinco anos em relação ao estadiamento e localização dos tumores em cavidade oral

Sítio primário	Sobrevida em cinco anos Percentual / Estádio			
	I	II	III	IV
Língua oral	35-85	26-77	10-50	0-26
Assoalho da boca	58-75	40-64	21-43	0-15
Rebordo gengival	73	41	17	0-10
Mucosa jugal	77-83	44-65	20-27	0-18
Área retromolar	70	57,8	46,5	0-10
Palato duro	60-80	40-60	20-40	0-30

Fonte: INCA, 2015

2.2 ESTUDO DA VIA DE SINALIZAÇÃO

Como resultado de inúmeras pesquisas no mundo, estão sendo elucidadas as vias de sinalização que estão alteradas durante a oncogênese, bem como a forma como estas vias agem desregulando processos de proliferação e sobrevivência celular (Reagan-Shaw; Ahmad, 2006; Bernal et al., 2007; Fujimura et al., 2007).

Dentre estas vias, uma das que vem sendo bastante estudada é a via do Akt (Squarize et al., 2006; Pontes et al., 2009; Abrahao et al., 2010; Giudice et al., 2011; Silva et al., 2012; Sperandio et al., 2013; Abrahao et al., 2013; Pontes et al., 2013).

O Akt, também chamado de proteína quinase B (PKB) é uma serina/treonina quinase considerada como reguladora crucial de vários processos celulares vitais, como apoptose, proliferação, diferenciação e metabolismo. A regulação inapropriada da via PI3k/Akt tem sido associada com o desenvolvimento de vários tipos de cânceres em humanos (Nicholson; Anderson, 2002; Giudice et al., 2011; Pontes et al., 2013). Esta via de sinalização participa não só do desenvolvimento de neoplasias como também tem papel fundamental na resposta do câncer frente a variados agentes terapêuticos. Esta ligação entre a ativação da via do Akt e o câncer torna esta via um interessante alvo terapêutico (West et al., 2002; Abrahao et al., 2013).

Neste sentido, a proposta deste projeto foi estudar a proteína Akt, que é o gene central desta via de sinalização em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço. Este gene ativa muitas outras proteínas importantes que fazem parte desta via, tais como: NF- κ B, I κ B, mTOR e CD1 (veja na figura 2.5). Todos estes genes já são citados na literatura como tendo participação ativa no processo de carcinogênese, mas a atuação específica de cada um deles ainda permanece em discussão (Seo et al., 2004; Ahmed et al., 2006; Park et al., 2006; Zhang et al., 2007; Kapoor et al., 2012; Broek et al., 2015).

2.2.1 Akt

O Akt é uma serina/treonina quinase de 59 kDa pertencente à família de proteínas AGC. Possui três isoformas, sendo elas: Akt1, Akt2 e Akt3 que são codificadas por três genes díspares. Estas três isoformas possuem uma estrutura semelhante que inclui um domínio catalítico de homologia a plecstrina (PH) na região amino terminal e um domínio regulatório em sua região carboxiterminal. O Akt é ativado quando as células são estimuladas por diversos fatores de crescimento. (Zhang et al., 2007; Porta et al., 2014).

O Akt participa da sobrevivência celular por meio da fosforilação de proteínas envolvidas na apoptose através da ativação de proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W) e inibição de proteínas pró-apoptóticas (Bad, Procaspase 9, Bax). O Akt também fosforila FKHR que é membro da família dos fatores de transcrição “forkhead”. Esta proteína, quando está no núcleo, promove a ativação de seus genes alvo, como Fas ligante e Bim que são proteínas integrantes da cascata de apoptose (Vivanco; Sawyers, 2002; Porta et al., 2014).

O Akt1 é um essencial mediador de função biológica em STAT5; este se liga em alguns sítios do Akt1, aumentando sua transcrição. A via VEGF ativa diretamente a via do Akt, portanto, sua regulação negativa é fundamental para supressão da angiogênese tumoral (Zhao et al., 2015).

Além disso, o Akt pode influenciar reguladores de morte celular, como o NF- κ B e o p53. O Akt fosforila a I κ B quinase (IKK) que por sua vez, fosforila o inibidor de κ B (I κ B) e libera o NF- κ B para ser translocado até o núcleo e atuar como fator de transcrição, transcrevendo até 150 genes alvo. Quando o Akt fosforila a proteína MDM2, há ubiquitinação do p53 e consequente degradação em um proteossoma. Isto regula negativamente a ação do p53 (Manning; Cantley, 2007).

A via de sinalização PI3K/Akt regula funções celulares normais e fundamentais como: crescimento celular, proliferação, sobrevivência celular e movimentos, processos estes que também são importantes na oncogênese. A regulação inapropriada da via PI3K/Akt tem sido associada com o desenvolvimento de doenças como diabetes e câncer. Esta via de sinalização participa não só do desenvolvimento de neoplasias como também tem papel fundamental na resposta

do câncer frente a variados agentes terapêuticos (Ždychová, Komers, 2005; Pang et al., 2007; Zhang et al., 2007).

Figura 2.5 - Representação esquemática da via de sinalização do Akt e genes associados

Fonte: National Cancer Institute at National Institutes of Health (2015)

St-Germain et al. (2004) realizaram um estudo com o objetivo de verificar a relação entre as proteínas Akt, NF-κB e COX-2, utilizando linhagens de carcinoma de endométrio que possuíam a proteína PTEN inativa, que leva à ativação do Akt. Seus resultados sugeriram que o Akt exerce importante função regulatória sobre a expressão do NF-κB através da fosforilação do IκB nas células do câncer de endométrio. Quando fosforilado, o IκB libera o NF-κB que estava inativo no citoplasma para entrar no núcleo e exercer sua função na transcrição genética, aumentando os níveis de COX-2. Após realizar o bloqueio do pAkt, o NF-κB fica restrito ao citoplasma e os níveis de COX-2 diminuem.

Giudice et al. (2011) estudaram a via PI3K/Akt através da expressão de pAkt, NF-κB e ciclina D1 em linhagens celulares de carcinoma epidermoide de cabeça e

pescoço submetidas a um ensaio de invasão in vitro. Os autores encontraram que o pAkt e o NF-kB obtiveram expressão diferente no citoplasma e no núcleo dependendo da linhagem celular estudada. As células do carcinoma de língua apresentaram expressão citoplasmática de pAkt semelhante a rede. Esta linhagem, assim como a do carcinoma de faringe, também mostrou transporte nuclear de pAkt e NF-kB. Significativo aumento de pAkt e de NF-kB foi observado nas células de carcinoma de língua e faringe. Ciclina D1 foi detectada no núcleo de todas as células estudadas e foi significativamente detectada nas células do carcinoma de língua e da faringe. Os autores concluem sugerindo a participação de pAkt, NF -kB e ciclina D1 no processo de invasão do carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço.

Em 2007 Sandur et al. analisaram linhagens celulares de leucemia mieloide crônica e carcinoma renal embrionário (KBM-5 e A293) e sugerem que o TNF (Fator de Necrose Tumoral) é um potente ativador do Akt.

Diante do exposto acima, vimos que a via de sinalização do Akt é uma via extremamente importante no processo da carcinogênese. É uma via central que ativa diversas outras vias e muitos genes na cascata de sinalização celular. Muitos dos genes que o Akt ativa são transdutores de sinal, grandes fatores de transcrição, proteínas envolvidas na apoptose, proteínas que agem no ciclo e no metabolismo celular. Assim, o estudo destes genes é essencial para elucidar o funcionamento da via do Akt e entender a progressão da carcinogênese de cabeça e pescoço. Descreveremos a seguir alguns destes genes.

2.2.2 NF-kB

NF-kB é um fator de transcrição, descoberto em 1986, que pode ser ativado por uma variedade de sinais como infecções, estresse oxidativo, carcinógenos e citocinas (Carlsen et al., 2004). Todos os estímulos acima descritos ativam a via de transdução de sinal que induz a ativação e a translocação do NF-kB do citoplasma para o núcleo, onde ocorre a ativação de genes envolvidos com a sobrevivência celular (Clarkson, 2002). A sua capacidade de realizar a transcrição gênica só é possível quando está localizado no núcleo celular. Este controle é realizado pelo

Inibidor de KB (I κ B) que se liga ao NF- κ B e o inativa, mantendo-o no citosol. Para que o NF- κ B possa ser translocado para o núcleo, uma outra proteína conhecida como IKK precisa ser fosforilada e ativada pelo Akt, sendo então capaz de fosforilar o I κ B levando-o para ubiquitinação e consequente degradação. Na ausência do I κ B, o NF- κ B entra no núcleo onde induz a transcrição (Chang et al., 2003; Dolcet et al., 2005).

