NATHALIA CRUZ DE VICTO

**AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR INDUZIDA PELA ASSOCIAÇÃO DE
PACLITAXEL E CISPLATINA EM LINHAGENS CELULARES DERIVADAS DE
TUMOR DE CABEÇA E PESCOÇO**

Dissertação apresentada ao
Departamento de Imunologia
do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade
de São Paulo, para obtenção
do Título de Mestre em
Ciências.

São Paulo
2013

NATHALIA CRUZ DE VICTO

**AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR INDUZIDA PELA ASSOCIAÇÃO DE
PACLITAXEL E CISPLATINA EM LINHAGENS CELULARES DERIVADAS DE
TUMOR DE CABEÇA E PESCOÇO**

Dissertação apresentada ao
Departamento de Imunologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Profa. Dra. Jacqueline
de Fátima Jacysyn

Versão corrigida. A versão original
eletrônica encontra-se disponível
tanto na Biblioteca do ICB quanto na
Biblioteca Digital de Teses e
Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Victo, Nathalia Cruz de.

Avaliação da morte celular induzida pela associação de paclitaxel e cisplatina em linhagens celulares derivadas de tumor de cabeça e pescoço / Nathalia Cruz de Victo. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Jacqueline de Fátima Jacysyn.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunorregulação e tolerância imunológica.

Versão do título para o inglês: Evaluation of cell death induced by the combination of paclitaxel and cisplatin in cell lines derived from head and neck squamous cell carcinoma.

1. HNSCC 2. Apoptose 3. Paclitaxel 4. Cisplatina I. Jacysyn, Profa. Dra. Jacqueline de Fátima II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB098/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Nathalia Cruz de Victo.

Título da Dissertação: Avaliação da morte celular induzida pela associação de paclitaxel e cisplatina em linhagens celulares derivadas de tumor de cabeça e pescoço.

Orientador(a): Profa. Dra. Jacqueline de Fátima Jacysyn.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

(☐) **Aprovado(a)**

(☐) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 485/11 referente ao projeto intitulado: "*Avaliação de moléculas pró- e anti-apoptóticas e vias de sinalização em células tumorais*" sob a responsabilidade de Nathalia Cruz de Victo, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°196 de 1996.

São Paulo, 19 de outubro de 2011.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

**Aos meus pais, Rosana e Salvador e
ao meu amor Cristiano, que me
incentivaram e nunca me deixaram
desistir.**

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer meus pais, Salvador e Rosana, pelo apoio, compreensão e por sempre me apoiarem nas minhas decisões. Agradeço também aos meus irmãos Gabrielle, Marcelo e Eduardo que sempre estiveram presentes nessa minha caminhada. Não poderia esquecer minhas tias, tios, primos e a Sandra, que mesmo sem saber direito o que eu estava fazendo me deram total apoio. Uma pessoa muito especial e que sem dúvida é o alicerce de nossa família e merece todos os agradecimentos é a minha avó Carmen, que é um exemplo de pessoa e me ensinou todos os valores que devemos ter, muito obrigado vó por tudo.

Agradeço ao meu amor Cristiano que conheci durante o mestrado, que de uma amizade se tornou carinho, paixão e amor. Obrigada meu amor por sempre estar ao meu lado, por me acalmar quando eu necessitava, por me estimular quando eu queria desistir, por ser meu guia, meu amigo, meu companheiro.

Agradeço a minha orientadora Jackie pela confiança, amizade, carinho, por me orientar durante esse trajeto de minha vida e nos próximos que virão. A Carol e Paola pelas risadas e conversas que proporcionaram momentos de descontração. Agradeço ao Professor Dr. Gustavo Amarante Mendes por me deixar usufruir das instalações do laboratório onde realizei todos os experimentos, pela contribuição intelectual durante as reuniões de laboratório onde aprendi bastante.

Agradeço também ao Profº. Drº Samir Rasslan e Profa. Dra. Edna aos funcionários do laboratório de Fisiopatologia Cirúrgica, LIM 62 – FMUSP ao qual faço parte como aluna. Agradeço a todos meus amigos do laboratório que sempre estiveram presentes nas discussões, dúvidas e realizações. Agradeço ao Narcis que me aturou no momento de entrada quando a gente estudava e eu “surtava”, a Lú por toda a ajuda nas discussões de resultados e principalmente na finalização da dissertação, a Cris pelas conversas e os muitos cremes de queijo que fizemos a Flávia, Jú pelos almoços divertidos na copa, Emília pelas dicas no decorrer do mestrado, ao Tiago pelas risadas, Sandy apesar de pouco tempo de convivência, ao Daniel pelas atividades realizadas no laboratório que facilitaram o trabalho e aos amigos Inaê, Rodolfo, Bárbara que fizeram parte do grupo e que agora estão em uma nova fase em suas vidas.

Agradeço ao Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior, do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo por ter cedido as linhagens tumorais, sem as quais eu não poderia concretizar o trabalho.

Agradeço aos membros de minha banca de qualificação: Prof. Dr. Niels, Profa. Dra. Ana Paula Lepique e ao Dr. Welbert pelos conselhos e sugestões que foram fundamentais para a concretização do trabalho. Agradeço a todos os professores que durante esse trajeto ministraram aulas e palestras e os amigos de departamento que fizeram parte da minha formação.

Agradeço a todos os funcionários do departamento, ao pessoal da limpeza, audiovisual, aos porteiros por estarem sempre dispostos a ajudar. Aos secretários Eni, João, Jotelma e Amanda que tanto atormentei com dúvidas, favores e que sempre foram atenciosos. Agradeço a Áurea que se não fosse por seus cafés e pela sua alegria durante as manhãs eu não conseguiria iniciar os dias de bom humor.

Agradeço as agências de fomento CAPES e CNPq pelo apoio financeiro durante os anos de pesquisa. E por fim, agradeço a todos que fizeram parte destes dois anos de mestrado direta, ou, indiretamente. Muito Obrigada!

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”.

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

Victo NC. Avaliação da morte celular induzida pela associação de paclitaxel e cisplatina em linhagens celulares derivadas de tumor de cabeça e pescoço. [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Os tumores de cabeça e pescoço (HNSCC) ocupam o sexto lugar no ranking de incidência mundial, e estão localizados na região da face, fossas nasais, seios paranasais, boca, faringe, laringe entre outros tecidos moles do pescoço. O tabagismo, etilismo, radiação solar e o vírus HPV, são fatores de risco associados a esses tipos de tumores. A terapia combinada de drogas antineoplásicas tem sido utilizada para amenizar os efeitos colaterais e potencializar o tratamento antitumoral, sendo que a administração conjunta de paclitaxel e cisplatina tem se mostrado eficaz em tumores sólidos, como o HNSCC. A morte celular induzida pelo paclitaxel é mediada pela ruptura da dinâmica dos microtúbulos normais, já a cisplatina induz ligações cruzadas de DNA, estes tratamentos induzem a célula à morte por apoptose. Em mamíferos foram identificadas duas vias principais de sinalização da apoptose que envolvem a ativação de caspases, são elas: a via intrínseca (via mitocondrial) e via extrínseca (via receptor de morte). Entender por quais vias estes quimioterápicos induzem a morte nestas células tumorais é importante para compreender o que causa resistência nestas células após o tratamento. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a indução de morte de uma linhagem de HNSCC quando tratada com paclitaxel e cisplatina de forma isolada ou em associação e analisar as alterações a nível proteico que ocorrem após o tratamento destas células. Para isso, utilizamos a linhagem celular FaDu que foi tratada por um período de 48 horas com as drogas e verificamos sua resistência a indução de morte. Os resultados mostraram que a linhagem FaDu mais sensível ao tratamento com cisplatina e a associação com paclitaxel não potencializa a morte desta célula. A via de ativação de apoptose desta linhagem é dependente de caspases, 8 e 9, ativando as duas vias de morte, extrínseca e intrínseca. Avaliações quanto à participação de membros da família BCL-2 mostraram que a modulação desta morte se dá pelo balanço das proteínas pró- e anti-apoptóticas da família BCL-2 que são responsáveis pela regulação da apoptose. Verificamos que o tratamento com cisplatina induz a expressão da proteína pró-apoptótica BAK e a diminuição das proteínas anti-apoptóticas BCL-2 e BCL-XL. Com os resultados obtidos, concluímos que a cisplatina apresentou-se efetiva na indução de morte por apoptose, aumentando a expressão da proteína BAK e diminuindo a expressão das proteínas BCL-2 e BCL-XL e que a associação de paclitaxel e cisplatina não potencializa a morte da linhagem celular FaDu.

Palavras-chave: HNSCC. Apoptose. Paclitaxel. Cisplatina.

ABSTRACT

Victo NC. Evaluation of cell death induced by the combination of paclitaxel and cisplatin in cell lines derived from head and neck squamous cell carcinoma. [Masters thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) are the world's sixth most common cancer, developing on, areas, such as, the face, nostrils, paranasal sinuses, mouth, pharynx, larynx and on other neck soft tissues. Tobacco and alcohol consumption, excessive exposure to sunlight and HPV infection are associated with the development of these tumors. Anticancer therapies combining paclitaxel and cisplatin administration have been used to ameliorate chemotherapy side effects and enhancing the antitumor treatment, being considered an effective strategy against solid tumors, such as HNSCC. Paclitaxel-induced cell death is mediated by normal microtubule dynamics disruption, whereas cisplatin induces DNA cross-links, both mechanisms resulting in cell death by apoptosis. In mammals, two main apoptosis signaling pathways, involving caspase activation, were identified: the intrinsic pathway (mitochondrial pathway) and extrinsic (death receptor pathway). Understand by what pathway the chemotherapies induce death in these tumor cells is critical to try to avoid the resistance of these cells to treatment. Therefore, this study aimed to evaluate death induction in a HNSCC cell lineage when treated with single or combined paclitaxel and cisplatin administration and analyze changes in cell protein level after treatment. For this purpose, FaDu cell line was chosen, then treated for 48 hours with the drugs, and cell resistance to death induction was verified. Our results showed that FADU cell line was found to be more sensitive to single cisplatin treatment, whereas, when combined with paclitaxel did not enhance cell death. We also assessed the modulation of the BCL-2 family members, responsible for apoptosis regulation by the the balance between pro- and anti-apoptotic proteins. We found cisplatin treatment enhanced BAK (pro-apoptotic protein) expression and decreased BCL-2 and BCL-XL (anti-apoptotic proteins). Considering these results, we concluded that cisplatin was effective in inducing cell death by apoptosis in the studied cell line, increasing protein expression of BAK and decreasing BCL-2 and BCL-XL. Moreover, paclitaxel/cisplatin combined treatment did not potentiate FaDu cell line death.

