UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

REPOSICIONAMENTO DE

FÁRMACOS

NO CÂNCER DE BOCA

Identificação de possíveis agentes terapêuticos

Kellen Cristine Tjioe

BAURU
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

KELLEN CRISTINE TJIOE

Reposicionamento de fármacos no câncer de boca:
Identificação de possíveis agentes terapêuticos

BAURU
2015

KELLEN CRISTINE TJIOE

Reposicionamento de fármacos no câncer de boca:
Identificação de possíveis agentes terapêuticos

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em
Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na
área de concentração Patologia Bucal.

Orientadoras: Profª Drª Denise Tostes Oliveira
Drª Julie Gavard

BAURU
2015

T546r Tjioe, Kellen
Reposicionamento de fármacos no câncer de boca: Identificação de possíveis agentes terapêuticos / Kellen Cristine Tjioe. – Bauru, 2015.
133 p. : il. ; 31cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Profª Drª Denise Tostes Oliveira

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

DEDICATÓRIA

Eu dedico esta tese, as minhas conquistas, os meus sorrisos e a minha felicidade

A Deus, que por meio de seus caminhos inusitados, nos guia por esta aventura que é a vida.

*Aqueles que sempre estiveram ao meu lado mesmo quando eu estava longe. O sorriso encorajador de
você foi e ainda é fundamental nesta caminhada, mãe, pai, Karen e Bart.*

A Prof^a Dr^a Denise Tostes Oliveira, minha mentora e maior exemplo.

AGRADECIMENTOS

Ao longo do caminho percorrido durante minha vida acadêmica incipiente venho
acumulado amigos, colegas e mestres que me inspiram.

Assim, eu imensamente agradeço...

O meu pai, **Khing**, e a minha mãe, **Carmen**, por serem os alicerces da nossa família. Vocês são a joia mais preciosa que eu tenho e eu agradeço a Deus todas as noites por ter me dado pais como vocês. Vocês são o meu maior exemplo de honestidade e humildade.

A minha irmã **Karen**, de quem sinto muita falta, mas que está sempre presente em meu pensamento. Tenho muito orgulho da pessoa que você se tornou. Obrigada por todo o apoio nos momentos difíceis mesmo quando eu não pedi.

***Bart**, the sweetest surprise I had in Europe. Thank you for being at my side all the time I was in Paris, even during the nights at the lab. You are my safety island and I hope we will be together soon. Ik hou van jou! I also thank **Wis, Paul, An, Jen, and Leo** for welcoming me so warmly in Belgium and in your lives.*

A **Profª. Denise Tostes Oliveira**, minha orientadora, a maior responsável por eu seguir a carreira acadêmica. Você é o meu exemplo de integridade, honestidade e competência. Obrigada por me apoiar em todos os momentos e me aconselhar quando meus pensamentos estavam turvos.

***Dr. Julie Gavard**, my supervisor in France, I thank you for opening the doors of your lab and give me the conditions to be a researcher. I am very thankful for all the scientific brainstorming we did and for the advice you gave to me during my stay at your lab. I am honored to have had the opportunity to work with a researcher like you. Merci!*

À minha grande amiga **Agnes**, que me ajudou em milhares de situações sem hesitar. Eu não sei como demonstrar a minha gratidão por tudo o que você fez por mim durante todos esses anos. Sua amizade é um grande privilégio.

Os meus amigos de pós-graduação, **Pepe, Heliton, Danilo, Thaís, Karen e Raquel** pela amizade de vocês! Vocês fazem os meus dias mais alegres! Obrigada pelo apoio. Sempre.

***Eva**, I thank you for all the scientific support and advice you gave me at the lab even when I did not ask. Thank you for embracing my work as it was yours. You are my angel and “I want to die your friend”. **Eva** and **Elizabeth**, you made my days at the lab happy and light! Thank you both for your friendship!*

*Thank you, Gavardians, **Nicolas, Heloise, Jagoda, Julie, Lucas, Sandy, Steven, and Sonia** for welcoming me and for helping me when I needed! I also would like to thank the **Sandrine Bourdoulous** team (**Sandrine, Camille, Hania, Kevin, and Nawal**) for the enriching discussions during the lab meetings.*

A minha família de Paris: **Andreza, André, Carol, Bárbara, Júnior e Júlio**. Sinto muita falta do nosso convívio e agradeço à Deus por ter unido pessoas tão diferentes. Vocês estiverem ao meu lado durante um momento delicado da minha vida. Foi lindo! Obrigada!

Os meus amigos da *(my friends from) Maison du Brésil*: **Felipe, Michele, Cezinaldo, Magno, Fábio, Kata, Adrienne, Fernando, Nataly, João, Fábio, Daniel, Sheila, Raffaella, Leo, Hudson, Val, Júlia**. Foi ótimo conviver com vocês! *It was a pleasure to live with you guys!*

To my friends from around the world: **Wanderley, Eloísa, Bruno, William, Any, Emma, Elena, Alessandro, Hugo, Lien, Julie, and Alexandra**. Thank you for the awesome adventures we had!

O **Prof. Dr. José Humberto Damante**, orientador de mestrado e professor nato com quem tive o privilégio de trabalhar. O senhor me guiou os primeiros passos do ensino da Estomatologia e sou muito grata por isso.

*I would like to thank **Dr. Cathie Garnis** from the British Columbia Cancer Agency Research for guiding my first steps through the molecular biology research. I wish I could stay longer to work further with you! I also would like to thank my lab mates, **Becki, Sara, and Chris** for being always so helpful and to make me feel welcomed in Vancouver.*

As minhas grandes amigas **Karen, Camila e Natália**. Mesmo distantes a tantos anos, a nossa amizade perdura. Obrigada por tudo!

Ao **Hugo, Fátima, Laércio, Bruno, Josi e Natália**. Nossas vidas nos levaram para caminhos diferentes mas vocês fazem e sempre farão parte da minha família!

O meus colegas de pós-graduação das disciplinas de Patologia (**Ana Paula, Bruna, Diego, Felipe, Nara, Natália, Paula, Rafaela, Regina, Taiane e Thaísa**) pela convivência amistosa.

Os colegas da disciplina de Estomatologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista (FOA-UNESP), **Daniel Galera Bernabé, Glauco Issamu Miyahara e Eder Ricardo Biasoli**, por me receberem de braços abertos na instituição e me guiar nos primeiros passos da docência. Me considero feliz e honrada por trabalhar ao lado dos senhores! Também agradeço a todos os **funcionários e alunos de graduação e pós-graduação do departamento** pela calorosa acolhida.

Os professores do Departamento de Estomatologia, **Prof^a Ana Lúcia Álvares Capelloza, Prof^a Izabel Regina Fischer Rubira-Bullen, Prof. José Humberto Damante, Prof. Luiz Eduardo Montenegro Chinellato, Prof. Paulo S. Santos, Prof. Alberto Consolaro, Prof^a**

Denise Tostes Oliveira, Prof. Luís Antônio de Assis Taveira, Prof^a Vanessa Soares Lara Prof. Eduardo Sant'Ana, Prof. Eduardo Sanches Gonçales, Prof. Osny Ferreira Júnior, Prof. Paulo Sérgio Perri de Carvalho e Prof. Renato Yassutaka Faria Yaedú, por terem participado ativamente da minha formação.

Os funcionários do Departamento de Estomatologia, **Fatiminha, Cris, Marina, Luciana, Alexandre, Andréia, Roberto e Fernanda**, pela convivência diária tão prazerosa.

Os **alunos e pacientes da FOB-USP e da FOA-UNESP** por me confiarem a sua educação e a sua saúde e auxiliarem a minha formação de professora. Agradeço, em especial, a **Yara, Laís e Paula**, as primeiras alunas de iniciação científica com quem tive o prazer de trabalhar. Tenho muito orgulho de ter participado da formação de vocês!

A Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, na pessoa da sua diretora Prof^a Dr^a **Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado**, pelo apoio institucional.

A Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, na pessoa do seu presidente, Prof. Dr. **Guilherme dos Reis Pereira Janson**.

O Institut Cochin, na pessoa do seu diretor, **Dr. Pierre Olivier Couraud**, pelo apoio institucional.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão das bolsas institucionais de doutorado e de doutorado sanduíche (Processo 2788-13-6). Sem este auxílio financeiro, a realização deste trabalho se tornaria inviável.

A Cité Universitaire de Paris e a Maison du Brésil pela oportunidade de morar neste lugar histórico.

UM MEIO OU UMA DESCULPA

"Não conheço ninguém que conseguiu realizar seu sonho sem sacrificar feriados e domingos pelo menos uma centena de vezes.

Da mesma forma, se você quiser construir uma relação amigável com seus filhos, terá que se dedicar a isso, superar o cansaço, arrumar tempo para ficar com eles, deixar de lado o orgulho e o comodismo.

Se quiser um casamento gratificante, terá que investir tempo, energia e sentimentos nesse objetivo.

O sucesso é construído à noite!

Durante o dia você faz o que todos fazem.

Mas, para obter um resultado diferente da maioria, você tem que ser especial.

Se fizer igual a todo mundo, obterá os mesmos resultados.

Não se compare à maioria, pois, infelizmente ela não é modelo de sucesso.

Se você quiser atingir uma meta especial, terá que estudar no horário em que os outros estão tomando chope com batatas fritas.

Terá de planejar, enquanto os outros permanecem à frente da televisão.

Terá de trabalhar enquanto os outros tomam sol à beira da piscina.

A realização de um sonho depende de dedicação. Há muita gente que espera que o sonho se realize por magia, mas toda magia é ilusão e a ilusão não tira ninguém de onde está. Em verdade, a ilusão é combustível dos perdedores pois...

Quem quer fazer alguma coisa, encontra um **MEIO**.
Quem não quer fazer nada, encontra uma **DESCULPA**".

ROBERTO SHINYASHIKI

RESUMO

Objetivos: O objetivo deste estudo foi o de identificar compostos seletivamente tóxicos ao carcinoma espinocelular de boca *in vitro* por meio do reposicionamento de fármacos.

Material e Métodos: Por meio de um escaneamento baseado na viabilidade celular de 1.280 fármacos, nós selecionamos três princípios ativos [luteolin, metixene hydrochloride e nitazoxanide] letais às células de câncer de boca SCC-25 e pouco tóxicos às células de queratinócitos cutâneos imortalizados HaCaT. Os fármacos candidatos foram investigados quanto à sua dose- e tempo-resposta bem como comparados e combinados à agentes quimioterápicos padrão por meio do ensaio por colorimetria com brometo de tiazolil azul de tetrazolio (MTT). O impacto dos fármacos na motilidade do SCC-25 e do HaCaT foi verificado pelo ensaio de migração celular e seus mecanismos de ação também foram explorados por meio da verificação dos níveis das proteínas fosforiladas pelo western blotting. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e, pelo menos, três vezes independentes. O teste t de student foi utilizado para confrontar as variáveis e nível de significância de 5% foi estabelecido para todos os testes.

Resultados: O flavonoide natural luteolin exerceu citotoxicidade potente contra as células de câncer de boca *in vitro*, apresentando baixa toxicidade ao HaCaT e alta eficiência quando comparado a quimioterápicos como a cisplatina e o AG1478. Do ponto de vista molecular, a luteolin ativou a via de sinalização do dano do DNA e, combinada com um inibidor do Chk, apresentou efeitos potencializados. Além disso, nós demonstramos que a nitazoxanide e o metixene hydrochloride são capazes de destruir células SCC-25 porém não as HaCaT de maneira proporcional à dose e ao tempo de tratamento. As combinações entre os três fármacos *hit* e com a cisplatina ou o AG1478 potencializaram seus efeitos contra as células malignas.

Conclusões: O presente estudo traz a luteolin, o metixene hydrochloride e a nitazoxanide como fortes candidatos a agentes terapêuticos contra o câncer de boca uma vez que estes compostos apresentam maior eficácia contra células de câncer de boca e menor toxicidade contra células não tumorais *in vitro* do que agentes quimioterápicos convencionais.

Palavras-chave: Luteolina. Reposicionamento de medicamentos. Carcinoma de células escamosas. Quimioterapia combinada.

ABSTRACT

Drug repositioning for oral cancer: Identifying candidate therapeutic agents

Objectives: Here we aimed at identifying and reposition approved drugs that could be selectively toxic towards oral squamous cell carcinoma cells.

Materials and Methods: Through a cell-based drug screening of 1,280 chemical molecules, we selected 3 compounds (luteolin, metixene hydrochloride, and nitazoxanide) lethal to oral cancer SCC-25 cells, while sparing immortalized keratinocyte HaCaT cells. The drugs were then further challenged for their time- and dose-responses, as well as their comparison and combination to standard chemotherapeutic agents by colorimetric assay 1-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-3,5-diphenylformazan, Thiazolyl blue formazan (MTT). The impact on SCC-25 and HaCaT motility as well as the mode of action of the drugs was then further explored by scratching assay and western blotting, respectively. All the experiments were performed in triplicated and, at least, three independent times. Student's t test was performed to verify the differences among the variables and the level of significance was set at 5%.

Results: The natural flavonoid luteolin was a potent cytotoxic agent against oral cancer cells *in vitro*, presenting low toxicity against HaCaT cells and high efficiency as compared to standard-of-care, such as cisplatin and AG1478. From a molecular standpoint, luteolin co-opted the DNA-damage pathway and could be efficiently combined with Chk pharmacological inhibitor. Moreover, we demonstrated that nitazoxanide and metixene hydrochloride kill the SCC-25 but not the HaCaT cells in a dose- and time-dependent. The combinations among the three drugs hit and with cisplatin and AG1478 improved their effect against the malignant cells.

Conclusions: Luteolin, metixene hydrochloride, and nitazoxanide emerge as strong cytotoxic and/or adjuvant therapy in oral cancer, as these compounds present higher efficiency and lower toxicity against oral cancer cells *in vitro* than conventional chemotherapeutic agents.

Keywords: Luteolin. Drug repositioning. Carcinoma, squamous cell. Drug therapy, combination.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

- Figura 1 - Comparação entre os processos de descoberta de fármacos clássica e o reposicionamento de fármacos. Adaptado de [Ashburn e Thor, 2004]..... 49
- Figura 2 - Via de sinalização do dano celular. ATM: Ataxia-telangiectasia mutated protein; ATR: ATM and rad3-related protein; BRCA-1: Breast cancer 1, early onset ; CDK: Quinase dependente da ciclina; Check: Proteína checkpoint; DSB: Double strand break; H2AX: Histone H2A; SSB: Single strand break..... 59
- Figura 3 - Citotoxicidade dos fármacos hit no câncer de boca. a) Luteolin, b) Metixene hydrochloride e c) Nitazoxanide exibiram efeito inibitório proporcional ao tempo de ação e dose administrada contra o SCC-25 mas não contra o HaCaT. As fórmulas químicas dos referidos princípios ativos encontram-se no lado esquerdo do painel de figuras. Para o ensaio dose-resposta [gráficos do meio], SCC-25 ou HaCaT foram incubados com as doses indicadas de cada fármaco por 72 horas e a viabilidade celular foi checada por MTT. Para o ensaio tempo-resposta [gráficos à direita], SCC-25 ou HaCaT foram tratados com cada composto hit pelos tempos indicados e a viabilidade celular foi analisada [MTT]. Como controle, somente o veículo para os compostos, o dimetil sulfoxido [DMSO], foi adicionado na mesma concentração dos fármacos. As porcentagens de viabilidade celular estão representadas pela média das triplicatas + desvio-padrão de, pelo menos, três experimentos independentes. Teste t de Student: * $P < 0,1$, ** $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$ 91

Figura 4 - O impacto da a) *luteolin*, b) *metixene hydrochloride* e c) *nitazoxanide* nas propriedades do SCC-25 foi verificado pelo ensaio de migração celular. SCC-25 e HaCaT foram cultivados até atingir 90% de confluência e uma fenda foi feita com uma ponteira de 200µL. As células foram lavadas gentilmente com PBS e tratadas com 10µM de cada fármaco *hit*. Fotos foram tiradas nas mesmas áreas 0 e 24 horas após o tratamento e a atividade migratória foi expressa em aumento de vezes em relação ao controle. Como controle, somente o veículo para os compostos, o dimetil sulfóxido (DMSO), foi adicionado na mesma concentração dos fármacos. As porcentagens de viabilidade celular estão representadas pela média das triplicatas + desvio-padrão de, pelo menos, três experimentos independentes. Teste t de Student: * $P < 0,05$ e ns: não significante.....