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

O NF- κ B nuclear é um importante fator de transcrição de muitos genes e chega a regular até 150 genes dentro da via de sinalização celular neoplásica. Está presente na via do Akt e é ativado constitutivamente pelo Akt fosforilado via ativação da IKK. Portanto, sua regulação negativa é fundamental para reduzir a proliferação celular descontrolada (Joyce et al., 2001; Ravi; Bedi, 2004).

2.2.3 I κ B

O I κ B, assim como as subunidades que compõem o NF- κ B, pertence à família de proteínas Rel. Existem aproximadamente 8 membros da família I κ B, sendo que os subtipos mais estudados são o I κ B α e o I κ B β . Vários estímulos levam à fosforilação do I κ B, processo que é fundamental para a sua posterior degradação. A proteína I κ B fosforilada recebe a adição da ubiquitina ligase e é em seguida degradada, fato que resulta na liberação do NF- κ B (Baldwin, 1996; Zandi et al., 1997). O desmembramento do complexo I κ B/NF- κ B permite o transporte do NF- κ B para o núcleo, com consequente ligação desse nos genes que apresentam

sequência regulatória GGGACTTTCC junto à região promotora, levando a um aumento na expressão dos genes alvo. A fosforilação do I κ B ocorre pela ação de proteínas quinases específicas, como o complexo I κ B quinase (IKK) (Glezer et al., 2000; Perkins, 2007).

A inibição das proteínas de transdução de sinal que levam à ativação do NF- κ B, tem sido utilizada há muitos anos para combater a inflamação e também tem mostrado seu papel benéfico no tratamento do câncer humano (Darnell, 2002).

2.2.4 Ciclina D1 (CD1)

As ciclinas representam uma família de proteínas diretamente envolvidas na regulação do ciclo celular. São proteínas de 38kDa relacionadas com a mitose de todos os seres eucariontes e responsáveis pelo controle da progressão pelos pontos de checagem do ciclo celular através da fosforilação e inativação de outras moléculas (Golias et al., 2004). Existem diferentes tipos de ciclinas que estão presentes em diferentes fases do ciclo celular, sendo uma das mais importantes a ciclina D1 (CD1). A CD1 é conhecida por possuir importante função no ponto de checagem G1/S do ciclo celular e é neste momento que os níveis de CD1 nuclear estão mais elevados. Existem evidências de estudos *in vitro* e *in vivo* sobre a sua associação no processo de carcinogênese (Lehrbach et al., 2003; Shai et al., 2007).

Pesquisas indicam que o NF- κ B age aumentando os níveis de CD1. A relação do NF- κ B com o ciclo celular e principalmente com a CD1 foi demonstrada utilizando o I κ B “super repressor” (I κ B-SR), para inibir a atividade do NF- κ B. O I κ B-SR bloqueia o aumento da atividade nuclear do NF- κ B e atrasa a entrada de células na fase S do ciclo celular. A diminuição da atividade nuclear não teve relação com os níveis das proteínas ciclina E, ciclina D2, ciclina D3, CDK2, p15, p16, p27 ou p21, por outro lado houve diminuição dos níveis da CD1 (Perkins, 2007).

A consequência da superexpressão da ciclina D1 é uma transição encurtada pelo ciclo celular que confere uma vantagem proliferativa às células e talvez limite a capacidade de reparação aos danos genômicos causados pela exposição a carcinógenos (Petty et al., 2003).

2.2.5 mTOR

mTOR, do inglês “Mammalian target rapamycin” é uma quinase que tem papel chave no metabolismo catabólico e anabólico de inúmeras doenças. Pertence à família dos fosfatidilinositol quinases (PI3K) e encontra-se na via de sinalização PI3K/Akt (Tsang et al., 2007; Du et al., 2013).

O mTOR participa da biogênese de ribossomos e fosforila substratos impedindo que ocorra a tradução proteica (Tsang et al., 2007; Broek et al., 2015). A regulação do mTOR é ainda controversa e incerta. Evidências de envolvimento da via do Akt em sua regulação baseia-se em estudos que demonstram que o mTOR é um substrato direto do Akt (Sekulic et al., 2000).

Inúmeras patologias têm sido associadas à desregulação do mTOR, incluindo doenças imunológicas, metabólicas, cardiovasculares, neurológicas e câncer. Existem relatos de mutações em genes que codificam componentes da via de sinalização mTOR em cânceres de pulmão, rim, ovário, mama, estômago, pâncreas e cabeça e pescoço (Guertin; Sabatini, 2005).

Dentre outras alterações, estas anormalidades genéticas podem causar hiperatividade da PI3K e superexpressão do Akt. Recentemente o mTOR é considerado como alvo para a atuação de drogas antineoplásicas, utilizando-se inibidores de mTOR para bloquear genes importantes para o crescimento das células neoplásicas localizados abaixo dele na via de sinalização, fazendo com que haja interrupção na proliferação e aceleração da apoptose (Faivre et al., 2006; Tsang et al., 2007; Broek et al., 2015).

2.3 SUBSTÂNCIA UTILIZADA PARA O TRATAMENTO DAS CÉLULAS

2.3.1 Curcumina

A curcumina foi isolada pela primeira vez em 1815 do rizoma da planta *Cúrcuma longa* L., e obtida em forma cristalina em 1870. Consiste de um pó amarelo-laranja encontrado em vários alimentos, principalmente aqueles condimentados com açafrão e curry (Srinivasan; Sambaiah, 1991; Lodha; Baggha, 2000; Aggarwal et al., 2003; Goel et al., 2008). A curcumina é insolúvel em água e éter, mas solúvel em etanol, acetona e dimetilsulfóxido (Goel et al., 2008).

Estudos demonstram seus efeitos benéficos no tratamento de várias patologias, tais como: doenças biliares, diabetes, mal de Alzheimer, mal de Parkinson (Zbarsky et al., 2005; Aggarwal; Sung, 2009), dentre outras que podem ser vistas na figura 2.6.

Figura 2.6 - Efeito da curcumina nas doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, pulmonares, metabólicas, neoplásicas e autoimunes

Fonte: Aggarwal, Sung, 2009, p. 89

Com relação ao câncer, a curcumina tem sido considerada um potencial agente terapêutico contra diversos tumores malignos (Bimonte et al., 2013; Zhan et al., 2014), podendo agir na supressão da transformação e proliferação celular, impedindo o desenvolvimento de metástases. Estes efeitos são mediados através da regulação de diversos fatores de transcrição, fatores de crescimento, citocinas inflamatórias, proteínas quinases e outras enzimas. A inibição da proliferação das células tumorais também se dá pela parada do ciclo celular em várias fases e pela indução da apoptose (Shishodia et al., 2007).

Com relação às alterações moleculares em genes associados à carcinogênese, a curcumina suprime a expressão de ciclina D1 (Mukhopadhyay et al., 2002), induz a apoptose em células tumorais através da ativação da caspase-8 e suprime a ativação de vários fatores de transcrição que são implicados na carcinogênese, tais como NFkB e pelo menos 2 transdutores de sinal e ativadores da transcrição de proteínas (STAT3, STAT5) (Bharti et al., 2003). Além disso, estudos evidenciam que a curcumina modula a expressão de genes envolvidos na proliferação celular, invasão celular, metástase, angiogênese e resistência à quimioterapia (Shishodia et al., 2005), “downregulate” da expressão de Bcl-2, Bcl-XL, ciclo-oxigenase 2 (COX-2), metaloproteinase 9 (MMP-9), fator de necrose tumoral (TNF), ciclina D1 e moléculas de adesão (Shishodia et al., 2005).

Em 2015, Zhao et al. avaliaram a expressão de proteínas presentes no carcinoma de pulmão (linhagem SK-MES-1) tratadas com curcumina e encontraram resultados favoráveis, como regulação positiva de genes como PCNA, POLL, MUTHY, STAT5A, Akt1 e regulação negativa de genes como MAPK1, ARRB2, PTK2, MAPK14, VEGFA e NF-kB1. Estes genes têm ligação direta com as vias de sinalização BER, JAK-STAT, VEGF e MAPK. Os autores ainda sugerem que a curcumina poderia melhorar a reparação de danos do DNA existentes na carcinogênese e induzir a apoptose.