Keywords: HNSCC. Apoptosis. Paclitaxel. Cisplatin.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A1** – *BCL-2 related gene 1*
- APAF-1** – *Apoptotic protease-activating factor 1*
- ATCC** – *American type culture collection*
- BAK** – *BCL-2 antagonist killer 1*
- BAX** – *BCL-2 associated X protein*
- BCL-2** – *B-cell CLL/Lymphoma 2*
- BCL-XL** – *BCL-2 related gene, long isoform*
- BH** – *BCL-2 homology domain*
- BID** – *BH3-interacting domain death agonist*
- BIM** – *BCL-2 interacting mediator of cell death*
- C. elegans** – *Caenorhabditis elegans*
- CARD** – *Caspase-recruitment domain*
- Caspase** – *Cysteine-aspartic acid protease*
- CED** – *Cell death abnormal*
- c-FLIP** – *Cellular FLICE inhibitory protein*
- c-IAP** – *Cellular-IAP*
- CIS** – *Cisplatina*
- CTL** – *Cytotoxic T cell*
- DD** – *Death domain*
- DED** – *Death effector domain*
- DIABLO** – *Direct IAP-binding protein with low pI*
- DiOC₆** – *3,3'-Dihexylaxacarbocyanine iodide*
- DISC** – *Death-inducing signaling complex*
- DR** – *Death receptor*
- ECL** – *Enhanced chemiluminescence*
- Egl-1** – *Egg-laying defective*
- FADD** – *FAS-associated death domain*
- FASL** – *FAS ligand*
- HNSCC** – *Head and neck squamous cell carcinoma*
- HPV** – *Human papiloma virus*
- IAP** – *Inhibitors of apoptosis proteins*
- MCL-1** – *Myeloid cell leukemia 1*

NK – *Natural killer*

PAC – *Paclitaxel*

PI – *Propidium iodide*

PVDF – *Polyvinylidene fluoride*

SDS – *Sodium dodecyl sulphate*

SMAC – *Second mitochondrial-derived activator of caspases*

tBID – *Truncad BID*

TNF – *Tumor necrosis factor*

TRADD – *TRAIL-associated death domain*

TRAIL – *Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand*

XIAP – *X-chromosome linked IAP*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Região da cabeça e pescoço	17
Figura 2 – Diagrama esquemático das caspases de mamíferos. Exceto caspase-11 e -12 (camundongo) e -13 (bovina), as demais caspases são de origem humana	24
Figura 3 – Representação esquemática da família BCL-2.....	25
Figura 4 – Principais vias apoptóticas	28
Figura 5 – Cinética de crescimento celular	43
Figura 6 – Tratamento da célula FaDu com diferentes concentrações de paclitaxel e cisplatina	45
Figura 7 – Efeito do paclitaxel e cisplatina na morte celular	48
Figura 8 – Efeito da inibição geral das caspases na morte celular	49
Figura 9 – Efeito da inibição das caspases-8 e -9 na morte celular	51
Figura 10 – Tratamento da célula FaDu para avaliar a indução de ativação das caspases-8, caspase-9 e caspase-3	52
Figura 11 – Despolarização mitocondrial na linhagem celular FaDu induzida pelos tratamentos de paclitaxel e cisplatina.....	53
Figura 12 – Tratamento da célula FaDu para avaliar a expressão de proteínas da família BCL-2.....	54

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação TNM	19
Quadro 2 – Ficha técnica do Paclitaxel	32
Quadro 3 – Ficha técnica da Cisplatina	35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (HNSCC – <i>Head and Neck Squamous Cell Carcinoma</i>)	17
1.2 Apoptose	20
1.2.1 Família das caspases	22
1.2.2 Família BCL-2	24
1.2.3 Vias de apoptose	26
1.3 Drogas quimioterápicas	29
1.3.1 Paclitaxel	30
1.3.2 Cisplatina	33
1.3.3 Associação entre paclitaxel e cisplatina	34
2 OBJETIVO	37
3 MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 Linhagem celular	38
3.2 Cinética de crescimento celular	38
3.3 Tratamento para indução de morte	38
3.4 Tratamento para inibição de caspases	39
3.5 Ensaios para detecção de morte celular	39
3.5.1 Externalização de fosfatidilserina	39
3.5.2 Análise do conteúdo do DNA genômico	40
3.5.3 Marcação de células com DiOC ₆	40

3.6 Extração e quantificação proteica	40
3.7 Eletroforese de proteínas (SDS-PAGE) e “Western-blot”	41
3.8 Análise estatística	42
4 RESULTADOS	43
4.1 Avaliação do crescimento celular e viabilidade da linhagem tumoral de cabeça e pescoço FaDu	43
4.2 Análise da morte celular da linhagem FaDu tratada com diferentes doses de paclitaxel e cisplatina	44
4.3 Efeito da indução de morte celular da linhagem tumoral FaDu tratada com paclitaxel e cisplatina associadas ou administradas isoladamente	46
4.4 Efeito da inibição das caspases no tratamento da célula FaDu para indução de morte	48
4.5 Avaliação da perda de potencial de membrana mitocondrial das células da linhagem FaDu tratadas com paclitaxel e cisplatina associadas ou administradas isoladamente	52
4.6 Avaliação das proteínas pró- e anti-apoptóticas na participação da morte das células FaDu tratadas com paclitaxel e cisplatina associadas ou administradas isoladamente	53
5 DISCUSSÃO	55
6 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (HNSCC – *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*)

Os tumores de cabeça e pescoço ocupam o sexto lugar no ranking de incidência mundial com aproximadamente 600.000 novos casos em todo o mundo por ano (Leemans et al., 2011). HNSCC estão localizados na região da face, fossas nasais, seios paranasais, boca, faringe, laringe, tireóide, glândulas salivares e dos tecidos moles do pescoço (Fig. 1). De acordo com a origem do tecido o tipo de câncer é denominado, sendo assim, o carcinoma se origina da pele e das mucosas (tecido epitelial), e o de sarcoma se origina de ossos, músculos, cartilagens e partes moles (tecido conjuntivo). Portanto, o carcinoma da cabeça e do pescoço “compreende todos os carcinomas originários do epitélio muco-escamoso, desde o lábio, cavidades nasal e oral, faringe, até a laringe e ouvido médio” (Sbcancer, 2013).

Figura 1 – Região da cabeça e pescoço

Esquema anatômico mostrando as localizações dos tumores.
Fonte: Gao, 2012.

O câncer de laringe é um dos tipos mais comuns que acomete a região da cabeça e pescoço representando em torno de 25% dos tumores malignos que acometem essa região. Nesses tipos de tumores, cerca de 90% apresenta o padrão histológico de carcinoma epidermóide. Dados do INCA (Instituto Nacional do

Câncer) apontam 3.618 mortes em 2010, sendo 3.189 homens e 429 mulheres e a estimativa para 2012 foi de 6.110 novos casos (INCA, 2012).

O tabagismo, o consumo de álcool e uma má higiene oral são identificados como principais fatores associados aos tumores de cabeça e pescoço. Além desses fatores extrínsecos, destaca-se a participação do gene p53 que é considerado um dos mais importantes genes, sendo responsável pela regulação da apoptose. A mutação desse gene tem sido descrita nesses tipos de tumores variando entre 35 a 70% (Leite et al., 2010). Outro subgrupo de pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço que devemos citar são os pacientes positivos para o vírus do HPV (*human papilloma vírus*). Este vírus é particularmente comum nos tumores de orofaringe, onde a porcentagem de tumores positivos para o HPV varia entre 20 e 80%. Estes pacientes tem melhor prognóstico após a radioterapia e quimioterapia devido a um melhor controle loco-regional do tumor (Braakhuis et al., 2012).

Cerca de um terço dos pacientes com a doença em estágio inicial, são tratados com cirurgia ou radioterapia tendo um prognóstico favorável. Pacientes com tumores localmente avançados da cavidade oral são tratados principalmente por cirurgia combinada com quimioterapia e radioterapia. Na última década, os protocolos de preservação desses órgãos tem utilizado a quimioterapia combinada, tratamento sistêmico combinado com cisplatina e radioterapia loco-regional que se tornou o padrão para carcinomas de orofaringe, hipofaringe e laringe localmente avançados. Os carcinomas da hipofaringe e laringe muito avançados são tratados com cirurgia seguida de radioterapia pós-operatória (Braakhuis et al., 2012).

Os estabelecimentos do planejamento terapêutico e do prognóstico dos HNSCC baseiam-se principalmente em parâmetros clínicos, radiológicos e histopatológicos, os quais consistem na avaliação do local do tumor primário e no sistema de estadiamento, classificação TNM. Esse sistema de classificação, TNM, é importante na prática clínica para guiar o tratamento selecionado e a sobrevida desses pacientes está fortemente associada com o estágio da doença que o paciente se encontra. O sistema baseia-se no tamanho do tumor e invasão, estágio T, região de extensão de metástase em linfonodos regionais, estágio N, e a presença de metástase à distância, estágio M, representados no quadro 1 (Colombo, Rahal, 2009; Mao et al., 2004).

Como a maioria dos cânceres epiteliais, o HNSCC desenvolve-se através do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas em diversos processos. Deleção da

região de supressão tumoral, mutação em um gene supressor, e amplificação de oncogenes são frequentemente detectados em HNSCC. Entender o processo molecular envolvido na tumorigênese como a regulação do ciclo celular e angiogênese, é essencial para o desenvolvimento de novas estratégias para um diagnóstico precoce, classificação molecular e marcadores para prevenção e tratamento (Mao et al., 2004; Yoo et al., 2000).

Quadro 1 – Classificação TNM

T– TUMOR PRIMÁRIO
TX – tumor primário que não pode ser avaliado
T0 – não há evidências de tumor primário
Tis – carcinoma <i>in situ</i>
T1, T2, T3, T4 – tamanho crescente e/ou extensão local do tumor primário
N – LINFONODOS REGIONAIS
NX – os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0 – ausência de metástase em linfonodos regionais
N1, N2, N3 – comprometimento crescente dos linfonodos regionais
M – METÁSTASE À DISTÂNCIA
MX – a presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0 – ausência de metástase à distância
M1 – metástase à distância

Ref: INCA, 2004.

Antes do desenvolvimento das terapias moleculares orientadas, a terapia sistêmica foi limitada a agentes citotóxicos para inibir a replicação celular. Em grande parte, estes medicamentos funcionam através da indução de dano no DNA (por exemplo, cisplatina), na interferência com a replicação do DNA (por exemplo, fluorouracil), ou a interrupção da mitose (por exemplo, os taxanos). Com o uso da biologia molecular e celular o estudo da tumorigênese foi expandido com a melhor compreensão das vias de sinalização que contribuem para o crescimento de tumores e a sobrevivência dos mesmos. Além disso, a identificação de oncogenes que podem ser desregulados e supressores de tumor que podem ser silenciados

para promover a proliferação de células tumorais revelaram-se alvos críticos específicos (Rao et al., 2012).

Mutações no gene p53 são uma das mais comuns alterações moleculares em células tumorais, incluindo as HNSCC. O prognóstico para pacientes com tumores que possuem mutações no gene p53 é muitas vezes pior do que os que não possuem essa alteração. Linhagens celulares de HNSCC, p53-dependente, sensibilizadas com radio- ou quimioterapia foram induzidas a morte por apoptose. Consequentemente, a restauração da função de p53 e terapias independentes de p53 têm sido desenvolvidas como estratégias terapêuticas para esses tipos de tumores. Na ausência dessa reparação competente, danos no DNA induzem a apoptose através de interações de outros genes regulados pelo p53, que incluem proteínas apoptóticas da família BCL-2 como BAX e PUMA (Ota et al., 2012).

1.2 Apoptose

O desenvolvimento e a manutenção dos organismos multicelulares dependem de um balanço constante entre a proliferação das células e a morte das mesmas, que garante a homeostasia celular. Esse programa de deleção de células é um fenômeno biológico e um componente essencial no desenvolvimento embrionário (Duvall et al., 1985). Os processos de morte celular podem ser classificados de acordo com suas características morfológicas e bioquímicas, sendo a necrose a morte na qual a célula sofre algum tipo de insulto resultando no aumento do volume celular, agregação da cromatina, perda da integridade da membrana plasmática (Grivicich et al., 2007). A caracterização morfológica que difere a apoptose da necrose é um evento importante para diferenciação da morte celular. O processo de apoptose é dependente da ativação de certas caspases que são responsáveis pelas alterações morfológicas e bioquímicas que induzem a morte celular (Amarante-Mendes, Green, 1999).

A morte celular programada ou apoptose pode ser identificada por células com o DNA degradado, morfologia citoplasmática alterada, células que externalizam a fosfatidilserina ou que são ativadas por caspases. Inicialmente a definição de apoptose foi “morte celular mediada por caspases com associação à morfologia apoptótica” (Festjens et al., 2006).