103

Figura 5 - Western-blots contra os anticorpos acima descritos foram realizados nas células SCC-25 tratadas, por 30 minutos, com (a) 10µM de luteolin, 10µM de metixene hydrochloride ou 10µM de nitazoxanide, (b) e (c) 10µM de luteolin e (d) 10µM de luteolin, 100nM AZD7767 ou a combinação de ambos. (e) A viabilidade celular do SCC-25 foi verificada por MTT após a adição de 10µM de luteolin, 100nM AZD7767 ou a combinação de ambos. Como controle, somente o veículo para os compostos, o dimetil sulfóxido (DMSO), foi adicionado na mesma concentração dos fármacos. As porcentagens de viabilidade celular estão representadas pela média das triplicatas + desvio-padrão de, pelo menos, três experimentos independentes. Teste t de Student: * $P < 0,1$, ** $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$

107

- GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Resultado da triagem dos fármacos baseada na viabilidade celular. Dos 1.280 compostos, 1.180 não foram efetivos contra o SCC-25, 77 eram tóxicos ao HaCaT, 14 não foram validados e 9 compostos foram selecionados como fármacos *hit*..... 87
- Gráfico 2 - Viabilidade celular do SCC-25 e do HaCaT após a incubação com 10 μ M de cada fármaco *hit* por 72 horas. Como controle, somente o veículo para os compostos, o dimetil sulfóxido (DMSO), foi adicionado na mesma concentração dos fármacos. As porcentagens de viabilidade celular estão representadas pela média das triplicatas + desvio-padrão de, pelo menos, três experimentos independentes. Teste t de Student: *P<0,1, **P<0,05 e ***P<0,001..... 87
- Gráfico 3 - Opções combinatórias entre os fármacos *hit* para o tratamento do câncer de boca. SCC-25 e HaCaT foram tratados com concentração de 10 μ M de cada fármaco ou combinados, conforme gráfico, por 72 horas e sua viabilidade celular foi verificada por MTT. Como controle, somente o veículo para os compostos, o dimetil sulfóxido (DMSO), foi adicionado na mesma concentração dos fármacos. As porcentagens de viabilidade celular estão representadas pela média das triplicatas + desvio-padrão de, pelo menos, três experimentos independentes. Teste t de Student: *P<0,1, **P<0,05 e ***P<0,001..... 95
- Gráfico 4 - Opções combinatórias entre os fármacos *hit* para o tratamento do câncer de boca. SCC-25 e HaCaT foram tratados com concentração de 5 μ M de cada fármaco ou combinados, conforme gráfico, por 72 horas e sua viabilidade celular foi verificada por MTT. Como controle, somente o veículo para os compostos, o dimetil sulfóxido (DMSO), foi adicionado na mesma concentração dos fármacos. As porcentagens de viabilidade celular estão representadas pela média das triplicatas + desvio-padrão de, pelo menos, três experimentos independentes. Teste t de Student: *P<0,1, **P<0,05 e ***P<0,001..... 97

Gráfico 5 - Combinação dos fármacos *hit* com quimioterápicos já utilizados contra o SCC-25. Luteolin, metixene hydrochloride e nitazoxanide foram individualmente combinadas com AG1478 10 μ M, cisplatina 5 μ M (CP5) ou cisplatina 10 μ M (CP10). Como controle, somente o veículo para os compostos, o dimetil sulfóxido (DMSO), foi adicionado na mesma concentração dos fármacos. Como controle, somente o veículo para os compostos, o dimetil sulfóxido (DMSO), foi adicionado na mesma concentração dos fármacos. As porcentagens de viabilidade celular estão representadas pela média das triplicatas + desvio-padrão de, pelo menos, três experimentos independentes. Teste t de Student: *P<0,1, **P<0,05 e ***P<0,001.....

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Relação de alimentos ricos em luteolin (Lopez-Lazaro, 2009).....	51
Tabela 2 -	Relação dos trabalhos investigando se há sinergismo da ação antitumoral da combinação entre a luteolin e a cisplatina.....	63
Tabela 3 -	Relação dos trabalhos investigando se há sinergismo da ação antitumoral da combinação entre a luteolin e a inibidores do EGFR.....	64
Tabela 4 -	Propriedades dos fármacos <i>hit</i> selecionados para o presente estudo.	89
Tabela 5 -	Opções combinatórias entre os fármacos <i>hit</i> para o tratamento do câncer de boca. SCC-25 e HaCaT foram tratados com concentração de 10µM de cada fármaco ou combinados, conforme indicado por 72 horas, e sua viabilidade celular foi verificada por MTT. As porcentagens de viabilidade celular estão representadas pela média das triplicatas.....	95
Tabela 6 -	Opções combinatórias entre os fármacos <i>hit</i> para o tratamento do câncer de boca. SCC-25 e HaCaT foram tratados com concentração de 5µM de cada fármaco ou combinados, conforme indicado por 72 horas, e sua viabilidade celular foi verificada por MTT. As porcentagens de viabilidade celular estão representadas pela média das triplicatas.....	97
Tabela 7 -	Opções combinatórias dos fármacos <i>hit</i> com outros agentes quimioterápicos para o tratamento do câncer de boca. SCC-25 foi tratado com concentração de 5µM ou 10µM de cada fármaco ou combinados, conforme indicado, por 72 horas e sua viabilidade celular foi verificada por MTT. As porcentagens de viabilidade celular estão representadas pela média das triplicatas.....	101

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
ATM	Ataxia-telangiectasia mutated protein
ATR	ATM and rad3-related protein
BCA	Ácido bicinconínico
BRM4819	Bromo-thiazolide RM4819
BRCA	Breast cancer 1, early onset
CDK	Quinase dependente da ciclina
CDKi	Inibidor da quinase dependente da ciclina
Chk	Proteína checkpoint
CEC	Carcinoma espinocelular
DMSO	Dimetil sulfóxido
DP	Desvio-padrão
DR	Death receptor
DSB	Double strand break
EGFR	Receptor do fator de crescimento dos queratinócitos European Medicines
EMA	Agency
ERBB2	Proteína-tirosina quinase erbB-2
FAK	Quinase de adesão focal
FDA	Food and Drug Administration
GSK-3 β	Glicogênio sintase kinase-3 β
GSTP1	Glutathione-S-transferase P1
H2AX	Histone H2A
JNK	c-Jun N-terminal kinases
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50%
L	Luteolin
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
M	Metixene hydrochloride
MMP	Metaloproteinase
MOPS	Ácido 3-(n-morfolino) propanosulfônico
MTT	Brometo de tiazolil azul de tetrazolio
N	Nitazoxanide
NF	Fator nuclear
NIH	National Institutes of Health
p	Fosforilado
PARP	Polimerase ribose poli-ADP
Rb	Retinoblastoma

RF	Reposicionamento de fármacos
ROS	Espécies reativas de oxigênio
Ser	Serina
TBST	Tris-buffered saline and tween
TNF	Fator de necrose tumoral
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	39
2	REVISÃO DE LITERATURA	45
2.1	REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS	45
2.2	LUTEOLIN	51
2.2.1	Aspectos gerais	51
2.2.2	Efeito antitumoral	53
2.2.3	Combinação da luteolin com outros quimioterápicos	61
2.2.3.1	Luteolin e cisplatina	61
2.2.3.2	Luteolin e inibidores do fator de crescimento epidérmico (EGFR)	63
2.3	METIXEHE HYDROCHLORIDE	65
2.4	NITAZOXANIDE	65
3	PROPOSIÇÃO	69
4	MATERIAL E MÉTODOS	73
4.1	FÁRMACOS	75
4.2	CULTURA CELULAR	76
4.3	TRIAGEM DE FÁRMACOS BASEADA NA VIABILIDADE CELULAR	76
4.4	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR POR COLORIMETRIA COM BROMETO DE TIAZOLIL AZUL DE TETRAZOLIO (MTT)	77
4.5	AVALIAÇÃO DOSE-RESPOSTA E CINÉTICA DOS FÁRMACOS <i>HIT</i>	78
4.6	WESTERN BLOTTING	78
4.6.1	Recuperação dos lisados proteicos	78
4.6.2	Dosagem proteica	79
4.6.3	Eletroforese	79
4.6.4	<i>Western blotting</i>	80
4.6.5	Incubação com os anticorpos e leitura	80
4.7	ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR	80
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	81
5	RESULTADOS	83
5.1	TRIAGEM DE FÁRMACOS BASEADA NA VIABILIDADE CELULAR	85

5.2	CITOTOXICIDADE DOS FÁRMACOS <i>HIT</i> NO CÂNCER DE BOCA	89
5.3	ASSOCIAÇÃO DOS FÁRMACOS <i>HIT</i> ENTRE SI	93
5.4	ASSOCIAÇÃO DOS FÁRMACOS <i>HIT</i> COM OUTROS QUIMIOTERÁPICOS	99
5.5	IMPACTO DOS FÁRMACOS <i>HIT</i> NAS PROPRIEDADES MIGRATÓRIAS DO SCC-25	99
5.6	MECANISMO DE AÇÃO DA LUTEOLIN CONTRA O CÂNCER DE BOCA	105
6	DISCUSSÃO	109
7	CONCLUSÕES	119
	REFERÊNCIAS	123

1

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma espinocelular de boca (CEC) é um dos dez tipos de câncer mais comuns no mundo e ainda constitui-se em um problema de saúde pública importante. Estima-se que em 2030, a carga global será de 21,4 milhões de casos novos de câncer e 13,2 milhões de mortes por esta doença em consequência do crescimento e do envelhecimento da população, bem como da redução da mortalidade infantil e das mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento [Inca, 2014]. No Brasil, há um risco estimado de 11,54 casos novos a cada 100 mil homens e 3,92 a cada 100 mil mulheres [Inca, 2014]. Além disso, cerca de 50% dos pacientes diagnosticados com CEC irá a óbito anualmente [Warnakulasuriya, 2009] apesar do investimento maciço em pesquisas buscando melhorar o seu prognóstico. O tratamento padrão para o CEC de boca ainda é predominantemente o cirúrgico, porém o envolvimento de estruturas nobres pelo tumor frequentemente resulta em mutilações do paciente ou impossibilidade da remoção total do tumor [Shah e Gil, 2009]. A radioterapia é frequentemente utilizada como tratamento adjuvante bem como agentes quimioterápicos como a cisplatina, 5-fluorouracil, o cetuximab, docetaxel, entre outros [Busch *et al.*, 2015]. Embora tais modalidades terapêuticas adjuvantes e pós-operatórias melhorem o prognóstico da doença, a taxa de mortalidade dos portadores da mesma permanece alta [Belcher *et al.*, 2014]. Além disso, a radioterapia e a quimioterapia resultam em vários efeitos adversos como a mucosite oral, osteonecrose, cárie de radiação, hipossalivação remanescentes [Watters *et al.*, 2011; Beech *et al.*, 2014; Chaveli-Lopez, 2014] além de incitar a resistência tumoral de possíveis células neoplásicas [Aktipis *et al.*, 2011]. Assim, a identificação de modalidades terapêuticas mais efetivas contra o câncer de boca constitui-se em uma necessidade urgente.

Neste contexto, o reposicionamento de fármacos emerge como uma ferramenta promissora no processo de descoberta e desenvolvimento de medicamentos

para o tratamento do CEC de boca. Esta prática refere-se à identificação de novas indicações para fármacos já existentes [Shim e Liu, 2014]. Assim, um medicamento desenvolvido para, em um primeiro momento, tratar uma doença, é utilizado para tratar uma outra. Esta é uma alternativa interessante no processo de descoberta de novos medicamentos pois a identificação e validação de novos fármacos é um processo extremamente demorado e dispendioso [Ashburn e Thor, 2004; Shim e Liu, 2014]. Além da economia de tempo para realização dos testes clínicos, o reposicionamento de fármacos também oferece uma redução significativa dos riscos para o uso do princípio ativo estudado pois os compostos candidatos já apresentam a farmacodinâmica, farmacocinética, efeitos adversos e contraindicações bem descritos além da otimização química, melhor forma de administração do fármaco, toxicologia e conhecimento dos custos e forma de produção já analisados [Ashburn e Thor, 2004]. Neste trabalho, nós escaneamos uma biblioteca composta por 1.280 fármacos aprovados pela *Food and Drugs Administration* (FDA) e pela *European Medicines Agency* (EMA).

Entre os 9 princípios ativos *hit* efetivos contra o CEC de boca identificados pelo nosso trabalho, nós aprofundamos as nossas investigações nos efeitos antitumorais de 3 deles, a luteolin, o methixene hydrochloride e o nitazoxanide.

A luteolin é um flavonoide presente em diversas plantas e vegetais tais como cenoura, brócolis e chá verde. Ela apresenta atividade anti-inflamatória e antioxidativa [Lin *et al.*, 2008; Lopez-Lazaro, 2009]. Além disso, é um composto altamente potente contra alguns tipos de câncer [Tuorkey, 2015] e é capaz de reverter a resistência de alguns tipos de tumores [Tu *et al.*, 2013]. A luteolin participa da modulação da apoptose, regulação de ciclo celular, angiogênese e até da regulação epigenética, auxiliando a impedir a invasão e metástase de tumores do fígado [Shi *et al.*, 2007], estômago [Wu *et al.*, 2008], pulmão [Hong *et al.*, 2014] e mama [Lee *et al.*, 2012]. Em relação ao câncer de boca, ainda há escassez de informações a respeito do mecanismo de ação deste fármaco [O'prey *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2008; Amin *et al.*, 2010; Verschooten *et al.*, 2012; Majumdar *et al.*, 2014]. Foi demonstrado que a luteolin é capaz de induzir a interrupção do ciclo celular e a

apoptose de células de câncer de cabeça e pescoço *in vitro* (Yang et al., 2008; Amin et al., 2010; Verschooten et al., 2012; Majumdar et al., 2014).

O metixene hydrochloride é um anti-colinérgico previamente utilizado no manejo da doença de Parkinson (Pubchem database, 2015) . Seu uso e fabricação, porém, foram descontinuados a algumas décadas e informações sobre seu mecanismo de ação não foram encontradas na literatura da língua inglesa (Pubchem database, 2015; Drugs.com, 2015).

A nitazoxanide é um fármaco com um espectro de atividade amplo, apresentando atividade antibacteriana, anti-protozoária, antiviral e anti-helmíntica (Rossignol *et al.*, 1998; Adagu *et al.*, 2002; White, 2004; Cohen, 2005; Hemphill *et al.*, 2006). Além disso, apresenta baixa toxicidade contra tecidos normais e efeitos colaterais brandos (Broekhuysen *et al.*, 2000; Cohen, 2005). O efeito antitumoral da nitazoxanide foi descrito em câncer colorretal, de mama, linfático, ósseo *in vitro* e *in vivo* (Muller *et al.*, 2008; Sidler *et al.*, 2012; Fan-Minogue *et al.*, 2013; Brockmann *et al.*, 2014; Senkowski *et al.*, 2015).

Do exposto acima, observa-se que há uma evidente necessidade de esclarecer os efeitos da luteolin, metixene hydrochloride e nitazoxanide no câncer de boca com a finalidade de colocá-los como candidatos em potencial para o tratamento deste tipo de neoplasia. O poder anti-carcinogênico do metixene hydrochloride e da nitazoxanide ainda não foram descritos em CEC de boca. Neste estudo, nós demonstramos o impacto destes compostos na sobrevivência e nas propriedades do câncer de boca *in vitro*, analisamos o impacto das suas combinações entre si e com outros agentes quimioterápicos já consagrados além de contribuir para desvendar os mecanismos moleculares pelos quais estes fármacos são capazes de matar as células tumorais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura deste trabalho foi dividida em tópicos para melhor compreensão do leitor. Nós a iniciamos com uma breve explicação sobre o conceito de reposicionamento de fármacos e, em seguida, discorremos sobre os compostos químicos candidatos ao tratamento do carcinoma espinocelular (CEC) de boca identificados neste estudo.

2.1. REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS

O conceito da descoberta de fármacos é definido pelo conjunto de processos pelos quais um medicamento contra determinada doença é identificado; desde a sua descoberta até a sua colocação à venda nas drogarias. O processo clássico do desenvolvimento de um medicamento inicia-se com uma proteína ou molécula alvo causadora de uma determinada doença a ser estudada [Figura 1]. Assim, sua expressão, função, investigação da sua síntese e papel *in vitro* e *in vivo* são exaustivamente descritos. Além disso, os resultados devem ser validados em diferentes linhagens celulares e modelos experimentais de animais. Nesta etapa, os recursos de bioinformática podem auxiliar na identificação das proteínas alvo mais promissoras para o tratamento de determinada doença. Uma vez definida a molécula-alvo, são realizadas tentativas de se desenvolver um fármaco estimulador ou inibidor da mesma, de acordo com as expectativas. Este fármaco pode ser natural ou sintético. Segue-se, então, os testes dos efeitos dos fármacos na doença estudada *in vitro* e *in vivo*. Obtendo-se resultados satisfatórios, busca-se a otimização do mesmo e estudo da sua farmacocinética, farmacodinâmica, biodisponibilidade e toxicidade. Superadas todas estas etapas, o fármaco será submetido aos testes clínicos e, finalmente, submetido à apreciação de órgãos regulamentadores de medicamentos, como a *Food and Drug Administration* (FDA),

European Medicines Agency (EMA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), este último, no Brasil. Todo este processo de descoberta de fármacos leva, em média de 10 a 17 anos. Além disso, são poucos os compostos que acabam se mostrando realmente eficazes no tratamento da doença estudada (Ashburn e Thor, 2004).

A indústria farmacêutica tem investido maciçamente no desenvolvimento de fármacos porém o retorno financeiro não tem sido proporcionalmente satisfatório. Assim, novas estratégias para otimizar e agilizar este processo vêm ganhando força (Ashburn e Thor, 2004; Shim e Liu, 2014).