Bharti et al. (2003) avaliou linhagens celulares de mieloma múltiplo humano (U266, RPMI 8226 e MM.1) ao serem tratadas com curcumina e encontraram resultados muito satisfatórios, como: regulação negativa da forma ativa do NF-kB (ou seja, do NF-kB nuclear), supressão constitutiva da fosforilação do IkB, da atividade da IKK quinase e da expressão dos produtos do NF-kB como IkB α , Bcl-2, Bcl-x, ciclina D1 e Interleucina-6. A curcumina também induziu a apoptose através da ativação da caspase 7 e 9 e regulou negativamente STAT3 que é um transdutor de

sinal e ativador de transcrição de proteínas. Os genes regulados negativamente descritos acima (IKK, I κ B e NF- κ B) são ativados diretamente pelo Akt. Sendo assim, se o Akt não é fosforilado, não há consequente fosforilação da IKK quinase, I κ B e NF- κ B que leva à transcrição de mais de 150 genes de forma descontrolada. Com base nestes resultados sugere-se que a curcumina tem ação de supressão por grande parte da via de sinalização do Akt.

Em 2013, Bimonte et al. testaram a curcumina em linhagens celulares de câncer de pâncreas (MIA PaCa-2, MPanc- 96 e Panc-1) e encontrou a regulação negativa do NF- κ B. Entretanto, os autores também realizaram testes *in vivo* em ratos que tiveram tumor de pâncreas induzido (divididos em grupo controle e grupo curcumina). Os testes *in vivo* demonstraram que não houve diferença no peso corporal dos ratos do grupo curcumina após uma dieta com ração adicionada com 0,6% de curcumina por 6 semanas. Porém, houve diferença significativa no tamanho do tumor do grupo curcumina em relação ao grupo controle após 35 dias de tratamento. Também houve regulação negativa do NF- κ B nos tratamentos *in vivo* e, após experimentos de imuno-histoquímica, observou-se redução significativa de COX-2 e VEGF (proliferação e angiogênese) no grupo curcumina. Adicionalmente, houve redução da expressão da IKK quinase e do I κ B após análise por western-blotting. Os autores sugerem que a curcumina inibe a ativação do NF- κ B por meio da supressão da IKK quinase.

Aggarwal et al. (2004) também encontraram resultados positivos da curcumina ao avaliarem linhagens (MDA 1986, Tu 686, Tu 167, MDA 686LN, JMAR C42) de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP) quando tratadas com curcumina. Os principais resultados foram inibição do NF- κ B em células de CECP, indução do desaparecimento da subunidade p65 do NF- κ B dentro do núcleo, inibição da forma fosforilada do I κ B, regulação negativa da expressão de IL-6 e dos produtos do NF- κ B, supressão da proliferação de células do carcinoma, supressão de ciclina D1 e indução da apoptose através da ativação da caspase 9.

Em linhagens celulares de melanoma (MMAN, MMRU, RPEP, PMWK, Sk-mel-2, Sk-mel-5, Sk-mel-28 e MEWO) a curcumina é capaz de induzir a apoptose independentemente da ativação de p53 e Bcl-2, mas via ativação da via caspase 8/receptor Fas iniciado (Bush et al., 2001).

Após Sandur et al. (2007) analisarem linhagens celulares de leucemia mieloide crônica e carcinoma renal embrionário (KBM-5 e A293) e sugerirem que o

TNF (Fator de Necrose Tumoral) é um potente ativador do Akt, os autores também sugerem que a curcumina é capaz de inibi-lo. A análise por western-blotting revelou que a curcumina realmente suprimiu a ativação do pAkt. O intuito do trabalho também era verificar se a curcumina poderia ser inibida pelo GSH (Glutathiona) e os autores concluíram que sim.

Os alvos moleculares da Curcumina podem ser encontrados na Figura 2.7.

Figura 2.7 - Alvos moleculares da Curcumina

Fonte: Shishodia et al., 2007, p. 246

Em nosso estudo verificamos a expressão do gene Akt (que quando fosforilado ativa a via de sinalização PI3K/Akt) em linhagens celulares de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço após o tratamento com Curcumina, descrito abaixo.

3 PROPOSIÇÃO

- Verificar se a curcumina altera os níveis de expressão e efeitos nas linhagens celulares HaCat (Queratinócitos) e SCC9 (CE de língua).
- Analisar o comportamento da proteína pAkt presente na via de sinalização do Akt em células de CE de cabeça e pescoço quando tratadas com Curcumina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia descrita a seguir foi aprovada previamente pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Seres Humanos) da FOUSP sob parecer n. 697.534 (Anexo A).

O presente estudo contém ensaios in vitro, envolvendo cultura de células de CE bucal humano.

4.1 MATERIAL

Foram utilizadas duas linhagens celulares humanas de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço de humanos e uma linhagem de queratinócitos normais (Tabela 4.1) e dois anticorpos para as reações de western-blotting (Tabela 4.2).

Tabela 4.1 - Origem das linhagens celulares utilizadas no cultivo celular

<i>Linhagem celular</i>	<i>Localização da linhagem</i>
FaDu	Carcinoma epidermoide de faringe
SCC9	Carcinoma epidermoide de língua
HaCat	Queratinócitos

As células são acondicionadas em nitrogênio líquido no Laboratório de Biologia de Células Tronco em Odontologia (LABITRON) da Faculdade de odontologia da Universidade de São Paulo - FOUSP.

Tabela 4.2: Características dos anticorpos utilizados nas reações de Western blotting

<i>Anticorpo Primário</i>	<i>Procedência</i>	<i>Espécie</i>	<i>Diluição</i>
Anti-pAkt (Ser 473)	Cell signaling (clone 193H12)	Coelho	1:2000
Anti- β actina (clone AC-15)	Sigma	Camundongo	1:5000

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Cultivo celular

As células acondicionadas em criotubos no nitrogênio líquido foram descongeladas em banho-maria a 37°C e plaqueadas em frascos de cultivo de 25 cm² contendo 15 ml de meio Eagle modificado por Dulbeco - DMEM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO – USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP, BR) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Sigma) e mantidas em incubadora (Precision Scientific) à temperatura controlada de 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Para a linhagem celular SCC 9, o meio de cultivo utilizado foi o Eagle modificado por Dulbeco - DMEM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO – USA)/ Nutriente Mixture HAM F12 (Gibco - Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) na proporção de 1:1, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco - Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1% de antibiótico/ antimicótico (Gibco - Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e Hidrocortisona (50 µg/mL).

O cultivo das células ocorreu em fluxo laminar e o seu crescimento acompanhado diariamente em microscópio invertido com contraste de fase (Axio Vert®, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). O meio de cultivo foi trocado de acordo com o metabolismo celular, em média, a cada dois dias. Após ocuparem 70% do frasco, as células foram subcultivadas. O meio de cultura do frasco foi removido e separado em tubo de centrifugação e a monocamada celular lavada uma vez com

solução fosfato-salina, sem cálcio e magnésio (PBS A), pH 7,2. Em seguida, as células foram separadas com 2ml de solução de tripsina (Sigma) a 0,25% com EDTA 1mM (Sigma) durante 5 minutos, a 37°C. A tripsina foi inativada com o soro fetal bovino contido no meio de cultura reservado anteriormente, e as células em suspensão transferidas para um tubo de ensaio e centrifugadas de 1000 a 1200 rpm por cinco minutos, à temperatura ambiente. Após aspiração do sobrenadante, o precipitado de células foi ressuspensionado em 1ml de meio de cultura. Alíquotas da suspensão foram distribuídas em frascos de cultivo de 25 cm² contendo 15ml de meio de cultura e novamente levadas de volta à estufa, onde cada procedimento deste deu origem a uma nova passagem de linhagem celular.

Todos os experimentos foram realizados simultaneamente em dois grupos:

- A. Controle, sem aplicação de quaisquer substâncias estimulantes ou inibidoras do crescimento celular;
- B. Curcumina, com aplicação de Curcumina e consequente inibição da proliferação celular.

Depois de cultivadas sobre placas de petri, as células foram tratadas com solução de curcumina com concentração de 75 µM de acordo com a solução de trabalho usada por Giudice (2012) após testar diferentes concentrações. As células foram tratadas após a preparação de uma solução de estoque de 100Mm em DMSO (a partir desta solução de estoque foram preparadas as soluções de tratamento diluídas em meio de cultivo).

O grupo controle passou por todos os processos pelos quais passaram o grupo curcumina, sendo, no entanto, tratado apenas com o solvente DMSO, utilizado para diluir a curcumina.