O primeiro componente do mecanismo de morte celular a ser reconhecido foi o gene BCL-2 (*B-cell CLL/Lymphoma 2*), as evidências de um programa genético existente da morte celular fisiológica veio do estudo do desenvolvimento do *Caenorhabditis elegans*. A habilidade da proteína BCL-2 humana em prevenir a morte celular programada como no *C. elegans* mostrou que a apoptose em células humanas e em nematodos possui o mesmo processo conservado (Vaux, 1999). O *C. elegans* gera 1090 células somáticas durante o seu desenvolvimento, das quais 131 são programadas para a morte. O estudo destas células levou à identificação de 3 genes que são as chaves da regulação do processo de apoptose em *C. elegans* (Boxem, 2006). A análise genética no *C. elegans* revelou dois loci, CED-3 e CED-4 que seriam essenciais para morte celular programada durante seu desenvolvimento, e um terceiro, CED-9, que poderia impedir suas ações. O primeiro regulador em mamíferos surgiu quando o gene BCL-2, gene ativado por translocação cromossômica em linfoma folicular humano, foi estudado para permitir a sobrevivência de células hematopoiéticas dependentes de citocinas. Esta descoberta foi verificada em linhagens celulares e camundongos transgênicos, estabelecendo que a sobrevivência e proliferação celular fossem controladas por genes diferentes e que os distúrbios em ambos poderiam contribuir para neoplasias. CED-9 e BCL-2 possuem estrutura e funções homólogas. A fase de execução da apoptose foi elucidada quando CED-3 provou pertencer a uma nova família de proteases, chamada caspases, cuja ativação e clivagem sequencial de proteínas-alvo desencadeia o processo de morte. Entretanto, CED-4 e o seu homólogo em mamíferos, APAF-1, são reconhecidos como sendo os adaptadores para facilitar a autocatálise que inicia a cascata proteolítica das caspases (Adams, Cory, 1998). Quando CED-4 se liga a CED-3 promove sua ativação, entretanto quando CED-9 se liga a CED-4 impede a ativação de CED-3. Estímulos de apoptose causam a dissociação de CED-9, permitindo a ativação de CED-3 levando a célula à morte por apoptose (Ashkenazi, Dixit, 1998). O Egl-1 é um mecanismo de morte que ocorre pela ligação no antagonista homólogo de BCL-2 no *C. elegans*, CED-9. O CED-9 mantém a sobrevivência celular prevenindo a proteína adaptadora CED-4 de se ligar e a ativar a caspase CED-3 (Coultas et al., 2002).

1.2.1 Família das caspases

A maioria das alterações celulares observadas estão relacionadas a um grupo de cisteínas proteases que são ativadas principalmente em células apoptóticas. Essas proteases são homólogas entre si e compreendem uma grande família de proteínas conhecida como caspases (Hengartner, 2000). O nome caspase é baseado em duas propriedades catalíticas dessa enzima. A letra “c” compreende o mecanismo da cisteína protease, e “aspase” à habilidade de clivagem após um ácido aspártico (Alnemri et al., 1996). As caspases apoptóticas existem em células normais como enzimas inativas, quando as células sofrem estímulos apoptóticos as caspases tornam-se ativadas através eventos sequenciais que cliva o precursor em fragmentos grandes e pequenos que constituem a enzima ativa (Budihardjo et al., 1999).

A família das caspases humana possui 13 membros, algumas exercem função não relacionada a apoptose e sim, na maturação de citocinas durante a imunidade inata, diferenciação celular, proliferação e ativação de via de sinalização. As caspases podem ser classificadas em duas categorias, as com um pró-domínio grande (caspases-1, -2, -4, -5, -8, -9, -10, -11 e -12) que possuem um motivo estrutural da superfamília DD (*death domain*), os quais incluem os DEDs (*death effector domain*) e os CARDs (*caspase-recruitment domain*). Esse tipo de caspase está presente na célula como um monômero inativo e torna-se ativa quando recrutada e dimerizada em complexos proteicos. As caspases com pró-domínio curto (caspase-3, -6, -7 e -14) contém um domínio pequeno e existem como um dímero pré-formado na célula. Baseando-se nas suas funções as caspases são divididas em: inflamatórias (-1, -4, -5 e -11) e apoptóticas que estão subdivididas em iniciadoras (-2, -8, -9 e -10) e executoras (-3, -6, e -7) (Fig. 2). As caspases iniciadoras contém um pró-domínio grande, enquanto que as caspases executoras possuem um pró-domínio pequeno (Festjens et al., 2006).

A cascata de ativação das caspases na apoptose é iniciada através da ativação de caspases iniciadoras após estímulo via receptor de morte ou intracelular. As caspases-8 e -10 são ativadas quando há a interação de um ligante extracelular específico da família do fator de necrose tumoral com seu receptor (via extrínseca da apoptose), por outro lado a caspase-9 é ativada pela via mitocondrial (via intrínseca) essas vias serão abordadas adiante. Essas caspases iniciadoras ativam

as caspases efetoras pela clivagem em seus sítios alvos específicos, as caspases efetoras -3, -6 e -7 clivam proteínas em muitos compartimentos celulares e essa ativação é um dos eventos centrais que ocorre na apoptose (Wyllie, 2010).

Uma terceira via de ativação das caspases é iniciada por grânulos citotóxicos liberados pelas células NK (*natural killer*) e por CTLs (*cytotoxic T cell*), os quais induzem apoptose nas células-alvo. Esses grânulos citotóxicos contém perforina que formam poros na membrana da célula-alvo facilitando a entrada de outros grânulos, como a granzima B que cliva os substratos depois de um resíduo de ácido aspártico. Estudos sugerem que essa protease possua a habilidade de ativar diretamente os membros da família das caspases, sendo a caspase-3 o primeiro substrato identificado pela granzima B (Logue, Martin, 2008).

Figura 2 – Diagrama esquemático das caspases de mamíferos. Exceto caspase-11 e -12 (camundongo) e -13 (bovina), as demais caspases são de origem humana.

Suas relações filogenéticas (esquerda) parecem correlacionar-se com a sua função na apoptose e inflamação. As caspases iniciadoras e efetoras estão representadas pelas cores lilás e laranja, respectivamente. A posição da clivagem para a primeira ativação (entre as subunidades grandes e pequenas) está destacada pela seta mais longa enquanto, os locais adicionais de clivagem estão representados pelas setas médias e pequenas. L1-L4 indicam a região catalítica. O resíduo catalítico de cisteína está representado por uma linha laranja no início de L2.

Fonte: Shi, 2002.

1.2.2 Família BCL-2

Outro grupo de proteínas envolvidos no processo de apoptose são os membros pró- e anti-apoptóticos da família BCL-2 que representam reguladores centrais e conservados da via de morte celular (Korsmeyer, 1999). Todos os membros da família BCL-2 compartilham até quatro regiões de homologia denominadas domínios BH (*BCL-2 homology*), BH1-4, possuindo suas funções pró- ou anti-apoptóticas. As proteínas anti-apoptóticas da família BCL-2 que incluem BCL-2, BCL-W, BCL-XL, MCL-1 e A1 possuem até quatro domínios BH similares (Fig.3) (Giam et al., 2008).

Figura 3 – Representação esquemática da família BCL-2.

Os membros anti-apoptóticos da família - BCL-2, BCL-XL, BCL-W, A1, MCL1 e BOO (*BCL-2 homólogo de ovário*) - cada um tem dois ou quatro domínios distintos BH (*Bcl-2 homology*). Os membros pró-apoptóticos da família BCL-2 podem ser subdivididos em pelo menos dois grupos: BAX, BAK, BOK, que contêm dois ou três domínios distintos BH, e as proteínas BH3-only - BAD, BIK, BID, HRK, BIM, NOXA, PUMA e BMF - que partilham com os outros membros da família BCL-2 apenas o domínio curto BH3 (9-16 aminoácidos). TM, domínio transmembranar.

Fonte: Adaptado de Strasser, 2005.

Na ausência de sinais de morte, os membros pró- e anti-apoptóticos da família BCL-2 localizam-se em compartimentos intracelulares separados. Os membros anti-apoptóticos são encontrados na membrana mitocondrial, retículo endoplasmático ou na membrana nuclear. Em contrapartida, a fração substancial dos membros pró-apoptóticos estão localizados no citosol ou no citoesqueleto antes de um sinal de morte. Um exemplo é a ativação da molécula pró-apoptótica BAX que envolve sua translocação e dimerização. Em células viáveis, a porção existente de BAX está localizada no citosol em sua forma monomérica após um estímulo de morte BAX transloca-se para a mitocôndria onde se torna uma proteína de membrana como um homodímero (Gross et al., 1999).

1.2.3 Vias de apoptose

A apoptose é uma forma de morte celular desencadeada durante uma variedade de condições fisiológicas e é dependente da ativação de determinadas vias bioquímicas no interior de células que estão prestes a morrer (Brumatti et al., 2003). As proteínas da família BCL-2 constituem o *checkpoint* central na via de apoptose (Hu et al., 2012). Existem duas principais vias apoptóticas denominadas via intrínseca (via mitocondrial) e via extrínseca (via de receptor de morte) (Fig.4).

A via intrínseca é ativada por estímulos intracelulares, como dano ao DNA, que gera a liberação do citocromo c pela mitocôndria, essa liberação é regulada e dependente de duas proteínas da família BCL-2, BAX e BAK, que induzem alterações conformacionais na membrana mitocondrial. Animais e células *knockout* para essas duas proteínas são resistentes à morte induzida pela permeabilização mitocondrial que é induzida na presença de BAX e BAK. A liberação do citocromo c é um dos passos principais para a formação do apoptossomo. Uma vez liberado para o citosol, o citocromo c se liga a APAF-1 e na presença de um ATP recruta a caspase iniciadora, caspase-9, formando o apoptossomo e induz sua autoativação. A caspase-9 torna-se ativa e em seguida ativa as caspases efetoras -3, -6 e -7 desencadeando a apoptose (Du et al., 2000; Kemper et al., 2012; Zhao, He et al., 2012).

A via extrínseca é ativada através da ligação do receptor de morte da célula alvo ao seu ligante. Um dos receptores de morte mais conhecido é o FAS que se liga em seu ligante FASL. O sinal de ativação é transduzido através de domínios

intracelulares (Chinnaiyan et al., 1995). FAS, também conhecido como CD95 ou APO-1, é um receptor de morte que regula a manutenção/homeostasia do sistema imune através da indução de apoptose (Chen et al., 2010). Outro receptor conhecido é o DR4/DR5 que se liga ao seu ligante TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand*), ambos os receptores de morte pertencem aos receptores da superfamília do TNF (*tumor necrosis factor*). A interação do receptor com seu ligante faz com que ocorra a oligomerização na membrana celular e iniciação da apoptose através do recrutamento de FADD (*FAS-associated death domain*) ou TRADD (*TRAIL-associated death domain*) que contém um DD que se liga ao DD do receptor. FADD então recruta através de seu DED as caspases iniciadoras, caspase-8 ou -10 que se ligam pelo seu DED (Johnstone et al., 2008).

A formação desse complexo é designada DISC (*death-inducing signaling complex*). A ativação proteolítica das caspases-8 ou -10 no complexo DISC faz com que essas caspases sejam liberadas desse complexo, ativando dessa forma as etapas *downstream* da apoptose. Em células designadas do tipo I caspases efetoras, como a caspase-3, são ativadas diretamente pela caspase-8 de um modo eficiente e suficiente para induzir a apoptose. Em células denominadas do tipo II apenas uma pequena quantidade de caspase-8 ativa é liberada do DISC. Nessas células, a apoptose é dependente da clivagem da proteína BID que é um membro da família BCL-2 (Adam-Klages et al., 2005). A clivagem de BID pela caspase-8 gera um fragmento pró-apoptótico denominado tBID (*truncad BID*), essa forma truncada de BID transloca-se para a mitocôndria onde induz a agregação das proteínas BAX e BAK resultando no aumento da permeabilidade mitocondrial e consequentemente na liberação do citocromo c, formação do apoptossomo executor e ativação da caspase-9, que ativa as caspases efetoras -3, -6 e -7 levando a célula a apoptose (Pereira, Amarante-Mendes, 2011).

Figura 4 – Principais vias apoptóticas.

A via extrínseca é ativada por ligantes provenientes do meio extracelular que ativam as caspases iniciadoras –8 e –10 através da interação com os receptores de morte. A via intrínseca é ativada por estímulos intracelulares, como dano ao DNA, que levam um sinal à mitocôndria, levando a sua permeabilização e liberação de proteínas pró- apoptóticas com posterior ativação da caspase-9. Essas duas vias são capazes de ativar caspases efetoras, como a caspase-3, que levam a apoptose.

Fonte: Hengartner, 2000.