O reposicionamento de fármacos (RF) é, como o próprio nome sugere, a utilização de um medicamento originalmente desenvolvido para tratamento de uma doença na terapêutica de uma outra enfermidade (Shim e Liu, 2014). O processo de RF apresenta algumas vantagens em relação ao processo de descoberta de fármacos clássico. A primeira delas é o tempo. Como o fármaco em questão já é utilizado no tratamento de outra doença, somente é necessária a descrição dos efeitos deste na nova enfermidade a ser tratada. Informações farmacológicas e de produção do mesmo geralmente já estão disponíveis. Além disso, como a toxicidade e segurança do fármaco já foram verificadas, o composto químico candidato pode ser submetido à testes clínicos mais rapidamente do que um novo princípio ativo detectado. Estima-se que o tempo total entre a identificação de um novo propósito para a droga e a inclusão da sua nova indicação leve de 3 a 12 anos (Figura 1). A segunda vantagem é a diminuição do risco. Como os efeitos do fármaco reposicionado no organismo humano já são conhecidos, a previsibilidade de suas ações é maior (Ashburn e Thor, 2004).

Figura 1 – Comparação entre os processos de descoberta de fármacos clássica e o reposicionamento de fármacos. Adaptado de [Ashburn e Thor, 2004].

Para otimizar este processo de reposicionamento de fármacos, várias empresas e órgãos nacionais de saúde, como o *National Institutes of Health* (NIH), nos Estados Unidos, têm montado bibliotecas de fármacos já aprovados pelo FDA, EMEA e outros órgãos regulamentadores importantes. O intuito destas bibliotecas é o de poder testar de dezenas a milhares de compostos simultaneamente em uma mesma linhagem celular através de escaneamentos. Assim, quando um fármaco exibe a ação terapêutica esperada em determinada linhagem celular estudada, ele é chamado de fármaco *hit*, ou seja, um composto candidato a medicamento contra aquela enfermidade. A partir destes escaneamentos, é possível obter alguns compostos químicos efetivos no tratamento da doença alvo e seguir para os testes adicionais.

2.2. LUTEOLIN

2.2.1. Aspectos gerais

Os flavonoides compreendem um grupo de mais de 4.000 antioxidantes naturais largamente presentes em frutas, cereais, legumes, vegetais, castanhas, sementes, ervas, temperos, caules, flores e bebidas (Tabela 1) (Kandaswami *et al.*, 2005; Lopez-Lazaro, 2009). Por serem tão versáteis, os flavonoides fazem parte de diferentes tipos de dieta humana e estima-se que haja um consumo médio entre 200mg e 1g por dia destes compostos (Kandaswami *et al.*, 2005). Além disso, os flavonoides são estáveis ao calor e não são perdidos durante o cozimento (Le Marchand, 2002), fazendo com que sejam disponibilizadas quantidades farmacológicas no organismo do consumidor.

A luteolin é um flavonoide pertencente ao subgrupo das flavonas e foi identificada em mais de 300 espécies de plantas e vegetais. Nas plantas, a maioria dos flavonoides é encontrada na forma de glicosídeo e é clivada em aglicona (forma pura) na mucosa intestinal. Em seguida, a aglicona é degradada ou glucoronada pela UDP-glucuronosil transferase antes de ser liberada na corrente sanguínea (Seelinger *et al.*, 2008). A absorção dos glicosídeos flavonoides parece ser mais eficiente em humanos do que a das agliconas (Hollman e Katan, 1998).

Tabela 1 – Relação de alimentos ricos em luteolin (Lopez-Lazaro, 2009).

Alimentos ricos em luteolin	
• Aipo	• Menta
• Alcachofra	• Nabo
• Alcaparras	• Orégano
• Alecrim	• Óleo de oliva
• Alface	• Pepino
• Beterraba	• Pimenta
• Cebolinha	• Romã
• Cenoura	• Salsa
• Chá verde	• Tomilho
• Chocolate	• Trigo
• Couve	

Alguns estudos epidemiológicos têm sugerido que o consumo diário de alguns alimentos ricos em luteolin diminui o risco de desenvolvimento de câncer de pulmão, próstata, estômago e mama [Knekt *et al.*, 1997; Neuhouser, 2004; Wright *et al.*, 2004] além de diminuir o risco de infarto do miocárdio [Sun *et al.*, 2012]. Por outro lado, outros trabalhos não encontraram associação entre o consumo de alimentos que contenham o composto e a diminuição do risco de câncer de pulmão [Hirvonen *et al.*, 2001]. Embora haja dificuldade em comparar os estudos realizados dada às diferenças metodológicas, tais como a utilização de diferentes tipos de questionários e também da padronização dos hábitos dos indivíduos analisados, tais resultados apontam para um efeito protetivo da luteolin. Já há numerosas provas experimentais *in vitro* e *in vivo* de que a luteolin possui uma gama de efeitos biológicos envolvidos na prevenção e combate às doenças acima citadas [Knekt *et al.*, 1997; Mittra *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002; Kandaswami *et al.*, 2005; Hirano *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007; Ziyen *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2008; Seelinger *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2009; Weng e Yen, 2012]. O composto já tem sido empregado como agente anti-inflamatório, antimicrobiano e no tratamento do câncer na medicina tradicional chinesa e os efeitos antitumorais deste composto têm sido extensivamente investigados desde então [Lin *et al.*, 2008; Weng e Yen, 2012].

O poder antioxidante da luteolin e dos outros flavonoides é a sua propriedade mais marcante e, frequentemente, os compostos são referidos somente como “antioxidantes” [Kandaswami *et al.*, 2005; Ziyen *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2008]. As espécies reativas de oxigênio (ROS) englobam um grupo diverso de moléculas altamente reativas e de vida curta que funcionam como segundos mensageiros para sinalização celular. Entretanto, a produção excessiva das ROS resulta em estresse oxidativo e dano ao DNA, lipídio e proteína, processos que estão envolvidos com o câncer, doenças cardiovasculares e neuro-degenerativas. A luteolin exibe ação antioxidante por meio de diversos mecanismos: 1. Sua estrutura química proporciona sua própria oxidação, inibindo a formação das ROS, 2. Inibe oxidases cujos produtos são as ROS e 3. Estimula a atividade

de outros antioxidantes como a *glutathione-S-transferase*, *glutathione reductase*, *superoxide dismutase* e a *catalase* (Lin *et al.*, 2008).

A luteolin também apresenta atividade anti-inflamatória. Este princípio ativo é capaz de suprimir a produção de diversos fatores pró-inflamatórios, tais como fator de necrose tumoral (TNF)- α , NF-kappa B, AP-1, ciclooxigenase-2, lipoxigenase, diversas citocinas além das ROS (Hirano *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007; Ziyen *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2008). Ademais, a luteolin é capaz de inibir a inflamação induzida pelos lipopolissacarídeos, moléculas integrantes da parede celular de bactérias gram-negativas e altamente incitantes de resposta inflamatória (Lin *et al.*, 2008).

A luteolin apresenta, ainda, reconhecida atividade antibacteriana, antiviral, antifúngica e antiparasitária (Mitra *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002; Sartori *et al.*, 2003; Kirmizibekmez *et al.*, 2004; De Campos *et al.*, 2005; Lv *et al.*, 2009).

2.2.2. Efeito antitumoral

Entre todos os poderes terapêuticos exibidos pela luteolin descritos acima, a sua ação mais investigada atualmente é o seu efeito antitumoral. Não seria exagero afirmar que este princípio ativo é capaz de inibir dezenas de moléculas super expressas e estimular a expressão de moléculas suprimidas em diversos tipos de cânceres, apresentando tanto ação preventiva como terapêutica (Zhang *et al.*, 2009; Ong *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2011; Pratheeshkumar *et al.*, 2012; Wang, L. *et al.*, 2012; Wang, T. T. *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2014). As principais ações antitumorais da luteolin em tumores malignos epiteliais serão descritas a seguir e o seu papel na interrupção do ciclo celular e no dano ao DNA serão detalhadas.

Os efeitos pró-apoptóticos da luteolin têm sido alvo de diversas investigações (Wu *et al.*, 2008). Este fármaco pode desencadear a morte celular programada tanto através da via extrínseca quanto da via intrínseca da apoptose. Ele é capaz de ativar o polimerase ribose poli-ADP (PARP), as caspases-3, 8 e 9 e receptores de morte celular, como o DR5 em diversos tipos de câncer (Kandaswami *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2008;

Lopez-Lazaro, 2009; Zhang *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2014; Sakurai *et al.*, 2014; Tuorkey, 2015).

A luteolin também pode induzir a apoptose diretamente por meio da ativação do *c-Jun N-terminal kinases* (JNK), o qual inibe a translocação do fator nuclear (NF)- κ B-p65 mediada pelo fator de necrose tumoral (TNF)- α para o núcleo (Cai *et al.*, 2011). A ativação do JNK também ocasiona a inibição do NF- κ B. O NF- κ B é sintetizado no citoplasma e conjugado com o seu inibidor, o I- κ B; permanecendo inativo. Para ser ativado, o I- κ B é fosforilado e degradado. O p-NF- κ B livre, então, transloca para o núcleo celular para que ocorra a transcrição e ativação de genes pró-crescimento e anti-apoptóticos. A luteolin é capaz de inibir o NF- κ B, induzindo, portanto, a apoptose pelo TNF- α (Tuorkey, 2015).

Luteolin parece mediar a estabilização e acúmulo do p53 através da ativação do JNK e outras moléculas (Shi *et al.*, 2007), o que induz a apoptose e previne a proliferação de diversos tipos de células neoplásicas, incluindo de mama (Momtazi-Borojeni *et al.*, 2013), estômago (Wu *et al.*, 2008), pulmão (Amin *et al.*, 2010) e de cabeça de pescoço (Amin *et al.*, 2010). Inclusive, a ativação do JNK pela luteolin estabiliza o p53 por fosforilação, levando a uma redução da sua ubiquitinação e da sua degradação (Seelinger *et al.*, 2008).

A luteolin também é capaz de interromper o ciclo celular e, então, induzir à apoptose (Tuorkey, 2015). O composto interrompe o ciclo celular através da diminuição da expressão do Akt, PLK1, ciclina B1, ciclina A, ciclina D1, c-myc, CDK2, CDK4, CDK6, Bcl-2, Bcl-xL, Cdc2, Cdc25C, Rb1 e/ou survivin bem como do aumento da expressão do Bax, caspase-3 e/ou p21 em câncer de nasofaringe, pele, esôfago, intestino, mama, próstata e estômago (Lim Do *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009; Ong *et al.*, 2010; Shoulars *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2012; Verschooten *et al.*, 2012; Wang, T. T. *et al.*, 2012; Pandurangan *et al.*, 2013). Os dados prévios indicam que a luteolin é capaz de interromper o ciclo celular em diversas fases, atuando nas fases G1, S e G2 (Park *et al.*, 2014).

A luteolin também interrompeu a mitose por meio da cascata de sinalização Wnt/ β -catenina/glicogênio sintase kinase-3 β (GSK-3 β) (Pandurangan *et al.*, 2013), e da

Akt/GSK-3 β /Ciclina D1 [Ong *et al.*, 2010]. A ativação das cascatas é potencializada pela fosforilação do Akt, também proporcionada pela luteolin [Ong *et al.*, 2010].

Além de todos os efeitos da luteolin acima descritos, este fármaco ainda é capaz de desempenhar papel na prevenção da invasão tumoral e da metástase. Foi demonstrado que a luteolin é capaz de inibir a transição epitélio-mesênquima induzida por hipóxia ao inibir a expressão da integrina- β 1 e da quinase de adesão focal (FAK) [Ruan *et al.*, 2012] além de prevenir o E-caderina *switching* [Zhou *et al.*, 2009], processo pelo qual a expressão da E-caderina é suprimida e o de marcadores mesenquimais é estimulado em células epiteliais, aumentando sua capacidade invasiva e de comunicação com os tecidos de origem mesenquimal. Ademais, a luteolin demonstrou ação anti-angiogênica *in vivo* além de inibir a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)-A e da metaloproteinase (MMP)-9 [Lu *et al.*, 2013].

Todos estes achados, entretanto, foram obtidos em diferentes tipos de tumores. Em carcinoma espinocelular de boca, contudo, ainda há escassa informação acerca da ação antitumoral da luteolin.

O'prey *et al.* [2003] analisaram o efeito de diversos flavonoides, incluindo a luteolin, em culturas celulares primárias de mucosa oral normal e de CEC de boca. Os autores verificaram a concentração inibitória de 50% (IC₅₀) da luteolin para ambas linhagens e obtiveram 18 μ M para a mucosa oral normal e 22 μ M para a linhagem de CEC, não obtendo diferença estatisticamente significativa [O'prey *et al.*, 2003]. O'prey *et al.* [2003] também constataram ativação da ERK 1 e 2 após 24 horas de tratamento das células de CEC de boca com a luteolin, porém não houve alteração nos níveis de Akt. Já os níveis de p38 aumentaram e os de p-JNK permaneceram alterados com 18 horas de tratamento com o fármaco e 4 vezes a IC₅₀. Por fim, os autores demonstraram que o tratamento da linhagem de CEC de boca com duas vezes a IC₅₀ aumentou os níveis proteicos e a fosforilação do p53 [O'prey *et al.*, 2003].

Yang *et al.* [2008] verificaram a ação apoptótica da luteolin em linhagens de CEC de boca *in vitro* e *in vivo*. Os autores encontraram toxicidade diretamente proporcional à dose e ao tempo de aplicação do fármaco em duas linhagens de câncer de boca, embora

a luteolin pouco tenha afetado a viabilidade celular de fibroblastos gengivais. O tratamento com o referido fármaco também ocasionou um aprisionamento das células na fase G1 do ciclo celular e observou-se diminuição da expressão da CDK-2, CDK-4, CDK-6, ciclina 3 e pRb ao passo que não houve alteração nos níveis dos inibidores da quinase dependente da ciclina [CDKi] Cip1/p21 e Cip2/p27. Ademais, os autores encontraram incremento da ocorrência de apoptose com o aumentar da dose do fármaco além de aumento da expressão do Bax, caspase-9 e caspase-3 clivadas, PARP e diminuição da expressão do Bcl-2. Por fim, os autores constataram uma diminuição de 68,8% e 92,65% do tamanho dos tumores induzidos *in vivo* e tratados com, respectivamente, 3 e 5mg/kg de luteolin após 44 dias.

O trabalho de Amin *et al.* (2010) estudou os efeitos da luteolin em linhagens de câncer de boca e sua metástase linfonodal, hipofaringe e de uma metástase de laringe. Os autores também identificaram que o fármaco provoca apoptose das linhagens celulares por meio da marcação com a Anexina V e também observaram aumento da clivagem da caspase-8, caspase-3 e expressão do citocromo c. Ademais, os autores demonstraram efetividade da luteolin a 10mg/kg no combate ao tumor de hipofaringe e pulmão *in vivo* (Amin *et al.*, 2010). Embora os experimentos a seguir de Amin *et al.* (2010) tenham sido realizados em uma linhagem de câncer de pulmão, seus resultados merecem ser apresentados nesta revisão pois relacionam-se aos achados do presente trabalho. Antes de entrarmos nestes resultados, porém, uma breve revisão das vias de sinalização induzidas pelo dano celular é essencial.

A divisão celular é um processo rigorosamente controlado por diversas moléculas em pontos distintos durante a sua progressão. Antes que haja o avanço de uma fase para a outra, moléculas vigilantes checam se não há nenhum tipo de erro. Quando ocorre algum tipo de dano ao DNA celular, duas proteínas, a *Ataxia-telangiectasia mutated* [ATM] e/ou a *ATM-rad3-related* [ATR], são prontamente ativadas e desencadeiam vias de sinalização com o intuito de interromper o ciclo celular. Assim, é possível que haja tempo hábil para verificação do erro e a célula seja reparada ou induzida à apoptose. Quando o DNA sofre um *double strand break* (DSB), ou seja, quando há uma

quebra em ambas fitas de DNA em posições aproximadamente simétricas, a proteína ATM é ativada (Figura 2). Esta proteína é, portanto, especializada em reconhecer DSB. Ela, por sua vez, fosforila a proteína H2AX, que ativa a proteína BRCA-1, ativando e estabilizando o p53. Desta forma, a proteína H2AX fosforilada (pH2AX) é utilizada como um marcador de DSB. A proteína BRCA-1, por sua vez, é responsável pelo reparo do DNA. A ativação do p53 leva à interrupção do ciclo celular por meio da ativação do p21 para reparo da célula ou ao desencadeamento da apoptose celular. Quando recrutada, a ATM também fosforila outra proteína importante na manutenção do ciclo celular, que é a checkpoint (Chk)2. A Chk2 é uma proteína supressora de tumor responsável por controlar a velocidade do processo mitótico, fazendo com que a célula se prolifere adequadamente. Pois bem, ao ser ativada pelo ATM ou até pelo BRCA-1, a proteína Chk2 ativa a Cdc25a e inibe a ciclina CDK2 fazendo com que a célula interrompa o seu ciclo celular na fase G1. Do exposto acima, é possível observar que a ativação da ATM resulta na convocação de diversas proteínas *downstream* que, coletivamente, provocam o congelamento da célula na fase G1 do ciclo celular enquanto as proteínas reparadoras do DNA tentam reverter o erro. Quando tal erro não pode ser reparado, a célula inicia o seu processo de apoptose [Deng e Brodie, 2000; Shiloh e Ziv, 2013; Stracker *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2015].