4.2.2 Teste de viabilidade celular

Para se verificar o número de células viáveis, utilizou-se o ensaio MTS (sal tetrazolium). As células FaDu, HaCat e SCC9 foram cultivadas em uma placa de ELISA (96 poços) branca, de fundo transparente. O número de células plaqueadas

foi 1×10^8 . As células FaDu e HaCat foram cultivadas em 150 μ l de meio DMEM sem soro e as células SCC9 foram cultivadas em 150 μ l de meio DMEM – F12 sem soro por 24 horas, para em seguida realizar-se o tratamento com curcumina. Após cada tempo de tratamento (24h e 48h) realizou-se o teste de viabilidade celular com o MTS *Kit* Cell Titer 96 (Promega, madison, Wisconsin, USA) após prévia substituição do meio de cultura por 180 μ l de PBS. Em cada poço foram aplicados 20 μ l da solução Cell Titer96, seguindo incubação por 180 min em estufa de CO₂ a 37° C. Os poços que possuíram mais células viáveis produziram maior quantidade do sal formazam tornando o meio azulado. A leitura da densidade óptica foi então proporcional ao número de células viáveis, sendo realizada em um aparelho de ELISA (ELX 800 Bio-Tek instruments Inc., Winooski, VT, EUA) com filtro de 490nm. Todos os experimentos de MTS foram realizados em triplicata.

4.2.3 Extração e quantificação de proteínas

Após a subconfluência (70% da área cultivável) realizou-se o tratamento com a curcumina por 24h e 48 h. O meio foi removido e as células lavadas 3x com PBSA a frio e colocadas sobre o gelo (4 °C). Adicionou-se 0,5 ml/placa de tampão RIPA⁺ (10 mM Tris HCl pH 7,5; 10mM desoxicolato de sódio; 1% Triton X-100; 150 mM NaCl; 0,1% SDS, 2 μ g/ml aprotinina, 2 μ g/ml pepstatina, 1Mm PMSF) acrescido de inibidor de protease (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) e as células incubadas por 10 min nesta temperatura sob agitação. Com o auxílio do "cell scraper" foi possível espalhar o tampão de RIPA+IP para coletar o lisado.

O lisado foi coletado, transferido para eppendorfs, centrifugado a 15000 rpm por 15 min a 4° C e o sobrenadante aliquotado e estocado a -80°C. Ao estocar o lisado, foi separado um eppendorf específico para a quantificação de proteínas para que não houvesse desnaturação proteica nas amostras de WB. As proteínas do lisado foram quantificadas com o kit BCA Protein Assay Kit da Pierce (Reagente B + Reagente A 1:50 + 25 μ l de amostra, ThermoScientific, EUA). A quantificação foi realizada em um aparelho de ELISA (ELX 800 Bio-Tek Instruments, Inc.) em placas de 96 poços contendo 200 μ l de BCA, além de 25 μ l de cada lisado ou 25 μ l de BSA,

nas concentrações indicadas pelo fabricante, para realização da curva padrão. As amostras permaneceram congeladas a -80°C até a realização dos ensaios de Western-Blotting.

4.2.4 Western-blotting

As alíquotas do lisado foram misturadas contendo 30µg de proteína total, com tampão de amostra (3% de dodecil sulfato de sódio, 150mM Tris pH6,8, 15% de β-mercaptoetanol, 30% de glicerol e 0,01% de azul de bromofenol) para concentração final de 1X. Em seguida, para desnaturação das proteínas, as amostras foram fervidas em banho-maria seco a 95°C por 5 min e então submetidas SDS-PAGE, sendo feita eletroforese à 100V por 180 minutos, em gel de acrilamida a 10% (temperatura ambiente). Foi utilizada cuba para eletroforese vertical (BioRad, Hercules, CA, USA) acoplada a fonte de elétrons (LPS 300V, Loccus do Brasil LTDA, São Paulo, Brasil). Para o controle da eletroforese e posteriormente do blot, utilizou-se padrão de peso molecular Precision Plus Kaleidoscope Protein Standard (Bio Rad, Hercules, CA, USA).

A transferência das proteínas do gel de acrilamida para a membrana de nitrocelulose foi feita por eletrotransferência em aparelho especial (Amersham-GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, Reino Unido) com o tampão de transferência (48mM Tris-Base; 39mM Glicina, 20% Metanol; pH 8,3) utilizado como recomendado pelo fabricante. A transferência foi feita com 60V por 180min. Após a transferência, a membrana foi submetida à fase de bloqueio ou lavada e seca para posterior reação. Para a imunorreação, foi feito o bloqueio dos sítios inespecíficos com TBST em BSA 1 % por 1-2h em temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida, a solução de bloqueio foi removida lavando-se três vezes a membrana com TBST (150mM cloreto de sódio, 20mM Tris base pH7,6, 0,1% Tween 20). O anticorpo primário de interesse anti-pAkt (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, MA, USA) foi diluído em solução de bloqueio e aplicado de acordo com o tempo recomendado pelo fabricante, e mantidos à temperatura ambiente sob agitação. Foram realizadas três lavagens para remoção do anticorpo não absorvido com TBST sob agitação durante 20 minutos e à

temperatura ambiente. O anticorpo secundário anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, MA, USA) foi então diluído em solução de bloqueio, aplicado e incubado por 45 minutos em temperatura ambiente, e depois lavado em TBST 1X por cinco minutos seguido de dois banhos de 10 minutos cada com PBS.

A detecção colorimétrica para análise por quimioluminescência foi feita através do kit ECL Plus (ECL Prime, Amersham-GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, Reino Unido). As membranas foram então digitalizadas em scanner para blot (C-Digit®, Li-Cor Biosciences, Lincoln, Reino Unido) e a quantificação das bandas foi feita pela análise de densidade utilizando o programa Image J.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR E EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Os resultados do teste de viabilidade celular serão apresentados nos gráficos seguintes. Os experimentos foram realizados em triplicata em uma MP de 96 poços e os gráficos (5.1, 5.2 e 5.3) obtidos por meio da média dos três resultados. A análise partia de um ponto zero. Para adquirir o ponto zero de cada linhagem, o meio de cultura de uma placa de petri com as células aderidas foi removido e então realizado o ensaio de MTS para ter um ponto de partida. Diariamente, antes e depois dos tratamentos, as células eram analisadas no microscópio invertido para verificação do experimento.

Gráfico 5.1 - Resultados obtidos no teste de viabilidade celular (MTS) para os grupos controle e curcumina da linhagem celular FaDu, durante um período de crescimento celular de 2 dias

O teste de viabilidade celular nos permitiu verificar o comportamento das linhagens celulares de carcinoma epidermoide após o tratamento com curcumina nos períodos de 24h e 48h. A diferença da atividade celular entre as linhagens era notória. Porém, a que mais se destacou foi a linhagem celular SCC9. Durante a análise dos gráficos, notou-se que a linhagem celular FaDu em 24h apresentou resultados iguais, porém em queda para os grupos controle e curcumina; entretanto, em 48h o grupo controle aumentou fortemente a sua viabilidade celular agindo de maneira contrária ao grupo curcumina que se manteve em acentuada queda.

Gráfico 5.2 - Resultados obtidos no teste de viabilidade celular (MTS) para os grupos controle e curcumina da linhagem celular HaCat, durante um período de crescimento celular de 2 dias

Na linhagem HaCat observa-se que o grupo controle apresentou uma linha de crescimento ascendente em 24h com posterior avanço em 48h. Já o grupo curcumina demonstrou queda as 24h e, principalmente às 48h.

Gráfico 5.3 - Resultados obtidos no teste de viabilidade celular (MTS) para os grupos controle e curcumina da linhagem celular SCC9, durante um período de crescimento celular de 2 dias

Ao avaliar a linhagem celular SCC9, pôde-se observar que o grupo controle apresentou um pequeno aumento em 24h com sequente aumento significativo em 48h. Entretanto, o grupo curcumina se manteve em forte queda desde as 24h permanecendo em queda até as 48h.

Diante disso, nota-se que o comportamento celular das linhagens é totalmente diverso nas primeiras 24 horas. Entretanto, em 48 horas as três linhagens apresentaram comportamentos iguais com um salto de crescimento do grupo controle e uma queda acentuada da viabilidade do grupo curcumina. Além disso, o período de 48 horas foi o que se demonstrou mais estável para a extração e quantificação de proteínas.

Para extração e quantificação de proteínas (em 24 e 48 horas) as células foram cultivadas em placas de petri (P100) e tratadas com curcumina. O aspecto visual da placa era notavelmente crescente nos grupos controle e decrescente nos grupos curcumina. As figuras 5.1 a 5.3 ilustram o aspecto da placa de petri imediatamente antes da extração de proteínas.