Os membros anti-apoptóticos da família BCL-2 (BCL-2 e BCL-XL), preservam a integridade mitocondrial e impedem a liberação do citocromo c na presença de estímulos apoptóticos. Os membros pró-apoptóticos, BAX, BID e BIM, migram de outros compartimentos celulares para a mitocôndria em resposta a estímulos apoptóticos e BAK, outro membro pró-apoptótico se encontra na membrana mitocondrial, essas proteínas promovem a liberação do citocromo c. Proteínas inibidoras de apoptose, conhecidas como IAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*), são um outro grupo de proteínas que regulam a formação do apoptossomo. Três proteínas IAPs (XIAP, c-IAP-1 e c-IAP-2) ligam-se a caspase-9 inativa e inibe sua ativação, os IAPs também podem se ligar diretamente e inibir as caspases já ativadas (Andersen et al., 2005; Du et al., 2000). O aumento da permeabilidade

mitocondrial além de liberar o citocromo c libera também outros fatores apoptogênicos, como Smac/DIABLO. Esses fatores apoptogênicos ativam a cascata das caspases via apoptossomo bloqueando o seu antagonista XIAP (Kaufmann et al., 2012). Outro modo de regular a indução de apoptose é através da inibição da caspase-8 pelo seu homólogo c-FLIP (*cellular FLICE inhibitory protein*). A proteína c-FLIP compete com a caspase-8 pelo sítio de ligação em FADD, sendo que c-FLIP possui maior afinidade pelo receptor, a caspase-8 inibe c-FLIP quando em altas concentrações (Ulukaya et al., 2011).

1.3 Drogas quimioterápicas

A principal estratégia que envolve um tratamento efetivo contra o câncer é o uso de uma combinação de fatores que incluem alguns agentes citotóxicos que atuam nas células tumorais via mecanismos diferentes. O paclitaxel induz a morte celular via apoptose pela interrupção da dinâmica funcional dos microtúbulos bloqueando a dissociação cromossômica. Por outro lado, a cisplatina induz apoptose através de ligações cruzadas no DNA (Rodriguez-Antona, 2010; Hackenberg et al., 2012). Devido muitas drogas atuarem na morte de células tumorais pela indução da apoptose, mutação ou desregulação das proteínas pró- e anti-apoptóticas, alterações nessas proteínas podem contribuir para resistência dessas células ao tratamento. Embora a apoptose induzida por drogas seja geralmente dependente da ativação da caspase-9 (via mitocondrial), drogas que induzem a ativação da caspase-8 tem mostrado que não só induzem a morte via receptor de morte, mas também pela via mitocondrial através da clivagem de BID (Liu et al., 2011).

Em 1969, Bruce e Lin já acreditavam que a razão para a resistência de células tumorais ao tratamento poderia ser uma característica genotípica ou fenotípica das células tumorais, a consequência para isso seria a diferença de penetração do fármaco em diferentes porções do tumor ou a diferença de atuação do fármaco no ciclo celular. Também acreditavam que a combinação de fármacos, cada um dado em suas doses mais eficazes, poderia potencializar a morte das células malignas mais do que o fármaco isolado (Bruce, Lin, 1969). Hoje é sabido que os agentes antineoplásicos podem atuar especificamente ou não no ciclo celular. Muitos fármacos que são eficazes contra as células tumorais exercem suas funções no ciclo celular, e são denominados fármacos ciclo-celular específicos, os

fármacos que possuem a capacidade de eliminar a célula maligna independente de estarem atravessando o ciclo celular são denominados ciclo-celular não específico (Almeida et al., 2005).

1.3.1 Paclitaxel

Um grande número de substâncias químicas se liga a tubulina do microtúbulo. Essas drogas são geralmente classificadas em dois grupos. Um grupo, os agentes desestabilizadores do microtúbulo, inibe a polimerização dos microtúbulos em concentrações elevadas de droga. Estes medicamentos incluem os alcalóides da vinca (vinblastina, vincristina). O segundo grupo, o agente de estabilização de microtúbulos, estimula a polimerização do microtúbulo em concentrações elevadas e inclui o paclitaxel, docetaxel provocando um retardamento ou bloqueio completo da mitose na metáfase para anáfase ponto de verificação, o qual, por sua vez, leva à morte celular por apoptose. (Wilson, Jordan, 2004). O paclitaxel (Quadro 2) é um taxano semi-sintético que interfere com fusos mitóticos, inibe a despolimerização de microtúbulos, bloqueando o ciclo celular mitótico na fase tardia G2 e fase M do ciclo celular, inibindo assim a replicação celular (Funato et al., 2012; Panchagnula, 1998).

Isolado originalmente na década de 1960 a partir da casca do teixo do Pacífico, *Taxus brevifolia*, o paclitaxel não recebeu muita atenção, até que se descobriu essa atividade de estabilizar os microtúbulos. Em concentrações relativamente elevadas, os taxanos promovem a polimerização dos microtúbulos estabilizando-os. Em concentrações mais baixas, semelhante aos alcalóides da vinca, os taxanos suprimem a dinâmica dos microtúbulos sem afetar a massa do polímero dos microtúbulos, mas mantêm a sua capacidade de bloquear a mitose e induzir a célula à morte por apoptose (Zhou, Giannakakou, 2005).

Kutuk e Letai mostraram que o paclitaxel utiliza a via intrínseca para induzir a morte em linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-468). Quando as drogas induzem a morte usando este caminho, elas o fazem, aumentando o equilíbrio de proteínas pró-apoptóticas em relação às anti-apoptóticas. Os dados indicam que tais alterações na sinalização de apoptose podem ser muito importantes em cânceres que adquirem resistência ao paclitaxel. A linhagem celular tumoral resistente ao paclitaxel, MCF-7, explora esta estratégia pelo aumento da expressão de BCL-2 e BCL-XL. Em contraste, as células MDA-MB-468 adquirem resistência ao

diminuir os níveis de BIM. Elas diminuem simultaneamente os níveis de BCL-XL, o que sugere que a perda de BIM é mais significativa do que a perda de BCL-XL, já que o fenótipo resultante é a resistência ao paclitaxel (Kutuk, Letai, 2008). O tratamento com o paclitaxel também estimula a fosforilação de BCL-2 inibindo a sua heterodimerização com a proteína pró-apoptótica BAX. Embora BAX não seja induzido pelo paclitaxel, os níveis livres de BAX são susceptíveis ao aumento após tratamento com paclitaxel porque há menos da proteína anti-apoptótica BCL-2 disponível para formação do complexo com BAX, induzindo assim a célula à morte por apoptose (Roth et al., 1998; Odoux et al., 2002)

Outro estudo relacionando o mecanismo de morte de célula tumoral com o tratamento com o Paclitaxel foi realizado com linhagem de tumor de próstata (PC-3), um estudo de Nimmanapalli e colaboradores mostraram que o pré-tratamento dessas células com paclitaxel induz a expressão de receptores de morte DR4/DR5 aumentando a morte induzida por TRAIL, quando a célula tumoral PC-3 foi tratada somente com paclitaxel notou-se que a morte não era mediada pela indução de TRAIL e sim pela via mitocondrial. Porém, quando realizado o tratamento com paclitaxel seguido de TRAIL resultou em uma maior capacidade de processamento de caspase-8, BID, caspase-9 e caspase-3 sugerindo que esse pré-tratamento induz a morte dessa célula via receptor de morte (via extrínseca) (Nimmanapalli et al., 2001).

Quadro 2 – Ficha técnica do Paclitaxel

Nome Genérico: Paclitaxel
Apresentação: 6 mg/mL sol. injetável fr. amp. 50 mL 6 mg/mL sol. injetável fr. amp. 15 mL
Classificação: quimioterápicos antineoplásicos/ antineoplásico natural.
Mecanismos de Ação: Agente antimicrotúbulo que promove a agregação dos microtúbulos a partir dos dímeros de tubulina. Liga-se especificamente a unidade beta-tubulina, estabiliza os microtúbulos prevenindo a despolimerização e inibição da dinâmica normal de reorganização da rede de microtúbulos essencial para as funções celulares.
Indicação: câncer de ovário; câncer de mama; câncer de pulmão pequenas e não pequenas células; câncer de cabeça e pescoço; câncer de esôfago; câncer de próstata; câncer de bexiga e sarcoma de Kaposi relacionados à HIV.
Reações Adversas: Hematológicas: Mielossupressão, leucopenia, anemia, trombocitopenia, sangramento. Gastrintestinais: Náuseas e/ou vômitos, mucosite, estomatite, dor abdominal. Hepáticas: Aumento da fosfatase alcalina e AST Locais: eritema, sensibilidade, edema. Neuromuscular: Neuropatia periférica, mialgia e artralgia Cardiovascular: hipotensão, arritmias ventriculares, rubor e edema. Dermatológicos: Alopecia e rash cutâneo. Renaís: aumento da creatinina (em pacientes com Sarcoma de Kaposi) Mialgias, artralgias, febre, e fadiga são comuns.
Interações Medicamentosas: Fenitoina e Fenobarbital aceleram o metabolismo do paclitaxel resultando em níveis plasmáticos reduzidos do medicamento; Deve ser administrado antes da Carboplatina e da Cisplatina para prevenir o atraso na excreção do Paclitaxel e o aumento da toxicidade deste. Mielossupressão é mais severa quando ciclofosfamida é administrada antes do Paclitaxel. Paclitaxel reduz a depuração da doxorrubicina, resultando em aumento da mielossupressão.
Administração: EVI, infusão de 1 a 24 h Diluição: Compatível com NaCl 0,9% e Glicose 5%
Precauções: Medicamento irritante. Incompatibilidade com materiais plastificados com PVC; Pré-medicação com difenidramina, ranitidina e dexametasona 30 min. antes da infusão. Observar e notificar qualquer sinal de neuropatia periférica; Monitorar sinais vitais do paciente a cada 15 minutos durante a primeira hora de infusão; Ter um médico disponível no momento da infusão.

Fonte: Guia farmacoterapêutico, 2011.

1.3.2 Cisplatina

A cisplatina foi descoberta por acaso pelo Dr. Rosenberg, em 1965, enquanto ele estava examinando o efeito do campo eletromagnético sobre o crescimento da célula bacteriana, e foi usada pela primeira vez com propriedades antitumorais em ensaios clínicos há quase 30 anos. Desde a sua aprovação pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1978, cisplatina continua a ser um dos fármacos antineoplásicos mais eficazes utilizados no tratamento de tumores sólidos. A cisplatina tem sido usada como uma terapia de primeira linha para vários tipos de tumores, incluindo testículos, ovários, cabeça e pescoço, isoladamente ou em combinação com outros agentes antitumorais. Também é utilizado como uma terapia adjuvante após a cirurgia ou radioterapia. Além da cisplatina, seus análogos, tais como carboplatina e oxaliplatina, são também usados na prática clínica (Basu, Krishnamurthy, 2010).

A cisplatina (Quadro 3) é um complexo inorgânico neutro plano, quadrado, que reage com o DNA para induzir os seus efeitos biológicos característicos, que culminam em qualquer reparação de danos no DNA e sobrevivência celular ou a ativação do programa irreversível de morte celular programada. A cisplatina neutra tem de ser ativada através de uma série de reações aquosas espontâneas, as quais envolvem a substituição sequencial dos ligantes cis-cloro da cisplatina com moléculas de água (Siddik, 2003). Esta reação ocorre espontaneamente no citoplasma, devido à concentração relativamente baixa de íons de cloreto, e conduz à geração da forma ativa da cisplatina. A cisplatina se liga ao DNA, com uma predileção pelo N7 da base nitrogenada mais especificamente as purinas. Isto conduz à geração de complexos de DNA-proteína, bem como de DNA-DNA, inter- e intra-adutos de fita simples. Quando a extensão dos danos é limitada, adutos de cisplatina induzem o bloqueio do ciclo celular na fase S e G2, um fenômeno que exerce efeitos cito protetores por permitir que os mecanismos de reparação reestabeleçam a integridade do DNA e previnam mitoses anormais. Por outro lado, se o dano ao DNA não é reparável, as células tornam-se comprometidas e são induzidas a morte por apoptose (Galluzzi et al., 2012).

