STEPHANIE KENIG VIVEIROS

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

São Paulo

2016

STEPHANIE KENIG VIVEIROS

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

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

Viveiros, Stephanie Kenig.

Análise da expressão da proteína pAKT em cultura de células de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço tratadas com curcumina e celecoxib / Stephanie Kenig Viveiros ; orientador Décio dos Santos Pinto Júnior. -- São Paulo, 2016.

82 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. Curcumina. 3. Western blotting. I. Pinto Júnior, Décio dos Santos. II. Título.

Viveiros SK. Análise da expressão das proteínas pAKT em cultura de células de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço tratadas com curcumina e celecoxib. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / /2016

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico esse trabalho aos meus pais, Sérgio e Simone, que além de me darem esse lindo presente: a VIDA, me proporcionaram toda essa jornada acadêmica, me incentivando em todas as etapas deste processo, acalentando-me nos momentos de angústia, dividindo comigo meus risos e comemorando junto a mim as minhas vitórias.

À minha irmã, Victória, pela paciência e compreensão por todas às vezes, que por mais que a saudade batesse forte, tivemos que abrir mão de nossas tardes juntas para que eu pudesse desenvolver este trabalho.

Ao meu opa, Harry Kurt Kenig (*in memoriam*), sei que de algum lugar o senhor está vendo tudo o que está acontecendo e espero que esteja orgulhoso de mim.

À minha avó, Idília, que com seus “Tenha calma, filha, tudo vai dar certo!” foi me ajudando a superar cada pedra que aparecia no meu caminho.

E a todos que torceram e oraram para o sucesso deste projeto!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente o meu Orientador, Décio dos Santos Pinto Júnior, por ter me aceitado como orientada, pelo apoio, dedicação, suporte, incentivo, sustos, risadas, conselhos, por acreditar e confiar em mim mesmo quando eu mesma duvidava. Você é um grande exemplo e eu tenho muito orgulho de ser sua orientada.

Aos professores da disciplina: Profa. Dra. Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa, Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes, Profa. Dra. Marina Helena Cury Gallottin, Profa. Dra. Karem Lopes Ortega, Profa. Dra. Marília Trierveiler Martins e Profa. Dra. Andrea Mantesso Pobocik; e aos professores da Patologia geral Profa. Dra. Luciana Corrêa e Prof. Dr. Paulo Henrique Braz da Silva por toda ajuda, disponibilidade para sanar minhas dúvidas e todos os conhecimentos que me transmitiram em todas as oportunidades.

Síntique Nunes Schulz Moraes, minha dupla de laboratório, uma ajudando a outra nos experimentos e nos momentos que achávamos que não ia dar, mas deu!

Fabiana Mesquita Barros Silvestre, minha dupla dois! Minha amiga, minha conselheira, minha irmã! O que você faz por mim eu não sei nem como retribuir!

Flávia Rosin, não tenho palavras pra te agradecer pro TUDO que você fez por mim, toda ajuda, atenção, disponibilidade, paciência e carinho.

Bruno Sedassari, **P**risila Tobouti e **L**ourdes Chiok nossa equipe de pensamentos positivos e torcedores organizados! Quantas noites fazendo experimentos e sempre animados!

Letícia Drumond e **L**ara Gimenez minhas amigas, quantas horas conversando, nos ajudando, trocando experiências acadêmicas, ou não. A jornada não teria sido a mesma sem vocês.

Gabriela Nagata e **L**ilia Alves Rocha! Muito obrigada pela dedicação, ajuda e paciência que tiveram comigo durante todo esse tempo!

Aos colegas: Douglas Magno, Nelise Lascane, Cibele Pelissari, Marina Teixeira, Juliana Seo, Karin Fernandes, Daniela Assis, Fernanda Mombrini Pegatti, Renata Moura, Lilian Caldas Quirino, Ana Maria Hoyos, Rubens Caliento, Marília Figueiredo, Danielle Carvalho, Carolina Mussi, Nathalia Paiva, Cíntia Martins.

A vocês Zilda, Néia, Fátima e Vinícius pela ajuda, paciência e amizade.

A vocês **A**driana, **E**lisa e **J**uvani muito obrigada por toda ajuda nos laboratórios, na rotina e pela amizade de vocês.

À minha orientadora de iniciação científica e TCC, Profª. Dra. Renata Tucci, pela atenção, carinho, dedicação, paciência e cuidado que teve comigo durante todo o processo de realização daquele trabalho e por me inspirar a seguir esse caminho que não é fácil mas é muito gratificante. Além de te admirar como mestre, vejo em você uma grande amiga. Muito obrigada por tudo!

Ao Prof. Dr. Claudio Costa, por me dar a oportunidade de realizar a minha primeira iniciação científica e me mostrar como é instigante e gratificante o mundo da pesquisa.

A todos os professores que tive a oportunidade de conhecer durante o curso de graduação e que dedicaram seu tempo e paciência para transmitir seus conhecimentos para melhorar a minha formação.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho e para a minha jornada pedagógica.

*“Eu acredito demais na sorte. E tenho constatado que,
quanto mais duro eu trabalho, mais sorte eu tenho.”*

(Thomas Jefferson)

RESUMO

Viveiros SK. Análise da expressão da proteína pAKT em cultura de células de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço tratadas com curcumina e celecoxib [dissertação]. São Paulo. Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Versão Corrigida.

Diversas alterações genéticas estão associadas à patogênese do carcinoma epidermoide (CE), a neoplasia maligna mais comum de cabeça e pescoço. Algumas dessas alterações comprometem proteínas pertencentes à via de sinalização do AKT, envolvida em diferentes fenômenos celulares. Este projeto 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 expressão dessas moléculas em células de CE tratadas com Curcumina e Celecoxib. Foram utilizadas duas linhagens celulares de CE de cabeça e pescoço e uma linhagem de queratinócitos que foram divididas em quatro grupos: a. grupo controle não tratado; b. células tratadas com Curcumina, c. células tratadas com Celecoxib d. células tratadas com Curcumina e Celecoxib. A proliferação celular foi monitorada através do teste de viabilidade celular. A análise da expressão da proteína foi realizada através da técnica do Western Blot. Desta forma, foi possível entender em maior profundidade a ação do Celecoxib, da Curcumina e sua associação na via do AKT em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço. A associação de Curcumina com Celecoxib foi o tratamento que apresentou melhores resultados na redução da viabilidade celular. A linhagem SCC9 não apresentou expressão de pAKT após o tratamento com Curcumina e com a associação desta com o Celecoxib. A linhagem HaCat apresentou maior estabilidade na expressão de pAKT nos dois tempos de tratamento no grupo tratado com a associação das substâncias. A combinação da Curcumina com o Celecoxib mostrou resultados satisfatórios e promissores.

Palavras chave: Carcinoma Epidermoide. Curcumina. Celecoxib. Western blotting

ABSTRACT

Viveiros SK. Expression analysis of pAKT in cultured cells of head and neck squamous cell carcinomas treated with curcumin and celecoxib [dissertation]. São Paulo. Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Versão Corrigida.

Several genetic changes are associated with the squamous cell carcinoma's (SCC) pathogenesis, the most common malignant head and neck tumor. Some of these changes compromise proteins that belong to the AKT signaling pathway, involved in different cellular's phenomena. The aim of this project was to study the expression of pAKT in head and neck SCC cell lines in order to investigate possible alterations in these molecules's expression in cells treated with Curcumin and Celecoxib. Two head and neck SCC cell lines and a line of keratinocytes was divided into four groups: a. control group: untreated; b. cells treated with Curcumin, c. cells treated with Celecoxib d. cells treated with Curcumin and Celecoxib. Cell proliferation was monitored by cell viability test. Analysis of the protein's expression was performed using the Western blot technique. Then was possible to understand the action of Curcumin, Celecoxib and its association in the AKT pathway in head and neck SCC. Curcumin's association with Celecoxib was the treatment that showed best results in cell viability reduction. The SCC9 cell line not presented pAKT expression after the treatment with Curcumin and its association with Celecoxib. The cell line HaCat showed greater stability in pAkt expression during the treatment period with the association of substances. The association of Curcumin and Celecoxib showed satisfactory and promising results.

Keywords: Squamous cell carcinoma. Curcumin. Celecoxib. Western blotting

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1 - Mapa de incidência de casos de câncer de lábio e cavidade oral no mundo em pacientes de ambos os sexos	15
Figura 1.2 - Número de novos casos e de mortalidade pelos 10 cânceres que mais acometem a população brasileira entre homens e mulheres.....	16
Figura 1.3 - Esquema representativo do acúmulo de mutações por múltiplas gerações de um clone celular, culminando na manifestação do fenótipo neoplásico	17
Figura 1.4 - Capacidades adquiridas pelas células cancerígenas	17
Figura 1.5 - Via de Sinalização do AKT	19
Figura 2.1 - Mecanismos que ativam e são ativados pela atividade transcricional do NF-kB	24
Figura 2.2 - Ativação direta do mTOR pelo AKT	24
Figura 2.3 - Mecanismo de ativação da ciclina D1, sua relação com o NF-kB e a ação desta no ciclo celular	25
Figura 2.4 - Mecanismo de ação da COX-2 na regulação de eventos como apoptose, angiogênese e migração celular.....	25
Figura 2.5 - Alvos moleculares da Curcumina	27

Figura 4.1 - Células que foram cultivadas a: Fadu, b: HaCat e c: SCC 9. Em 1 observa-se as células mais individualmente e em 2 observa-se a formação das colônias celulares (10x).....	33
Figura 4.2 - Composição da placa nas primeira 24 horas, antes da aplicação dos tratamentos	35
Figura 4.3 - Distribuição dos grupos de tratamento nas placas, diluídos em meio com soro.....	36
Figura 4.4 - Representação da extração das proteínas e separação das alíquotas.....	37
Figura 4.5 - Representação da placa utilizada para quantificação de proteínas	38
Figura 4.6 - (A) Em um gel de poliacrilamida foram colocadas as amostras e um controle de proteínas com pesos moleculares conhecido (1). Ao conectar á uma fonte de energia essas proteínas correm pelo gel de acordo com o seu peso molecular (2). (B) Através da eltrotransferência a impressão das proteínas passam do gel para a membrana de nitrocelulose (1) , através de método quimioluminescente (2) e do scanner as bandas reveladas da membrana passam para o <i>software</i> de imagem (3).	39
Figura 5.1 - Placas da Fadu na hora da extração com 24 horas de tratamento (A: Controle, B: Celecoxib, C: Curcumina, D: Associação)	57
Figura 5.2 - Placas da Fadu na hora da extração com 48 horas de tratamento (A: Controle, B: Celecoxib, C: Curcumina, D: Associação)	58
Figura 5.3 - Placas da HaCat na hora da extração com 24 horas de tratamento (A: Controle, B: Celecoxib, C: Curcumina, D: Associação)	59

Figura 5.4 - Placas da HaCat na hora da extração com 48 horas de tratamento (A: Controle, B: Celecoxib, C: Curcumina, D: Associação - área mais vazia, E: Associação – área mais cheia)	60
Figura 5.5 - Placas da SCC9 na hora da extração com 24 horas de tratamento (A: Controle, B: Celecoxib, C: Curcumina, D: Associação)	61
Figura 5.6 - Placas da SCC9 na hora da extração com 48 horas de tratamento (A: Controle, B: Celecoxib, C: Curcumina, D: Associação)	62
Figura 5.7 - Resultados Western-blot pAKT. Sequencia das amostras da direita para a esquerda: Controle, celecoxib, curcumina e associação (24 horas); controle, celecoxib, curcumina e associação (48 horas)	63
Figura 5.8 - Resultados Western-blot pAKT. Sequencia das amostras da esquerda para a direita: Controle, celecoxib, curcumina e associação (24 horas); controle, celecoxib, curcumina e associação (48 horas).....	66