Figura 5.1 - FaDu: **A.** Células FaDu antes do tratamento; **B.** Grupo controle após 24 horas; **C.** Grupo Curcumina após 24 horas; **D.** Grupo Controle após 48 horas; **E.** Grupo Curcumina após 48 horas. Aumento 10x

Figura 5.2 - HaCat: **A.** Células HaCat antes do tratamento; **B.** Grupo controle após 24 horas; **C.** Grupo Curcumina após 24 horas; **D.** Grupo Controle após 48 horas; **E.** Grupo Curcumina após 48 horas. Aumento 10x

Figura 5.3 - SCC9: **A.** Células SCC9 antes do tratamento; **B.** Grupo controle após 24 horas; **C.** Grupo Curcumina após 24 horas; **D.** Grupo Controle após 48 horas; **E.** Grupo Curcumina após 48 horas. Aumento 10x

Em todas as linhagens observou-se uma diminuição significativa do número de células viáveis no grupo curcumina, porém, a que mais se destacou foi o grupo curcumina 48h da linhagem SCC9.

5.2 WESTERN-BLOTTING

O western-blotting revelou a resposta celular frente ao tratamento com curcumina. As figuras 5.4 e 5.5 mostram a imagem do padrão de expressão das proteínas.

5.2.1 HaCat

Figura 5.4 - HaCat – Padrão de expressão da proteína pAkt nos grupos controle e curcumina de 24 e 48 horas obtidas a partir da técnica de western-blotting

5.2.2 SCC9

Figura 5.5 - SCC9 – Padrão de expressão da proteína pAkt nos grupos controle e curcumina de 24 e 48 horas obtidas a partir da técnica de western-blotting

Os resultados da análise do western-blotting revelaram expressão de pAkt na linhagem HaCat nos grupos controle e curcumina, contudo, na linhagem SCC9 não houve expressão no grupo curcumina em 24 e em 48 horas.

Com a normalização das bandas, pudemos observar que na linhagem HaCat houve diminuição do pAkt no grupo curcumina 24h em relação ao grupo controle

24h. Porém, no grupo controle 48h, a expressão de pAkt foi menor que no grupo curcumina 48h.

Não obstante, na linhagem SCC9, não houve expressão de pAkt (normalização nula) nos grupos curcumina em relação aos respectivos grupos controle. No grupo controle 24h houve expressão de pAkt e no grupo controle 48h o aumento da expressão em relação ao aumento de 24h foi significativo.

Diante deste resultado, pode-se notar que a curcumina suprime a expressão do pAkt nesta linhagem de carcinoma epidermoide de boca, assim como tem suprimido a expressão do Akt em outros tipos de cânceres e de diversos outros genes associados a via de sinalização do Akt descritos na literatura. Contudo, na linhagem HaCat (Queratinócitos) a quantidade de pAkt aumentou no grupo curcumina 48h em relação ao controle 48h, fato que nos leva a indagar se a curcumina só age na célula desregulada e cancerosa ou se é a resposta específica desta linhagem.

Aggarwal et al. (2004) também encontraram resultados positivos da curcumina ao avaliarem linhagens (MDA 1986, Tu 686, Tu 167, MDA 686LN, JMAR C42) de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP) quando tratadas com curcumina. Seus principais resultados também foram de inibição, regulação negativa e supressão de genes presentes na via de sinalização do Akt (NF-kB, IκB, IL-6, CD1).

Em linhagens celulares de melanoma (MMAN, MMRU, RPEP, PMWK, Sk-mel-2, Sk-mel-5, Sk-mel-28 e MEWO) a curcumina foi capaz de induzir a apoptose independentemente da ativação de p53 e Bcl-2, mas via ativação da via caspase 8/Fas iniciado (Bush et al., 2001).

Os resultados de Zhao et al. (2015), confirmaram o efeito regulador da curcumina. Os resultados foram encontrados em linhagens de carcinoma de pulmão (SK-MES-1) e dentre eles está a regulação positiva do Akt1 e do STAT5 (se liga em alguns sítios do Akt1, aumentando sua transcrição).

Bharti et al. (2003) avaliou linhagens celulares de mieloma múltiplo humano (U266, RPMI 8226, MM.1) tratadas com curcumina e obteve diversos resultados que confirmam os encontrados em nosso trabalho. Dentre os principais resultados que foram encontrados, está a regulação negativa da forma ativa do NF-kB, a supressão

constitutiva da fosforilação do I κ B, da IKK quinase e dos produtos do NF- κ B. Diante disto, confirma-se a atividade antiproliferativa da curcumina e sugere-se que a curcumina exerce uma potente função de regulação da fosforilação de diversos genes presentes na via do Akt. Entretanto, estes genes estão mais “downstream” na via. E nossos resultados corroboram que a curcumina pode agir mais “upstream” regulando a fosforilação do Akt.

Em 2013, Bimonte et al. testou a curcumina em linhagens celulares de câncer de pâncreas (MIA PaCa-2, MPanc- 96, Panc-1) e encontrou a regulação negativa do NF- κ B, redução da expressão da IKK quinase e do I κ B após análise por western-blotting. Entretanto, os autores também realizaram testes *in vivo* em ratos que tiveram tumor de pâncreas induzido (divididos em grupo controle e grupo curcumina) e houve regulação negativa do NF- κ B nos tratamentos *in vivo*. Após experimentos de imuno-histoquímica, observou-se redução significativa de COX-2 e VEGF (proliferação e angiogênese) no grupo curcumina. Novamente, os genes com regulação negativa tanto *in vitro* quanto *in vivo* fazem parte da via de sinalização PI3K/Akt e são ativados pelo pAkt, gene que foi suprimido na linhagem SCC9 do nosso trabalho.

Sandur et al. (2007) analisaram linhagens celulares de leucemia mieloide crônica e carcinoma renal embrionário (KBM-5 e A293) e também encontraram resultados positivos ao tratarem as linhagens com curcumina. Os autores sugerem que o TNF (Fator de Necrose Tumoral) é um potente ativador do Akt e que a curcumina é capaz de inibi-lo. A análise por western-blotting confirmou que a curcumina realmente suprimiu a ativação do pAkt, confirmando os resultados obtidos em nosso trabalho. O intuito da pesquisa também era verificar se a curcumina poderia ser inibida pelo GSH (Glutathiona) e os autores concluíram que sim.

Os resultados obtidos em nosso trabalho corroboram os resultados que Tomita et al. (2006) encontraram ao analisar linhagens (MT-2, C5/MJ, SLB-1 e HUT-102) de células T adultas infectadas pelo vírus HTLV-I (causador da Leucemia de células T adultas - ATL). Os resultados foram positivos em relação a via do Akt quando tratadas com curcumina. As análises por western-blotting revelaram que a curcumina inibiu a fosforilação constitutiva do pAkt nas linhagens de células infectadas pelo HTLV-I e em células de ATL primárias. Ainda neste estudo, os autores verificaram a fosforilação da enzima PDK-1 que é responsável pela fosforilação e ativação do Akt e os resultados mostraram que a curcumina reduziu a

expressão de PDK-1 fosforilada de forma dose e tempo dependentes, do mesmo modo como aconteceu na análise de inibição do pAkt.

Diante do exposto, nossos resultados são compatíveis com a literatura em relação à ação antiproliferativa da curcumina em linhagens de carcinoma e supressão ou regulação negativa de diversos genes envolvidos na carcinogênese, principalmente os pertencentes à via de sinalização do Akt.

6. CONCLUSÕES

Após os experimentos e seus respectivos resultados, conclui-se que a curcumina demonstrou exercer uma potente ação antiproliferativa na linhagem celular de carcinoma epidermoide de língua (SCC9).

Quando tratadas com curcumina, as linhagens (HaCat e SCC9) expressaram resultados diferentes, sendo a proteína Akt fosforilada suprimida na linhagem de carcinoma epidermoide, enquanto na linhagem de queratinócitos (HaCat) ainda houve expressão.

Na linhagem FaDu, não foi possível identificar as bandas após diversas tentativas de revelação, logo, não há resultados para esta linhagem nas análises por Western-blotting.

Vimos que diversos genes descritos na literatura são ativados pelo pAkt em linhagens de carcinoma, desse modo, a supressão deste gene é de grande importância. Além disso, estes genes estão mais “downstream” na via e nossos resultados propõem que a curcumina pode agir mais “upstream”. Agora, novos estudos com novas metodologias são necessários para confirmar esta ação mais “upstream”. Portanto, a curcumina pode ser um potencial agente terapêutico nos cânceres, sendo capaz de inibir o processo de evolução da carcinogênese e, ainda, proporcionar melhor qualidade de vida ao paciente.