Apoptose induzida pela cisplatina pode ser desencadeada através da via extrínseca ou intrínseca, mediada através da modulação das proteínas pró- e anti-apoptóticas da família BCL-2. A resistência à cisplatina pode ocorrer por meio de

perda ou diminuição da expressão de proteínas pró-apoptóticas ou aumento da expressão das proteínas anti-apoptóticas. Entre as várias proteínas da família dos IAP, o XIAP parece ser o mais potente regulador. Em estudos pré-clínicos o XIAP tem sido implicado na resistência à cisplatina. A aquisição de resistência à cisplatina foi associada com aumento da expressão de XIAP em linhagens celulares de tumor de ovário (Koberle et al., 2010).

1.3.3 Associação entre paclitaxel e cisplatina

O paclitaxel e cisplatina são dois agentes antineoplásicos eficazes para o tratamento de vários tumores sólidos e tem sido usado em combinação com outros agentes terapêuticos anticancerígenos (Levy-Nissenbaum et al., 2012). Em tumores avançados de ovário a quimioterapia que usa sequencialmente paclitaxel e cisplatina tornou-se amplamente aceita como tratamento de primeira linha nesses tipos de tumores (Chen et al., 2013). Em tumores avançados de HNSCC a radioquimioterapia é um tratamento padrão para a maioria dos pacientes. A cisplatina e paclitaxel são quimioterápicos tipicamente utilizados em fases tumorais paliativas. A morte celular induzida por paclitaxel é mediada pela ruptura da dinâmica dos microtúbulos normais. A cisplatina induz ligações cruzadas de DNA que leva a apoptose (Hackenberg et al., 2012).

Stefano Pergolizi e colaboradores acompanharam 43 pacientes com tumores de cabeça e pescoço em estágio local-avançado e/ou inoperável. Esses pacientes foram tratados com três ciclos de quimioterapia de indução seguida por quimioterapia concorrente. A quimioterapia de indução consistiu em uma dose de paclitaxel no dia 1 e a dose de cisplatina no dia 2, uma vez a cada três semanas, durante os três ciclos de tratamento. A radioterapia curativa começou quatro semanas após o último ciclo de quimioterapia, durante essa semana foi administrado paclitaxel. Esse estudo indicou que esse tipo de tratamento é viável e possui uma taxa de resposta razoavelmente boa (Pergolizzi et al., 2011).

Quadro 3 – Ficha técnica da Cisplatina

Nome Genérico: Cisplatina
Apresentação: 1 mg/mL sol. Injetável fr. amp. 50 mL
Classificação: quimioterápico antineoplásico / complexo de platina
Mecanismos de Ação: Inibe a síntese de DNA pela formação de ligações cruzadas com o DNA; desnatura a dupla hélice; liga-se de forma covalente com bases do DNA e altera a função do mesmo. Também pode ligar-se à proteínas. A cisplatina também pode ligar duas guaninas adjacentes no mesmo filamento de DNA, produzindo ligação cruzada intrafilamentar e ruptura.
Indicação: Câncer de testículos, ovário, bexiga, cabeça e pescoço, câncer de pulmão pequenas e não pequenas células; linfoma de Hodgkin e câncer de esôfago.
Reações Adversas: Nefrotoxicidade em 35 a 40% dos pacientes Náuseas e vômitos tanto na forma aguda como na forma tardia (24h) Mielossupressão: (dose-limitante) trombocitopenia e leucopenia Neurotoxicidade: Neuropatia periférica e parestesia; Ototoxicidade: perda de audição em alcance alta frequência especialmente em altas doses Toxicidade ocular Gosto metálico e perda de apetite; Alopecia
Interações Medicamentosas: Diminui os efeitos terapêuticos da Fenitoína; Aminoglicosídeos, Anfotericina B e outros agentes nefrotóxicos concorrente à cisplatina aumentam a toxicidade renal; Cisplatina reduz o clearance renal do etoposídeo, metotrexato, ifosfamida e ble-omicina, resultando em aumento do acúmulo desses medicamentos; Cisplatina deve ser administrada depois do paclitaxel, essa sequência previne atraso na excreção do paclitaxel e assim a toxicidade deste; Risco de ototoxicidade aumentado quando administrado cisplatina combinado a aminoglicosídeos e diuréticos de alça como a furosema.
Administração: EVI, EVC, infusão de 2 a 24 h Diluição: Compatível com NaCl 0,9% e Glicose 5%
Precauções: Medicamento irritante. Monitoramento da função renal; Administração de antieméticos até 30 min antes da infusão de cisplatina Hidratação intravenosa. Observar se a diurese está adequada (100 mL/h)

Fonte: Guia farmacoterapêutico, 2011.

Com base nos dados da literatura, a proposta do nosso trabalho visa utilizar os quimioterápicos administrados em pacientes, paclitaxel e cisplatina, em

combinação ou isoladamente para determinar se uma linhagem tumoral derivada de cabeça e pescoço é suscetível ou resistente à indução de morte.

2 OBJETIVO

No modelo *in vitro* de cultivo de célula tumoral epidermóide derivada de tumor de cabeça e pescoço, submetida ou não ao tratamento com paclitaxel e cisplatina os objetivos deste trabalho foram:

- Avaliar a resistência da célula tumoral epidermóide à morte celular programada tratada ou não com paclitaxel e cisplatina de forma isolada ou em associação.
- Analisar a expressão de proteínas da família BCL-2 na célula tumoral tratada ou não com paclitaxel e cisplatina em associação ou em forma isolada.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagem celular

Para os experimentos realizados utilizamos a linhagem de célula tumoral epidermóide de cabeça e pescoço imortalizada, FaDu (carcimona escamoso de faringe) adquirida da ATCC (*American Type Culture Collection*). Essa linhagem foi gentilmente doada pelo Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior, do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

O cultivo desta linhagem foi realizado em meio DMEM (Gibco, São Paulo, SP, Brasil) completo (suplementado com 10% soro fetal bovino, 1,5 mM glutamina, 63 mg/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina), em estufa 37 °C umidificada com 5% de CO₂.

3.2 Cinética de crescimento celular

Para os experimentos de cinética de crescimento celular, a linhagem celular FaDu foi descongelada e mantida em estufa umidificada a 37 °C com 5% de CO₂ em uma garrafa pequena até atingir uma confluência de aproximadamente 95%. Após isto, foi transferida e expandida para uma garrafa média e mantida em cultura até atingir a confluência desejada. Quando a garrafa média atingiu a confluência de 95%, a célula foi tripsinizada, contada e ajustada para uma concentração celular ideal. Foram plaqueadas, em placas de 35 X 10 mm em uma concentração 1x10⁵ células/poço em 2 mL de meio de cultura DMEM completo. O protocolo utilizado para esta cinética foi: utilizamos 7 placas, uma para cada dia da semana e as células foram coletadas sempre no mesmo horário para verificar crescimento e viabilidade.

O crescimento e viabilidade foram verificados por exclusão com azul de Tripán 0,2%. A contagem do número de células foi realizada com o auxílio de uma câmara de Neubauer.

3.3 Tratamento para indução de morte

Para os ensaios de indução de morte, a linhagem FaDu foi plaqueada na concentração de 2×10^5 células por poço em placa de 12 poços, cultivadas em 500 μ L de meio DMEM completo na presença ou ausência das drogas, Cisplatina, (Bergamo, Taboão da Serra, SP, Brasil) e Paclitaxel, (Zodiac, Pindamonhangaba, SP, Brasil). As células foram mantidas na estufa a 37 °C e 5% de CO₂ por 48 horas. Após tratamento as células foram coletadas, processadas e submetidas a marcações específicas para quantificação da apoptose e expressão proteica.

3.4 Tratamento para inibição de caspases

Os inibidores utilizados foram: Q-VD-OPH (inibidor das caspases-1, -3, -8 e -9), Z-LEHD-FMK (inibidor da caspase-9), Z-IETD-FMK (inibidor da caspase-8) (Kamiya Biomedical, Seattle, WA, USA).

Antes dos tratamentos para indução de morte com cisplatina e paclitaxel, combinados ou utilizados de forma isolada, a linhagem celular FaDu, foi submetida a inibição das caspases. Foram adicionados 20 μ M de inibidor em cada poço da cultura e a placa foi incubada por uma hora na estufa. Após esse período foi realizado o tratamento de indução de morte das células e estas foram mantidas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Após 48 horas as células foram coletadas, marcadas e avaliadas em citômetro de fluxo.

3.5 Ensaios para detecção de morte celular

3.5.1 Externalização de fosfatidilserina

As células foram marcadas pela incubação com Anexina V acoplada a FITC e com PI (*propidium iodide*), células em fase precoce de apoptose são positivas para Anexina V e negativas para PI, indicando a externalização de fosfatidilserina e a integridade das membranas, ao contrário de células necróticas e em fase tardia do processo apoptótico, as quais são positivas para os dois marcadores. As células após tratamento foram coletadas e centrifugadas a 300g por 5 minutos a uma temperatura de 4 °C e lavadas uma vez em tampão de ligação (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂ e 1,8 mM CaCl₂). Em seguida, foram incubadas com 2 μ g/mL de Anexina V em 100 μ L de tampão de ligação por 30 minutos no

escuro em temperatura ambiente. Após incubação foi acrescentado 100 µL de tampão de ligação e 100 µg/mL de PI. As células foram analisadas por citometria de fluxo (FACScalibur, BD Biosciences). Os dados obtidos foram analisados utilizando o *software* FlowJo (Three Star).

3.5.2 Análise do conteúdo do DNA genômico

Esta técnica consiste na análise do conteúdo de DNA verificado através da incorporação de PI em núcleos isolados. Os núcleos de células saudáveis exibem uma incorporação compatível com conteúdo diplóide ou tetraplóide, presentes em células em fase G0- G1 e G2-M, respectivamente. Ao contrário, núcleos apoptóticos aparecem na região hipodiplóide ou Sub-G1, devido uma redução do conteúdo de DNA, resultado de sua fragmentação e/ou a uma maior condensação da cromatina, o que dificultaria a incorporação de PI. As células após tratamento foram coletadas e centrifugadas a 300g por 5 minutos a uma temperatura de 4 °C. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 200 µL de uma solução de *Fluorochrome Solution* para HFS (0,1% citrato de sódio, 0,1% Triton 100X, 50 µg/L de iodeto de propídeo). As células foram analisadas por citometria de fluxo (FACScalibur, BD Biosciences). Os dados obtidos foram analisados utilizando o *software* FlowJo (Three Star).

3.5.3 Marcação de células com DiOC₆

A técnica de DiOC₆ é utilizada para avaliar o potencial da mitocôndria das amostras através de sua incorporação, um corante fluorescente verde que se insere na membrana mitocondrial, e que portanto serve como ferramenta para investigar a variação do potencial dessa incorporação nas diferentes condições experimentais. Após tratamento, as células foram coletadas e incubadas com 200 µL de DiOC₆ (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) a 40 nM diluído em meio DMEM completo por 15 minutos a 37 °C abrigado da luz. As células foram analisadas por citometria de fluxo (FACScalibur, BD Biosciences) e os dados obtidos foram analisados utilizando o *software* FlowJo (Three Star).

3.6 Extração e quantificação proteica

Para obtenção das proteínas para eletroforese foram plaqueadas 1×10^7 células por garrafa média cultivadas em 10 mL de meio DMEM completo na presença ou ausência das drogas paclitaxel e cisplatina. As células foram mantidas na estufa a 37 °C e 5% de CO₂ por 48 horas. Após tratamento as células foram coletadas e ressuspensas em 500 µL de tampão RIPA (50 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% Sodium Deoxycholate, 0,1% SDS) contendo inibidor de protease (Complete mini EDTA-free, Roche) em seguida, foram centrifugadas a 12.000g por 3 minutos a uma temperatura de 4 °C e após centrifugação o sobrenadante foi coletado e quantificado.

Após extração proteica, as amostras foram quantificadas seguindo o protocolo do kit *BCA protein assay*, Pierce Thermo. Foi realizada medida de absorbância das amostras em espectrofotômetro (Versa MAX) em um comprimento de onda de 562nm. A análise das amostras foi realizada pelo *software* SOFTmax PRO 40, Molecular devices.