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5.1 - Resultados dos testes de viabilidade celular realizados com a linhagem Fadu com os 6 tratamentos por 24, 48 e 72 horas	43
Gráfico 5.2 - Resultados dos testes de viabilidade celular realizados com a linhagem HaCat com os 6 tratamentos por 24, 48 e 72 horas	46
Gráfico 5.3 - Resultados dos testes de viabilidade celular realizados com a linhagem SCC9 com os 6 tratamentos por 24, 48 e 72 horas	49
Gráfico 5.4 - Resultados dos testes de viabilidade celular realizados com a linhagem Fadu com os tratamentos e tempos de escolha	55
Gráfico 5.5 - Resultados dos testes de viabilidade celular realizados com a linhagem HaCat com os tratamentos e tempos de escolha	56
Gráfico 5.6 - Resultados dos testes de viabilidade celular realizados com a linhagem SCC9 com os tratamentos e tempos de escolha	56
Gráfico 5.7 - Resultado do Wester-blot da proteína pAKT na linhagem celular HaCat nos grupos com os tratamentos por 24 e 48 horas	63
Gráfico 5.8 - Resultado do Wester-blot da proteína pAKT na linhagem celular SCC9 nos grupos com os tratamentos por 24 e 48 horas	66

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 Carcinoma epidermoide.....	21
2.2 Proteína estudada.....	21
2.2.1 AKT	22
2.3 Substâncias utilizadas para o tratamento.....	26
2.3.1 Curcumina	26
2.3.2 Celecoxib	27
2.3.3 Associação	28
3 PROPOSIÇÃO	30
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 Cultivo Celular	31
4.2 Teste de Viabilidade Celular	34
4.3 Extração e quantificação de proteína	36
4.4 Western-blot.....	38
4.5 Análise estatística	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 Teste de viabilidade celular.....	42
5.1.1 Fadu.....	42
5.1.2 HaCat.....	46
5.1.3 SCC9	48
5.2 Escolha da concentração ideal da associação e tempo ideal do tratamento.....	54
5.3 Extração de proteínas	57
5.3.1 Fadu.....	57
5.3.2 HaCat.....	59
5.3.3 SCC9	61
5.4 Western- blotting	63
5.4.1 HaCat.....	63
5.4.2 SCC9	66
6 CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

No ano de 2012, foram registrados 14,1 milhões de novos casos de câncer, no mundo. Desses, podemos observar que a incidência dos cânceres de lábio e cavidade oral é bastante grande e bem distribuída no globo (Figura 1.1). No Brasil, é o 10º câncer mais frequente na população em geral (Figura 1.2) (Globocan, 2012).

Fonte Globocan, 2012

Figura 1.1 - Mapa de incidência de casos de câncer de lábio e cavidade oral no mundo em pacientes de ambos os sexos

Fonte: Globocan, 2012

Figura 1.2 - Número de novos casos e de mortalidade pelos 10 cânceres que mais acometem a população brasileira entre homens e mulheres

Mais de 90 % das neoplasias de cavidade oral e orofaringe são de carcinoma epidermoide (CE), que consiste em uma neoplasia maligna de origem epitelial caracterizada pela proliferação de queratinócitos atípicos e a consequente invasão destes no tecido conjuntivo e estruturas subjacentes (Johnson *et al.*, 2005; Neville *et al.* 2009). Essa neoplasia se origina através de um processo gradual de múltiplas etapas nas quais estão envolvidos diversos fatores tanto extrínsecos como fumo, ingestão de bebidas alcóolicas, e radiação solar, este último relacionado ao carcinoma de lábio; quanto fatores intrínsecos como mutações gênicas. Sendo assim, sua etiologia é considerada multifatorial, não existindo um único fator causador definido ou aceito (Johnson *et al.*, 2005; Neville *et al.*, 2009; Franceschi *et al.*, 2000; Tsantoulis *et al.*, 2007).

A fim de que seja expresso o fenótipo neoplásico, é necessário que um clone celular acumule mutações gênicas por múltiplas gerações (Figura 1.3) e que essas sejam capazes de expressar características fenotípicas que possam culminar na expressão do mesmo como: rápida e ilimitada proliferação, invasão de tecidos vizinhos e metástases regionais e à distância, dentre outras (Figura 1.4) (Mimeault *et*

al., 2007; Gormally et al., 2007; Oakley, Van Zant, 2007; Hanahan; Weinberg, 2000).

Figura 1.3 – Esquema representativo do acumulo de mutações por múltiplas gerações de um clone celular, culminando na manifestação do fenótipo neoplásico

Fonte: Hanahan; Weinberg, 2000 página 58

Figura 1.4 - Capacidades adquiridas pelas células cancerígenas

Esses processos alterados durante a oncogênese são regulados por vias de sinalização que vem sendo estudadas por inúmeras pesquisas ao redor do mundo, com o objetivo de elucidar como agem na regulação e desregulação destes processos (Reagan-Shaw; Ahmad, 2007; Fujimura et al., 2007; Bernal et al., 2007).

As vias de sinalização são sequências de eventos iniciados por um estímulo celular, através do qual ocorre a ativação de um gene principal que por sua vez estimula ou inibe a produção de outros genes ou proteínas secundários a ele na via gerando como resultado a ativação ou inibição de processos celulares comuns, como apoptose, proliferação celular, angiogênese, entre outros.

Dentre esses eventos regulados pelas vias de sinalização tem-se alguns mais diretamente relacionados com a carcinogênese, como: a proliferação celular, inibição da apoptose, angiogênese, adesão celular, migração celular, dentre outros. Para que se possa compreender melhor esses processos envolvidos na carcinogênese, torna-se essencial que se estude as vias de sinalização reguladoras desses e seus mecanismos de ação para que se possa identificar os genes que atuam direta ou indiretamente regulando-os e assim possa-se fazer uma escolha mais precisa quanto aos alvos terapêuticos que devem ter maior eficácia.

Uma das vias que vem sendo bastante estudada nessa linha é a via do AKT (Figura 1.5) (Squarize et al., 2006, Pontes et al., 2009. Abrahao et al., 2013, Giudice et al., 2011; Sperandio et al., 2013; Silva et al., 2012; Pontes et al., 2013). Também chamado de proteína quinase B (PKB), o AKT é uma serina/treonina quinase indicada como importante reguladora de vários processos celulares vitais, como apoptose, proliferação, diferenciação e metabolismo. A regulação inapropriada desta via tem sido relacionada com o desenvolvimento de vários tipos de cânceres em humanos (Nicholson, Anderson, 2002; Giudice et al., 2011; Pontes et al., 2013).

Fonte: Cancer Genome Anatomy Project

Figura 1.5 - Via de Sinalização do AKT

A importância dessa via de sinalização no desenvolvimento de neoplasias, segundo alguns estudos, se estende além da regulação dos processos celulares tendo uma participação crucial na resposta do câncer frente a agentes terapêuticos. Essa ampla participação no processo oncogênico torna essa via um interessante alvo terapêutico (West; Castillo, 2002; Abrahao et al., 2013).

Devido a isso, foi selecionado para esse trabalho o estudo da proteína AKT fosforilada (pAKT), já que como pode-se observar na figura 1.5 é através dessa fosforilação que ocorre a ativação de diversos genes como: NF-κB, IκB e mTOR que promovem a sobrevivência celular, além de outros genes também regulados por essa proteína como a ciclina D1 e a COX-2. Todos esse genes e proteínas tem comprovada, na literatura, sua participação ativa no processo da carcinogênese de cabeça e pescoço, ainda que não esteja estabelecido o modo efetivo como influem nesta (Seo et al., 2004; Ahmed et al., 2006; Park et al., 2006; Zhang et al., 2007; Kapoor et al., 2012; Broek et al., 2015; Yu et al., 2004; Alves Junior, 2007; Shakibaei

et al., 2007; Pang et al., 2007; Abrahao et al., 2013).

Sendo então a fosforilação do AKT um evento chave para ativação de diversos genes que levam a sobrevivência celular, um dos muitos eventos da oncogênese, o intuito desse trabalho foi verificar os efeitos do Celecoxib e da Curcumina, substâncias consideradas potenciais agentes antineoplásicos pela literatura, individualmente e associados, na expressão do pAKT e viabilidade celular em células de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (Bimonte et al., 2013, Zhan et al., 2014; Kashfi; Rigast, 2005, Abrahao et al., 2013; Roh et al., 2004; Vital-Reyes et al. 2006).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Carcinoma epidermoide

De acordo com a Classificação Internacional de Doenças (CID versão 9, categorias 140-146, 149) o câncer de boca representa um sub grupo dos cânceres de cabeça e pescoço que pode acometer lábios, mucosa jugal, gengiva, palato, língua, assoalho bucal e orofaringe. Cerca de 90% dos câncer orais são representados por carcinomas epidermóides (CE) . (DATASUS, 2008; Johnson *et al.*, 2005; Neville *et al.*, 2009 ; Tsantoulis *et al.*, 2007).

O CE consiste em uma proliferação de queratinócitos displásicos em direção ao tecido conjuntivo. Esta invasão ocorre sob a forma de ilhas ou cordões, podendo haver diversos graus de diferenciação epidermoide dessas células chegando a ocorrer produção de pérolas de queratinas, por vezes extensas em CE mais bem diferenciados. As células que infiltram o tecido conjuntivo, perdem a adesão ao tecido epitelial tornando-se estruturas independentes permitindo que a infiltração se torne mais profunda, destruindo o tecido a medida que progride podendo atingir células adiposas, musculares, vasos e nervos da região afetada (Johnson *et al.*, 2005; Neville *et al.*, 2009).

Essa doença acomete mais homens, entre 5º e 6º décadas de vida, que consomem bebidas alcólicas e fumam. Os sintomas e sinais clínicos da doença costumam variar dependendo do sítio e da extensão da lesão, podendo ir desde pequenas lesões brancas, vermelhas ou mistas assintomáticas até causar grandes destruições das estruturas adjacentes e dor intensa (Johnson *et al.*, 2005; Neville *et al.*, 2009; Tsantoulis *et al.*, 2007).

2.2 Proteína estudada

2.2.1 AKT

O AKT é uma serina/treonina quinase de 59 kDa ativada pelo estímulo celular gerado por diversos fatores de crescimento. A via de sinalização PI3K/AKT regula funções celulares normais e fundamentais como: crescimento, proliferação e sobrevivência celular e movimentos; que também são importantes na oncogênese. A regulação inapropriada desta via tem sido associada não só com o desenvolvimento de cânceres, mas também de outras doenças como diabetes. O que torna essa via um interessante alvo terapêutico contra o câncer é que além de agir durante a oncogênese ela também participa da resposta do câncer frente a agentes terapêuticos (Zhang et al., 2007; Pang et al., 2007).