REFERÊNCIAS¹

Abrahao AC, Castilho RM, Squarize CH, Molinolo AA, Pinto-Junior D dos S, Gutkind JS. A role for COX2-derived PGE2 and PGE2-receptor subtypes in head and neck squamous carcinoma cell proliferation. *Oral Oncol.* 2010 Dec;46(12):880–887. doi: 10.1016/j.oraloncology.2010.09.005.

Abrahao AC, Giudice FS, Sperandio FF, Pinto Junior DD. Effects of celecoxib treatment over the Akt pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2013 Nov;42(10):793-8. doi: 10.1111/jop.12081.

Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 2003 Jan-Feb;23(1A):363-98.

Aggarwal S, Takada Y, Singh S, Myers JN, Aggarwal BB. Inhibition of growth and survival of human head and neck squamous cell carcinoma cells by curcumin via modulation of nuclear factor-kb signaling. *Int J Cancer.* 2004 Sep;111(5):679–92. doi: 10.1002/ijc.20333.

Aggarwal BB, Sung B. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. *Trends in Pharmacological Sciences* 2009 Feb;30(2):85-94. doi: 10.1016/j.tips.2008.11.002.

Ahmed KM, Cao N, Li JJ. HER-2 and NF-kappaB as the targets for therapy-resistant breast cancer. *Anticancer Res.* 2006 Nov-Dec;26(6B):4235-43.

Anand P, Sundaram C, Jhurani S, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin and cancer: An “old-age” disease with an “age-old” solution. *Cancer Lett.* 2008 Aug;267(1):133–64. doi: 10.1016/j.canlet.2008.03.025.

Anto RJ, Mukhopadhyay A, Denning K, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis through activation of caspase-8 BID cleavage and cytochrome c release: its suppression by ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xL. *Carcinogenesis.* 2002 Jan;23(1):143-50. doi: 10.1093/carcin/23.1.143.

¹ De acordo com o Estilo Vancouver.

Baldwin AS, Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:649-83. doi: 10.1146/annurev.immunol.14.1.649.

Barcellos-Hoff MH, Lyden D, Wang TC. The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2013 Jul;13(7):511–18. doi: 10.1038/nrc3536.

Belcher R, Hayes K, Fedewa S, Chen MY. Current Treatment of Head and Neck Squamous Cell Cancer. *J Surg Oncol*. 2014;110:551–74. doi: 10.1002/jso.23724.

Bernal F, Tyler AF, Korsmeyer SJ, Walensky LD, Verdine GL. Reactivation of the p53 tumor suppressor pathway by a stapled p53 peptide. *J Am Chem Soc*. 2007 Mar;129(9):2456-7. doi: 10.1021/ja0693587.

Bharti AC, Donato N, Singh S, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates the constitutive activation of nuclear factor-kappa B and I kappa B kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis. *Blood*. 2003 Feb;101(3):1053-62. doi: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2002-05-1320>.

Bimonte S, Barbieri A, Palma G, Luciano A, Rea D, Arra C. Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in an orthotopic mouse model of human pancreatic cancer. *BioMed Res Int*. 2013;2013:810423. doi: 10.1155/2013/810423.

Bush JA, Cheung KJ e Li G. Curcumin induces apoptosis in human melanoma cells through a Fas receptor / caspase -8 pathway independent of p53. *Experimental Cell Research*. 2001 Dec;271(2):305–14. doi:10.1006/excr.2001.5381.

Calabrese L, Bruschini R, Ansarin M, Giugliano G, De Cicco C, Ionna F, et al. Role of sentinel lymph node biopsy in oral câncer. *Acta Otorhinolaryngol Ital*. 2006 Dec; 26:345-9.

Carlsen H, Alexander G, Austenaa LM, Ebihara K, Blomhoff R. Molecular imaging of the transcription factor NF-kappaB, a primary regulator of stress response. *Mutat Res*. 2004 Jul;551(1-2):199-211. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.02.024.

Chang F, Lee JT, Navolanic PM, Steelman LS, Shelton JG, Blalock WL, et al. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia*. 2003 Mar;17(3):590-603. doi:10.1038/sj.leu.2402824.

Chen HW, Lee JY, Huang JY, Wang CC, Chen WJ, Su SF, et. al. Curcumin Inhibits Lung Cancer Cell Invasion and Metastasis through the Tumor Suppressor HLJ1. *Cancer Res.* 2008; 68:7428-7438. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6734.

Clarkson R. Ikb kinase alpha: a link in the chain of the mammary cycle. *Breast Cancer Res.* 2002;4(5):173-5. doi:10.1186/bcr446.

Darnell JE, Jr. Transcription factors as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2002 Oct;2(10):740-9. doi: 10.1038/nrc906.

Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X. NF-kB in development and progression of human cancer. *Virchows Arch.* 2005 May;446(5):475-82. doi: 10.1007/s00428-005-1264-9.

Du YF, Long QZ, Shi Y, Liu XG, Li XD, Zeng J, et al. Prostate-targeted mTOR-shRNA inhibit prostate cancer cell growth in human tumor xenografts. *Int J Clin Exp Med.* 2013;6(2):126-32.

Faivre S, Djelloul S, Raymond E. New paradigms in anticancer therapy: targeting multiple signaling pathways with kinase inhibitors. *Semin Oncol.* 2006 Aug;33(4):407-20. doi: <http://dx.doi.org/10.1053/j.seminoncol.2006.04.005>.

Franceschi S, Bidoli E, Negri E, Zambon P, Talamini R, Ruol A, et al. Role of macronutrients, vitamins and minerals in the aetiology of squamous-cell carcinoma of the oesophagus. *Int J Cancer.* 2000;86(5):626-31. doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(20000601).

Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Kumagai J, Ogushi T, Horie-Inoue K, et al. Increased expression of estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) is a negative prognostic predictor in human prostate cancer. *Int J Cancer.* 2007 Jun;120(11):2325-30. doi: 10.1002/ijc.22363.

Giudice FS. O envolvimento da remodelação da cromatina no controle do comportamento agressivo dos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço. [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2012.

Giudice FS, Dal Vechio AM, Abrahao AC, Sperandio FF, Pinto-Junior D dos S. Different expression patterns of pAkt, NF-kappaB and cyclin D1 proteins during the invasion process of head and neck squamous cell carcinoma: an in vitro approach. *J Oral Pathol Med.* 2011 May;40(5):405-11. doi: 10.1111/j.1600-0714.2010.00960.x.

Glezer I, Marcourakis T, Avellar MCW, Gorenstein C, Scavone C. O fator de transcrição NF-kB nos mecanismos moleculares de ação de psicofármacos. *Ver Bras Psiquiatr.* 2000;22(1):26-30. doi: 10.1590/S1516-44462000000100008.

Globocan.iarc.fr/[homepage on the internet]. Lyon, France. The Section of Cancer Information (CIN) at Internacional Agency for Research on Cancer (IARC) 2015. GLOBOCAN 2015: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worlwide. [citado 20 nov. 2015]. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>

Goel A, Jhurani S, Aggarwal BB. Multi-targeted therapy by curcumin: how spicy is it? *Mol Nutr Food Res.* 2008 Sep;52(9):1010-30. doi: 10.1002/mnfr.200700354.

Golias CH, Charalabopoulos A, Charalabopoulos K. Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *Int J Clin Pract.* 2004 Dec;58(12):1134-41. doi: 10.1111/j.1742-1241.2004.00284.x.

Gormally E, Caboux E, Vineis P, Hainaut P. Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: practical aspects and biological significance. *Mutat Res.* 2007 May-Jun;635(2-3):105-17. doi: 10.1016/j.mrrev.2006.11.002.

Guertin DA, Sabatini DM. An expanding role for mTOR in cancer. *Trends Mol Med.* 2005 Aug;11(8):353-61. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2005.06.007>

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan;100(1):57-70. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9).

INCA – Instituto Nacional do Câncer. 2015 [citado 02 nov. 2015]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>.

Jang MK, Sohn DH, Ryu JH. A curcuminoid and sesquiterpenes as inhibitors of macrophage TNF- α release from *Curcuma zedoaria*. *Planta Med.* 2001 Aug;550-2. doi: 10.1055/s-2001-16482.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics, 2008. *CA Cancer J Clin.* 2011 Mar; 61(2):69-90. doi: doi:10.3322/caac.20107.