Por outro lado, a ATR já é capaz de reconhecer diversos tipos de dano celular que acometem somente uma fita da dupla hélice de DNA. Entre eles, deslocamento da forquilha de replicação, nucleotídeos danificados ou até mesmo um DSB. O recrutamento da ATR, por sua vez, irá ocasionar a ativação da Chk1, que irá ativar o p53 e estacionar o ciclo celular na fase S ou G2. É pertinente destacar que a ATM também é capaz de ativar a ATR diretamente [Goto *et al.*, 2015].

Figura 2 – Via de sinalização do dano celular. ATM: *Ataxia-telangiectasia mutated protein*; ATR: *ATM and rad3-related protein*; BRCA-1: *Breast cancer 1, early onset*; CDK: Quinase dependente da ciclina; Check: Proteína checkpoint; DSB: Double strand break; H2AX: *Histone H2A*; SSB: Single strand break.

Tendo em vista as informações acima, seguimos aos achados de Amin *et al.* [2010]. Os autores observaram que a luteolin foi capaz de estabilizar e ativar o p53 por meio de fosforilação na serina [Ser]¹⁵ na linhagem de câncer de pulmão [esta linhagem não apresentava mutação no p53, ao contrário das linhagens de câncer de cabeça de pescoço]. Curiosamente, a Ser¹⁵ também é um local de ligação da ATM e os autores postularam que esta proteína seria responsável pelo recrutamento do p53 diante do dano no DNA provocado pela luteolin. Ao inibir a ATM com o Ku55933, a fosforilação do p53 foi inibida, confirmando os resultados dos autores. Ainda, foi possível observar um aumento da expressão do γ -H2AX, confirmando a presença de DSB causada pela luteolin [Amin *et al.*, 2010].

Os efeitos antitumorais da luteolin foram investigados em uma linhagem de CEC de cabeça e pescoço e em duas de câncer de pele por Verchooten *et al.* [2012]. Curiosamente, os autores constataram que queratinócitos cutâneos obtidos de cultura celular primária eram imunes aos efeitos da luteolin enquanto todas as linhagens tumorais

apresentaram diminuição da viabilidade celular após o tratamento com diferentes doses de luteolin. Os autores demonstraram, mais uma vez, que a luteolin desencadeia a apoptose tanto pela via intrínseca quanto pela extrínseca ao observarem um aumento da clivagem das caspases-3, 8 e 9 e da expressão do PARP [Verschooten *et al.*, 2012].

Majumdar *et al.* (2014) investigaram um modo de administração da luteolin [nanocápsulas hidrofílicas] para utilizá-la como quimiopreventivo de câncer. Os autores, mais uma vez, demonstraram a citotoxicidade do fármaco em linhagens de CEC de boca e de câncer de pulmão com IC₅₀ de 6,96µM para o CEC de boca. Além disso, a luteolin demonstrou importante ação tumoral *in vivo* [Majumdar *et al.*, 2014].

2.2.3. Combinação da luteolin com outros quimioterápicos

No presente trabalho, nós verificamos a combinação dos fármacos *hit* identificados pelo escaneamento com dois quimioterápicos utilizados como adjuvantes no tratamento do câncer de boca, a cisplatina e inibidores do receptor do fator de crescimento epidérmico [EGFR]. Como praticamente não há estudos acerca da combinação destes quimioterápicos com os outros fármacos *hit*, as associações da luteolin com os referidos princípios ativos serão revisados nas subseções a seguir.

2.2.3.1. Luteolin e cisplatina

A cisplatina é um potente quimioterápico utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer como o de cabeça e pescoço, testicular, ovariano, de bexiga, cervical e de pulmão. Este fármaco teve seus primeiros estudos pré-clínicos publicados em 1969 e, dada sua efetividade, é utilizado até os dias de hoje [Fuertes *et al.*, 2003]. Entretanto, embora a cisplatina seja efetiva contra alguns tipos de tumores, seu maior problema se refere aos efeitos adversos e à resistência à droga, limitando o seu poder curativo [Wong e Giandomenico, 1999]. Assim, a sua associação com outros quimioterápicos visa o

aumento da sua efetividade antitumoral, sensibilização das células neoplásicas resistentes e redução das sequelas do tratamento.

O seu mecanismo de ação principal envolve a sua ligação ao DNA celular e subsequente interferência no processo normal de transcrição ou replicação celular. Tais danos levam à morte celular [Fuertes *et al.*, 2003].

Atualmente, há seis trabalhos buscando verificar o impacto da associação da cisplatina com a luteolin no tratamento de diversos tipos de câncer [Tabela 2].

Shi *et al.* [2007] demonstraram que a luteolin aumentou a morte celular em linhagens de câncer colorretal e de fígado *in vivo* e *in vitro* ao comparar as ações de dela e da cisplatina isoladamente. Além disso, os autores observaram que este sinergismo só ocorria em linhagens sem a mutação do p53. Nestes casos, a luteolin aumentou o acúmulo desta proteína *in vivo*, melhorando o efeito terapêutico da cisplatina [Shi *et al.*, 2007].

A luteolin otimizou o efeito antitumoral da cisplatina em comparação com a última isoladamente em câncer de estômago *in vitro* [Wu *et al.*, 2008].

Johnson *et al.* [2013] verificaram o impacto da associação da luteolin com a cisplatina no tratamento do câncer de pâncreas. Os autores observaram uma IC₅₀ de 21,7µM para a cisplatina e de próximo de 15µM para a combinação entre os fármacos. Curiosamente, a IC₅₀ da luteolin foi de apenas 16,3µM, sugerindo maior efetividade da luteolin no tratamento de malignidades no pâncreas em comparação com a cisplatina.

O trabalho de Chian *et al.* [2014] demonstrou que células de neoplasia maligna colorretal resistentes à oxaliplatina apresentaram ativação da via de sinalização da Nrf2 quando tratadas com a luteolin. Este fármaco foi capaz de incrementar a quantidade de morte celular ao ser combinada com a cisplatina, oxaliplatina e doxorrubicina além de atenuar a ativação da Nrf2.

O trabalho de Hong *et al.* [2014] não testou a associação da cisplatina com a luteolin, mas sim comparou os seus efeitos em câncer de pulmão *in vivo*. Foi observado que a luteolin provocou maior redução do tamanho dos tumores em comparação ao

controle, aos animais tratados somente com a cisplatina ou com o erlotinib (um inibidor do EGFR).

O sinergismo entre a luteolin e a cisplatina foi demonstrada *in vivo* em câncer de pulmão [Chian, Thapa, *et al.*, 2014]. Animais com tumores induzidos e tratados com a cisplatina, luteolin e combinação de ambos tiveram redução de 47%, 55% e 70% do peso tumoral, respectivamente.

Tabela 2 – Relação dos trabalhos investigando se há sinergismo da ação antitumoral da combinação entre a luteolin e a cisplatina.

Referência	Tipo de câncer	IVT / IVV *	Sinergismo?
Shi <i>et al.</i> [2007]	Fígado e colorretal	IVT e IVV	Sim
Wu <i>et al.</i> [2008]	Estômago	IVT	Sim
Johnson <i>et al.</i> [2013]	Pâncreas	IVT	Sim
Chian <i>et al.</i> [2014]	Colorretal	IVT e IVV	Sim
Hong <i>et al.</i> [2014]	Pulmão	IVV	IND
Chian, Thapa, <i>et al.</i> [2014]	Pulmão	IVV	Sim

*IVT: Estudos *in vitro*; IVV: Estudos *in vivo*; IND: Informação não disponível. O efeito da combinação dos fármacos nos tumores não foi verificada.

2.2.3.2. Luteolin e inibidores do fator de crescimento epidérmico (EGFR)

O fator de crescimento epidérmico (EGR) é super expresso em diversos tipos de malignidades, inclusive o câncer de boca. Assim, fármacos cujo alvo é o seu receptor, o EGFR, têm apresentado bons resultados no tratamento adjuvante oncológico. Atualmente, os fármacos gefinitib, erlotinib, cetuximab, lapatinib, panitumumab e vandetanib estão disponíveis e apresentam como alvo, o EGFR. Contra o câncer de boca, somente o cetuximab é utilizado [Saba *et al.*, 2014; Levy *et al.*, 2015], porém não há nenhuma investigação a respeito de sua associação com a luteolin. Assim, apresentamos uma

revisão dos quatro estudos disponíveis acerca da sua combinação com os outros fármacos que possuem como alvo o EGFR (Tabela 3).

Menendez *et al.* (2008) investigaram as ações da luteolin e do lapatinib no combate ao câncer de mama. Além de inibidor do EGFR, o lapatinib também suprime o receptor proteína-tirosina quinase erbB-2 (ERBB2), superexpresso no câncer de mama. Os autores encontraram efeitos semelhantes entre a luteolin isoladamente e o lapatinib. A associação dos fármacos não foi analisada (Menendez *et al.*, 2008).

Markaverich *et al.* (2010) testaram o tratamento da luteolin combinada com o gefitinib em câncer de próstata. Os autores não encontraram diferenças significantes entre a quantidade de células em apoptose entre os tratamentos individuais e a associação dos mesmos, porém identificaram diferentes mecanismos de indução da apoptose para suas atividades antitumorais (Markaverich *et al.*, 2010).

O trabalho de Hong *et al.* (2014) relatou que o tratamento com a luteolin de animais com câncer de pulmão *in vivo* causou maior redução do tamanho de tumores de pulmão em comparação aos animais tratados somente com o erlotinib.

Sakurai *et al.* (2014) verificaram a viabilidade celular de cultura de células de câncer de próstata após o tratamento com a luteolin, gefinib e a combinação de ambos. Foi verificada que, após 72 horas de tratamento com os referidos fármacos, obteve-se 24,3%, 15,2% e 6,5% de células vivas, respectivamente (Sakurai *et al.*, 2014).

Tabela 3 – Relação dos trabalhos investigando se há sinergismo da ação antitumoral da combinação entre a luteolin e a inibidores do EGFR.

Referência	Tipo de câncer	IVT / IVV*	Sinergismo?
Menendez <i>et al.</i> (2008)	Mama	IVT	IND
Markaverich <i>et al.</i> (2010)	Próstata	IVT	Não
Hong <i>et al.</i> (2014)	Pulmão	IVV	IND
Sakurai <i>et al.</i> (2014)	Próstata	IVT	Sim

*IVT: Estudos *in vitro*; IVV: Estudos *in vivo*; IND: Informação não disponível. O efeito da combinação dos fármacos nos tumores não foi verificada.

2.3. METIXENE HYDROCHLORIDE

O metixene hydrochloride é um anti-colinérgico previamente utilizado no tratamento da doença de Parkinson [Pubchem, 2015]. Contudo, diante do desenvolvimento de fármacos com maior eficácia no combate desta doença, a produção e a venda do metixene hydrochloride acabaram sendo descontinuados há algumas décadas atrás [Pubchem, 2015; Drugs.com, 2015].

Informações acerca de seu mecanismo de ação, farmacologia e toxicidade são extremamente escassas. Nós não conseguimos identificar nenhum estudo na língua inglesa sobre os efeitos moleculares do metixene hydrochloride em nenhum tipo de célula ou tecido tampouco investigações sobre o efeito antitumoral do princípio ativo em câncer.

2.4. NITAZOXANIDE

A nitazoxanide (*2-acetyloxy-N-(5-nitro-2-thiazolyl)benzamide*) é um composto descrito em 1975 e originalmente empregado como anti-helmíntico [Hemphill *et al.*, 2006]. No entanto, estudos posteriores demonstraram que este fármaco exibe um espectro de atividade anormalmente amplo com atividade anti-protozoária, anti-viral, antibacteriana e até mesmo anti-inflamatória [Rossignol *et al.*, 1998; Adagu *et al.*, 2002; White, 2004; Cohen, 2005; Hemphill *et al.*, 2006]. Desta forma, manipulações na sua estrutura química foram realizadas para tentar aumentar a especificidade do fármaco e, atualmente, o grupo dos tiazolidos constitui uma classe dos fármacos derivados na nitazoxanide.

A nitazoxanide apresenta boa absorção quando administrada via oral e ela é duas vezes maior quando administrada com uma refeição [White, 2004]. Após sua ingestão, a pró-droga nitazoxanide é rapidamente convertida em tizoxanida, que apresenta mesma efetividade que a nitazoxanide [Adagu *et al.*, 2002]. Sua excreção se dá pela bile ou pela urina [Broekhuysen *et al.*, 2000]. Os seus efeitos adversos são brandos e incluem irritabilidade do trato gastro-intestinal, resultando náusea e vômito [White, 2004].

Em 2008 foi publicado um surpreendente estudo demonstrando que a ação das tiazolidos não se restringe apenas às bactérias, protozoários vírus e helmintos, mas também às células humanas neoplásicas (Muller *et al.*, 2008). Um novo fármaco derivado da nitazoxanide, o bromo-thiazolide RM4819 (BRM4819) foi desenvolvido neste trabalho. Os autores demonstraram que a eficácia do BRM4819 é alta em linhagens de câncer de colorretal *in vitro*. Porém quando o ciclo celular das células foi interrompido com o nocodazol, a eficácia do BRM4819 também apresentou-se diminuída, indicando influência direta do ciclo celular para a ação do fármaco (Muller *et al.*, 2008). Além disso, os autores relataram que as células Caco2 tratadas com o BRM4819 apresentaram alterações fenotípicas compatíveis com apoptose, tais como condensação nuclear, exposição da fosfatidilserina e fragmentação do DNA (Muller *et al.*, 2008).

O mesmo grupo continuou estudando os efeitos do RM4819 no câncer colorretal (Sidler *et al.*, 2012). Os autores demonstraram que o RM4819 induz a apoptose de duas linhagens, Caco2 e LS174T, enquanto outras duas linhagens, HT29 e Colo205, foram resistentes ao tratamento com o fármaco. Além disso, eles observaram que os efeitos do RM4819 são dependentes do *glutathione-S-transferase P1* (GSTP1), que é super expresso em câncer colorretal. Este trabalho também observou que o RM4819 possui um efeito sinérgico com a cisplatina na concentração de 10 ou 20µg/ml (Sidler *et al.*, 2012).

Fan-Minogue *et al.* (2013) identificaram a nitazoxanide em um escaneamento de alto rendimento de fármacos inibidores da c-Myc, um protooncogene superexpresso em câncer de mama. Foi demonstrado que a nitazoxanide inibe a expressão do c-Myc de forma dose-dependente em linhagens de câncer de mama, linfoma e osteossarcoma e em câncer de mama *in vivo* na dosagem de 200mg/kg duas vezes ao dia por 27 dias (Fan-Minogue *et al.*, 2013).

Em 2014, foi publicado outro trabalho demonstrando que o BRM4819 é capaz de induzir a apoptose em três linhagens de câncer colorretal. Esta atividade pró-apoptótica é dependente da ativação da caspase-3 e da expressão do GSTP1 (Brockmann *et al.*, 2014).

O trabalho recente de Senkowski *et al.* [2015] baseou-se em um escaneamento de fármacos para identificação de agentes citotóxicos contra o câncer colorretal. Os autores mimetizaram a estrutura tridimensional do tumor por meio da técnica dos esferóides tumorais multicelulares com o intuito de simular a hipóxia na porção central e identificaram a nitazoxanide como um fármaco efetivo no combate às células tumorais. Ademais, o trabalho também mostrou que a nitazoxanide ativou a via do MAPK, suprimiu c-Myc, mTOR e Wnt.

Ainda não há estudos disponíveis sobre o efeito antitumoral da nitazoxanide em câncer de boca.

3 PROPOSIÇÃO

3. PROPOSIÇÃO

A partir da triagem de fármacos baseada na viabilidade celular realizada em cultura de células de carcinoma espinocelular de boca e de queratinócitos cutâneos imortalizados, este trabalho propôs-se a:

1. Identificar fármacos *hit* capazes de eliminar as células tumorais sem causar danos excessivos às células não neoplásicas;
2. Analisar a citotoxicidade bem como o impacto dos fármacos *hit* nas referidas células;
3. Verificar a eficácia da associação dos fármacos *hit* entre si e com quimioterápicos já utilizados no tratamento do câncer de boca;
4. Contribuir para o conhecimento dos mecanismos de ação dos fármacos *hit* no combate às células de carcinoma espinocelular de boca.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos deste trabalho foram realizados em triplicata e, no mínimo, três vezes independentes.

4.1. FÁRMACOS

Para a realização da triagem de fármacos baseada na viabilidade celular, foi utilizada a biblioteca da Prestwick (Prestwick Chemical, Illkirch, França). Ela é composta por 1.280 fármacos já aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) e pela *European Medicines Agency* (EMA). Desta forma, estes compostos já apresentam suas propriedades farmacológicas definidas e já são liberadas para a terapêutica de outras doenças em seres humanos.

A biblioteca da Prestwick contém 16 placas de 96 poços, sendo cada uma delas composta por 80 diferentes fármacos e 16 poços para controle. Todos os princípios ativos foram suspensos em dimetil sulfoxido (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) até atingirem a concentração de 10mM. A biblioteca foi minuciosamente identificada e armazenada a -20°C.