O estudo de St-Germain et al. (2004) que teve como objetivo verificar a relação entre as proteínas AKT, NF- κ B e COX-2, em linhagens de carcinoma de endométrio que possuíam a proteína PTEN inativa levando a ativação do AKT sugeriu em seus resultados que o AKT exerce importante função regulatória sobre a expressão do NF- κ B através da fosforilação do I κ B nas células do câncer de endométrio. Quando fosforilado o I κ B liberou o NF- κ B, que estava inativo no citoplasma, para entrar no núcleo e exercer sua função na transcrição genética, aumentando os níveis de COX-2. Após realizar o bloqueio do pAKT, o NF- κ B ficou restrito ao citoplasma e os níveis de COX-2 diminuíram.

Giudice et al., (2011) estudaram a expressão de pAKT, NF- κ B e ciclina D1 em linhagens celulares de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço submetidas a um ensaio de invasão in vitro e encontraram que o pAKT e o NF- κ B tiveram expressão diferente no citoplasma e no núcleo dependendo da linhagem celular estudada. A Ciclina D1 foi detectada no núcleo de todas as células estudadas e foi significativamente identificada nos clones invasivos de língua e da faringe. Os autores sugerem que o processo de invasão de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço tem a participação da pAKT, NF- κ B e ciclina D1.

Estudos como esses demonstram o envolvimento dos genes da via de sinalização do AKT na carcinogênese de cabeça e pescoço, tornando fundamental a compreensão destes para o entendimento do processo de formação e progressão dessa doença e futuramente aperfeiçoar a terapêutica dos pacientes acometidos.

O pAKT participa da regulação de genes e proteínas de grande importância na carcinogênese (Tabela 2.1):

Tabela 2.1 - Genes regulados/ envolvidos na via do AKT e seus respectivos mecanismos de ação

Genes envolvidos na via AKT	Mecanismo de ação
NK-kB	<ul style="list-style-type: none"> - Quando da sua ativação e translocação para o núcleo induz a transcrição de genes envolvidos com a sobrevivência celular (Clarkson, 2002). - Grande quantidade de genes são regulados por esse fator, tornando-o interessante alvo terapêutico (Glezer et al, 2000; Perkins, 2007) (Figura 2.1).
IKB	<ul style="list-style-type: none"> - O Inibidor de KB (IKB) se liga ao NF-kB mantendo o inativo no citoplasma. - A proteína pIKK quando ativada pelo AKT é capaz de fosforilar o IKB levando-o pra ubiquitinação e consequente degradação; permitindo que o NF-kB, uma vez livre, possa ir para o núcleo (Chang et al., 2003; Dolcet et al., 2005).
mTOR	<ul style="list-style-type: none"> - Participa da biogênese de ribossomos e fosforila substratos impedindo que ocorra a tradução proteica (Tsang et al., 2007; Broek et al., 2015). - Sua regulação é ainda controversa e incerta, mas estudos demonstram que o mTOR é um substrato direto do AKT (Sekulic et al., 2000) (Figura 2.2).
Ciclina D1	<ul style="list-style-type: none"> - Conhecida por possuir importante função no ponto de checagem G1/S do ciclo celular quando os níveis desta proteína estão mais elevados no núcleo. - Evidências apontadas por estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> mostram a sua associação no processo de carcinogênese (Lehrbach et al. , 2003; Shai et al., 2007). - Pesquisas indicam que o aumento dos níveis de CD1 ocorre pro ação do NF-kB (Perkins, 2007) (Figura 2.3).
COX 2	<ul style="list-style-type: none"> - Diversos tipos de neoplasias tem sido relacionada com a elevada expressão da COX-2, o prognóstico dessas parece estar diretamente relacionado com a expressão da COX-2 (O'Connor et al., 2004; Nagoya et al., 2014). - Há diversas possibilidades sobre a indução da expressão da COX-2 dentro da via do AKT (Reddy et al. , 2000; Tang et al., 2001; Kundu et al., 2006). - A PGE2 produzidas no microambiente tumoral em decorrência da superexpressão de COX-2 em células tumorais e inflamatórias pode promover o crescimento de células de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço de forma autócrina e parácrina, atuando sobre os receptores da PGE2 que são amplamente expressos na maioria das células do carcinoma epidermoide (Abrahao et al., 2010) (figura 2.4).

Fonte: Oeckinghaus et al., 2011 página 704

Figura 2.1 – Mecanismos que ativam e são ativados pela atividade transcritcional do NF-κB

Nature Reviews | Drug Discovery

Fonte: Holmes, 2011 página 563

Figura 2.2 – Ativação direta do mTOR pelo AKT

Fonte: Karin, Cao, Greten & Li, 2002 página 306

Figura 2.3 – Mecanismo de ativação da ciclina D1, sua relação com o NF-κB e a ação desta no ciclo celular

Fonte: Gupta & DuBois, 2001 página 16

Figura 2.4 - Mecanismo de ação da COX-2 na regulação de eventos como apoptose, angiogênese e migração celular

2.3 Substâncias utilizadas para o tratamento

2.3.1 Curcumina

Isolada pela primeira vez em 1815 do rizoma da planta *Cúrcuma longa* L., e obtida em forma cristalina em 1870 a Curcumina consiste de um pó amarelo-laranja, insolúvel em água e éter, mas solúvel em etanol, acetona e dimetilsufóxido (Aggarwal et al., 2003; Goel et al., 2008). Estudos tem demonstrado seus efeitos benéficos no tratamento de várias patologias, como doenças biliares, diabetes, mal de Alzheimer, mal de Parkinson dentre outras (Zbarsky et al., 2005).

Com relação ao câncer, ela 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 e 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).

Quanto 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, suprime a ativação de vários fatores de transcrição que são implicados na carcinogênese, tais como NF- κ B e pelo menos 2 transdutores de sinal e ativadores da transcrição de proteínas (STAT3, STAT5) (Bharti et al., 2003). Além disso estudos evidenciam que ela modula a expressão de genes envolvidos na proliferação e invasão celular, metástase, angiogênese e resistência à quimioterapia, contra-regula a 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).

Os alvos moleculares da Curcumina podem ser encontrados na figura 2.5.

Fonte: Shishodia et al., 2007 página 246

Figura 2.5 - Alvos moleculares da Curcumina

2.3.2 Celecoxib

A atuação dos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) foi descoberta por Vane, em 1971. São primordialmente inibidores de COX e, portanto bloqueadores da formação de prostaglandina (pg) em tecidos normais e inflamados.

Os efeitos terapêuticos anti-inflamatório, analgésico e antipirético dos AINEs convencionais, que inibem a COX-1, estão associados a graves efeitos colaterais, principalmente relacionados ao sistema gastrointestinal que ocorrem devido a importante função protetora que a COX-1 exerce na região gastrointestinal (Fu et al., 2004).

Em 1998 uma nova classe de drogas chamadas de inibidoras de COX-2 foi desenvolvida e o Celecoxib foi o primeiro inibidor específico de COX-2 aprovado para tratar os sinais e sintomas de processos inflamatórios, sendo que sua maior

vantagem parece ser o menor número de efeitos colaterais principalmente no que se refere ao trato gastrointestinal (Tive, 2000).

Alguns trabalhos demonstraram que muitos tipos de câncer produzem altos níveis de COX-2, sugerindo uma provável ação dos AINEs na prevenção e/ou tratamento do câncer além do seu uso para tratamento de doenças inflamatórias crônicas. Muitos estudos têm demonstrado que o Celecoxib apresenta uma importante indicação clínica para o tratamento dos pacientes com câncer e é utilizado para prevenir o câncer em pacientes com Adenomatose Polipose hereditária (Kashfi; Rigast, 2005).

Seu efeito antineoplásico é ainda pouco conhecido, mas as bases moleculares para tal efeito têm sido atribuídas principalmente à inibição da COX-2 (Roh et al., 2004; Vital-Reyes et al., 2006, Abrahao et al., 2013). No entanto, o Celecoxib pode atuar de outras formas, mesmo na ausência da COX-2, apresentando efeitos compatíveis com a prevenção do câncer como inibição da proliferação celular, indução da apoptose, inibição da angiogênese (Kashfi; Rigast, 2005, Abrahao et al., 2013).

O trabalho de Alves Junior, (2007) buscou entender melhor os mecanismos celulares alvo do Celecoxib e seus efeitos sobre a via de sinalização AKT, estudando o comportamento de duas linhagens de células de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP) e os resultados deste artigo mostraram diminuição dos níveis de ciclina D1, mas não de pAKT *in vitro*, além de diminuição do número de células viáveis após o tratamento com Celecoxib. Concluíram assim, que o Celecoxib pode ser considerado uma droga adjuvante para o tratamento do CECP.

2.3.3 Associação

A relação entre câncer e a expressão de COX-2 vem fazendo com que se busque alternativas cada vez mais eficientes para a diminuição dos níveis dessa proteína e conseqüentemente aumentando os efeitos benéficos dessa diminuição no tratamento do câncer.

A associação de Curcumina e Celecoxib tem sido testada em células de adenocarcinoma pancreático, câncer colorretal – também testado em modelo animal, ratos - e osteoartrite, com efeitos benéficos na diminuição proliferação celular e diminuição da expressão de COX-2 nos dois primeiros casos – não foi testado no modelo animal de câncer colorretal (Lev-Ari, et al, 2005 b; Lev-Ari, et al 2006; Lev-Ari, et al., 2005 a; Shpitz, et al 2006). A Curcumina e o Celecoxib, associados á silibinina apresentaram resultados positivos em estudos *in vitro* de isquemia do miocárdio (Wan et al., 2014).

Todos os estudos encontrados na literatura até o presente momento com relação á associação dessas substâncias, tiveram como objetivo verificar o efeito desta na redução da viabilidade celular, e os que tiveram intenção de verificar redução da expressão de proteína, o fizeram com a COX-2. Sendo assim, não há relatos até o presente momento sobre os efeitos dessa associação na expressão do pAKT e nem estudos sobre os efeitos dela na inibição da proliferação celular em CECp.

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho pretende:

- Estudar os efeitos da Curcumina e do Celecoxib isoladamente e quando associados sobre os índices de proliferação celular de linhagens celulares de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço
- Analisar a expressão da proteína pAKT obtidas pelas técnicas Western Blot para melhor compreensão da expressão desta molécula em células de carcinoma epidermoide tratadas com Curcumina, Celecoxib, e Curcumina associada ao Celecoxib
- Verificar se a associação da Curcumina com o Celecoxib melhora ou anula o efeito que têm isolados
- Verificar se ao associar essas duas substâncias se é possível conseguir resultados positivos com uma concentração menor do que a utilizada individualmente.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo sob parecer 658.995 em 23/05/2014. (Anexo A)

4.1 Cultivo Celular

Foram utilizadas duas linhagens celulares comerciais de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP) e uma de queratinócitos todas linhagens comerciais da ATCC (Figura 4.1):

- SCC9 (Carcinoma epidermoide de língua);
- FADU (Carcinoma epidermoide de faringe) e
- HaCat (Queratinócitos).