Joyce D, Albanese C, Steer J, Fu M, Bouzahzah B, Pestell RG. NF-kappaB and cell-cycle regulation: the cyclin connection. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001 Mar;12(1):73-90. doi: 10.1016/S1359-6101(00)00018-6.

Kapoor V, Zaharieva MM, Das SN, Berger MR. Erufosine simultaneously induces apoptosis and autophagy by modulating the Akt-mTOR signaling pathway in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett.* 2012 Jun;319(1):39-48. doi: 10.1016/j.canlet.2011.12.032.

Kunnumakkara AB, Anand P, Aggarwal BB. Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. *Cancer Lett.* 2008 Oct;269(2):199–22. doi:10.1016/j.canlet.2008.03.009.

Lehrbach DM, Nita ME, Cecconello I. Molecular aspects of esophageal squamous cell carcinoma carcinogenesis. *Arq Gastroenterol.* 2003 Oct-Dec;40(4):256-61. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-28032003000400011>.

Lodha R, Bagga A. Traditional Indian systems of medicine. *Ann Acad Med Singapore.* 2000 Jan;29(1):37–41.

Manning BD, Cantley LC. Akt/PKB signaling: navigating downstream. *Cell.* 2007 Jun;129(7):1261-74. doi:10.1016/j.cell.2007.06.009.

Masuelli L, Di Stefano E, Fantini M, Mattera R, Benvenuto M, Marzocchella L, et al. Resveratrol potentiates the in vitro and in vivo anti-tumoral effects of curcumin in head and neck carcinomas. *Oncotarget.* 2014 Nov;5(21):10745-10762. doi: 10.18632/oncotarget.2534.

Mimeault M, Batra SK. Functions of tumorigenic and migrating cancer progenitor cells in cancer progression and metastasis and their therapeutic implications. *Cancer Metastasis Rev.* 2007 Mar;26(1):203-14. doi: 10.1007/s10555-007-9052-4.

Mohan R, Sivak J, Ashton P, Russo LA, Pham BQ, Kasahara N, et al. Curcuminoids inhibit the angiogenic response stimulated by fibroblast growth factor-2, including expression of matrix metalloproteinase gelatinase B. *J Biol Chem.* 2000 Apr;275(14):10405-12. doi: 10.1074/jbc.275.14.1040.

Moore SR, Johnson NW, Pierce AM, Wilson DF. The epidemiology of lip cancer: a review of global incidence and aetiology. *Oral Dis.* 1999;5(3):185-95. doi: 10.1111/j.1601-0825.1999.tb00300.x.

Mukhopadhyay A, Bueso-Ramos C, Chatterjee D, Pantazis P e Aggarwal BB. Curcumin downregulates cell survival mechanisms in human prostate cancer cell lines. *Oncogene.* 2001;Nov;20(52):7597-609.

Mukhopadhyay A, Banerjee S, Stafford LJ, Xia C, Liu M, Aggarwal BB. Curcumin-induced suppression of cell proliferation correlates with down-regulation of cyclin D1 expression and CDK4-mediated retinoblastoma protein phosphorylation. *Oncogene*. 2002 Dec;21(57):8852-61. doi: 10.1038/sj.onc.1206048.

National Cancer Institute. National Institutes of Health. Representação esquemática das regiões anatômicas da cavidade oral. [Bethesda]: U.S Department of Health and Human Services/National Institutes of Health/National Cancer Institute; 2015 [citado 22 nov. 2015]. Disponível em: <http://www.cancer.gov/types/head-and-neck/patient/lip-mouth-treatment-pdq>.

National Cancer Institute. National Institutes of Health. Representação esquemática da via de sinalização do Akt e genes associados. [Bethesda]: U.S Department of Health and Human Services/National Institutes of Health/National Cancer Institute; 2015 [citado 22 nov. 2015]. Disponível em: http://cgap.nci.nih.gov/Pathways/BioCarta/h_aktPathway

Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal*. 2002 May;14(5):381-95. doi:10.1016/S0898-6568(01)00271-6.

Oakley EJ, Van Zant G. Unraveling the complex regulation of stem cells: implications for aging and cancer. *Leukemia*. 2007;21(4):612-21. doi: 10.1038/sj.leu.2404530.

Pang RP, Zhou JG, Zeng ZR, Li XY, Chen W, Chen MH, et al. Celecoxib induces apoptosis in COX-2 deficient human gastric cancer cells through Akt/GSK3beta/NAG-1 pathway. *Cancer Lett*. 2007 Jun;251(2):268-77. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2006.11.032>.

Park JS, Jun HJ, Cho MJ, Cho KH, Lee JS, Zo JI, et al. Radiosensitivity enhancement by combined treatment of celecoxib and gefitinib on human lung cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2006 Aug;12(16):4989-99. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-2259.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005 Mar;55(2):74-108.
Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Jan;8(1):49-62. doi: 10.1038/nrm2083.

Petty WJ, Dragnev KH, Dmitrovsky E. Cyclin D1 as a target for chemoprevention. *Lung Cancer*. 2003 Aug;41 Suppl 1:S155-61. doi: 10.1016/S0169-5002(03)00159-4.

Pontes HA, de Aquino Xavier FC, da Silva TS, Fonseca FP, Paiva HB, Pontes FS, et al. Metallothionein and p-Akt proteins in oral dysplasia and in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med*. 2009 Sep;38(8):644-50. doi: 10.1111/j.1600-0714.2009.00787.x.

Pontes HA, Pontes FS, Fonseca FP, de Carvalho PL, Pereira EM, de Abreu MC, et al. Nuclear factor kappaB and cyclooxygenase-2 immunoexpression in oral dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Ann Diagn Pathol*. 2013 Feb;17(1):45-50. doi: 10.1016/j.anndiagpath.2012.04.008.

Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. *Front Oncol*. 2014 Apr;4:64. doi:10.3389/fonc.2014.00064.

Ravi R, Bedi A. NF-kappaB in cancer--a friend turned foe. *Drug Resist Updat*. 2004 Feb;7(1):53-67. doi: 10.1016/j.drug.2004.01.003.

Reagan-Shaw S, Ahmad N. The role of Forkhead-box Class O (FoxO) transcription factors in cancer: a target for the management of cancer. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007;224(3):360-8. doi: 10.1016/j.taap.2006.12.003.

Saha A, Kuzuhara T, Echigo N, Fujii A, Suganuma M, Fujiki H. Apoptosis of human lung cancer cells by curcumin mediated through up-regulation of "growth arrest and DNA damage inducible genes 45 and 153". *Biol Pharm Bull*. 2010;33(8):1291-9. doi: <http://doi.org/10.1248/bpb.33.1291>.

Sandur SK, Ichikawa H, Pandey MK, Kunnumakkara AB, Seng B, Sethi G, et al. Role of prooxidants and antioxidants in the anti-Inflammatory and apoptotic effects of curcumin (diferuloylmethane). *Free Radic Biol Med*. 2007 Aug;43(4):568–80. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.05.009.

Scully C, Bagan JV. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Diseases*. 2009 Nov;15:388–399. doi: 10.1111/j.1601-0825.2009.01563.x.

Sekulic A, Hudson CC, Homme JL, Yin P, Otterness DM, Karnitz LM, et al. A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-Akt signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells. *Cancer Res*. 2000 Jul;60(13):3504-13.

Seo SS, Song YS, Kang DH, Park IA, Bang YJ, Kang SB, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in association with clinicopathological prognostic factors and molecular markers in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2004 Mar;92(3):927-35. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2003.11.055>.

Shai A, Brake T, Somoza C, Lambert PF. The human papillomavirus E6 oncogene dysregulates the cell cycle and contributes to cervical carcinogenesis through two independent activities. *Cancer Res*. 2007 Feb;67(4):1626-35. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3344.

Shishodia S, Sethi G, Aggarwal BB. Curcumin: getting back to the roots. *N Y Acad Sci*. 2005 Nov;1056:206-17. doi: 10.1196/annals.1352.010.

Shishodia S, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Role of curcumin in cancer therapy. *Curr Probl Cancer*. 2007 Jul-Aug;31:243-305.

doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.crrproblcancer.2007.04.001>.

Shureiqi I, Baron JA. Curcumin chemoprevention: the long Road to clinical translation. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011 Mar;4(3):296–8. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0060.

Silva BS, Yamamoto FP, Pontes FS, Cury SE, Fonseca FP, Pontes HA, et al. TWIST and p-Akt immunoexpression in normal oral epithelium, oral dysplasia and in oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012 Jan;17(1):29-34. doi: 10.4317/medoral.17344.