3.7 Eletroforese de proteínas (SDS-PAGE) e “Western-blot”

Este método foi utilizado para detectar a expressão de proteínas BAK, BAX, BIM, BCL-2, BCL-XL, MCL-1, caspase-8, caspase-9, caspase-3 e actina. Assim sendo, foram utilizadas 15 µg de proteína dos grupos tratados ou não. O estoque destas amostras foi mantido a -80 °C. As proteínas presentes foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS PAGE – “*Sodium dodecyl sulphate gel electrophoresis*”), seguida de “Western-Blot”.

Após a preparação do gel de corrida na percentagem adequada entre 10-15%, para viabilizar a detecção de cada proteína estudada, 20 µL de cada amostra contendo 15 µg de proteína foram aplicadas em cada poço e a eletroforese foi conduzida a 100V.

Após a eletroforese, as proteínas do gel foram transferidas através de um sistema semi-seco (*Semi-Dry transfer cell* – BIO-RAD) para uma membrana de 0,22 mm de PVDF durante 1 hora e 20 minutos a 15V . Após transferência, as membranas foram deixadas na solução de bloqueio contendo 5% leite em pó desnatado em TBS-Tween (150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl, 0,05% Tween 20) acrescido de 0,1% azida por 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida as membranas foram incubadas *overnight* a 4 °C com o anticorpo primário. Após a

marcação as membranas foram lavadas três vezes em tampão TBS-Tween e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com o anticorpo secundário apropriado conjugado a peroxidase. Após este período as membranas foram novamente submetidas à lavagem por três vezes consecutivas e a detecção dos imunocomplexos foi feita pelo método de quimiluminescência, ECL (*enhanced chemiluminescence*) preparado em nosso laboratório [Solução A: 9 mL H₂O, 1 mL Tris/HCl 1M pH 8,5, 22 µL p-Coumaric acid 90 mM, 50 µL Luminol 250 mM e Solução B: 450 µL H₂O e 50 µL H₂O₂ 30%]. Após esse procedimento as membranas foram expostas a um filme de autoradiografia (Kodak) e as bandas analisadas quanto ao peso molecular das proteínas investigadas. O tempo de exposição das membranas ao filme foi de acordo com a intensidade de marcação e variou de 5 minutos à 1 hora.

Os anticorpos primários utilizados foram: BAK (Calbiochem, Hessen, Darmstadt, GERMANY); BAX, BIM, BCL-2, BCL-XL, MCL-1, caspase-8, caspase-9, caspase-3 (Cell Signaling, Danver, MA, USA) e actina (Sigma, San Luis, MO, USA). Os anticorpos secundários utilizados foram: anti-rabbit (Cell Signaling, Danver, MA, USA) e anti-mouse (BIO-RAD, Irvine, CA, USA).

3.8 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio de um *software* computacional *Graphpad Prism*, da companhia *Graphpad Software Incorporation*, versão 4. O teste usado foi o ANOVA, seguido pelo teste Tukey. O primeiro tipo de análise foi utilizado para averiguar se o fenômeno observado era resultante da variação entre os diferentes tratamentos e não de uma combinação aleatória. A segunda análise consistiu em comparar tratamentos dois a dois e ver se estes eram significativamente diferentes entre si. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação do crescimento celular e viabilidade da linhagem tumoral de cabeça e pescoço FaDu

Para melhor entendimento do comportamento da linhagem celular a ser estudada, foi realizada uma cinética para avaliar o crescimento e a viabilidade. A linhagem celular FaDu foi plaqueada na concentração de 1×10^5 células por poço em 2 mL de meio de cultura e seu crescimento e viabilidade foram acompanhados durante 7 dias. Notou-se que o perfil de crescimento chegou a aproximadamente 18×10^5 células no quinto dia de cultura e decaíram nos últimos dois dias (figura 5a). Esse mesmo perfil foi observado quando avaliamos a viabilidade dessa célula em que ocorre uma diminuição na porcentagem de células vivas a partir do sexto dia de cultura (figura 5b).

Figura 5 – Cinética de crescimento celular.

1×10^5 células da linhagem FaDu foram plaqueadas em 2 mL de meio de cultura e seu crescimento (a) e viabilidade (b) foram observados durante 7 dias. Os resultados representam três experimentos independentes.

Ao avaliarmos a cinética, observamos que os melhores dias para iniciar os tratamentos seriam entre os dias 2 e 3 de cultura, no início da fase exponencial, onde há maior crescimento celular e a viabilidade celular se mantém constante. A partir desses resultados os tratamentos para indução de morte foram realizados no segundo ou terceiro dia de cultura celular.

4.2 Análise da morte celular da linhagem FaDu tratada com diferentes doses de paclitaxel e cisplatina

Para definir qual a melhor dose a ser utilizada nos experimentos seguintes foi realizada uma curva com concentrações diferentes de paclitaxel e cisplatina. A linhagem tumoral FaDu proveniente de tumor de faringe foi tratada com as seguintes concentrações de quimioterápicos: paclitaxel (PAC) nas concentrações de 4, 8, 16, 32 ou 64 nM, e cisplatina (CIS) nas concentrações de 12.5, 25, 50, 100 ou 200 μ M no período de 48 horas de tratamento (Figura 6).

A externalização da fosfatidilserina é um dos eventos iniciais e essenciais na detecção do processo de apoptose, ao marcar as células com Anexina V observamos que as três primeiras doses testadas com CIS não possuem diferenças entre si, porém quando comparadas com a célula não tratada a morte está em torno de 55 e 60% nos tratamentos. Já as doses de 100 e 200 μ M variaram entre 90 e 95%, respectivamente. As células tratadas com 4 e 8 nM de PAC não apresentaram um aumento significativo em relação ao grupo sem tratamento, ambos os grupos permaneceram com aproximadamente 10% de morte celular. Os resultados observados nos tratamentos com 16, 32 e 64 nM são dose dependente, sendo que a dose de 64 nM não ultrapassou os 30% de morte (Fig. 6a).

Figura 6 – Tratamento da célula FaDu com diferentes concentrações de paclitaxel e cisplatina.

As células foram tratadas para indução de morte durante 48 horas nas seguintes concentrações: cisplatina (12,5, 25, 50, 100 e 200 μ M) e paclitaxel (4, 8, 16, 32, 64 nM) (a) Marcação com Anexina V para observar a externalização da fosfatidilserina; (b) Marcação com iodeto de propídeo (PI) para observar fragmentação nuclear. Os resultados representam dois experimentos independentes, cada um foi realizado em triplicata. ST (sem tratamento). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

Quando avaliamos a fragmentação nuclear, evento mais tardio da apoptose, nestes tratamentos, observamos que a linhagem celular FaDu tratada com CIS não apresentou diferenças significativas nas doses de 12,5, 25 e 50 μ M em relação à célula não tratada, sendo que a fragmentação nuclear observada nestas células não ultrapassou 20%. Entretanto, quando as células foram tratadas com 100 e 200 μ M foi observado um aumento significativo da fragmentação 53% ($P < 0,001$) e 85% ($P < 0,001$) de núcleos hipodiplóides, respectivamente (Fig. 6b). O tratamento com

PAC apresentou ser dose-dependente nas concentrações testadas, na dose de 4 nM não resultou em um aumento significativo em relação ao grupo não tratado. No entanto, as demais concentrações apresentaram um aumento da fragmentação nuclear significativo em relação ao grupo sem tratamento. Nas células tratadas com 8 nM de PAC foi de 20% ($P<0,05$), com 16 e 32 nM 21% ($P<0,01$) e na dose de 64 nM 35% ($P<0,001$) de fragmentação nuclear (Fig. 6b).

A partir dos dados obtidos na figura 6 decidimos as concentrações ideais para o tratamento de indução de morte, a escolha das doses baseou-se no perfil de morte da linhagem tumoral aos tratamentos. As concentrações foram: CIS 100 μ M e PAC 16 nM em que a morte celular variou em 90% e 18% na verificação da externalização da fosfatidilserina e 53% e 21% pela fragmentação nuclear, respectivamente.

4.3 Efeito da indução de morte celular da linhagem tumoral FaDu tratada com paclitaxel e cisplatina associadas ou administradas isoladamente

A linhagem celular FaDu foi tratada para indução de morte com os quimioterápicos PAC e CIS nas concentrações de 16 nM e 100 μ M, respectivamente, administrados isoladamente ou associados por um período de 48 horas. Após tratamento as células foram coletadas e marcadas para a quantificação da apoptose.

A figura 7a mostra que o grupo sem tratamento apresentou uma morte basal de 6,99% dentre esses valores 2,87% apenas positivo para Anexina V indicando que as células estão em fase inicial de apoptose e 4,12% positivo tanto para Anexina V quanto para PI, indicando estar em um processo tardio de apoptose. As células tratadas com PAC possuem um perfil semelhante ao grupo sem tratamento, a morte foi de 12,56% dentre eles, 4,35% positivo apenas para Anexina V e 8,21% positivo para ambas as marcações. Entretanto, quando a linhagem celular FaDu foi tratada com CIS e a associação PAC+CIS apresentou uma maior sensibilidade em que a morte celular está em 68,8% (17,9% apenas Anexina V e 50,9% positiva para ambas as marcações) e 70,5% (16,2% Anexina V e 54,3% duplo positivo), respectivamente. Esses resultados indicam que a célula FaDu é mais sensível ao tratamento com CIS e que a associação com PAC não altera esse perfil.

Analizamos sob outro aspecto o experimento, as células foram avaliadas pelo seu tamanho (FSC) e positividade para Anexina V (Fig 7b). Os resultados obtidos nesta análise são semelhantes aos encontrados na análise anterior e estão representados na figura 7c. O grupo tratado com PAC apresentou uma morte de 6,16% de diferença em relação ao sem tratamento ($P<0,05$). Contudo, os tratamentos com CIS (69,7%) e PAC+CIS (71,5%) são estatisticamente maiores em relação ao ST e PAC ($P<0,001$), porém quando comparados entre si não há diferenças significativas.

Concluimos, com base nestes resultados, que a associação de PAC com CIS, nas referidas doses e tempo de administração, não potencializa a morte da célula FaDu, mas experimentos realizados por nós mostraram que essa associação potencializa a morte da célula FaDu em 72 horas de tratamento (dados não mostrados) sugerindo assim, uma investigação nos mecanismos de morte envolvidos nesses tratamentos.

Figura 7 – Efeito do paclitaxel e cisplatina na morte celular.

A linhagem FaDu foi tratada para indução de morte por 48 horas com PAC (16 nM) e CIS (100 μ M) associadas ou administradas individualmente. A morte celular foi analisada através da marcação com (a) Anexina V X PI, onde células positivas apenas para Anexina V e positiva para ambas as marcações foram consideradas em apoptose, (b) análise da população celular por tamanho (FSC) X Anexina V e (c) gráfico representativo da análise mostrada em b. Os resultados representam dois experimentos independentes, cada um foi realizado em triplicata. ST, sem tratamento. *P<0,05 e ***P<0,001.

4.4 Efeito da inibição das caspases no tratamento da célula FaDu para indução de morte

Para determinar quais caspases participam do processo de morte e quais vias de indução estão relacionadas no tratamento da célula FaDu, as células foram tratadas por um período de 48 horas com 16 nM de PAC e 100 μ M de CIS administrados separadamente ou em associação. Uma hora antes de fazer este tratamento com os quimioterápicos as células foram pré-incubadas com o inibidor de caspases, o Q-VD-OPH, que inibe as caspases-1, -3, -8 e -9. Este inibidor foi utilizado na concentração de 20 μ M e após esse período de incubação as células foram submetidas ao tratamento.

Figura 8 – Efeito da inibição geral das caspases na morte celular.

A linhagem FaDu foi tratada para indução de morte por 48 horas com PAC (16nM) e CIS (100 μ M) associadas ou administradas individualmente, uma hora antes do tratamento as células foram incubadas com Q-VD-OPH (pan-caspase) na concentração de 20 μ M. Apoptose foi analisada através da marcação com Anexina V. As barras brancas indicam as células sem o inibidor e as barras pretas indicam as células que foram incubadas com 20 μ M de Q-VD-OPH antes do tratamento. Os resultados representam dois experimentos independentes, cada um foi realizado em triplicata. ST, sem tratamento. *P<0,05 e ***P<0,001.