As células foram plaqueadas em frascos de 75cm² contendo 15 mL de DMEM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO – USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP, BR) , 1% de solução antibiótica-antimicótica (Sigma), 1% de L-glutamina (FADU e HaCat), 44% de F-12 (SCC9) e 0,8% de hidrocortisona (SCC 9) e mantidas em incubadora (Precision Scientific) à temperatura controlada de 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

Após ocuparem 70% do frasco, as células foram subcultivadas. O meio de cultura do frasco foi removido e a monocamada celular lavada uma vez com solução fosfato-salina, sem cálcio e magnésio (PBS A), pH 7,2. Em seguida, as células foram separadas com 1ml de solução de tripsina (Sigma) a 0,25% com EDTA 1mM (Sigma) durante 5 minutos, a 37°C. A tripsina foi inativada com o soro fetal bovino contido no novo meio de cultura, e as células em suspensão transferidas para um tubo de ensaio e centrifugadas a 1000 rpm por cinco minutos, à temperatura ambiente. Após aspiração do sobrenadante, o precipitado de células foi ressuspensionado em 1ml de novo meio de cultura. As alíquotas da suspensão foram distribuídas em frascos de cultivo de 175 cm² contendo 20mL 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 subsequentes foram realizados simultaneamente em quatro grupos:

1. Controle, sem aplicação de quaisquer substâncias estimulantes ou inibidoras do crescimento celular;
2. Inibição da proliferação celular com aplicação de Curcumina;
3. Inibição da proliferação celular com aplicação de Celecoxib;
4. Inibição da proliferação celular com a aplicação de Curcumina associada ao Celecoxib.

O celecoxib foi doado pela Companhia Farmacêutica Pfizer.

As células foram tratadas com uma solução de Curcumina de concentração: 75 μ M (Giuduce, 2012) e de Celecoxib de concentração de 25 μ M (Moura, 2014).

O grupo tratado com a associação de substâncias foi subdividido e foi realizado o tratamento com três diferentes concentrações durante o teste de viabilidade celular: Celecoxib 25 μ M + Curcumina 75 μ M (Associação 1), Celecoxib 15 μ M + Curcumina 50 μ M (Associação 2) e Celecoxib 05 μ M + Curcumina 10 μ M (associação 3), para verificar a concentração ideal de trabalho desta.

O grupo controle passou por todos os processos pelos quais passaram o grupo Curcumina, Celecoxib e Curcumina associada ao Celecoxib, sendo, no entanto, tratado apenas com o DMSO 1%, utilizado para diluir a Curcumina e o Celecoxib.

Figura 4.1- Células que foram cultivadas a: Fadu, b: HaCat e c: SCC 9. Em 1 observa-se as células mais individualmente e em 2 observa-se a formação das colônias celulares (10x)

4.2 Teste de Viabilidade Celular

O experimento foi realizado em triplicata amostral e experimental em placa de ELISA (96 poços). Foram plaqueadas 8×10^3 células por poço e as células foram cultivadas em 150µl de meio por 24 horas (figura 4.2). Em seguida realizaram-se os tratamentos com Celecoxib, Curcumina e Curcumina associada ao Celecoxib (figura 4.3). Após cada tempo de tratamento (24h, 48h e 72h), foi realizado o teste de viabilidade celular com o MTS *Kit* Cell Titer96 (Promega, madison, Wisconsin, USA). Em cada poço foi aplicados 20µl da solução Cell Titer96 e 180 µl de PBS A, seguindo de incubação por 180 min em estufa de CO₂ a 37° C. Os poços que possuíam mais células viáveis produziram maior quantidade do sal formazan tornando o meio alaranjado. A leitura da densidade óptica foi então proporcional ao número de células viáveis e foi realizada em um aparelho de ELISA (ELX 800 Bio-Tek instruments Inc.) com filtro de 490nm.

Apesar da transcrição ocorrer em minutos foi escolhido medir o efeito global das substâncias nas células em dias.

Figura 4.2 - Composição da placa nas primeira 24 horas, antes da aplicação dos tratamentos

Figura 4.3 - Distribuição dos grupos de tratamento nas placas, diluídos em meio com soro

4.3 Extração e quantificação de proteína

Foram plaqueadas 10^5 células em placas petri de 100mm de diâmetro, com 12 mL de meio. Após a subconfluência (70% da área cultivável), foi realizado o tratamento com o Celecoxib, Curcumina e a associação que apresentou melhor resultado no teste de viabilidade celular por 48 horas. As extrações foram realizadas em dois tempos, 24 e 48 horas. O meio foi removido e as células lavadas 2X com PBSA a frio e colocadas sobre o gelo (4 °C).

Foi adicionado 0,5 ml/placa de tampão RIPA⁺ (10 mM Tris HCl pH 7,5; 10mM desoxicolato de sódio; 1% Triton X-100; 150 mM NaCl; 0,1% SDS, 2µg/ml aprotinina, 2µg/ml pepstatina, 1Mm PMSF) e as células incubadas por 10 min nesta temperatura sob agitação. O lisado centrifugado a 15000 rpm por 15 min e o sobrenadante aliqotado e estocado a -80 °C.

Figura 4.4 –Representação da extração das proteínas e separação das alíquotas

As proteínas do lisado foram quantificadas com o kit BCA Protein Assay Kit da Pierce (Reagente B + Reagente A 1:50 + 25µl de amostra). A quantificação foi realizada em um aparelho de ELISA (ELX 800 Bio-Tek Instruments, Inc.) em placas de 96 poços contendo 200µl de BCA, além de 12,5 µl de cada lisado com 12,5 µl de RIPA⁺ ou 25 µl de BSA, nas concentrações indicadas pelo fabricante, para realização da curva padrão.

Figura 4.5 – Representação da placa utilizada para quantificação de proteínas

Os resultados obtidos foram então multiplicado por 2 a fim de reverter a diluição feita na placa.

4.4 Western-blot

As alíquotas do lisado contendo 30µg de proteína total foram misturadas com tampão de amostra para concentração final de 1X. Em seguida, as amostras foram fervidas por 5 min e então submetidas SDS-PAGE, sendo feita eletroforese à 100V, em gel de acrilamida a 10%. O padrão de peso molecular utilizado foi o Kaleidoscope Prestained Standards (BioRad).

A transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose foi feita por eletrotransferência em aparelho especial (Amersham mini VE) com o tampão de transferência (48mM Tris-Base; 39mM Glicina, 20% Metanol; pH 8,3) utilizado como recomendado pelo fabricante. A transferência foi feita com 60V por 180min. Após a

transferência, a membrana foi submetida à fase de bloqueio ou lavada e mantida hidratada em TBST 1X para posterior reação.

Para a imunoreação, foi feito bloqueio dos sítios inespecíficos com 5% de BSA em TBST por 1-2h em temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida, a solução de bloqueio foi removida e o anticorpo primário de interesse (anti-AKT (Santa Cruz), diluídos em solução de bloqueio e aplicados de acordo com o tempo recomendado pelo fabricante, mantidos à temperatura ambiente sob agitação. Foram realizadas três lavagens de 15 minutos para remoção do anticorpo não absorvido com TBST sob agitação e à temperatura ambiente. O anticorpo secundário foi então diluído em solução de bloqueio e aplicado por 1 hora e meia, e depois foram realizadas três lavagens de 15 minutos para remoção do anticorpo não absorvido com TBST sob agitação durante e à temperatura ambiente.

A detecção das bandas foi feita através do método de quimioluminescência com o kit ECL Plus (Amersham), a digitalização das membranas foi feita através do *scanner* para blot *C-DiGit® Blot Scanner* (LI-COR Biosciences, Lincon, Reino Unido) segundo instruções do fabricante e a quantificação das bandas foi realizada através do programa ImageJ (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, Estados Unidos).

Figura 4.6 – (A) Em um gel de poliacrilamida foram colocadas as amostras e um controle de proteínas com pesos moleculares conhecido (1). Ao conectar á uma fonte de energia essas proteínas correm pelo gel de acordo com o seu peso molecular (2). (B) Através da eltrotransferência a impressão das proteínas passam do gel para a membrana de nitrocelulose (1) , através de método quimioluminescente (2) e do scanner as bandas reveladas da membrana passam para o *software* de imagem (3).

Tabela 4.1 – Anticorpos utilizados nas reações de Western-blot

Anticorpo primário	Procedência	Espécie	Diluição
Anti-pAKT (Ser 437)	Cell signaling (clone 193H12)	Coelho	1:2000
Anti-βactina (clone AC-15)	Sigma	Camundongo	1:5000

4.5 Análise estatística

O teste de viabilidade celular foi realizado em triplicata, permitindo assim a análise estatística dos seus resultados através dos testes ANOVA ou Kruskal-Wallis,

realizados pelo programa BioEstat 5.0 (Instituto Mamirauá, Belém, PA, Brasil), sendo os resultados considerados estatisticamente relevantes quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Teste de viabilidade celular

O teste de viabilidade celular teve dentre os objetivos verificar a concentração ideal de trabalho da associação entre a Curcumina e o Celecoxib, assim como determinar o tempo ideal de tratamento com as substâncias.

Para que se chegasse a concentração ideal da associação, foram selecionadas três concentrações de cada uma das drogas utilizadas iniciando-se com as mesmas concentrações de Curcumina e Celecoxib utilizadas individualmente de 75 μM e 25 μM (Associação 1), respectivamente, e depois fazendo duas regressões significativas (50 μM e 15 μM – Associação 2 ; 10 μM e 5 μM – Associação 3) a fim de se detectar se os resultados seriam mais ou menos expressivos.

A associação dessas drogas é algo inédito na literatura em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço (CECP), a intenção de associa-las foi verificar se seus efeitos seriam anulados ou potencializados e neste caso se conseguiríamos um bom resultado utilizando uma concentração menor do que a utilizada no tratamento com as substâncias isoladamente.

5.1.1 Fadu

Gráfico 5.1 - Resultados dos testes de viabilidade celular realizados com a linhagem Fadu com os 6 tratamentos por 24, 48 e 72 horas

Ao analisar o comportamento desta linhagem celular, observa-se (Gráfico 5.1) que houve uma queda, após 24 horas de tratamento, de todos os grupos. O que foi surpreendente já que se esperava que o grupo controle tivesse um aumento do número das células viáveis, pois não sofreu adição de nenhuma substância inibidora da proliferação celular. Esta queda pode ter ocorrido em função do manuseio da placa durante a aplicação dos tratamentos. Quanto aos outros grupos a queda da viabilidade celular vai ao encontro do esperado, uma vez que foram tratados com substâncias potencialmente inibidoras da proliferação celular.

Em ordem decrescente de viabilidade celular notamos que os grupos se encontravam dispostos da seguinte maneira:

- ❖ Celecoxib;
- ❖ Associação 1;
- ❖ Associação 3;
- ❖ Controle;
- ❖ Associação 2;
- ❖ Curcumina.

No entanto, após 48 horas de tratamento notou-se que o grupo controle voltou a aumentar como o esperado sendo o grupo com maior índice de células viáveis. Os grupos tratados com a associação 3, o Celecoxib e a associação 1 também tiveram um aumento da viabilidade celular ainda que menor que a do grupo controle; enquanto os tratados com a Curcumina e a associação 2 tiveram uma diminuição da viabilidade celular. Ficando, em ordem decrescente de células viáveis, os grupos organizados da seguinte forma:

- ❖ Controle;
- ❖ Associação 3;
- ❖ Celecoxib;
- ❖ Associação 1;
- ❖ Curcumina;
- ❖ Associação 2.

Após 72 horas de tratamento houve um aumento da viabilidade celular do grupo tratado com a associação 3 superando o grupo controle onde pode-se observar que houve uma queda da mesma. Os grupos tratados com associação 1, Curcumina, associação 2 e Celecoxib também apresentaram queda da viabilidade celular. Alterando o quadro observado para o seguinte, mantendo-se a ordem decrescente de viabilidade celular:

- ❖ Associação 3;
- ❖ Controle;
- ❖ Associação 1;
- ❖ Curcumina;
- ❖ Associação 2 ;
- ❖ Celecoxib.