Sperandio FF, Giudice FS, Correa L, Pinto DS, Jr., Hamblin MR, de Sousa SC. Low-level laser therapy can produce increased aggressiveness of dysplastic and oral cancer cell lines by modulation of Akt/mTOR signaling pathway. *J Biophotonics*. 2013 Oct;6(10):839-47. doi: 10.1002/jbio.201300015.

Squarize CH, Castilho RM, Sriuranpong V, Pinto DS, Jr., Gutkind JS. Molecular cross-talk between the NFkappaB and STAT3 signaling pathways in head and neck squamous cell carcinoma. *Neoplasia*. 2006 Sep;8(9):733-46. doi: 10.1593/neo.06274.

Srinivasan K, Sambaiah K. The effect of spices on cholesterol levels 7a-Hydroxylase activity and on serum e hepatic cholesterol levels in the rat. *Int J Vitam Nutr Res*. 1991;61(4):364- 9.

St-Germain ME, Gagnon V, Parent S, Asselin E. Regulation of COX-2 protein expression by Akt in endometrial cancer cells is mediated through NF-kappaB/IkappaB pathway. *Mol Cancer*. 2004;3:7. doi: 10.1186/1476-4598-3-7.

Tomita M. Curcumin targets Akt cell survival signaling pathway in HTLV-I-infected T-cell lines. *Cancer Sci.* 2006 Apr;97(4):322-7. doi: 10.1111/j.1349-7006.2006.00175.x.

Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global Cancer Statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015 Mar; 65(2):87–108. doi: 10.3322/caac.21262.

Tsang CK, Qi H, Liu LF, Zheng XF. Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases. *Drug Discov Today.* 2007 Feb;12(3-4):112-24. doi: 10.1016/j.drudis.2006.12.008.

Tsantoulis PK, Kastrinakis NG, Tourvas AD, Laskaris G, Gorgoulis VG. Advances in the biology of oral cancer. *Oral Oncol.* 2007;43(6):523-34. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2006.11.010>.

Vander Broek R, Mohan S, Eytan DF, Chen Z, Van Waes C. The PI3K/Akt/mTOR axis in head and neck cancer: functions, aberrations, crosstalk, and therapies. *Oral Dis.* 2015 Oct;21(7):815-25. doi: 10.1111/odi.12206.

Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002 Jul;2(7):489-501. doi:10.1038/nrc839.

Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.* 2009 Apr-May;45(4-5):309–16. doi:10.1016/j.oraloncology.2008.06.002.

West KA, Castillo SS, Dennis PA. Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. *Drug Resist Updat.* 2002 Dec;5(6):234-48. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1368-7646\(02\)00120-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1368-7646(02)00120-6).

Who. International Classification of Disease (ICD). Geneva; 1994 [citado 24 nov. 2015]. Disponível em: <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2016/en#/>

Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M. The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell.* 1997 Oct;91(2):243-52. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80406-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80406-7).

Zbarsky V, Datla KP, Parkar S, Rai DK, Aruoma OI, Dexter DT. Neuroprotective properties of the natural phenolic antioxidants curcumin and naringenin but not

quercetin and fisetin in a 6-OHDA model of Parkinson's disease. *Free Rad Res.* 2005 Oct;39(10):1119-25. doi: 10.1080/10715760500233113.

Ždychová J, Komers R. Emerging role of Akt kinase/protein kinase B signaling in pathophysiology of diabetes and its complications. *Physiol. Res.* 2005;54(1):1-16.

Zhan Y, Chen Y, Liu R, Zhang H, Zhang Y. Potentiation of paclitaxel activity by curcumin in human breast cancer cell by modulating apoptosis and inhibiting EGFR signaling. *Archives of Pharm Res.* 2014 Aug;37(8):1086–95. doi: 10.1007/s12272-013-0311-3.

Zhang M, Fang X, Liu H, Guo R, Wu X, Li B, et al. Bioinformatics-based discovery and characterization of an Akt-selective inhibitor 9-chloro-2-methylellipticinium acetate (CMEP) in breast cancer cells. *Cancer Lett.* 2007 Jul;252(2):244-58. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2006.12.035>.

Zhao W, Wang Y, Gao N, Han Z, Yu H. Potential anticancer effect of curcumin in human lung squamous cell carcinoma. *Thoracic Cancer* 2015 Jul; 6(4):508-16. doi: 10.1111/1759-7714.12222.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS COX-2, AKT, NFκB, IκB, MTOR E CD1 EM CULTURA DE CÉLULAS DE CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE CABEÇA E PESCOÇO TRATADAS COM CURCUMINA.

Pesquisador: Décio dos Santos Pinto Junior

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 30858614.8.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 697.534

Data da Relatoria: 23/05/2014

Apresentação do Projeto:

O carcinoma epidermóide (CE) é a neoplasia maligna mais comum da região de cabeça e pescoço. A etiologia do CE é muito variada, não existindo um único fator causador definido ou aceito. Sua patogênese é claramente multifatorial, envolvendo fatores extrínsecos, como fumo, ingestão crônica de bebidas alcoólicas e radiação solar (Franceschi et al., 2000)(2). Acredita-se atualmente que o desenvolvimento do CE é um processo de várias etapas, no qual inúmeros fatores externos e alterações genéticas podem estar envolvidos (Tsantoulis et al., 2007)(3). A carcinogênese é entendida como o resultado de um acúmulo de alterações gênicas que se processam ao longo das múltiplas gerações de um clone celular e geram progressivamente características fenotípicas particulares, culminando na manifestação completa do fenótipo neoplásico (Mimeault et al., 2007(4); Gormally et al., 2007(5); Oakley, Van Zant, 2007(6)). Durante o desenvolvimento do câncer, as células neoplásicas adquirem um número de características fenotípicas que as levam à rápida e ilimitada proliferação, invasão dos tecidos vizinhos e metástases regionais e a locais secundários

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 697.534

(Hanahan; Weinberg, 2000(7)). Como resultado de inúmeras pesquisas no mundo, as vias de sinalização que estão alteradas durante a oncogênese e a forma como estas vias agem desregulando processos de proliferação e sobrevivência celular vem sendo elucidada (Reagan-Shaw; Ahmad, 2006(8); Fujimura et al., 2007(9); Bernal et al., 2007(10)). Dentre estas vias, uma das que vem sendo bastante estudada é a via do AKT (Squarize et al., 2006(1), Pontes et al., 2009(11). Abrahao et al., 2010(12), Giudice et al., 2011(13), Sperandio et al., 2012(14), Silva et al 2012(15), Pontes et al., 2013(16), Abrahao et al., 2013(12)). O estudo das vias de sinalização é fundamental para uma melhor compreensão dos processos da carcinogênese. Nos últimos anos, inúmeros trabalhos foram realizados para tentar elucidar quais genes estão envolvidos em processos cruciais do desenvolvimento do câncer, dentre eles proliferação celular, inibição da apoptose, angiogênese, adesão celular, dentre outros.

Objetivo da Pesquisa:

A curcumina é uma substância que vem sendo estudada como importante agente terapêutico contra o câncer e neste estudo serão utilizadas outras metodologias para tentarmos aprofundar e elucidar os achados já obtidos em estudos anteriores.

Objetivo Primário:

- Verificar os efeitos da Curcumina em linhagens celulares de CE de cabeça e pescoço. - Analisar o comportamento de proteínas presentes na via de sinalização do AKT em células de CE de cabeça e pescoço quando tratadas com Curcumina.

Objetivo Secundário:

- Estudar os efeitos da Curcumina sobre os índices de proliferação celular de linhagens celulares de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. -

Analisar a expressão de proteínas obtidas pelas técnicas Western Blot e imunoprecipitação para melhor compreensão dos processos de transcrição e tradução destas moléculas em células de CE tratadas com curcumina.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não há.

Benefícios:

Possível comprovação dos efeitos da curcumina sobre a via de sinalização do AKT, podendo ser

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 697.534

utilizados futuramente para o tratamento antineoplásico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estima-se que a curcumina pode agir na via de sinalização do AKT inibindo a proliferação celular. Assim, poderá haver um controle da progressão do Carcinoma Epidermóide.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentam a folha de rosto e o projeto detalhado.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais semestrais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Efetivamente nenhum trabalho experimental apresenta risco zero, porém entende-se que o cultivo de células é um trabalho de baixo risco.

Como as linhagens celulares são provenientes de banco (aquisições), não implicações éticas para este projeto.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 25 de Junho de 2014

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br