Para a realização dos experimentos com os fármacos selecionados, novas alíquotas dos mesmos foram adquiridas da Prestwick, individualmente. Elas também foram suspensas em DMSO e armazenadas em pequenas alíquotas de 10mM. Estoques intermediários de 1mM, suspensos em meio de cultura livre de soro fetal bovino, também foram preparados e utilizados, no máximo, duas vezes e em curto intervalo de tempo.

4.2. CULTURA CELULAR

Neste estudo, foram utilizadas duas linhagens celulares, o SCC-25 e o HaCaT. A linhagem SCC-25 [originalmente adquirida da American Type Culture Collection (ATCC)] advém de um carcinoma espinocelular de língua de um paciente do sexo masculino e com 70 anos de idade [Rheinwald e Beckett, 1981]. O HaCaT é oriundo do tecido cutâneo normal de um homem de 62 anos [Boukamp *et al.*, 1988]. Uma vez que o queratinócito apresenta poder de expansão limitado ao se diferenciar, esta linhagem foi imortalizada.

O SCC-25 foi cultivado e expandido em meio de cultura composto por partes iguais de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) e meio de cultura F12 (DMEM/F12; Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 1% de penicilina e estreptomicina, 400ng/ml de hidrocortisona e 15mM de HEPES.

Já o HaCaT foi cultivado e expandido em meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco 1X contendo 4,5g/L de D-glucose (DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 1% de penicilina e estreptomicina (Penstrep, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 0,1% de Normocin (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

As células foram expandidas ao atingir aproximadamente 80% de confluência com tripsina 0,2% após duas lavagens com PBS [Ca₂/Mg₂]. A tripsina foi inativada com meio de cultura. As linhagens celulares permaneceram incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

4.3. TRIAGEM DE FÁRMACOS BASEADA NA VIABILIDADE CELULAR

Para identificação dos compostos *hit*, ou seja, aqueles efetivos no tratamento do câncer de boca, foi realizada a primeira triagem dos 1.280 fármacos da biblioteca da Prestwick na linhagem celular SCC-25. As células foram cultivadas a 2.500 células/poço em placas de 96 poços. Vinte e quatro horas depois, os fármacos eram adicionados na

concentração de 10 μ M. Como controle, somente o veículo para os fármacos (dimetil sulfóxido, DMSO) foi adicionado, na mesma concentração. Setenta e duas horas após o tratamento com os compostos químicos, a viabilidade celular do SCC-25 foi verificada por meio do ensaio por colorimetria com brometo de tiazolil azul de tetrazolio (MTT).

Na triagem inicial, realizada com o SCC-25, os fármacos capazes de induzir a morte de pelo menos 70% das células foram selecionados. Em seguida, um novo escaneamento foi realizado somente com os compostos selecionados: novamente com o SCC-25 (para confirmação dos resultados iniciais) e com o HaCaT (para verificação da toxicidade dos princípios ativos). Desta vez, os fármacos que ocasionaram a morte de pelo menos 70% da linhagem SCC-25 e menos do que 30% da linhagem HaCaT foram considerados *hit*.

4.4. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR POR COLORIMETRIA COM BROMETO DE TIAZOLIL AZUL DE TETRAZOLIO (MTT)

A viabilidade das células tumorais e não-tumorais tratadas com os fármacos foi definida pelo ensaio por colorimetria com brometo de tiazolil azul de tetrazolio (MTT).

Vinte e cinco microlitros de MTT (5mg/mL) foram adicionados às células e a placa foi incubada a 37°C por três horas para permitir a formação dos cristais de formazan. Após este período, o meio de cultura foi aspirado cuidadosamente e 100 μ L de DMSO foi adicionado para solubilização dos cristais. A placa, então, foi delicadamente agitada e incubada a 37°C novamente, por cinco minutos. Em seguida, procedeu-se a leitura.

Uma vez que o MTT é sensível à luz, a manipulação da placa foi realizada com a luz da cabine de fluxo laminar desligada e a placa foi mantida envolta por papel alumínio.

A absorbância dos poços tratados foi mensurada em leitor de microplacas Multiskan EX (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, EUA) com comprimento de onda de 560nm e 650nm (filtro de referência). Os resultados foram calculados pela fórmula abaixo e expressos em porcentagem:

Viabilidade celular (%) = $A_{560} - A_{650} / AC_{560-650}$, sendo:

A_{560} = Absorbância da luz a 560nm (poço tratado com a droga)

A_{650} = Absorbância da luz a 650nm (poço tratado com a droga)

$AC_{560-650}$ = Absorbância da luz a 560nm (controle) - Absorbância da luz a 650nm (controle)

Todos os valores (A_{560} , A_{650} e $AC_{560-650}$) foram obtidos pela média da triplicata.

4.5. AVALIAÇÃO DOSE-RESPOSTA E CINÉTICA DOS FÁRMACOS *HIT*

Para verificar a citotoxicidade dos fármacos nas células tumorais e não tumorais, ambas foram tratadas com diferentes concentrações dos fármacos *hit* (0,5 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 20 μ M e 50 μ M). Já para verificação da ação do fármaco ao longo do tempo (cinética), as células foram tratadas com os compostos de interesse com concentração de 10 μ M por 0, 24, 48 e 72 horas.

O SCC-25 e o HaCaT foram cultivados com uma concentração de 2.500 células/poço em placa de 96 poços com fundo chato. Vinte e quatro horas depois, as células foram tratadas com os fármacos nas diferentes concentrações acima citadas ou somente com o veículo (DMSO), para controle. Após o tempo de tratamento de interesse, o ensaio de viabilidade celular (MTT) foi realizado conforme item 4.4.

4.6. WESTERN BLOTTING

4.6.1. Recuperação dos lisados proteicos

As placas contendo os experimentos de interesse foram retiradas da incubadora e imediatamente colocadas em gelo para recuperação das proteínas. O procedimento foi realizado utilizando a solução tampão TNT (Tris-NaCl Tween), conforme previamente descrito [Le Guelte *et al.*, 2012]. A solução foi adicionada à placa e, com o

auxílio de um raspador, as células foram lisadas e removidas. Os lisados celulares foram, então, recolhidos, deixados em gelo por 30 minutos e centrifugados à 12.000rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi cuidadosamente colhido e as *pellets* celulares foram descartadas.

4.6.2. Dosagem proteica

A dosagem proteica foi realizada utilizando-se o kit *micro BCA Protein Assay* [Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA] de acordo com as recomendações do fabricante. Esta técnica é baseada no ácido bicinconínico (BCA)[Smith *et al.*, 1985]. Quatro resíduos de aminoácidos [cisteína, cistina, tirosina e triptofano] das proteínas presentes na amostra são capazes de reduzir o cobre de Cu^{+2} para Cu^{+1} em ambiente alcalino e em alta temperatura. O BCA, então, é capaz de ligar-se ao Cu^{+1} , tornando a solução arroxeadada. Esta solução possui absorbância a 562nm e sua intensidade é diretamente proporcional à quantidade proteica. Como padrão, foi utilizada a albumina bovina [Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA].

4.6.3. Eletroforese

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida com NuPage, que já vem pronto para uso. O mesmo foi imerso no tampão de corrida MOPS [ácido 3-(n-morfolino) propanosulfônico] e as proteínas foram inseridas nas caselas. O marcador de massa molecular utilizado foi o PageRuler Plus Prestained Protein Ladder [Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA]. A eletroforese foi realizada utilizando a fonte *Power PAC 200* [Biorad, Hercules, CA, EUA] a 120mA por 45-60 minutos.

4.6.4. Western blotting

As frações proteicas separadas no gel NuPAGE foram transferidas eletroforéticamente para membranas de di-fluoro polivinilideno (PVDF, Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). A transferência foi realizada por 1 hora e 20 minutos e, em seguida, as membranas foram bloqueadas por 40 minutos em solução de 5% de leite desnatado e 0,05% de *tris-buffered saline and tween* (TBST).

4.6.5. Incubação com os anticorpos e leitura

Para detecção das proteínas de interesse, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários *overnight*, sob agitação e a 4°C. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: fosfo-JNK (T183/Y185), fosfo-EGFR Y1068, fosfo-AKT (S473), fosfo-p38 (T180/Y182), fosfo-ERK1/2 (T202/T204), fosfo-ATM (S1981), fosfo-ATR (S428), fosfo-H2AX (S139), fosfo-CHK2 (T68), fosfo-BRCA1 (S1524), ERK1/2, JNK1/2, ERK2, CHK2 (Cell Signaling, Ozyme, Montigny-Le-Bretonneux, França). Os mesmos foram diluídos em solução de 5% de leite desnatado e 0,05% de TBST. No dia seguinte, as membranas sofreram três lavagens de 15 minutos com TBST e incubadas com o anticorpo secundário específico, anti-rato ou anti-coelho conjugado com AlexaFluor 680 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), com concentração de 1:5.000, por uma hora, protegidas da luz e sob agitação. Por fim, as membranas foram escaneadas diretamente em um leitor infra-vermelho (Odyssey, Li-Cor, Lincoln, NE, EUA).

4.7. ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR

O impacto dos fármacos nas atividades migratórias celulares do SCC-25 e HaCaT foi avaliado através de ensaio de migração celular por cicatrização. Após o plaqueamento das células e confluência de aproximadamente 90%, uma lesão na monocamada com a ponta da pipeta de 200µL foi provocada. Em seguida, as células foram

gentilmente lavadas com PBS e o meio de cultura foi trocado. As células foram incubadas com os fármacos, em concentração de 10 μ M, por 24 horas para permitir que as células migrassem pela fenda formada. As amostras, fixas, foram fotografadas e a distância relativa, caracterizada pela relação entre a posição inicial e final das células foi calculada com o software Image J e expressas em porcentagem.

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados apresentados representam a média de, no mínimo, três experimentos independentes e os mesmos estão acompanhados dos desvios-padrão (DP). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e, no mínimo, três vezes. A análise estatística foi realizada com o auxílio do software SPSS 21.0.0.0 (IBM, New York, USA). Para comparação entre os grupos foi utilizado o teste *t* de Student. Os níveis de significância indicados nas figuras foram os seguintes: * $P < 0,1$, ** $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$.

5 RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. TRIAGEM DE FÁRMACOS BASEADA NA VIABILIDADE CELULAR

Para a identificação de possíveis agentes terapêuticos contra o câncer de boca, foi realizada uma triagem de fármacos. Nós utilizamos a biblioteca de compostos químicos da Prestwick, que contém 1.280 moléculas aprovadas pela *Food and Drug Administration* e pela *European Medicines Agency*.

Assim, o primeiro passo foi o tratamento das células SCC-25 com todos os 1.280 fármacos e verificação da sua viabilidade celular após 72 horas de tratamento. Cem delas foram capazes de reduzir em, no mínimo, 70% da viabilidade celular das células neoplásicas e foram preliminarmente consideradas fármacos *hit*.

Em seguida, procedeu-se um segundo escaneamento somente com os 100 fármacos selecionados, novamente com o SCC-25, para validação dos resultados; e com o HaCaT, utilizado como tecido não tumoral. No caso do HaCaT, os fármacos que provocaram a morte de mais de 30% das células foram excluídos por serem considerados tóxicos. Dos 100 princípios ativos estudados, 9 satisfizeram estes critérios.

Portanto, dos 1.280 compostos químicos investigados, 1.180 não apresentaram ação contra o SCC-25; 77 foram tóxicos ao HaCaT; 14 fármacos não foram validados no segundo escaneamento e 9 compostos foram considerados fármacos *hit* [Gráfico 1].

O Gráfico 2 mostra os efeitos dos fármacos *hit* sobre as linhagens celulares estudadas e a Tabela 4 lista os princípios ativos e suas reconhecidas funções terapêuticas de acordo com a biblioteca fornecida pela Prestwick. Entre os 9 princípios ativos identificados, nós selecionamos três para aprofundar os nossos estudos: luteolin, metixene hydrochloride e nitazoxanide.

Gráfico 1 – Resultado da triagem dos fármacos baseada na viabilidade celular. Dos 1.280 compostos, 1.180 não foram efetivos contra o SCC-25, 77 eram tóxicos ao HaCaT, 14 não foram validados e 9 compostos foram selecionados como fármacos *hit*.

Gráfico 2 – Viabilidade celular do SCC-25 e do HaCaT após a incubação com 10µM de cada fármaco *hit* por 72 horas. Como controle, somente o veículo para os compostos, o dimetil sulfoxido (DMSO), foi adicionado na mesma concentração dos fármacos. As porcentagens de viabilidade celular estão representadas pela média das triplicatas + desvio-padrão de, pelo menos, três experimentos independentes. Teste t de Student: *P<0,1, **P<0,05 e ***P<0,001.

Tabela 4 – Propriedades dos fármacos *hit* selecionados para o presente estudo.

N	Número Prestwick	Composto químico	Fórmula química	Peso molecular*	Classe terapêutica	Efeito terapêutico
1	Prestw-516	Lovastatin	C ₂₄ H ₃₆ O ₅	404,6	Metabolismo	Hipocolesterolêmico
2	Prestw-870	Luteolin	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286,2	Respiratório	Expectorante
3	Prestw-491	Metixene hydrochloride	C ₂₀ H ₂₄ ClNS	345,9	Sistema nervoso central	Antiparkinsoniano
4	Prestw-1733	Nitazoxanide	C ₁₂ H ₉ N ₃ O ₅ S	307,3	Infectologia	Antiprotozoário
5	Prestw-476	Primaquine diphosphate	C ₁₅ H ₁₂ N ₃ O ₈ P ₂	455,3	Infectologia	Antimalárico
6	Prestw-862	Raloxifene hydrochloride	C ₂₈ H ₂₈ ClNO ₄ S	510,1	Endocrinologia	–
7	Prestw-1342	Sildenafil	C ₂₂ H ₃₀ N ₆ O ₄ S	474,6	Cardiovascular	Anti-hipertensivo
8	Prestw-865	Simvastatin	C ₂₅ H ₃₈ O ₅	418,6	Cardiovascular	Antilipêmico
9	Prestw-1356	Vardenafil	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S	488,6	Cardiovascular	Tratamento da disfunção erétil

Informações originadas da Prestwick.

* em g/mol

5.2. CITOTOXICIDADE DOS FÁRMACOS *HIT* NO CÂNCER DE BOCA

A citotoxicidade de fármacos *hit* foi analisada por meio dos ensaios de dose-resposta e tempo-resposta. A viabilidade celular do SCC-25 e do HaCaT foi medida 72 horas após o tratamento de ambas com a luteolin, metixene hydrochloride ou nitazoxanide nas concentrações de 0,5µM, 1µM, 5µM, 10µM, 20µM ou 50µM (Figuras 3A, 3B e 3C, gráficos do centro). As suas respectivas fórmulas químicas podem ser visualizadas na Figuras 3A, 3B e 3C, à esquerda. As células viáveis totalizaram 29%, 30% e 45% para o SCC-25 e 88%, 90% e 106% para o HaCaT com a concentração de 10µM de luteolin, metixene hydrochloride e nitazoxanide, respectivamente. Concentrações inferiores a 10µM

mostraram menor efetividade contra o SCC-25 e superiores a 10 μ M, maior toxicidade ao HaCaT. Desta forma, a concentração final de 10 μ M foi selecionada para a realização do ensaio de tempo-resposta.

As taxas de sobrevivência do SCC-25 e do HaCaT foram analisadas após o tratamento das células com 10 μ M de cada fármaco *hit* pelos períodos de 6, 24, 48 ou 72 horas [Figura 3, gráficos à direita]. Luteolin já exibiu uma diminuição da viabilidade celular [75%] apenas 24 horas após a administração do princípio ativo, atingindo a marca de 47% de células mortas em 72 horas. Além disso, luteolin apresentou apenas leve toxicidade contra o HaCaT, inibindo seu crescimento em 106% em 72 horas de tratamento.

Vinte e quatro horas após a adição do metixene hydrochloride, a viabilidade celular do SCC-25 decaiu de forma dose-dependente aproximando-se dos 13% de células viáveis com 72 horas de ação do fármaco. O HaCaT apresentou uma toxicidade relativamente baixa [81%] em 72 horas de tratamento.

A nitazoxanide também induziu a morte das células malignas [35% de células viáveis em 72 horas] e baixa toxicidade contra as células não malignas [95% de células viáveis em 72 horas].

Uma vez que os fármacos *hit* exibiram ação anti-tumoral na linhagem de câncer de boca e atividade relativamente baixa contra o HaCaT, levantamos a hipótese de que a combinação dos mesmos poderia amplificar seus efeitos no SCC-25 sem induzir a uma toxicidade demasiada no HaCaT e foram realizados os testes a seguir.

Figura 3 - Citotoxicidade dos fármacos *hit* no câncer de boca. a) Luteolin, b) Metixene hydrochloride e c) Nitazoxanide exibiram efeito inibitório proporcional ao tempo de ação e dose administrada contra o SCC-25 mas não contra o HaCaT. As fórmulas químicas dos referidos princípios ativos encontram-se no lado esquerdo do painel de figuras. Para o ensaio dose-resposta [gráficos do meio], SCC-25 ou HaCaT foram incubados com as doses indicadas de cada fármaco por 72 horas e a viabilidade celular foi checada por MTT. Para o ensaio tempo-resposta [gráficos à direita], SCC-25 ou HaCaT foram tratados com cada composto *hit* pelos tempos indicados e a viabilidade celular foi analisada [MTT]. Como controle, somente o veículo para os compostos, o dimetil sulfóxido [DMSO], foi adicionado na mesma concentração dos fármacos. As porcentagens de viabilidade celular estão representadas pela média das triplicatas + desvio-padrão de, pelo menos, três experimentos independentes. Teste t de Student: *P<0,1, **P<0,05 e ***P<0,001.