Ao observar todo o período de tratamento nota-se que o grupo controle, apesar da queda inicial nas primeiras 24 horas, teve um aumento da viabilidade celular no tempo seguinte e uma queda no último tempo de tratamento que pode ter ocorrido pela inibição da proliferação por contato devido a alta população celular presente no poço de cultivo. Esses resultados, apesar da queda inicial de 24 horas, concordam o que era esperado para esse grupo, já que não foi adicionado nenhum tipo de substância inibidora da proliferação celular.

Enquanto o grupo tratado exclusivamente com Celecoxib, apresentou um comportamento interessante, uma vez que nas primeiras 24 horas de sua aplicação

a redução promovida neste grupo foi inferior ao esperado, apresentando mais células viáveis que o controle. Já com 48 horas, foi iniciado o processo de inibição da proliferação celular o que pode ser observado pelo seu aumento ter sido inferior ao controle. E apenas com 72 horas de tratamento foi observado uma real diminuição da viabilidade celular, no entanto, como esta queda também ocorreu no grupo controle, não podemos afirmar se ocorreu efetivamente por sua ação inibidora, ou se ocorreu o mesmo que no grupo controle e houve indução da apoptose em virtude da alta população celular.

Já o grupo tratado com Curcumina apresentou uma queda progressiva da viabilidade celular durante todo o período do tratamento.

Quanto as associações, a associação 3 apesar da boa redução de viabilidade celular que ocorreu com 24 horas de tratamento, apresentou um aumento desta nos tempos seguintes. A associação 2 apresentou uma queda gradual em todos os tempos de tratamento e a associação 1 apresentou uma queda inicial, após 48 horas esse grupo apresentou um aumento da viabilidade celular e uma nova redução desta com 72 horas de tratamento.

	Controle	Celecoxib 25 µM	Curcumina 75 µM	Associ- ação 1	Associ- ação 2	Associ- ação 3
Tempo zero	0,043	0,043	0,043	0,043	0,043	0,043
24 horas	0,011333 333	0,0176666 67	0,011	0,015	0,01166 6667	0,01366 6667
48 horas	0,098333 333	0,033	0,01033333 3	0,02333 3333	0,00866 6667	0,03366 6667
72 horas	0,019	0,0016	0,0063	0,013	0,003	0,032

P= 0,49

Quadro 5.1 - Análise estatística dos tratamentos aplicados na linhagem celular Fadu analisados pelo teste de Kruskal-Wallis

No entanto, apesar da diferença entre os grupos ser microscopicamente significativa, podemos observar (Quadro 5.1) que após a realização do teste de Kruskal-Wallis não houve diferença estatisticamente significativa entre nenhum dos grupos de tratamento.

5.1.2 HaCat

Gráfico 5.2 - Resultados dos testes de viabilidade celular realizados com a linhagem HaCat com os 6 tratamentos por 24, 48 e 72 horas

A linhagem celular HaCat apresentou (Gráfico 5.2) um aumento inicial do grupo controle já com 24 horas após a aplicação dos tratamentos, como o esperado. Os grupos tratados com o Celecoxib e associação 3 também apresentaram um aumento da viabilidade celular, enquanto os grupos tratados com associação 1, a Curcumina e a associação 2 tiveram um diminuição da viabilidade celular. A sequência dos grupos de tratamentos em ordem decrescente:

- ❖ Controle;
- ❖ Celecoxib;
- ❖ Associação 3;
- ❖ Associação 1;
- ❖ Curcumina;
- ❖ Associação 2.

Essa sequência manteve-se tanto na ordem quanto no resultado (aumento ou diminuição da viabilidade celular) para as 48 horas.

Já com 72 horas de tratamento o grupo controle manteve-se como sendo o grupo com maior número de células viáveis apesar de sofrer uma queda. O grupo tratado com associação 3 foi o único grupo que apresentou um aumento da viabilidade celular. Ficando os grupos em ordem decrescente de viabilidade celular da seguinte maneira:

- ❖ Controle;
- ❖ Associação 3;
- ❖ Celecoxib;
- ❖ Associação 1;
- ❖ Associação 2;
- ❖ Curcumina.

O grupo controle apresentou então um aumento da viabilidade celular nas primeiras 48 horas, como esperado, e apesar de uma queda no último tempo de tratamento que pode ter ocorrido pelo mesmo motivo que na linhagem celular Fadu, ou seja, o desencadeamento da inibição da proliferação por contato devido a alta população celular, este grupo ainda foi o que apresentou maior número de células viáveis com 72 horas de tratamento.

O mesmo padrão foi observado no grupo tratado exclusivamente com Celecoxib, no entanto o aumento da viabilidade celular, tanto com 24 horas quanto com 48 horas, foi inferior ao do grupo controle, permitindo a identificação de uma ação inibidora da proliferação celular ainda que inicialmente pequena, e a queda da viabilidade celular com 72 horas foi mais ampla que a do controle, podendo sugerir uma associação da promoção dos eventos pró-apoptóticos com o seu potencial de inibição celular. Contudo, tanto o grupo controle quanto o grupo tratado com Celecoxib, apresentaram o mesmo padrão – aumento da viabilidade celular nas primeiras 48 horas e queda da mesma no último período de tratamento – não podendo ser descartada a hipótese de que o mesmo mecanismo que permitiu o diminuição da viabilidade celular do grupo controle após 72 horas de cultivo, tenha ocorrido no grupo tratado com Celecoxib.

No grupo tratado com Curcumina, assim como na linhagem celular Fadu, nota-se que ocorreu uma queda progressiva da viabilidade celular durante todo o período do tratamento.

Já a associação 3 apresentou um aumento progressivo da viabilidade celular durante todo o tempo de tratamento, a associação 2 apresentou uma redução

gradual em todos os tempos de tratamento, como na Fadu e na associação 1 sendo essa menor nas primeiras 48 horas do que no último tempo de tratamento.

	Controle	Celecoxib 25 µM	Curcumina 75 µM	Associação 1	Associação 2	Associação 3
Tempo zero	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012
24 horas	0,020333 333	0,0186666 67	0,01066666 7	0,01166 6667	0,00733 3333	0,015333 333
48 horas	0,061	0,05	0,00933333 3	0,01033 3333	0,00333 3333	0,029
72 horas	0,0396	0,01366	-0,00133	0,008	- 0,00033 3	0,0323

p=0,04*/ p>0,05**

Quadro 5.2 - Análise estatística dos tratamentos aplicados na linhagem celular HaCat analisados pelo teste ANOVA* com correção de Tukey**

Assim como na Fadu, apesar da diferença entre os grupos ser microscopicamente significativa, pode-se observar (Quadro 5.2) que após a realização do teste ANOVA com correção de Tukey não houve diferença estatisticamente significativa entre nenhum dos grupos de tratamento. No entanto, nessa linhagem, ao realizar o teste ANOVA observou-se um valor de p=0,04, no entanto, após a correção de Tukey nenhum grupo apresentou um p<0,05, sugerindo que pode haver uma diferença entre alguns dos grupos, mas que essa diferença não entra nos nossos resultados, pois o alfa teria que ser maior que 5%, o que não seria interessante para o nosso estudo.

5.1.3 SCC9

Gráfico 5.3 - Resultados dos testes de viabilidade celular realizados com a linhagem SCC9 com os 6 tratamentos por 24, 48 e 72 horas

A linhagem celular SCC9 (Gráfico 5.3), apesar de também ter apresentado um aumento da viabilidade celular do grupo controle já com 24 horas após a aplicação dos tratamentos teve também um aumento do grupo tratado com Celecoxib, que chegou a ser mais expressivo que o do grupo controle. Todos os outros grupos tiveram uma diminuição da viabilidade celular. Em ordem decrescente de viabilidade celular os grupos se apresentaram:

- ❖ Celecoxib;
- ❖ Controle;
- ❖ Associação 3;
- ❖ Associação 2;
- ❖ Curcumina;
- ❖ Associação 1.

O mesmo padrão foi observado após 48 horas exceto pela associação que teve maior diminuição da viabilidade celular que neste caso foi o grupo tratado com a associação 2. Em ordem decrescente de viabilidade celular observa-se:

- ❖ Celecoxib;
- ❖ Controle;
- ❖ Associação 3;
- ❖ Associação 1;
- ❖ Curcumina;
- ❖ Associação 2

Já com 72 horas de tratamento os três primeiros grupos se mantiveram na mesma ordem, mas o grupo tratado com celecoxib apresentou uma queda enquanto o grupo controle continuou a aumentar. Todos os outros grupos também apresentaram um aumento da viabilidade celular. Em ordem decrescente, os grupos se apresentavam, portanto:

- ❖ Celecoxib;
- ❖ Controle;
- ❖ Associação 3;
- ❖ Curcumina;
- ❖ Associação 2;
- ❖ Associação 1

O grupo controle apresentou então um aumento da viabilidade celular durante todo o período de tratamento, conforme o esperado já que este grupo não teve adição de nenhuma substância com potencial inibidor da proliferação celular.

Enquanto no grupo tratado exclusivamente com Celecoxib observou-se o aumento da viabilidade celular, tanto com 24 horas quanto com 48 horas e havendo uma queda apenas com 72 horas da aplicação do tratamento, mas ainda assim durante todo o período do tratamento, o grupo tratado exclusivamente com Celecoxib apresentou viabilidade celular superior ao grupo controle. O que foi surpreendente pois se esperava que devido ao potencial inibidor da proliferação celular desta substância, a proliferação celular desse grupo fosse inferior ao grupo controle. Quanto a queda após 72 horas de tratamento, assim como no grupo controle da Fadu e HaCat, pode ser decorrente da inibição da proliferação por contato.

Já o grupo tratado com Curcumina, apresentou uma diminuição da viabilidade celular nas primeiras 48 horas, sendo este mais expressivo nas primeiras 24 horas, enquanto houve um pequeno aumento com 72 horas de tratamento.

Ao passo que a associação 3 foi a que apresentou menor diminuição da viabilidade celular durante todo o período de tratamento, apresentando redução da mesma nas primeiras 48 horas, sendo esta mais expressiva nas primeiras 24 horas e um aumento com 72 horas, a associação 2 apresentou uma diminuição progressiva nas primeiras 48 horas e um discreto aumento no último tempo de tratamento e a associação 1 também apresentou uma redução da viabilidade celular durante as primeiras 48 horas de tratamento e no tempo seguinte apresentou um aumento desta.

	Controle	Celecoxib 25 µM	Curcumina 75 µM	Associação 1	Associação 2	Associação 3
Tempo zero	0,036	0,036	0,036	0,036	0,036	0,036
24 horas	0,0376	0,0513	0,006	0,00433	0,00733	0,021
48 horas	0,0686	0,1083	0,0023	0,0036	-0,003	0,0193
72 horas	0,0743	0,0856	0,006	0,0056	0,0063	0,0286

P=0,0099*/ p>0,05**

Quadro 5.3 - Análise estatística dos tratamentos aplicados na linhagem celular da SCC9 analisados pelo teste de Kruskal-Wallis* com correção de Dunn**

Pode-se observar (Quadro 5.3) que, assim como na HaCat, ao se realizar o teste estatístico, neste caso Kruskal-Wallis, observou-se um valor de $p < 0,05$, mas após a correção, neste caso de Dunn, todos os grupos apresentaram um $p > 0,05$, sugerindo que pode haver uma diferença entre alguns dos grupos, mas que para que essa diferença fosse reconhecida o alfa teria que ser maior que 5%, o que não seria interessante para o nosso estudo.