Ao avaliarmos as populações celulares tratadas vimos que a morte da célula FaDu submetida aos tratamentos é dependente de caspase, indicando uma morte por apoptose (Fig. 8). A inibição das caspases no tratamento com PAC fez com que as células incubadas com o inibidor permanecessem no mesmo perfil das células

não tratadas. No entanto, quando utilizamos os tratamentos com CIS e PAC+CIS observamos uma proteção na morte destas células de aproximadamente 40%.

Após verificar a participação de caspases na morte da linhagem celular FaDu tratadas com quimioterápicos, conforme observado, nosso próximo passo foi desvendar por qual via de apoptose esta morte está ocorrendo, se é pela ativação da caspase-8, principal caspase envolvida na via extrínseca da apoptose, ou pela caspase-9 principal caspase na via intrínseca.

Para determinar a via de apoptose que, preferencialmente, a linhagem FaDu é induzida, nós inibimos especificamente as caspases iniciadoras de cada via do processo de apoptose com 20 μ M de Z-IETD-FMK (caspase-8) e Z-LEHD-FMK (caspase-9). Foi visto que, ao bloquearmos a caspase-8 (Fig. 9a) não há diferença no tratamento com PAC nos grupos com e sem inibidor. Porém, ao analisar os grupos tratados com CIS e PAC+CIS observou-se que essa proteção é maior e que as células tratadas anteriormente com o inibidor protegem aproximadamente 50% quando comparadas com as que não foram tratadas.

Quando a via intrínseca da apoptose foi bloqueada através da inibição da caspase-9 (Fig. 9b) foi notado que o tratamento com PAC não teve alteração entre os grupos, resultado semelhante ao da figura 9a. Por outro lado, a inibição da caspase-9 nos grupos tratados com CIS e PAC+CIS foi reduzida, porém significativa e a proteção foi menor quando comparado os inibidores mostrando que essa indução de morte é dependente de ambas as vias da apoptose.

Sabendo que a morte da célula FaDu é dependente da ativação da via extrínseca e, conseqüentemente, da ativação da intrínseca fomos investigar se a nível proteico havia alterações entre as caspases relacionadas com essas vias. Para isso, as células FaDu tratadas por 48 horas com PAC, CIS e PAC+CIS foram avaliadas quanto a presença ou não das formas inativas das caspases-8 e -9 (procaspase-8 e procaspase-9) que após clivagem liberam a forma ativa das caspase-8 e -9, que são as caspases iniciadoras da via extrínseca e intrínseca da apoptose, respectivamente. Em seguida, avaliamos a presença da procaspase-3 que após clivagem gera a forma ativa, caspase-3, que é a caspase efetora do processo de apoptose sendo compartilhada em ambas as vias.

Figura 9 – Efeito da inibição das caspases-8 e -9 na morte celular.

A linhagem FaDu foi tratada para indução de morte por 48 horas com PAC (16 nM) e CIS (100 μ M) associadas ou administradas individualmente, uma hora antes do tratamento as células foram incubadas com (a) Z-IETD-FMK, inibidor da caspase-8 e (b) Z-LEHD-FMK, inibidor da caspase-9 na concentração de 20 μ M. Apoptose foi analisada através da marcação com Anexina V. As barras brancas indicam as células sem o inibidor e as barras pretas indicam as células que foram incubadas com 20 μ M de inibidor antes do tratamento. Os resultados representam dois experimentos independentes, cada um foi realizado em triplicata. ST, sem tratamento. ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

Notamos na figura 10 que há uma diminuição da procaspase-8 quando tratada com CIS ou PAC+CIS que pode estar relacionado a estímulos de receptores de morte da família do TNF como FAS ou DR4/DR5. Por outro lado, há uma maior degradação da procaspase-9 nas células tratadas com CIS e PAC+CIS em relação às células sem tratamento ou tratadas com PAC. Em ambas as caspases iniciadoras avaliadas o tratamento com PAC não apresentou alterações em relação ao grupo sem tratamento. Isso nos indica que a morte das células FaDu tratadas com CIS ou a associação podem ocorrer pelas duas vias de morte através da ativação da caspase-8 que pode direcionar uma morte direta, ou pela clivagem de BID que pode induzir a morte pela ativação da via intrínseca da apoptose. Por outro lado, a ativação da via intrínseca pode ocorrer independentemente da ativação da via extrínseca com a formação do apoptossomo, ativação da caspase-9 que consequentemente ativa a caspase-3 induzindo a morte dessas células como demonstrado com a degradação da procaspase-3.

Figura 10 – Tratamento da célula FaDu para avaliar a indução de ativação das caspase-8, caspase-9 e caspase-3.

A linhagem FaDu foi tratada com 16 nM de PAC, 100 μ M de CIS e a associação PAC+CIS e os lisados celulares foram coletados. A expressão proteica da procaspase-8 (57kDa), procaspase-9 (47kDa), procaspase-3 (35kDa) e como controle utilizamos actina (45kDa) foram detectadas por Western blot em diferentes tempos. Experimento representativo de dois experimentos independentes.

Estes dados nos mostram que as células FaDu tratadas com CIS e PAC+CIS são induzidas à morte por ambas as vias de apoptose, sendo induzidas preferencialmente pela via extrínseca ou pela via intrínseca, estas podem atuar diretamente ou uma ativação indireta da via intrínseca pela via extrínseca, levando a ativação da caspase-9 e consequentemente ativação da caspase-3. O próximo passo foi então avaliar se nessas células tratadas à liberação de citocromo c, que é um dos primeiros eventos da via intrínseca da apoptose.

4.5 Avaliação da perda de potencial de membrana mitocondrial das células da linhagem FaDu tratadas com paclitaxel e cisplatina associadas ou administradas isoladamente

A linhagem celular FaDu após tratamento por 48 horas com PAC, CIS e PAC+CIS foram submetidas a marcação com DiOC₆ para análise da perda de potencial de membrana mitocondrial, em que o aumento da permeabilidade sugere que a morte dessas células é desencadeada através da liberação do citocromo c. As células sem tratamento possuem em seu basal 10,8% de perda de potencial de membrana mitocondrial, já as células tratadas com PAC possuem 27%, o que sugere que essas células estão em processo inicial de indução de morte. Por outro

lado, as células tratadas com CIS e PAC+CIS apresentaram maior perda do potencial de membrana mitocondrial, desencadeando maior indução de morte pela liberação do citocromo c para a formação do apoptossomo que culminará na morte celular dependente da caspase-9 (Fig. 11).

Figura 11 – Despolarização mitocondrial na linhagem celular FaDu induzida pelos tratamentos de paclitaxel e cisplatina.

As células FaDu foram tratadas com 16 nM de PAC, 100 μ M de CIS e a associação PAC+CIS foram avaliadas quanto a perda do potencial de membrana mitocondrial. Os resultados representam dois experimentos independentes, cada um foi realizado em triplicata. ST, sem tratamento.

Esses resultados corroboram os resultados anteriores em que a indução de morte da linhagem celular FaDu pode ser induzida pela via intrínseca com a participação, ou não, da via extrínseca da apoptose, ou, a morte é induzida diretamente pela via extrínseca.

4.6 Avaliação das proteínas pró- e anti-apoptóticas na participação da morte das células FaDu tratadas com paclitaxel e cisplatina associadas ou administradas isoladamente

Para determinar quais proteínas da família BCL-2 estão envolvidas na indução de morte das células FaDu tratadas com PAC e CIS sozinhos ou associados fomos investigar algumas proteínas envolvidas na morte celular por apoptose. As células FaDu foram tratadas com 16 nM de PAC, 100 μ M de CIS e com a associação das duas drogas por 48 horas, após tratamento as células foram coletadas e adicionadas em um tampão de lise para extração das proteínas.

Figura 12 – Tratamento da célula FaDu para avaliar a expressão de proteínas da família BCL-2.

As células FaDu foram tratadas com 16 nM de PAC, 100 μ M de CIS e a associação PAC+CIS e os lisados celulares foram coletados. A expressão proteica de BAX (20kDa), BIM (23kDa), BCL-2 (28kDa), BAK (30kDa), BCL-XL (30kDa), MCL-1 (40kDa) e controle actina (45kDa) foram detectadas por Western blot em diferentes tempos. Experimento representativo de dois experimentos independentes.

O tratamento com CIS e PAC+CIS inibe a expressão da proteína pró-apoptótica BIM bem como diminui ligeiramente a expressão BAX ao contrário do tratamento com PAC que se assemelha ao não tratado. Por outro lado, há um aumento da expressão de BAK nas células tratadas com CIS e PAC+CIS o que sugere que a morte dessas células é mediada pela superexpressão dessa proteína, o mesmo não foi observado com o tratamento de PAC (Fig 12).

O tratamento com PAC reduz a expressão da proteína anti-apoptótica BCL-2 quando comparada com o grupo sem tratamento. No entanto, nos grupos CIS e PAC+CIS não verificamos a expressão dessa proteína. O mesmo é observado para a proteína MCL-1. Já quando avaliado a expressão da proteína BCL-XL nos tratamentos observamos que há uma menor expressão nas células tratadas com CIS e PAC+CIS em relação ao grupo sem tratamento e tratada com PAC.

Esses resultados nos mostram que a morte dessas células após tratamento com CIS e PAC+CIS induzem um aumento da proteína pró-apoptótica BAK e a diminuição das proteínas anti-apoptóticas BCL-2 e MCL-1.

5 DISCUSSÃO

Os tumores de cabeça e pescoço se desenvolvem nas mucosas do trato aerodigestivo superior sendo a sexta maior causa de câncer em todo o mundo. Os fatores de risco relacionados com os tumores são o consumo excessivo de álcool, tabagismo, infecção pelo vírus do HPV e predisposição genética. É uma doença heterogênea distinguida entre tumores HPV-positivo e HPV-negativo, no qual a questão da patogênese dos HNSCC é que os carcinomas se desenvolvem dentro de campos pré-neoplásicos do epitélio da mucosa composta de células geneticamente alteradas e também, há uma alta frequência de recorrência local gerando tumores secundários e metástase à distância. Uma compreensão do processo pelo qual as células tumorais destroem a membrana basal causam invasão e metástases, é essencial para o desenvolvimento de estratégias de tratamento (Leemans et al., 2011; Scanlon et al., 2013). Um dos objetivos da pesquisa sobre o câncer é encontrar drogas que induzam apoptose, e outro é identificar novas combinações de drogas que resultem em uma melhor terapêutica e que diminuam os efeitos adversos (Kotowski et al., 2012).

Com base na literatura, o objetivo desse trabalho foi avaliar a resistência de linhagem celular tumoral derivada de cabeça e pescoço à morte celular induzida por quimioterápicos, comparando e caracterizando as vias e as proteínas de apoptose envolvidas neste processo. A apoptose é essencial para o desenvolvimento embrionário e a homeostasia do tecido, sendo mediada pela ativação das caspases através de sinalização, as quais incluem a via de receptores de morte (extrínseca) e mitocondrial (intrínseca) (Ranjan et al., 2012). As alterações morfológicas observadas no processo de apoptose são a condensação da cromatina, fragmentação nuclear, fragmentação do DNA, formação de pregas na membrana plasmática (*blebbing*). Deste modo, estes sinais são características da morte celular induzida por apoptose e são meios de detectar esse processo (Sasi et al., 2009).

Para investigar se a linhagem tumoral derivada de tumor de cabeça e pescoço é suscetível a indução de apoptose através do tratamento com quimioterápicos, utilizamos a linhagem celular FaDu que foi estabelecida em 1968 através da biópsia da hipofaringe de um paciente Hindu que após exame histológico teve o tumor classificado como carcinoma escamoso de faringe grau II (Rangan, 1972). A cinética de crescimento e viabilidade desta linhagem foi realizada para

traçar um perfil de tratamento, percebemos que sua fase exponencial acontece entre o segundo e terceiro dia de cultura onde seu crescimento se inicia e a viabilidade permanece constante, sendo nestes dias o momento ideal para realizar os tratamentos de indução de morte por estarem em crescimento sem perder sua viabilidade.