5.3. ASSOCIAÇÃO DOS FÁRMACOS *HIT* ENTRE SI

Para verificar os efeitos da associação dos fármacos *hit* entre si nas células SCC-25 e HaCaT, 10 μ M de cada princípio ativo foi adicionado às células individualmente, aos pares ou em trio. A viabilidade celular do SCC-25, verificada 72 horas depois, demonstrou que todas as combinações aprimoraram os efeitos anti-tumorais de forma importante (Tabela 5 e Gráfico 3).

Notável foi observar que a combinação “luteolin + metixene hydrochloride” (29% de células viáveis) não só foi capaz de destruir maior quantidade de células tumorais do que os compostos individualmente (44% e 50% de células viáveis para a luteolin e metixene hydrochloride, respectivamente) como também sua toxicidade contra o HaCaT foi baixa (106%, 78%, 87% para combinação, luteolin e metixene hydrochloride, respectivamente; Tabela 5 e Gráfico 3).

O mesmo ocorreu com a combinação “metixene hydrochloride e nitazoxanide”, que exibiu apenas 37% de células SCC-25 vivas após o tratamento com a combinação e 50% e 68% de células viáveis após o tratamento com a metixene hydrochloride e a nitazoxanide individual e respectivamente. As células HaCaT pouco foram afetadas pelos fármacos individualmente (metixene hydrochloride, 87% e nitazoxanide, 80%) porém sua combinação aumentou a toxicidade (60%).

As combinações da luteolin + nitazoxanide com ou sem o metixene hydrochloride, entretanto, resultaram em citotoxicidade importante contra as células HaCaT (31% e 56% de células viáveis, respectivamente) embora tenham aumentado os efeitos anti-neoplásicos contra as células SCC-25 (26% e 43% de células viáveis, respectivamente; Tabela 5 e Gráfico 3).

Assim, na expectativa constatar diminuição da toxicidade das duas últimas combinações acima citadas nas células HaCaT, realizamos o mesmo experimento porém com concentração de 5 μ M de todos os fármacos *hit* (Tabela 6 e Gráfico 4). Embora houvesse significativa diminuição dos efeitos dos fármacos contra o HaCaT em todas as opções, estas combinações também resultaram em um impacto negativo das suas ações contra as células SCC-25.

Tabela 5 – Opções combinatórias entre os fármacos *hit* para o tratamento do câncer de boca. SCC-25 e HaCaT foram tratados com concentração de 10 μ M de cada fármaco ou combinados, conforme indicado por 72 horas, e sua viabilidade celular foi verificada por MTT. As porcentagens de viabilidade celular estão representadas pela média das triplicatas.

Combinação (10 μ M)	HaCaT (%)	SCC-25 (%)
L	78	44
M	87	50
N	80	68
L + M	106	29
L + N	56	43
M + N	60	37
L + M + N	31	26

L: Luteolin, M: Metixene hydrochloride, N: Nitazoxanide.

Gráfico 3 – Opções combinatórias entre os fármacos *hit* para o tratamento do câncer de boca. SCC-25 e HaCaT foram tratados com concentração de 10 μ M de cada fármaco ou combinados, conforme gráfico, por 72 horas e sua viabilidade celular foi verificada por MTT. Como controle, somente o veículo para os compostos, o dimetil sulfoxido (DMSO), foi adicionado na mesma concentração dos fármacos. As porcentagens de viabilidade celular estão representadas pela média das triplicatas + desvio-padrão de, pelo menos, três experimentos independentes. Teste t de Student: *P<0,1, **P<0,05 e ***P<0,001.

Tabela 6 – Opções combinatórias entre os fármacos *hit* para o tratamento do câncer de boca. SCC-25 e HaCaT foram tratados com concentração de 5 μ M de cada fármaco ou combinados, conforme indicado por 72 horas, e sua viabilidade celular foi verificada por MTT. As porcentagens de viabilidade celular estão representadas pela média das triplicatas.

Combinação (5 μ M)	HaCaT (%)	SCC-25 (%)
L	99	85
M	74	66
N	94	104
L + M	103	84
L + N	94	62
M + N	82	58
L + M + N	76	55

L: Luteolin, M: Metixene hydrochloride, N: Nitazoxanide.

Gráfico 4 – Opções combinatórias entre os fármacos *hit* para o tratamento do câncer de boca. SCC-25 e HaCaT foram tratados com concentração de 5 μ M de cada fármaco ou combinados, conforme gráfico, por 72 horas e sua viabilidade celular foi verificada por MTT. Como controle, somente o veículo para os compostos, o dimetil sulfoxido (DMSO), foi adicionado na mesma concentração dos fármacos. As porcentagens de viabilidade celular estão representadas pela média das triplicatas + desvio-padrão de, pelo menos, três experimentos independentes. Teste t de Student: *P<0,1, **P<0,05 e ***P<0,001.

5.4. ASSOCIAÇÃO DOS FÁRMACOS *HIT* COM OUTROS QUIMIOTERÁPICOS

A associação da luteolin, metixene hydrochloride e nitazoxanide com dois quimioterápicos largamente utilizados no tratamento de câncer de cabeça e pescoço foi verificada na linhagem SCC-25. O AG1478 é um inibidor do receptor do fator de crescimento dos queratinócitos (EGFR) e a cisplatina liga-se ao DNA da célula, inibindo sua transcrição e replicação, levando-a à apoptose.

A Tabela 7 e o Gráfico 5 demonstram que o AG1478 foi capaz de incrementar a atividade de todos os fármacos *hit* contra o SCC-25. Ao associar o AG1478 aos mesmos, a viabilidade celular das células neoplásicas diminuiu mais 15%, 24% e 24% em comparação com a luteolin, metixene hydrochloride e nitazoxanide adicionadas isolada e respectivamente.

Um achado surpreendente foi o de que a luteolin (44% de células viáveis) e o metixene hydrochloride (50% de células viáveis) apresentaram maior citotoxicidade contra o SCC-25 do que a cisplatina (73% de células viáveis) na dosagem de 10 μ M e a nitazoxanide teve efeitos bem semelhantes (74% de células viáveis; Tabela 7 e Gráfico 5).

Já a cisplatina na concentração de 5 μ M pouco alterou a resposta dos princípios ativos selecionados e, no caso na luteolin, apresentou resultados menos satisfatórios do que o fármaco estudado isoladamente (Tabela 7 e Gráfico 5).

A associação da cisplatina na concentração de 10 μ M impactou de forma tímida a viabilidade celular do SCC-25 em comparação com os fármacos isoladamente (Tabela 7 e Gráfico 5).

5.5. IMPACTO DOS FÁRMACOS *HIT* NAS PROPRIEDADES MIGRATÓRIAS DO SCC-25

O impacto da luteolin, metixene hydrochloride e nitazoxanide na atividade migratória do SCC-25 e do HaCaT foi verificada pelo ensaio de migração celular (Figura 4). Luteolin e nitazoxanide exibiram efeito inibitório sobre o fechamento da fenda no SCC-25 mas não no HaCaT. Por outro lado, o metixene hydrochloride não prejudicou a migração de nenhuma linhagem celular (Figura 4).

Tabela 7 – Opções combinatórias dos fármacos *hit* com outros agentes quimioterápicos para o tratamento do câncer de boca. SCC-25 foi tratado com concentração de 5 μ M ou 10 μ M de cada fármaco ou combinados, conforme indicado, por 72 horas e sua viabilidade celular foi verificada por MTT. As porcentagens de viabilidade celular estão representadas pela média das triplicatas.

	VEÍCULO	AG1478 (10 μ M)	CISPLATINA (5 μ M)	CISPLATINA (10 μ M)
VEÍCULO	100	56	78	73
LUTEOLIN	44	29	48	40
METIXENE HYDROCHLORIDE	50	26	42	34
NITAZOXANIDE	74	50	73	63

L: Luteolin, M: Metixene hydrochloride, N: Nitazoxanide.

Gráfico 5 – Combinação dos fármacos *hit* com quimioterápicos já utilizados contra o SCC-25. Luteolin, metixene hydrochloride e nitazoxanide foram individualmente combinadas com AG1478 10 μ M, cisplatina 5 μ M [CP5] ou cisplatina 10 μ M [CP10]. Como controle, somente o veículo para os compostos, o dimetil sulfóxido (DMSO), foi adicionado na mesma concentração dos fármacos. Como controle, somente o veículo para os compostos, o dimetil sulfóxido (DMSO), foi adicionado na mesma concentração dos fármacos. As porcentagens de viabilidade celular estão representadas pela média das triplicatas + desvio-padrão de, pelo menos, três experimentos independentes. Teste t de Student: *P<0,1, **P<0,05 e ***P<0,001.

Figura 4 – O impacto da a) *luteolin*, b) *metixene hydrochloride* e c) *nitazoxanide* nas propriedades do SCC-25 foi verificado pelo ensaio de migração celular. SCC-25 e HaCaT foram cultivados até atingir 90% de confluência e uma fenda foi feita com uma ponteira de 200 μ L. As células foram lavadas gentilmente com PBS e tratadas com 10 μ M de cada fármaco *hit*. Fotos foram tiradas nas mesmas áreas 0 e 24 horas após o tratamento e a atividade migratória foi expressa em aumento de vezes em relação ao controle. Como controle, somente o veículo para os compostos, o dimetil sulfóxido (DMSO), foi adicionado na mesma concentração dos fármacos. As porcentagens de viabilidade celular estão representadas pela média das triplicatas + desvio-padrão de, pelo menos, três experimentos independentes. Teste t de Student: **P<0,05 e ns: não significante.

5.6. MECANISMO DE AÇÃO DA LUTEOLIN CONTRA O CÂNCER DE BOCA

Buscando contribuir para o conhecimento dos mecanismos envolvidos nas ações anti-tumorais dos nossos fármacos *hit* no câncer de boca, nós investigamos as expressões do p-JNK, p-EGFR e p-ERK2 nas células SCC-25 após o tratamento com luteolin, metixene hydrochloride ou nitazoxanide, por 30 minutos e concentração de 10 μ M. Somente a luteolin exibiu um aumento dos níveis protéicos de p-JNK em relação ao controle (Figura 5A) e aprofundamos nossas investigações com este princípio ativo.

Uma vez que o JNK é integrante da via *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), as expressões dos seus componentes principais, ou seja, do Akt, p38, ERK1 e ERK2, também foram analisadas nas células tumorais tratadas com a luteolin (Figura 5B). Entretanto, não houve diferença entre as células controle e que estavam sob o efeito do fármaco.

Em seguida, levantamos a hipótese de a luteolin induzir a morte das células do câncer de boca por meio de ativação da via de dano ao DNA. Embora não tenhamos encontrado alterações nos níveis de p-ATR, observou-se um aumento marcante da expressão protéica do p-ATM nas células tratadas com a luteolin em comparação ao controle (Figura 5C). Então, foram checados os níveis das proteínas *downstream* desta via, p-Chk2 e p-H2AX, e ambas apresentaram-se com aumento de expressão.

Como houve um incremento dos níveis de Chk2 após o tratamento com a luteolin, nos perguntamos se a combinação do referido fármaco com o AZ7762 (um inibidor do Chk2) potencializaria os efeitos anti-tumorais da luteolin contra o SCC-25 e, de fato, a associação dos dois fármacos aumentou a fosforilação do ATM, Chk2, H2AX, BRCA1 e até do ATR em comparação ao controle ou aos fármacos isoladamente (Figura 5D). É interessante observar que o tratamento das células com AZD7762 não foi capaz de alterar os níveis de nenhuma proteína estudada. Ainda, a combinação da luteolin com o AZD7762 aumentou em 17% e 65% a efetividade em destruir as células malignas em comparação à luteolin e ao AZD7762, respectivamente (Figura 5E).

Figura 5 – Western-blots contra os anticorpos acima descritos foram realizados nas células SCC-25 tratadas, por 30 minutos, com [a] 10 μ M de luteolin, 10 μ M de metixene hydrochloride ou 10 μ M de nitazoxanide, [b] e [c] 10 μ M de luteolin e [d] 10 μ M de luteolin, 100nM AZD7767 ou a combinação de ambos. [e] A viabilidade celular do SCC-25 foi verificada por MTT após a adição de 10 μ M de luteolin, 100nM AZD7767 ou a combinação de ambos. Como controle, somente o veículo para os compostos, o dimetil sulfóxido (DMSO), foi adicionado na mesma concentração dos fármacos. As porcentagens de viabilidade celular estão representadas pela média das triplicatas + desvio-padrão de, pelo menos, três experimentos independentes. Teste t de Student: *P<0,1, **P<0,05 e ***P<0,001.

6 DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho, nós identificamos 9 fármacos previamente aprovados pela *Food and drug administration* (FDA) e pela *European Medicines Agency* (EMA) capazes de diminuir a viabilidade celular do câncer de boca *in vitro* [Gráfico 2]. Destes, 3 foram selecionados para estudos adicionais: luteolin (L), metixene hydrochloride (M) e nitazoxanide (N).

Luteolin, metixene hydrochloride e nitazoxanide exibiram toxicidade contra o SCC-25 diretamente proporcional à dose e ao tempo de ação dos fármacos (Figura 3A, 3B e 3C). Outras investigações com a luteolin em linhagens celulares de câncer de cabeça e pescoço [O'prey *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2008; Amin *et al.*, 2010; Verschooten *et al.*, 2012; Majumdar *et al.*, 2014] obtiveram resultados semelhantes. Amin *et al.* (2010) demonstraram que o tratamento de uma linhagem de câncer de hipofaringe (Tu212) com uma dose de 10 μ M de luteolin por 72 horas foi suficiente para diminuir a viabilidade celular a valores inferiores a 10% e Majumdar *et al.* (2014) encontraram uma IC₅₀ de 6,96 μ M para esta mesma linhagem, sendo estes valores similares aos nossos 29% de células SCC-25 viáveis após o tratamento com 10 μ M de luteolin (Figura 3A). Por outro lado, as linhagens celulares de câncer de cabeça e pescoço estudadas por O'prey *et al.* (2003), Yang *et al.* (2008) e Verschooten *et al.* (2012) demandaram pelo menos 20 μ M para eliminar 50% das células tumorais. Para a nitazoxanide, duas investigações [Sidler *et al.*, 2012; Brockmann *et al.*, 2014] obtiveram de 20 a 30% de células de câncer colorretal viáveis após o tratamento com 10 μ M de nitazoxanide, corroborando os nossos 35% de células SCC-25 viáveis tratadas com as mesmas condições (Figura 3C). Entretanto, dois outros autores [Muller *et al.*, 2008; Senkowski *et al.*, 2015] reportaram que a concentração de 10 μ M de nitazoxanide foi suficiente para matar somente 20% das células de câncer colorretal *in vitro* e obtiveram bons resultados com concentrações

maiores do composto. Dos dados acima expostos, nós podemos concluir que estas diferenças entre as doses tóxicas dos fármacos *hit* para destruir as células tumorais parecem refletir as particularidades de cada linhagem celular além da variabilidade da metodologia empregada para aferição da viabilidade celular. Entretanto, o que é consenso entre todos os estudos, incluindo o nosso, é o poder anti-tumoral da luteolin e da nitazoxanide contra o câncer de boca e de outras localizações anatômicas *in vitro*.

Fato interessante por nós observado foi que luteolin, metixene hydrochloride e nitazoxanide apresentaram uma baixa toxicidade contra as células HaCaT (Figuras 3A, 3B e 3C), que foi utilizada como um tecido não-tumoral para comparação. Somente concentrações acima de 20 μ M para a luteolin e metixene hydrochloride e 50 μ M para nitazoxanide foram capazes de induzir morte significativa das células HaCaT. Similarmente, O'Prey *et al.* (2003) encontraram uma IC₅₀ de 18 μ M de luteolin para cultura celular primária de células do epitélio bucal normal. Apesar das células HaCaT serem uma linhagem imortalizada com algumas mutações também encontradas em células malignas (Boukamp *et al.*, 1988), nossos resultados somados aos de O'Prey *et al.* reforçam a nossa constatação de que a luteolin apresenta baixa toxicidade contra tecido não-tumoral. Além disso, a luteolin tem sido apontada como um agente quimiopreventivo para o desenvolvimento de câncer (Lin *et al.*, 2008) e também diminui a nefrotoxicidade da cisplatina ao suprimir a apoptose dependente do p53 no rim (Kang *et al.*, 2011). Para a nitazoxanide, além de nós demonstrarmos que este fármaco apresenta baixa efetividade contra as células HaCaT (Figura 3C), outro trabalho também observou sua baixa toxicidade contra uma linhagem celular de fibroblastos do prepúcio (Muller *et al.*, 2008). Além disso, já foi comprovado que este princípio ativo apresenta uma baixa toxicidade a tecidos normais uma vez que já é utilizado como agente anti-parasitário com efeitos colaterais brandos tais como náusea (White, 2004) e diarreia (Cohen, 2005) em altas concentrações.