Ao confrontar os dados desse trabalho com a literatura, podemos observar que ao se tratar do Celecoxib, nossos dados diferem dos resultados encontrados por outros autores como Alves Junior, (2007) que em seu trabalho com outras linhagens de CECF – exceto pela HaCat, utilizada nos dois experimentos - observou que o Celecoxib proporcionava uma diminuição das células viáveis já nas primeiras 24 horas de tratamento e esta continuava decaindo ao longos dos outros 2 períodos (48 e 72 horas). Já no nosso estudo, observamos que a linhagem HaCat apesar de apresentar uma viabilidade celular menor que o grupo controle durante todo o

período de tratamento apresentou um padrão de aumento da viabilidade celular nas primeiras 48 horas. No entanto esse estudo foi realizado com o Celecoxib numa concentração de 100 μM – bem maior do que a utilizada neste trabalho - e a quantidade de células plaqueadas foi inferior ao do nosso estudo (10^3).

Outros estudos com diferentes linhagens também apresentaram redução da viabilidade celular como o estudo de Abrahão et al. (2013) com outras duas linhagens de CECF também apresentou redução da viabilidade celular já nas primeiras 24 horas do tratamento, no entanto, também teve uma quantidade inferior de células plaqueadas em relação ao nosso estudo (5×10^3), mas a concentração de escolha de Celecoxib deste estudo também foi inferior a nossa (10 μM) após teste com as seguintes concentrações: 5, 10, 50, and 100 μM .

Vital-Reyes et al. (2006) também verificou redução da proliferação celular em células de carcinoma de ovário, sendo que seus melhores resultados foram com concentração de 50, 70, 100 μM e com 48 a 72 horas, sendo mais aparente em algumas células apenas após 72 horas.

Já o estudo de Roh et al. (2004), observou que a aplicação do Celecoxib provocou uma diminuição do crescimento dos tumores gerados pela implantação de células de uma linhagem de carcinoma epidermoide de *Murinae*, demonstrando que o potencial de inibição da proliferação celular do Celecoxib ocorre também *in vivo*

Como observamos em estudos mais similares ao nosso como de Abrahão et al. (2013) e Alves Junior (2007), tanto a quantidade de células plaqueadas foi inferior a do nosso estudo quanto a concentração utilizada também foi diferente do nosso estudo, superior ao primeiro e inferior ao segundo. Portanto, pode-se dizer que os resultados do Celecoxib como inibidor da proliferação celular dependem tanto da dose, quanto da quantidade de células em que essa substância é aplicada, além é claro do comportamento individual de cada linhagem.

Quanto a Curcumina, no estudo de Bimonte et al. (2013) a Curcumina numa concentração de 50 μM – inferior á utilizada no nosso trabalho - reduziu a viabilidade celular de células de câncer pancreático *in vitro* já com 48 horas (tempo inicial do estudo) o mesmo que ocorreu com nosso trabalho, sendo que como este trabalho teve tempo inicial de 24 horas, a redução da viabilidade celular já foi constatada com este tempo em todas as linhagens. Nesse mesmo estudo, observou-se uma inibição do crescimento desse tumor em modelos ortotópicos de camundongos, sugerindo um efeito promissor destes resultados em pesquisas futuras.

Mukhopadhyay et al. (2002) também encontraram inibição da proliferação celular de células de câncer de próstata, mama e carcinoma epidermoide com uma concentração de 100 μM – superior á nossa. O estudo de Barthi et al. (2003) observou diminuição da proliferação celular em linhagem de mieloma múltiplo, essa redução foi dose dependente – foram testadas as seguintes concentrações: 1, 3, 10, 30 e 100 μM . Sonavane et al. (2012) também observou redução da proliferação celular de carcinomas epidermoide de pele quando tratadas com Curcumina *in vitro* e *in vivo* (camundoungo).

O trabalho de Meyer et al. (2011), comparou a resposta de duas outras linhagens de CECP, BHY e PCI-1, quando tratadas com diferentes agentes: Ácido acetilsalicílico 2mM, Celecoxib 25 μM , Dexametasona 10 μM , Curcumina 15 μM e EPs 7630 25 $\mu\text{g/ml}$ – extrato de *Pelargonium sidoides* uma espécie de planta sul-africana aprovada para o uso em bronquite aguda. O Ácido acetilsalicílico foi considerado o inibidor menos potente, seguido do EPs 7630 e o Celecoxib. A Curcumina e a Dexametasona foram as substâncias mais eficientes na diminuição da viabilidade celular. Wang et al. (2008) estudaram os efeitos da Curcumina em linhagens de carcinoma epidermoide de cavidade oral tratadas com lipossomas vazias, lipossomas com curcumina, curcumina diluída em DMSO e apenas DMSO e observaram que a curcumina em lipossomas promoveu uma diminuição da viabilidade celular quando comparada aos lipossomas vazios, mas a Curcumina diluída em DMSO teve resultados mais expressivos.

Nota-se com essas comparações que não apenas em células de CECP, mas de diversos outros cânceres apresentam resultados positivos quando tratadas com Curcumina ainda que em diversas concentrações e tempos, o que nos permite inferir que ela se trata de um interessante agente terapêutico no tratamento destes e como sugere o trabalho de Sonavane et al. (2012), é provável que esses efeitos sejam semelhantes *in vivo*.

Assim como este trabalho, Meyer et al. (2011) verificaram que os efeitos de inibição da proliferação celular foram mais expressivos com a Curcumina do que com o Celecoxib. O que leva a crer que a associação dessas substâncias teria um resultado também expressivo na redução dessa viabilidade, o que se confirmou pelos experimentos realizados neste trabalho.

Quando se analisa o ocorrido com a associação de Curcumina e Celecoxib, verificamos que os resultados são bastante similares aos encontrados na literatura,

apesar de relacionados com outras doenças e com concentrações diversas, todos os trabalhos levantados observaram redução da proliferação celular quando realizado o tratamento com a associação de Curcumina e Celecoxib (Lev-Ariet al. 2005 b; Lev-Ari, et al 2006; Lev-Ariet al. 2005 a; Shpitz, et al 2006). Sendo esse o único trabalho até o momento que estudou a ação conjunta dessas substâncias na proliferação celular de CECP, podemos dizer que essa associação parece ser um interessante agente terapêutico para essa neoplasia, assim como tem demonstrado ser para outras doenças.

5.2 Escolha da concentração ideal da associação e tempo ideal do tratamento

Devido ao resultado de duas linhagens em que houve uma queda do grupo controle no tempo de 72 horas, o que pode comprometer a interpretação do resultado final obtido com a aplicação dos tratamentos, foi escolhido como tempo ideal da aplicação dos mesmos o tempo de 48 horas. Para fins de uma comparação mais detalhada a sequencia do experimento seguiu com coleta de resultados tanto com 24 quanto com 48 horas de tratamento.

Ao analisar o resultado obtidos com as associações entre si nota-se que a associação que teve um melhor resultado foi a de Curcumina 50 μ M + Celecoxib 15 μ M nas três linhagens celulares estudadas, o que vai ao encontro de um dos principais objetivos do estudo dessas associações que é, ao realizar o tratamento das células com a associação dessas drogas, utilizar uma menor concentração das mesmas do que quando utilizadas de maneira isolada.

Quando a análise é ampliada para incluir todos os tratamentos utilizados, nota-se que essa associação teve também o melhor resultado dentre todos os tratamentos utilizados.

Esses resultados são bastante interessantes, pois mostram que a associação de duas drogas sabidamente benéficas no tratamento de células cancerígenas pode ter um resultado ainda melhor quando utilizadas em conjunto e em concentração menor do que as utilizadas individualmente.

Sendo assim essa foi a associação e o tempo de tratamento de escolha para dar sequencia ao experimento. Os outros grupos continuaram tratados com as

mesmas substâncias e concentrações: Controle (DMSO1%), Celecoxib 25 μ M e Curcumina 75 μ M.

Sendo assim pode-se observar nos gráficos abaixo (Gráficos 5.4, 5.5 e 5.6) como cada linhagem reagiu aos tratamentos de escolha no tempo ideal.

Gráfico 5.4 - Resultados dos testes de viabilidade celular realizados com a linhagem Fadu com os tratamentos e tempos de escolha

Gráfico 5.5 - Resultados dos testes de viabilidade celular realizados com a linhagem HaCat com os tratamentos e tempos de escolha

Gráfico 5.6 - Resultados dos testes de viabilidade celular realizados com a linhagem SCC9 com os tratamentos e tempos de escolha

5.3 Extração de proteínas

5.3.1 Fadu

Figura 5.1 – Placas da Fadu na hora da extração com 24 horas de tratamento (A: Controle, B: Celecoxib, C: Curcumina, D: Associação)

Figura 5.2 – Placas da Fadu na hora da extração com 48 horas de tratamento (A: Controle, B: Celecoxib, C: Curcumina, D: Associação)

5.3.2 HaCat

Figura 5.3 – Placas da HaCat na hora da extração com 24 horas de tratamento (A: Controle, B: Celecoxib, C: Curcumina, D: Associação)

Figura 5.4 – Placas da HaCat na hora da extração com 48 horas de tratamento (A: Controle, B: Celecoxib, C: Curcumina, D: Associação - área mais vazia, E: Associação - área mais cheia)

5.3.3 SCC9

Figura 5.5 – Placas da SCC9 na hora da extração com 24 horas de tratamento (A: Controle, B: Celecoxib, C: Curcumina, D: Associação)

Figura 5.6 – Placas da SCC9 na hora da extração com 48 horas de tratamento (A: Controle, B: Celecoxib, C: Curcumina, D: Associação)

5.4 Western- blotting

5.4.1 HaCat

Figura 5.7 - Resultados Western-blot pAKT. Sequencia das amostras da direita para a esquerda: Controle, Celecoxib, Curcumina e Associação (24 horas); controle, celecoxib, curcumina e associação (48 horas)

Gráfico 5.7 - Resultado do Wester-blot da proteína pAKT na linhagem celular HaCat nos grupos com os tratamentos por 24 e 48 horas

Pode-se observar ao analisar esses resultados (Figura 5.7 e Gráfico 5.7) que a expressão da proteína pAKT, com 24 horas de tratamento, foi menor nos grupos tratados com Curcumina e associação de Curcumina e Celecoxib quando comparados com o grupo controle e tratado apenas com Celecoxib. Já, após 48 horas da aplicação das medicações, os grupos controle e Celecoxib foram os que apresentaram menor expressão de pAKT, enquanto o grupo tratado apenas com Curcumina apresentou a maior expressão de pAKT nesse tempo.

Ao comparar os tempos do mesmo grupo de tratamento observar-se que o grupo controle apresentou uma alta expressão de pAKT nas primeiras 24 horas e uma expressão significativamente menor dessa mesma proteína no tempo subsequente. Essa alta expressão da pAKT nas primeiras 24 horas do grupo controle, era esperada já que neste grupo não houve adição de nenhuma substância com potencial inibidor da proliferação celular. Porém, esperava-se que houvesse um aumento ainda maior da expressão desta após 48 horas de cultivo sem uso de substâncias inibidoras do crescimento celular.