Estimulados pelos nossos resultados promissores com os fármacos *hit* identificados neste estudo, levantamos a hipótese de que a combinação entre os mesmos resultaria em um sinergismo de seus efeitos nas células SCC-25. De fato, as combinações

de 10 μ M de L+M e M+N resultaram em diminuição do número de células SCC-25 viáveis em comparação ao controle e ao tratamento com os princípios ativos individualmente [Gráfico 3 e Tabela 5] enquanto, curiosamente, as células HaCaT exibiram baixa toxicidade quando comparadas com os tratamentos com os fármacos individualmente [Gráfico 3 e Tabela 5]. Sendo estes resultados inéditos, não há parâmetros para comparação com outros trabalhos porém indicam um sinergismo entre a luteolin e o metixene hydrochloride e entre o metixene hydrochloride e a nitazoxanide e colocam estas combinações como possíveis candidatos para investigações adicionais futuras. Por outro lado, embora as associações L+N e L+M+N aumentaram a toxicidade contra as células SCC-25 [Gráfico 3 e Tabela 5], o mesmo aconteceu com as células HaCaT [Gráfico 3 e Tabela 5] quando comparados aos tratamentos com os fármacos, individualmente. Assim, estas últimas opções combinatórias não parecem promissoras devido à alta toxicidade às células HaCaT.

O nosso próximo passo foi verificar o impacto na sobrevivência do SCC-25 da associação entre os fármacos *hit* identificados neste estudo com outros quimioterápicos utilizados como adjuvantes no tratamento do câncer de boca. Nós selecionamos a cisplatina e o AG1478 (um inibidor do EGFR) pois estes fármacos apresentam comprovada associação com melhora do prognóstico do CEC de cabeça e pescoço além de serem rotineiramente utilizados no manejo da doença [Levy *et al.*, 2015; Strom *et al.*, 2015]. Um achado surpreendente do nosso trabalho foi que a luteolin e o metixene hydrochloride apresentaram-se mais eficazes no combate às células SCC-25 do que a cisplatina ou o AG1478 individualmente e com uma dose de 10 μ M [Gráfico 5 e Tabela 7]. Este fato foi corroborado por outros dois trabalhos investigando as ações da luteolin *versus* cisplatina no câncer de pâncreas [Johnson e Gonzalez De Mejia, 2013], fígado e colorretal [Shi *et al.*, 2007] porém não confirmado em outro estudo com câncer colorretal [Chian, Li, *et al.*, 2014]. Embora não haja trabalhos publicados comparando as ações anti-tumorais da luteolin com a do AG1478, há investigações confrontando a luteolin com outros inibidores do EGFR utilizados para tratar outros tipos de câncer. Markaverich *et al.* [2010] e Sakurai *et al.* [2014] também encontraram um índice apoptótico maior para a

luteolin isoladamente do que para o gefitinib no tratamento do câncer de próstata *in vitro* [Markaverich *et al.*, 2010; Sakurai *et al.*, 2014] enquanto Menendez *et al.* (2008) demonstraram que o lapatinib e a luteolin foram similarmente efetivas contra câncer de mama *in vitro*. Os dados acima apontam que a luteolin é uma opção promissora no tratamento de diferentes tipos de câncer uma vez que ela parece exercer efeitos anti-tumorais mais expressivos e apresentar menor toxicidade às células não neoplásicas [Gráfico 5 e Tabela 7] do que a cisplatina. Quanto aos inibidores do EGFR, ainda são necessários estudos adicionais para definir a melhor opção no tratamento do câncer de boca, porém, mais uma vez, a baixa toxicidade ao HaCaT apresentada pela luteolin comparada com o AG1478 [Gráfico 5 e Tabela 7] mais uma vez demonstra o potencial terapêutico e específico deste fármaco.

Sobre a combinação dos fármacos *hit* do presente estudo com a cisplatina ou AG1478 para o tratamento do CEC de boca, nós encontramos uma melhora dos efeitos ao associar 10 μ M de AG1478 ou 10 μ M de cisplatina com a luteolin, metixene hydrochloride e nitazoxanide [Gráfico 5 e Tabela 7]. A adição de 5 μ M de cisplatina não aumentou a citotoxicidade dos fármacos *hit* [Gráfico 5 e Tabela 7]. Estudos prévios confirmaram o sinergismo entre a cisplatina e a luteolin em câncer de fígado [Shi *et al.*, 2007], colorretal [Shi *et al.*, 2007; Chian, Li, *et al.*, 2014], gástrico [Wu *et al.*, 2008], pancreático [Johnson e Gonzalez De Mejia, 2013] e de pulmão [Chian, Thapa, *et al.*, 2014; Hong *et al.*, 2014]. Estas investigações, de fato, demonstraram que a luteolin amplifica os efeitos da cisplatina, que é utilizada como referência. Contudo, a luteolin isoladamente tem apresentado resultados muito semelhantes ou até superiores aos da cisplatina além de induzir uma toxicidade muito menor aos tecidos não neoplásicos. Mais uma vez, os resultados sugerem superioridade da luteolin em relação à cisplatina no tratamento contra diversos tipos de câncer *in vitro*. Prosseguindo, dois estudos encontraram melhores efeitos associando inibidores do EGFR com a luteolin em câncer de pulmão [Hong *et al.*, 2014] e próstata [Sakurai *et al.*, 2014] ao passo que outros dois trabalhos não observaram esta otimização em câncer de mama [Menendez *et al.*, 2008] e próstata [Markaverich *et al.*, 2010]. No câncer de boca, os nossos resultados demonstraram um

forte sinergismo entre os fármacos (Gráfico 5 e Tabela 7), sugerindo que a combinação de ambos pode ser uma opção interessante para o tratamento deste tipo de neoplasia. Para a nitazoxanide, há somente um trabalho que confirma o sinergismo entre este fármaco e a cisplatina no tratamento do câncer colorretal *in vitro* (Sidler *et al.*, 2012), corroborando os nossos resultados. Concluindo, as combinações da luteolin, metixene hydrochloride e nitazoxanide com o AG1478 e do metixene hydrochloride e da nitazoxanide com a cisplatina exibiram uma potencialização do efeito anti-tumoral (Gráfico 5 e Tabela 7) dos fármacos ao compararmos com os efeitos dos compostos individualmente e, caso validados, também indicam opções terapêuticas para o CEC de boca. Em tempo, um dos grandes obstáculos no tratamento quimioterápico de diversos tipos de câncer é o aparecimento de células resistentes ao medicamento durante o período de administração do mesmo, ocasionando recidivas do tumor. Curiosamente, Chian *et al.* (2014) demonstraram que a luteolin é capaz de sensibilizar células de câncer colorretal resistentes ao tratamento com a oxaliplatina *in vitro* e Hong *et al.* (2014) também observaram sensibilização de células de câncer pulmão resistentes ao tratamento com o erlotinib (um inibidor do EGFR) pela luteolin. Estes resultados surpreendentes apontam que podemos estar diante de combinações farmacológicas que poderão tratar tipos de cânceres antes intratáveis.

A metástase é um evento maligno chave com forte impacto negativo no prognóstico do câncer de boca (Kohler e Kowalski, 2012). Este processo é dependente de numerosos fatores e entre eles está a habilidade migratória das células neoplásicas. Neste estudo, nós demonstramos que a luteolin e a nitazoxanide inibiram a atividade migratória do SCC-25 (Figura 4A e 4C) e pouco afetaram a do HaCaT (Figura 4A e 4C) enquanto o metixene hydrochloride pouco afetou o potencial de movimentação de ambas linhagens (Figura 4B). Este é um fato interessante e pouco reportado. Zhao *et al.* (2011) e Wang *et al.* (2012) observaram diminuição da migração de células de câncer de pulmão e próstata tratadas com a luteolin (Zhao *et al.*, 2011; Wang, L. *et al.*, 2012). Estes dados mostram que, além de apresentarem citotoxicidade contra as células SCC-25, a luteolin e a nitazoxanide ainda são capazes de reduzir a atividade migratórias destas células, sendo

possível aventar a hipótese de que estes fármacos podem auxiliar a prevenir o processo de metástase. Outros indícios deste poder incluem o aumento da expressão de genes responsáveis pela adesão celular em células de câncer de próstata, como a claudin-1, submetidas à ação da luteolin (Wang, L. *et al.*, 2012), diminuição da expressão das MMP-2 e -9 em câncer colorretal (Kim *et al.*, 2013) além do efeito anti-angiogênico já comprovado que este fármaco exerce em câncer de próstata *in vitro* e *in vivo* (Pratheeshkumar *et al.*, 2012).

Para melhor compreender os mecanismos fundamentais acerca da atividade anti-tumoral dos fármacos *hit* aqui identificados, foi investigado o impacto do tratamento das células SCC-25 com os mesmos em vias moleculares importantes para a progressão tumoral. Nós observamos que o tratamento com a luteolin por um curto período (30 minutos) ativou a JNK (Figura 5B) enquanto O'Prey *et al.* (2003), não observaram fosforilação do JNK até tratar as células de câncer de boca com 4 vezes a IC₅₀ (72μM) com luteolin e por um período mais longo (18 horas). Por outro lado, nós não observamos fosforilação do p38 (Figura 5B) e O'Prey *et al.* relataram ativação desta proteína nos períodos anteriormente indicados. Do exposto, é possível conjecturar que a ativação do JNK seja importante nos estágios iniciais da toxicidade desencadeada pela luteolin e que esta molécula induza a apoptose via p38 (Cai *et al.*, 2011), sendo o p38 expresso, portanto, em um período mais tardio. Além disso, foi demonstrado que a JNK fosforilada estabiliza a proteína p53, reduzindo sua ubiquitinação e consequente degradação (Seelinger *et al.*, 2008). Como o gene p53 apresenta mutação nas células tumorais porém não nas normais, nós podemos sugerir que este efeito citoprotetor sobre o p53 induzido pela luteolin só é efetivo nas células não tumorais, que apresentam a proteína adequadamente produzida. Este fato poderia explicar a alta eficácia da luteolin contra as células tumorais mas não contra as normais.

Por fim, este é o primeiro trabalho a reportar que a luteolin ativa a via do dano do DNA em CEC de boca *in vitro*. O tratamento das células SCC-25 com 10μM de luteolin por 30 minutos ativou a ATM e suas proteínas *downstream*, pH2AX e Chk2 (Figura 5C). Este primeiro resultado indicou que a luteolin é capaz de induzir um dano nas duas fitas do DNA

[DSB], causando a interrupção do ciclo celular via Chk2. Entretanto, como a proteína p53 apresenta mutação no SCC-25, levantamos a hipótese de que a célula, diante da impossibilidade de ser reparada, entra em processo apoptótico, resultando na diminuição da viabilidade celular, conforme demonstrado neste trabalho (Figura 3A). Em seguida, nós verificamos se inibir o Chk2 através do tratamento das células SCC-25 com baixa dose de AZD7762 resultaria em uma potencialização do efeito da luteolin uma vez que a supressão desta proteína *checkpoint* leva à uma catástrofe mitótica, incrementando a morte das células tumorais em comparação às células normais [Zabludoff *et al.*, 2008]. Conforme esperado, a combinação da luteolin com o AZD7762 aumentou a fosforilação do ATM, Chk2, BRCA-1, H2AX e até do ATR, não superexpresso pelo tratamento individual com a luteolin (Figura 5D). Além disso, a combinação foi capaz de diminuir a quantidade de células viáveis em relação ao controle e aos fármacos isoladamente (Figura 5E). O tratamento somente com o AZD7762 não foi capaz de promover nenhuma alteração nos níveis proteicos de nenhuma molécula estudada (Figura 5D). Estes dados demonstram que a perda da checagem do ciclo celular pelo Chk2 potencializou o dano ao DNA, induzindo, portanto, o aumento da fosforilação das moléculas desta via e à maior quantidade de apoptose. É interessante notar que o ATR, agora com níveis proteicos aumentados, pode ter sido ativado diante do dano celular mais severo do que anteriormente, diretamente pelo ATM ou, ainda, pela inibição do Chk1, também promovida pelo AZD7762. Todos estes resultados, em conjunto, nos permitem sugerir que a luteolin causa um DSB das células tumorais, ativando o Chk2 e, conseqüentemente, ocasionando a interrupção do ciclo celular. Sendo as células tumorais geneticamente alteradas, seus arsenais para reparo do DNA são limitados e as mesmas acabam sofrendo apoptose.

Todos os achados em relação ao metixene hydrochloride aqui demonstrados são resultados não antes reportados. Inclusive, obter informações acerca deste fármaco foi um processo árduo e pouco produtivo pois o metixene hydrochloride não é mais comercializado há décadas e não há publicações referentes aos mecanismos de ação deste fármaco na língua inglesa. Contudo, a sua alta eficácia em induzir a morte das células SCC-25 mas não das células HaCaT além de seus efeitos mais potentes do que o

da cisplatina e do AG1478 contra o CEC de boca já se constituem em dados fortes o suficiente para motivar investigações adicionais deste agente terapêutico em potencial no tratamento do câncer de boca.

O presente estudo trouxe a luteolin, o metixene hydrochloride e a nitazoxanide como fortes candidatos ao tratamento do câncer de boca. Os três fármacos apresentaram citotoxicidade significativa quando adicionados isoladamente ou combinados entre si às células SCC-25. Além disso, a luteolin e o metixene hydrochloride apresentaram-se mais eficazes na eliminação de células tumorais de boca do que a cisplatina e o AG1478, quimioterápicos consagrados. Assim, podemos nos perguntar se não estamos diante de agentes quimioterápicos com maior eficácia, custo mais baixo, maior acessibilidade e menor agressividade aos tecidos normais, o que poderia significar uma revolução no tratamento do câncer de boca. Como perspectivas futuras, nós destacamos a necessidade da validação dos resultados aqui reportados *in vitro* e *in vivo* além do aprofundamento dos mecanismos moleculares pelos quais a luteolin, metixene hydrochloride e nitazoxanide atuam ao eliminar as células malignas.

7 CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

A partir da análise de 3 fármacos *hits*, luteolin, metixene hydrochloride e nitazoxanide, identificados por meio da triagem de fármacos baseada na viabilidade celular realizada em cultura de células de câncer de boca SCC-25 e de queratinócitos cutâneos imortalizados HaCaT, nós verificamos que:

1. Luteolin, metixene hydrochloride e nitazoxanide apresentam citotoxicidade proporcional à dose e ao tempo de atuação do fármaco em células SCC-25 e HaCaT;
2. As combinações “luteolin + metixene hydrochloride” e “metixene hydrochloride + nitazoxanide” potencializaram os efeitos dos fármacos nas células malignas em relação aos tratamentos individuais sem aumentar significativamente a toxicidade contra as células HaCaT;
3. As combinações da luteolin, metixene hydrochloride e nitazoxanide com o AG1478 (10 μ M) ou com a cisplatina (10 μ M) potencializaram os efeitos dos fármacos nas células SCC-25 em relação aos tratamentos individuais;
4. Luteolin e nitazoxanide inibiram a atividade migratória das células SCC-25 porém não das HaCaT;
5. O tratamento das células SCC-25 com a luteolin promove ativação da via de dano ao DNA por meio da fosforilação da ATM, H2AX e Chk2. Esta ativação é potencializada ao inibir-se o Chk2;
6. Luteolin, metixene hydrochloride e nitazoxanide constituem-se em candidatos promissores à validação e à estudos adicionais para serem, eventualmente, utilizados no tratamento do câncer de boca.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ADAGU, I. S. et al. In vitro activity of nitazoxanide and related compounds against isolates of *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. **J Antimicrob Chemother**, v. 49, n. 1, p. 103-111, Jan 2002.

AKTIPIIS, C. A. et al. Overlooking evolution: a systematic analysis of cancer relapse and therapeutic resistance research. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e26100, 2011.

AMIN, A. R. et al. Enhanced anti-tumor activity by the combination of the natural compounds (-)-epigallocatechin-3-gallate and luteolin: potential role of p53. **J Biol Chem**, v. 285, n. 45, p. 34557-65, Nov 5 2010.

ASHBURN, T. T.; THOR, K. B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, n. 8, p. 673-83, Aug 2004.

BEECH, N. et al. Dental management of patients irradiated for head and neck cancer. **Aust Dent J**, v. 59, n. 1, p. 20-8, Mar 2014.

BELCHER, R. et al. Current treatment of head and neck squamous cell cancer. **J Surg Oncol**, v. 110, n. 5, p. 551-74, Oct 2014.

BOUKAMP, P. et al. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. **J Cell Biol**, v. 106, n. 3, p. 761-71, Mar 1988.

BROCKMANN, A. et al. Structure-function relationship of thiazolide-induced apoptosis in colorectal tumor cells. **ACS Chem Biol**, v. 9, n. 7, p. 1520-7, Jul 18 2014.

BROEKHUYSEN, J. et al. Nitazoxanide: pharmacokinetics and metabolism in man. **Int J Clin Pharmacol Ther**, v. 38, n. 8, p. 387-94, Aug 2000.

BUSCH, C. J. et al. The current role of systemic chemotherapy in the primary treatment of head and neck cancer. **Cancer Treat Rev**, v. 41, n. 3, p. 217-21, Mar 2015.

CAI, X. et al. Luteolin induced G2 phase cell cycle arrest and apoptosis on non-small cell lung cancer cells. **Toxicol In Vitro**, v. 25, n. 7, p. 1385-91, Oct 2011.

CHAVELI-LOPEZ, B. Oral toxicity produced by chemotherapy: A systematic review. **J Clin Exp Dent**, v. 6, n. 1, p. e81-90, Feb 2014.

CHIAN, S. et al. Luteolin sensitizes two oxaliplatin-resistant colorectal cancer cell lines to chemotherapeutic drugs via inhibition of the Nrf2 pathway. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 15, n. 6, p. 2911-6, 2014.

CHIAN, S. et al. Luteolin inhibits the Nrf2 signaling pathway and tumor growth in vivo. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 447, n. 4, p. 602-8, May 16 2014.

COHEN, S. A. Use of nitazoxanide as a new therapeutic option for persistent diarrhea: a pediatric perspective. **Curr Med Res Opin**, v. 21, n. 7, p. 999-1004, Jul 2005.

DE CAMPOS, M. P. et al. Evaluation of antifungal activity of *Piper solmsianum* C. DC. var. *solmsianum* (Piperaceae). **Biol Pharm Bull**, v. 28, n. 8, p. 1527-30, Aug 2005.

DENG, C. X.; BRODIE, S. G. Roles of BRCA1 and its interacting proteins. **Bioessays**, v. 22, n. 8, p. 728-37, Aug 2000.

DRUGSITE TRUST.

[Http://www.drugs.com/search.php?searchterm=metixene+hydrochloride](http://www.drugs.com/search.php?searchterm=metixene+hydrochloride). Acesso em 6 de junho de 2015.

FAN-MINOUE, H. et al. A c-Myc activation sensor-based high-throughput drug screening identifies an antineoplastic effect of nitazoxanide. **Mol Cancer Ther**, v. 12, n. 9, p. 1896-905, Sep 2013.

FUERTES, M. A. et al. Cisplatin biochemical mechanism of action: from cytotoxicity to induction of cell death through interconnections between apoptotic and necrotic pathways. **Curr Med Chem**, v. 10, n. 3, p. 257-66, Feb 2003.

GOTO, H.; KASAHARA, K.; INAGAKI, M. Novel insights into Chk1 regulation by phosphorylation. **Cell Struct Funct**, v. 40, n. 1, p. 43-50, 2015.

HEMPHILL, A.; MUELLER, J.; ESPOSITO, M. Nitazoxanide, a broad-spectrum thiazolide anti-infective agent for the treatment of gastrointestinal infections. **Expert Opin Pharmacother**, v. 7, n. 7, p. 953-64, May 2006.

HIRANO, T. et al. Luteolin, a flavonoid, inhibits AP-1 activation by basophils. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 340, n. 1, p. 1-7, Feb 3 2006.

HIRVONEN, T. et al. Flavonol and flavone intake and the risk of cancer in male smokers (Finland). **Cancer Causes Control**, v. 12, n. 9, p. 789-96, Nov 2001.

HOLLMAN, P. C.; KATAN, M. B. Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. **Arch Toxicol Suppl**, v. 20, p. 237-48, 1998.

HONG, Z. et al. Luteolin is effective in the non-small cell lung cancer model with L858R/T790M EGF receptor mutation and erlotinib resistance. **Br J Pharmacol**, v. 171, n. 11, p. 2842-53, Jun 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – INCA. **Estimativa 2014 - Incidência de Câncer no Brasil**. 2014.

JOHNSON, J. L.; GONZALEZ DE MEJIA, E. Interactions between dietary flavonoids apigenin or luteolin and chemotherapeutic drugs to potentiate anti-proliferative effect on human pancreatic cancer cells, in vitro. **Food Chem Toxicol**, v. 60, p. 83-91, Oct 2013.

KANDASWAMI, C. et al. The antitumor activities of flavonoids. **In Vivo**, v. 19, n. 5, p. 895-909, Sep-Oct 2005.

KANG, K. P. et al. Luteolin ameliorates cisplatin-induced acute kidney injury in mice by regulation of p53-dependent renal tubular apoptosis. **Nephrol Dial Transplant**, v. 26, n. 3, p. 814-22, Mar 2011.

KIM, E. K. et al. Flavonoids protect against cytokine-induced pancreatic beta-cell damage through suppression of nuclear factor kappaB activation. **Pancreas**, v. 35, n. 4, p. e1-9, Nov 2007.

KIM, H. Y. et al. Raf and PI3K are the molecular targets for the anti-metastatic effect of luteolin. **Phytother Res**, v. 27, n. 10, p. 1481-8, Oct 2013.

KIRMIZIBEKMEZ, H. et al. Inhibiting activities of the secondary metabolites of *Phlomis brunneogaleata* against parasitic protozoa and plasmodial enoyl-ACP Reductase, a crucial enzyme in fatty acid biosynthesis. **Planta Med**, v. 70, n. 8, p. 711-7, Aug 2004.

KNEKT, P. et al. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. **Am J Epidemiol**, v. 146, n. 3, p. 223-30, Aug 1 1997.

KOHLER, H. F.; KOWALSKI, L. P. Prognostic impact of the level of neck metastasis in oral cancer patients. **Braz J Otorhinolaryngol**, v. 78, n. 6, p. 15-20, Dec 2012.

LE GUELTE, A. et al. Semaphorin 3A elevates endothelial cell permeability through PP2A inactivation. **J Cell Sci**, v. 125, n. Pt 17, p. 4137-46, Sep 1 2012.

LE MARCHAND, L. Cancer preventive effects of flavonoids—a review. **Biomed Pharmacother**, v. 56, n. 6, p. 296-301, Aug 2002.

LEE, E. J.; OH, S. Y.; SUNG, M. K. Luteolin exerts anti-tumor activity through the suppression of epidermal growth factor receptor-mediated pathway in MDA-MB-231 ER-negative breast cancer cells. **Food Chem Toxicol**, v. 50, n. 11, p. 4136-43, Nov 2012.

LEVY, A. et al. Toxicity of concomitant cetuximab and radiotherapy with or without initial taxane-based induction chemotherapy in locally advanced head and neck cancer. **Head Neck**, May 13 2015.

LI, Y. L. et al. Antiviral activities of flavonoids and organic acid from *Trollius chinensis* Bunge. **J Ethnopharmacol**, v. 79, n. 3, p. 365-8, Mar 2002.

LIM DO, Y. et al. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in HT-29 human colon cancer cells by the dietary compound luteolin. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 292, n. 1, p. G66-75, Jan 2007.

LIN, Y. et al. Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 8, n. 7, p. 634-46, Nov 2008.

LOPEZ-LAZARO, M. Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. **Mini Rev Med Chem**, v. 9, n. 1, p. 31-59, Jan 2009.

LU, X. Y. et al. [Inhibitory effects of luteolin on human gastric carcinoma xenografts in nude mice and its mechanism]. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, v. 93, n. 2, p. 142-6, Jan 8 2013.

LV, P. C. et al. Synthesis and biological evaluation of novel luteolin derivatives as antibacterial agents. **Eur J Med Chem**, v. 44, n. 2, p. 908-14, Feb 2009.

MAJUMDAR, D. et al. Luteolin nanoparticle in chemoprevention: in vitro and in vivo anticancer activity. **Cancer Prev Res (Phila)**, v. 7, n. 1, p. 65-73, Jan 2014.

MARKAVERICH, B. M. et al. Luteolin and gefitinib regulation of EGF signaling pathway and cell cycle pathway genes in PC-3 human prostate cancer cells. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 122, n. 4, p. 219-31, Oct 2010.

MENENDEZ, J. A. et al. Analyzing effects of extra-virgin olive oil polyphenols on breast cancer-associated fatty acid synthase protein expression using reverse-phase protein microarrays. **Int J Mol Med**, v. 22, n. 4, p. 433-9, Oct 2008.

MITTRA, B. et al. Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. **Mol Med**, v. 6, n. 6, p. 527-41, Jun 2000.

MOMTAZI-BOROJENI, A. A.; BEHBAHANI, M.; SADEGHI-ALIABADI, H. Antiproliferative activity and apoptosis induction of crude extract and fractions of avicennia marina. **Iran J Basic Med Sci**, v. 16, n. 11, p. 1203-8, Nov 2013.

MULLER, J. et al. Thiazolides inhibit growth and induce glutathione-S-transferase Pi [GSTP1]-dependent cell death in human colon cancer cells. **Int J Cancer**, v. 123, n. 8, p. 1797-806, Oct 15 2008.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/64722#section=Top>. Acesso: 6 de junho de 2015.

NEUHOUSER, M. L. Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies. **Nutr Cancer**, v. 50, n. 1, p. 1-7, 2004.

O'PREY, J. et al. Effects of dietary flavonoids on major signal transduction pathways in human epithelial cells. **Biochem Pharmacol**, v. 66, n. 11, p. 2075-88, Dec 1 2003.

ONG, C. S. et al. Luteolin induces G1 arrest in human nasopharyngeal carcinoma cells via the Akt-GSK-3 β -Cyclin D1 pathway. **Cancer Lett**, v. 298, n. 2, p. 167-75, Dec 8 2010.

PANDURANGAN, A. K. et al. Luteolin induces growth arrest in colon cancer cells through involvement of Wnt/ β -catenin/GSK-3 β signaling. **J Environ Pathol Toxicol Oncol**, v. 32, n. 2, p. 131-9, 2013.

PARK, S. H. et al. Luteolin induces cell cycle arrest and apoptosis through extrinsic and intrinsic signaling pathways in MCF-7 breast cancer cells. **J Environ Pathol Toxicol Oncol**, v. 33, n. 3, p. 219-31, 2014.

PRATHEESHKUMAR, P. et al. Luteolin inhibits human prostate tumor growth by suppressing vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e52279, 2012.

RHEINWALD, J. G.; BECKETT, M. A. Tumorigenic keratinocyte lines requiring anchorage and fibroblast support cultured from human squamous cell carcinomas. **Cancer Res**, v. 41, n. 5, p. 1657-63, May 1981.

ROSSIGNOL, J. F. et al. A double-blind placebo-controlled study of nitazoxanide in the treatment of cryptosporidial diarrhoea in AIDS patients in Mexico. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 92, n. 6, p. 663-6, Nov-Dec 1998.

RUAN, J. et al. Inhibition of hypoxia-induced epithelial mesenchymal transition by luteolin in non-small cell lung cancer cells. **Mol Med Rep**, v. 6, n. 1, p. 232-8, Jul 2012.

SABA, N. F. et al. Phase 1 and pharmacokinetic study of everolimus in combination with cetuximab and carboplatin for recurrent/metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. **Cancer**, v. 120, n. 24, p. 3940-51, Dec 15 2014.

SAKURAI, M. A. et al. Gefitinib and luteolin cause growth arrest of human prostate cancer PC-3 cells via inhibition of cyclin G-associated kinase and induction of miR-630. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e100124, 2014.

SARTORI, M. R. et al. Antifungal activity of fractions and two pure compounds of flowers from *Wedelia paludosa* [*Acmela brasiliensis*] (Asteraceae). **Pharmazie**, v. 58, n. 8, p. 567-9, Aug 2003.

SEELINGER, G. et al. Anti-carcinogenic effects of the flavonoid luteolin. **Molecules**, v. 13, n. 10, p. 2628-51, 2008.

SENKOWSKI, W. et al. Three-dimensional cell culture-based screening identifies the anthelmintic drug nitazoxanide as a candidate for treatment of colorectal cancer. **Mol Cancer Ther**, Apr 24 2015.

SHAH, J. P.; GIL, Z. Current concepts in management of oral cancer–surgery. **Oral Oncol**, v. 45, n. 4-5, p. 394-401, Apr-May 2009.

SHI, R. et al. Luteolin sensitizes the anticancer effect of cisplatin via c-Jun NH2-terminal kinase-mediated p53 phosphorylation and stabilization. **Mol Cancer Ther**, v. 6, n. 4, p. 1338-47, Apr 2007.

SHILOH, Y.; ZIV, Y. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 14, n. 4, p. 197-210, Apr 2013.

SHIM, J. S.; LIU, J. O. Recent advances in drug repositioning for the discovery of new anticancer drugs. **Int J Biol Sci**, v. 10, n. 7, p. 654-63, 2014.

SHOULARS, K. et al. Regulation of cell cycle and RNA transcription genes identified by microarray analysis of PC-3 human prostate cancer cells treated with luteolin. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 118, n. 1-2, p. 41-50, Jan 2010.

SIDLER, D. et al. Thiazolide-induced apoptosis in colorectal cancer cells is mediated via the Jun kinase-Bim axis and reveals glutathione-S-transferase P1 as Achilles' heel. **Oncogene**, v. 31, n. 37, p. 4095-106, Sep 13 2012.

SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal Biochem**, v. 150, n. 1, p. 76-85, Oct 1985.

STRACKER, T. H. et al. The ATM signaling network in development and disease. **Front Genet**, v. 4, p. 37, 2013.

STROM, T. J. et al. Comparison of every 3 week cisplatin or weekly cetuximab with concurrent radiotherapy for locally advanced head and neck cancer. **Oral Oncol**, Apr 30 2015.

SUN, D. et al. Luteolin limits infarct size and improves cardiac function after myocardium ischemia/reperfusion injury in diabetic rats. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33491, 2012.

TU, S. H. et al. Luteolin sensitises drug-resistant human breast cancer cells to tamoxifen via the inhibition of cyclin E2 expression. **Food Chem**, v. 141, n. 2, p. 1553-61, Nov 15 2013.

TUORKEY, M. J. Molecular targets of luteolin in cancer. **Eur J Cancer Prev**, Feb 23 2015.

VERSCHOOTEN, L. et al. Autophagy inhibitor chloroquine enhanced the cell death inducing effect of the flavonoid luteolin in metastatic squamous cell carcinoma cells. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e48264, 2012.

WANG, L. et al. Specific pomegranate juice components as potential inhibitors of prostate cancer metastasis. **Transl Oncol**, v. 5, n. 5, p. 344-55, Oct 2012.

WANG, T. T. et al. Luteolin induced-growth inhibition and apoptosis of human esophageal squamous carcinoma cell line Eca109 cells in vitro. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 13, n. 11, p. 5455-61, 2012.

WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncol**, v. 45, n. 4-5, p. 309-16, Apr-May 2009.

WATTERS, A. L.; EPSTEIN, J. B.; AGULNIK, M. Oral complications of targeted cancer therapies: a narrative literature review. **Oral Oncol**, v. 47, n. 6, p. 441-8, Jun 2011.

WENG, C. J.; YEN, G. C. Flavonoids, a ubiquitous dietary phenolic subclass, exert extensive in vitro anti-invasive and in vivo anti-metastatic activities. **Cancer Metastasis Rev**, v. 31, n. 1-2, p. 323-51, Jun 2012.

WHITE, C. A., JR. Nitazoxanide: a new broad spectrum antiparasitic agent. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 2, n. 1, p. 43-9, Feb 2004.

WONG, E.; GIANDOMENICO, C. M. Current status of platinum-based antitumor drugs. **Chem Rev**, v. 99, n. 9, p. 2451-66, Sep 8 1999.

WRIGHT, M. E. et al. Development of a comprehensive dietary antioxidant index and application to lung cancer risk in a cohort of male smokers. **Am J Epidemiol**, v. 160, n. 1, p. 68-76, Jul 1 2004.

WU, B. et al. Anti-proliferative and chemosensitizing effects of luteolin on human gastric cancer AGS cell line. **Mol Cell Biochem**, v. 313, n. 1-2, p. 125-32, Jun 2008.

WU, Q.; JUBB, H.; BLUNDELL, T. L. Phosphopeptide interactions with BRCA1 BRCT domains: More than just a motif. **Prog Biophys Mol Biol**, v. 117, n. 2-3, p. 143-148, Mar 2015.

YANG, S. F. et al. Luteolin induces apoptosis in oral squamous cancer cells. **J Dent Res**, v. 87, n. 4, p. 401-6, Apr 2008.

ZABLUDOFF, S. D. et al. AZD7762, a novel checkpoint kinase inhibitor, drives checkpoint abrogation and potentiates DNA-targeted therapies. **Mol Cancer Ther**, v. 7, n. 9, p. 2955-66, Sep 2008.

ZHANG, Q.; ZHAO, X. H.; WANG, Z. J. Cytotoxicity of flavones and flavonols to a human esophageal squamous cell carcinoma cell line [KYSE-510] by induction of G2/M arrest and apoptosis. **Toxicol In Vitro**, v. 23, n. 5, p. 797-807, Aug 2009.

ZHAO, Y. et al. Luteolin suppresses growth and migration of human lung cancer cells. **Mol Biol Rep**, v. 38, n. 2, p. 1115-9, Feb 2011.

ZHOU, Q. et al. Luteolin inhibits invasion of prostate cancer PC3 cells through E-cadherin. **Mol Cancer Ther**, v. 8, n. 6, p. 1684-91, Jun 2009.

ZIYAN, L. et al. Evaluation of the anti-inflammatory activity of luteolin in experimental animal models. **Planta Med**, v. 73, n. 3, p. 221-6, Mar 2007.