No entanto, essa expressão reduzida de pAKT com 48 horas de cultivo, não impediu o aumento da viabilidade celular como foi observada no resultado do teste, portanto o aumento da proliferação celular nesse segundo tempo de tratamento se deu pela ativação de outras vias que não a do AKT.

Quando observamos o grupo tratado exclusivamente com Celecoxib, o aumento da expressão de pAKT com 24 horas de tratamento nota-se surpreendentemente próximo ao do controle, no entanto nota-se que após 48 horas da aplicação da medicação houve uma significativa diminuição da expressão do pAKT. Novamente o comportamento desse grupo foi semelhante ao do grupo controle não permitindo creditar a redução do nível do pAKT com 48 horas de tratamento exclusivamente ao uso do Celecoxib.

Ao analisarmos o resultado da expressão do pAKT, obtido no Western-Blot, com os resultados obtidos no MTS, podemos observar que a pequena diferença entre a expressão de pAKT entre os grupos controle e Celecoxib com 24 horas de tratamento concordam com o resultado do MTS no qual ambos os grupos apresentaram um aumento da viabilidade celular sendo que o grupo tratado com Celecoxib apresentou um aumento relativamente menor. No entanto, nota-se que após 48 horas de tratamento a expressão de pAKT foi maior no grupo tratado com Celecoxib do que no grupo controle, mas a viabilidade celular desse grupo, apesar

de ter aumentado, não superou a do controle, o que pode indicar que apesar dos baixos níveis de pAKT do grupo controle nesse tempo de tratamento, a proliferação celular se deu pela ativação de outros mecanismos promotores.

Já, quando observamos o grupo tratado apenas com Curcumina, podemos verificar que as primeiras 24 horas de aplicação do tratamento acarretaram numa menor expressão de pAKT do que após 48 horas de tratamento. No entanto, podemos observar nos resultados do teste de viabilidade celular que, apesar deste aumento da expressão do pAKT com 48 horas de tratamento, houve uma redução da viabilidade celular neste período, o que pode indicar que a Curcumina inibiu a proliferação celular através de outras vias além da AKT.

Enquanto o grupo tratado com a associação do Celecoxib e Curcumina, foi o grupo que apresentou maior estabilidade nos resultados mostrando uma redução da expressão do pAKT com 24 horas que se manteve após 48 horas da aplicação do tratamento o que se comprova na redução da viabilidade celular apresentada por esse grupo nos dois tempos de tratamento analisados no teste de viabilidade celular.

No estudo de Alves Júnior, 2007, no qual dentre outras linhagens ele utilizou a HaCat, ele observou que os níveis de pAKT permaneceram inalterados após a aplicação do Celecoxib por 24 horas, o que corrobora com nossos achados neste estudo.

5.4.2 SCC9

Figura 5.8 - Resultados Western-blot pAKT. Sequencia das amostras da esquerda para a direita: Controle, celecoxib, curcumina e associação (24 horas); controle, celecoxib, curcumina e associação (48 horas)

Gráfico 5.8 - Resultado do Wester-blot da proteína pAKT na linhagem celular SCC9 nos grupos com os tratamentos por 24 e 48 horas

Pode-se observar ao analisar esses resultados (Figura 5.8 e Gráfico 5.8) que a expressão da proteína pAKT, com 24 horas de tratamento, não foi identificada nos grupos tratados com Curcumina e associação de Curcumina e Celecoxib, que pode ser identificada nas amostra controle e tratada apenas com Celecoxib. O mesmo pode ser observado após 48 horas da aplicação dos tratamentos, sendo que os grupos controle e Celecoxib apresentaram uma expressão ainda maior de pAKT do que a apresentada com 24 horas de tratamento.

Quando comparamos os tempos do mesmo grupo de tratamento podemos observar que o grupo controle apresentou um aumento da expressão de pAKT durante o cultivo, como não houve adição de nenhuma substância com potencial de inibição da proliferação celular era esperado que os níveis de pAKT aumentassem conforme o tempo que as placas se encontravam em cultivo, uma vez que o pAKT gera a ativação de eventos promotores sobrevida celular.

Já, o grupo tratado somente com o Celecoxib apresentou um aumento dos níveis de pAKT. Esses níveis mais altos da expressão de pAKT no grupo tratado com Celecoxib do que quando comparado com o grupo controle, no tempo de 24 horas, e o aumento da expressão da pAKT nesse grupo com 48 horas corrobora com os resultados encontrados no teste de viabilidade celular que demonstrou que nos dois tempos de tratamento o grupo tratado com Celecoxib apresentou um aumento da viabilidade celular e uma quantidade maior de células viáveis do que o controle.

Quando observamos o grupo tratado apenas com Curcumina e tratado com Curcumina e a associação desta com o celecoxib, podemos verificar que nos dois tempos de tratamento não foi possível identificar a presença do pAKT comprovando a eficácia das medicações. O que se torna ainda mais expressivo quando observamos a eficácia desses dois grupos, também na redução da viabilidade celular.

Abrahão et al. (2013) em seu estudo com linhagens HN30 e HN31, também de CECP, notaram diminuição dos níveis de pAKT após tratamento com Celecoxib, o que não foi possível observar no nosso estudo em nenhuma das duas linhagens.

Quanto ao tratamento com Curcumina os resultados deste trabalho corroboram com o encontrado por outros autores como Sonavane et al. (2012) que observaram em células de carcinoma epidermoide de pele tratadas com Curcumina

20 μ M por 24 horas redução significativa da expressão de pAKT. Shakibaei et al. (2007) relataram que a Curcumina permitiu uma inibição expressiva da expressão do pAKT em linhagem de condrócitos. A maioria dos trabalhos analisou a expressão do pAKT apenas com 24 horas, não permitindo assim a comparação do aumento do nível de pAKT apresentado pela linhagem HaCat com outros resultados.

Não foram encontrados até o presente momento trabalhos na literatura que tenham relacionado a associação de Curcumina com Celecoxib e a expressão de pAKT, tornando os resultados deste trabalho bastante relevantes já que esse tratamento reduziu a expressão de pAKT em ambas as linhagens celulares, sendo o tratamento que apresentou maior estabilidade na linhagem HaCat e inibindo por completo a expressão do pAKT na linhagem SCC9. Dados esses que, complementados pelos resultados do teste de viabilidade celular, demonstram ser essa opção um interessante agente terapêutico no tratamento de CECP.

6 CONCLUSÕES

1. Tanto a Curcumina 75 μ M quanto o Celecoxib 25 μ M, isoladamente, reduziram a viabilidade das células Fadu e HaCat.
2. Apenas a Curcumina 75 μ M, isoladamente, conseguiu reduzir a viabilidade celular da linhagem SCC9.
3. O Celecoxib na concentração de 25 μ M, isoladamente, gerou um aumento da viabilidade celular da linhagem SCC9 principalmente nas primeiras 48 horas.
4. Apesar da análise de viabilidade celular não ter gerado uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos de tratamento, pode-se notar que essa diferença foi microscopicamente relevante.
5. O tratamento que melhor conseguiu reduzir a viabilidade celular de todas as linhagens foi a associação de Curcumina 50 μ M + Celecoxib 15 μ M.
6. Tanto a Curcumina 75 μ M quanto a associação de Curcumina 50 μ M + Celecoxib 15 μ M foram capazes de inibir a expressão do pAKT na linhagem SCC9.
7. A associação de Curcumina 50 μ M + Celecoxib 15 μ M foi o tratamento que apresentou maior estabilidade dos níveis de pAKT da linhagem HaCat durante o período de tratamento.
8. Os dados do teste de viabilidade celular associados aos resultados da expressão do pAKT obtidos pelo Western-blot indicam que o uso da associação de Curcumina 50 μ M + Celecoxib 15 μ M pode ter efeitos promissores com adjuvante no tratamento de CECP.

REFERÊNCIAS

Abrahao AC, Castilho RM, Squarize CH, Molinolo AA, dos Santos-Pinto D, Jr., Gutkind JS. A role for COX2-derived PGE2 and PGE2-receptor subtypes in head and neck squamous carcinoma cell proliferation. *Oral Oncol.* 2010 Oct;46(12):880-7. 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.

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.

Alves Junior, SM. Análise da expressão e mecanismos de ação da proteína COX-2 em cultura de células de carcinoma epidermóide bucal humano [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2007 citado 01 de outubro de 2015. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/23/23141/tde-13032007-085956/>.

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 IkappaBalpha kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis. *Blood.* 2003 Feb;101(3):1053-62. doi: 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.

Broek RV, 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.

Cancer Genome Anatomy Project [homepage]. Bethesda: National Cancer Institute at U.S. National Institute of Health [Citado 10 de jan. 2016]. Disponível em: http://cgap.nci.nih.gov/Pathways/BioCarta/h_aktPathway.

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.

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

DATASUS (Departamento de informática do SUS) [homepage]. Brasil: ministério da Saúde; 2008 [Citado 10 de jan. 2016]. Disponível em : <http://www.datasus.gov.br/cid10/v2008/cid10.htm>.

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.

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 Jun;86(5):626-31. doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(20000601)86:5<626::AID-IJC4>3.0.CO;2-Y.

Fu SL, Wu YL, Zhang YP, Qiao MM, Chen Y. Anti-cancer effects of COX-2 inhibitors and their correlation with angiogenesis and invasion in gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2004 Jul;10(13):1971-4. doi: 10.3748/wjg.v10.i13.1971.

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, 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.

Giudice, FS. O envolvimento da remodelação da cromatina no controle do comportamento agressivo dos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012 [citado 10 jan. 2016]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/23/23141/tde-13042013-103307/>.

Glezer I, Marcourakis T, Avellar MCW, Gorenstein C, Scavone C. O fator de transcrição NF- κ B nos mecanismos moleculares de ação de psicofármacos. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2000 Jan/Mar; 22 (1):26-30. doi:10.1590/S1516-44462000000100008.

Globocan.iarc.fr [homepage on the Internet]. Lyon: International Agency for Research on Cancer; Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 [Citado 10 de jan. 2016]. Available from: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.

Goel, A, Kunnumakkara, AB, Aggarwal, B. B. Curcumin as “Curecumin”: from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol*. 2008 Feb;75(4): 787-809. doi:10.1016/j.bcp.2007.08.016.

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.

Gupta, RA, DuBois, RN. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nature Reviews Cancer*. 2001Oct;1(1): 11-21. doi:10.1038/35094017.

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

Holmes, D. PI3K pathway inhibitors approach junction. *Nature Rev Drug Discovery*. 2011 Aug1;10(8), 563-564. doi: 10.1038/nrd3527.

Johnson N. *et al*. Squamous cell carcinoma In: Barnes *et al* . World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and genetics of head and neck tumor. 1ª ed. Lyon: IARC Press; 2005. p.168-75.

Kapoor V, Zaharieva MM, Das SN, Berger MR. Eruosine simultaneously induces apoptosis and autophagy by modulating the Akt-mTOR signaling pathway in oral

squamous cell carcinoma. *Cancer Lett.* 2012 Jun1;319(1):39-48. doi: 10.1016/j.canlet.2011.12.032.

Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF- κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nature reviews cancer.* 2002 Apr; 2(4): 301-310. doi:10.1038/nrc780.

Kashfi K, Rigas B. Is COX-2 a 'collateral' target in cancer prevention? *Biochem Soc Trans.* 2005 Aug;33(Pt 4):724-7. doi: 10.1042/BST0330724.

Kundu JK, Choi KY, Surh YJ. beta-Catenin-mediated signaling: a novel molecular target for chemoprevention with anti-inflammatory substances. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Jan;1765(1):14-24. doi:10.1016/j.bbcan.2005.08.006.

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

Lev-Ari S, Strier L, Kazanov D, Elkayam O, Lichtenberg D, Caspi D, et al. Curcumin synergistically potentiates the growth-inhibitory and pro-apoptotic effects of celecoxib in osteoarthritis synovial adherent cells. *Rheumatology.* 2006 Feb; 45(2), 171-7. doi: 10.1093/rheumatology/kei132.

Lev-Ari S, Strier L, Kazanov D, Madar-Shapiro L, Dvory-Sobol H, Pinchuk I, et al. Celecoxib and curcumin synergistically inhibit the growth of colorectal cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2005a Sep; 11(18), 6738-6744. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0171.

Lev-Ari S, Zinger H, Kazanov D, Yona D Ben-Yosef, R Starr, A, et al. Curcumin synergistically potentiates the growth inhibitory and pro-apoptotic effects of celecoxib in pancreatic adenocarcinoma cells. *Biomed pharmacother.* 2005b Oct; 59, S276-S280.

Meyer C, Pries R, Wollenberg B. Established and novel NF- κ B inhibitors lead to downregulation of TLR3 and the proliferation and cytokine secretion in HNSCC. *Oral Oncol.* 2011Sep; 47(9): 818-26. doi: 10.1016/j.oraloncology.2011.06.010.

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.
Moura, Renata Mendes. Avaliação do potencial antiproliferativo do dendrímero de Poliglicerol associado ao Celecoxibe em linhagens celulares de carcinoma

epidermóide de cabeça e pescoço [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014.

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*. 2002Dec;21(57):8852-61. doi:10.1038/sj.onc.1206048.

Nagoya H, Futagami S, Shimpuku M, Tatsuguchi A, Wakabayashi T, Yamawaki H, et al. Apurinic/Apyrimidinic endonuclease-1 is associated with angiogenesis and VEGF production via upregulation of COX-2 expression in esophageal cancer tissues. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2014 Feb; 306(3):G183-90. doi: 10.1152/ajpgi.00057.2013.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Patologia Epitelial: Carcinoma de células escamosas. Patologia oral e maxilofacial. 3ª ed. Rio de Janeiro Elsevier; 2009 p. 410-23.

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.

O'Connor JK, Avent J, Lee RJ, Fischbach J, Gaffney DK. Cyclooxygenase-2 expression correlates with diminished survival in invasive breast cancer treated with mastectomy and radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004 Mar;58(4):1034-40. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijrobp.2003.08.032>.

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

Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nature immunology*. 2011 Aug; 12(8): 695-708. doi:10.1038/ni.2065.

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/GSK3 β /NAG-1 pathway. *Cancer Lett*. 2007 Jun;251(2):268-77. doi: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.

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.

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.

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 Nov ;224(3):360-8. doi:10.1016/j.taap.2006.12.003.

Reddy ST, Wadleigh DJ, Herschman HR. Transcriptional regulation of the cyclooxygenase-2 gene in activated mast cells. J Biol Chem. 2000 Feb;275(5):3107-13. doi: 10.1074/jbc.275.5.3107.

Roh JL, Sung MW, Park SW, Heo DS, Lee DW, Kim KH. Celecoxib can prevent tumor growth and distant metastasis in postoperative setting. Cancer Res. 2004 May;64(9):3230-5. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-3050.

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: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.

Shakibaei M, John T, Schulze-Tanzil G, Lehmann I, Mobasheri A. Suppression of NF-kappaB activation by curcumin leads to inhibition of expression of cyclo-oxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human articular chondrocytes: Implications for the treatment of osteoarthritis. *Biochem Pharmacol.* 2007 May;73(9):1434-45. doi:10.1016/j.bcp.2007.01.005.

Shishodia S, Chaturvedi MM, Aggarwal BB, Role of curcumin in cancer therapy, *Curr. Probl. Cancer* 2007 Jul/Aug; 31(4): 243–305. doi: 10.1016/j.crrproblcancer.2007.04.001.

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

Shpitz B, Giladi N, Sagiv E, Lev-Ari S, Liberman E, Kazanov D, et al. Celecoxib and curcumin additively inhibit the growth of colorectal cancer in a rat model. *Digestion.* 2006; 74(3-4): 140-4. doi: 10.1159/000098655.

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):e29-34. doi: 10.4317/medoral.17344.

Sonavane K, Phillips J, Ekshyyan O, Moore-Medlin T, Roberts Gill J, Rong X, et al. Topical curcumin-based cream is equivalent to dietary curcumin in a skin cancer model. *J Skin Cancer.* 2012; 2012: 147863. doi: 10.1155/2012/147863.

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.

St-Germain ME, Gagnon V, Parent S, Asselin E. Regulation of COX-2 protein expression by Akt in endometrial cancer cells is mediated through NF-

kappaB/IkappaB pathway. *Mol Cancer*. 2004 Mar;3:7. doi: 10.1186/1476-4598-3-7.

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

Tive L. Celecoxib clinical profile. *Rheumatology (Oxford)*. 2000 Dec;39 Suppl 2:21-8; discussion 57-9.

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 Jul;43(6):523-34. doi:10.1016/j.oraloncology.2006.11.010.

Vital-Reyes V, Rodriguez-Burford C, Chhieng DC, Oelschlager DK, Reyes-Fuentes A, Barnes M, et al. Celecoxib inhibits cellular growth, decreases Ki-67 expression and modifies apoptosis in ovarian cancer cell lines. *Arch Med Res*. 2006 Aug;37(6):689-95. doi: 10.1016/j.arcmed.2005.11.014.

Wan X, Meng J, Dai Y, Zhang Y, Yan S. Visualization of Network Target Crosstalk Optimizes Drug Synergism in Myocardial Ischemia. *PloS One*. 2014 Feb 5; 9(2): e88137. doi: 10.1371/journal.pone.0088137.

Wang, D, Veena, MS, Stevenson, K, Tang, C, Ho, B, Suh, JD et al . Liposome-encapsulated curcumin suppresses growth of head and neck squamous cell carcinoma in vitro and in xenografts through the inhibition of nuclear factor κB by an AKT-independent pathway. *Clin Cancer Res*. 2008 Oct14(19): 6228-6236. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-5177 .

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: 10.1016/S1368-7646(02)00120-6.

Yu HP, Shi LY, Lu WH, Su YH, Li YY, Xu SQ. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in human esophageal cancer and in vitro inhibition by a specific COX-2 inhibitor, NS-398. *J Gastroenterol Hepatol*. 2004 Jun;19(6):638-42. doi: 10.1111/j.1440-1746.2004.03345.x.

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 Radical Res.* 2005 Oct;39(10):1119-25. doi:10.1080/10715760500233113.

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. *Arch 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: 10.1016/j.canlet.2006.12.035.

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Décio dos Santos Pinto Junior

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 30858414.1.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 658.995

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. 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. 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. Algumas dessas alterações comprometem proteínas pertencentes à via de sinalização do AKT, envolvida em diferentes fenômenos celulares. O Akt, também chamado de proteína quinase B (PKB) é uma serina/treonina quinase considerada como reguladora crucial de vários processos celulares vitais, como apoptose, proliferação, diferenciação e metabolismo. A regulação inapropriada da via PKB/Akt tem sido associada com o desenvolvimento de vários tipos de cânceres em humanos. Esta via de sinalização participa não só do desenvolvimento de neoplasias como também tem papel fundamental na resposta do câncer frente a variados agentes terapêuticos, tornando esta ligação entre a ativação da via do Akt e o câncer um interessante alvo terapêutico. Neste sentido, a

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: 656.995

proposta deste projeto é estudar genes e suas respectivas proteínas envolvidas na via de sinalização AKT em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, tais como AKT, NF- κ B, I κ B, mTOR e ciclina D1. 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.

A proteína COX-2, descrita inicialmente em processos inflamatórios, está associada com a oncogênese e recentemente tem sido associada com a via de sinalização AKT, ela também será estudada por ser alvo do medicamento celecoxib, sendo que pesquisas demonstraram que esta proteína está superexpressa em neoplasias de endométrio, ovário, estômago, esôfago dentre outras e percebe-se nestes trabalhos que o prognóstico dessas patologias parece estar diretamente relacionado com a expressão da COX-2, refletindo um possível

efeito terapêutico das drogas anti COX-2 no tratamento do câncer.

Outra substância que será estudada é a Curcumina, que é obtida do rizoma da planta *Curcuma longa* L., é um pó amarelo-laranja encontrado em vários alimentos, principalmente aqueles condimentados como o açafrão e curry. Estudos demonstram seus efeitos benéficos no tratamento de várias patologias, tais como doenças biliares, diabetes, mal de Alzheimer, mal de Parkinson, dentre outras. Com relação ao câncer, a curcumina tem sido

considerada um potencial agente terapêutico contra diversos tumores malignos, podendo agir na supressão da transformação e proliferação celular e 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. Este projeto tem como proposta avaliar como atuam proteínas presentes na importante via de sinalização AKT em linhagens celulares de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e verificar se existem alterações na expressão destas proteínas e na transcrição gênica frente à aplicação do celecoxib, que já demonstra resultados importantes de diminuição da proliferação e viabilidade celular, associado a Curcumina, que parece ter a mesma capacidade de inibição na proliferação celular.

Serão utilizadas três linhagens celulares de CE de cabeça e pescoço e uma linhagem de queratinócitos normais que serão divididas em quatro grupos: a. grupo controle não tratado; b. células tratadas com Curcumina, c. células tratadas com Celecoxib d. células tratadas com Curcumina e Celecoxib. A proliferação celular será monitorada através de curva de crescimento e teste de viabilidade celular. A análise da expressão e interação das proteínas será realizada através

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 PAULO

Continuação do Parecer: 658.995

da técnica do Western Blotting e imunoprecipitação. Desta forma, será entendida em maior profundidade a ação do Curcumina e sua associação com o Celecoxib na via do AKT em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço.

Objetivo da Pesquisa:

Verificar os efeitos da Curcumina e do medicamento Celecoxib 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 apenas com Curcumina, apenas com Celecoxib e com Curcumina + Celecoxib.

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

Estudar os efeitos da Curcumina associada ao Celecoxib sobre os índices de proliferação celular de linhagens celulares de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço

Analisar a expressão das 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, celecoxib, e curcumina associada ao celecoxib.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos pois o projeto será realizado com células comerciais pertencentes ao laboratório de biologia celular da disciplina de Patologia Bucal da FOUSP.

Como benefício se for possível a comprovação dos efeitos do celecoxib e da curcumina sobre a via de sinalização do AKT, poderão ser usados futuramente no tratamento anti-neoplásico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Espera-se que a curcumina, o celecoxib e a associação das duas substâncias consiga diminuir a proliferação das células mutadas no carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, isso será mais um passo para o controle e tratamento anti-neoplásico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos obrigatórios foram apresentados, sendo que não há necessidade do TCLE pois o projeto será realizado com células comerciais pertencentes ao laboratório de biologia celular da disciplina de Patologia Bucal da FOUSP.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais

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: 858.995

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:

Não há pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 23 de Maio de 2014

Assinado por:

Maria Gabriela Haye Blazevic
(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)3091-7614

E-mail: ceplo@usp.br