Como quimioterápicos utilizamos dois fármacos que são de uso comum na clínica, o paclitaxel (PAC) e a cisplatina (CIS). O PAC foi primeiramente aprovado para o tratamento de câncer de ovário, mas também demonstrou atividade contra o HNSCC. Um dos maiores obstáculos é a resistência do tumor ao tratamento. A atividade biológica do PAC é baseada na habilidade de inibir a despolimerização dos microtúbulos, parando essas células na fase G2/M induzindo assim a morte por apoptose, esse mecanismo quando induzido pelo tratamento com PAC envolve a sinalização por FAS/FASL, por proteínas da família BCL-2 e caspase-3 (Ma et al., 2011).

Por outro lado, a quimioterapia baseada na CIS é comumente utilizada no tratamento paliativo de HNSCC. Entretanto, um número limitado de pacientes é beneficiado com o tratamento com CIS, outros pacientes são resistentes a essa terapia e alguns morrem pela toxicidade do tratamento (Yang et al., 2012). Para definir qual a melhor dose a ser usada neste trabalho, realizamos uma curva com diferentes concentrações dos quimioterápicos em 48 horas de tratamento. Como mostrado na figura 6, a linhagem celular FaDu é mais resistente ao tratamento com PAC no entanto, a medida em que a concentração da droga foi aumentada houve um aumento proporcional da morte que não ultrapassou os 30%. Esse resultado permaneceu quando avaliamos a porcentagem de células positivas para Anexina quanto, a porcentagem de núcleos hipodiplóides.

Quando a linhagem celular FaDu foi submetida ao tratamento com CIS esta se mostrou mais sensível, as três primeiras doses testadas apresentaram similaridade tanto na avaliação por Anexina V quanto nos núcleos hipodiplóides, esse último é responsável por avaliar o quanto o DNA da célula tratada está fragmentado sendo um dos eventos tardios da apoptose. Entretanto, as concentrações de 100 e 200 μM apresentaram resultados semelhantes na avaliação de Anexina V, no entanto, quando verificamos o quanto de DNA destas células estava fragmentado percebemos que a dose de 100 μM está em 53% e a de 200 μM 85% mostrando que há uma maior indução de morte na última concentração

testada. Com os dados obtidos escolhemos as concentrações de 16 nM de PAC e 100 μ M de CIS para os experimentos.

Dados da literatura corroboram os resultados encontrados quanto a resistência da linhagem FaDu aos tratamentos de indução de morte. Yu-Chin Lin e colaboradores utilizaram o dasatinib, um inibidor do gene mutado da leucemia mieloide crônica (bcr-abl), *in vitro*. O dasatinib, além da eficácia no tratamento de leucemia, também, tem demonstrado ser eficiente em tumores sólidos. Este grupo de pesquisadores avaliaram a indução de apoptose em linhagens celulares de HNSCC tratadas com dasatinib, dentre elas a linhagem celular FaDu. Após 48 horas de tratamento, observaram a degradação do EGFR (*epidermal growth factor receptor*) e classificaram a linhagem celular FaDu como sendo uma célula resistente a esse tratamento (Lin et al., 2012).

Nossos resultados também mostraram que a linhagem celular FaDu é resistente ao tratamento com PAC, porém sensível ao tratamento com CIS. No entanto, ao associarmos os quimioterápicos, não houve potencialização da morte. Sugere-se que a morte observada da linhagem FaDu ocorra em virtude da sensibilidade dessas células ao tratamento com CIS, não havendo participação aparente do PAC. Quando avaliamos a indução de morte destas células vimos que apenas 13,9% das células tratadas com PAC foram sensíveis ao tratamento, já o tratamento com CIS a porcentagem foi de 69,7% e a associação de 71,5%. Era esperado que houvesse um aumento significativo entre o tratamento associado em relação às drogas isoladas, porém, isso não ocorreu no tempo e concentrações utilizadas.

A literatura mostra que células tumorais tratadas com PAC e CIS induzem a morte via apoptose, mas quais vias estão envolvidas neste processo? Para responder essa pergunta Hsiao e colaboradores trataram linhagens celulares de HNSCC com PAC na presença ou não de um inibidor geral das caspases (Z-VAD-FMK) por 48 horas e confirmaram que à medida que se bloqueia as vias de caspases essas células tratadas não são induzidas a morte (Hsiao et al., 2009). Esse resultado foi semelhante ao encontrado em nosso estudo, em que utilizamos outro inibidor geral de caspase (Q-VD-OPH) e como esperado houve uma proteção na morte induzida por apoptose. Os resultados do nosso trabalho e do grupo de Hsiao confirmam que há o envolvimento das caspases na indução de morte por apoptose das células tratadas.

Identificada a participação das caspases no processo de apoptose, das células FaDu tratadas com PAC, CIS e a associação nos perguntamos, por qual via essa morte é mais predominante. Ao inibirmos especificamente as caspases iniciadoras relevantes no processo de apoptose, caspase-8 (via extrínseca) e caspase-9 (via intrínseca) os dados sugerem que, o tratamento com PAC não sofre alteração mantendo um perfil de morte basal quando há a inibição das caspases-8 e -9.

Por outro lado, quando bloqueado a via da caspase-8 há uma maior proteção nas células tratadas com CIS e PAC+CIS confirmando que é uma morte preferencialmente dependente da via extrínseca da apoptose. Em contrapartida, há uma proteção menor, porém significativa quando utilizado o inibidor da caspase-9, sugerindo que a linhagem celular FaDu apresenta características de uma célula do tipo II que tem a sua indução de morte via receptor de morte com a participação da via intrínseca de apoptose.

Surpreendentemente a nível proteico há uma maior ativação da caspase-9 nas células tratadas com CIS e PAC+CIS, isso pode ocorrer devido ao fato da via extrínseca poder ativar a via intrínseca através de uma proteína da família BCL-2, BID. Essa proteína após ativação migra para a mitocôndria e faz com que ative BAX e BAK para que formem poros na membrana mitocondrial para liberação do citocromo c, formação do apoptossomo e ativação da caspase-9 desencadeando a apoptose.

A dimerização de BAX e BAK na membrana mitocondrial resulta na alteração de seu potencial de membrana, produção de espécies reativas de oxigênio, e consequentemente a liberação do citocromo c, o qual é responsável por ativar a via intrínseca de apoptose (Gross et al., 1999). Quando avaliado essa perda de potencial de membrana mitocondrial notamos que a morte da linhagem FaDu tratada com CIS e PAC+CIS poderia estar liberando citocromo c para a formação do apoptossomo e ativação da caspase-9 independente de qual via de apoptose foi desencadeada primeiro.

A modulação da apoptose depende da interação das proteínas anti- e pró-apoptóticas da família BCL-2, uma vez que haja a modulação dessas proteínas a célula é induzida a morte. O BCL-XL é uma proteína anti-apoptótica que bloqueia a morte celular programada, está normalmente expressa em HNSCC. No entanto, altas expressões de BCL-XL esta associada com a resistência dos tumores de

cabeça e pescoço ao tratamento com CIS. Pacientes que apresentam tumor de laringe com baixo nível de expressão de BCL-XL possuem um melhor prognóstico do que os que expressam altos níveis (Bauer et al., 2007).

Um estudo clínico de Bauer e colaboradores mostraram que pacientes com tumor de orofaringe que expressam baixos níveis de p53 e altos níveis de BCL-XL (risco alto) possuem uma baixa sobrevivência em relação aos tumores com elevados níveis de p53 (risco intermediário) e tumores com baixos níveis de p53 e baixos níveis de BCL-XL (risco baixo). Esses resultados sugeriram que HNSCC caracterizado por apresentar baixos níveis de p53 e altos níveis de BCL-XL são resistentes a CIS e que pacientes com esse tipo de diagnóstico possui um pior prognóstico (Bauer et al., 2007). Para verificar se a linhagem estudada era semelhante à condição clínica de pacientes verificamos o perfil de proteínas pro- e anti-apoptóticas da família BCL-2. A linhagem FaDu apresenta altas concentrações de BAX, MCL-1 e baixa expressão de BIM, BAK, BCL-2 e BCL-XL.

Quando a linhagem FaDu foi submetida ao tratamento com PAC, o perfil de expressão proteica não se alterou apenas houve uma pequena diminuição da proteína anti-apoptótica BCL-2. Entretanto, quando a linhagem FaDu foi tratada com CIS e PAC+CIS houve um aumento da expressão da proteína BAK que é uma das proteínas responsáveis por induzir a morte, com esse resultado nossa hipótese é de que essa proteína seja a responsável por induzir a morte nas células tratadas com CIS, uma vez que, a associação das drogas não altera esse perfil. Curiosamente, houve uma diminuição da expressão da proteína BIM que necessita de um estudo mais aprofundado para verificar seus mecanismos de modulação em HNSCC.

Como a elevada expressão da proteína anti-apoptótica BCL-XL é importante para que o tumor de HNSCC se torne resistente ao tratamento com CIS. Verificar se essa proteína é modulada no tratamento com os quimioterápicos PAC, CIS e PAC+CIS na linhagem celular FaDu foi importante para nosso estudo. Ao realizar o tratamento com PAC, CIS e a associação visto que, há uma diminuição na expressão de BCL-XL nas células tratadas com CIS que a modulação de BCL-XL no tratamento com PAC não é alterada e curiosamente, quando associamos as drogas ocorre uma ligeira diminuição comparada ao tratamento apenas com CIS. Esse resultado foi importante em nosso estudo, pois confirmamos que a linhagem celular FaDu é sensível ao tratamento com CIS e esse tratamento induz uma diminuição da expressão de BCL-XL aumentando assim a morte dessas células.

Outras proteínas apoptóticas envolvidas na modulação dos HNSCC são as proteínas inibidoras de apoptose (IAPs) que representam importantes moduladores endógenos que modulam funções biológicas que incluem, inibir ou se ligar a caspases. Um dos mais potentes IAPs é o XIAP que pode se ligar diretamente as caspases e inibir ambas as vias de apoptose. Estudos recentes *in vitro* relatam que o XIAP pode causar resistência em células tumorais quando expostas a estímulos apoptóticos, incluindo a quimioterapia. Há uma relação forte entre a expressão dos níveis de XIAP no prognóstico de pacientes com HNSCC avançado. Baixos níveis da expressão do XIAP estão correlacionados com uma resposta à quimioterapia e um prognóstico favorável enquanto, altas expressões de XIAP podem ser relacionadas com um prognóstico ruim e consequentemente um resultado falho na quimioterapia (Yang et al., 2012).

Entender os mecanismos que causam a resistência dos tumores de cabeça e pescoço é essencial para uma resposta mais eficiente ao tratamento quimioterápico. Sendo assim, um estudo mais aprofundado da modulação das proteínas apoptóticas que causam a resistência das células tumorais a quimioterapia é fundamental para um direcionamento do tratamento e, consequentemente, um prognóstico favorável aos pacientes com esse tipo de tumor.

6 CONCLUSÃO

Concluimos que a linhagem celular FaDu é resistente ao tratamento com paclitaxel, no tempo e concentrações testadas, sendo o tratamento com cisplatina mais eficiente. A associação das drogas não potencializou a morte, que manteve o perfil semelhante ao tratado com a cisplatina isolada.

O tratamento com cisplatina induz a morte por ambas as vias de apoptose, preferencialmente, pela via extrínseca que pode induzir a morte diretamente ou através da ativação da via intrínseca da apoptose. A indução da morte através do tratamento com cisplatina acontece pelo aumento da expressão da proteína BAK e a diminuição da expressão das proteínas BCL-2 e BCL-XL.

REFERÊNCIAS*

- Adam-Klages S, Adam D, Janssen O, et al. Death receptors and caspases: role in lymphocyte proliferation, cell death, and autoimmunity. *Immunol Res.* 2005;33(2):149-66.
- Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science.* 1998; 281(5381):1322-6.
- Almeida VL, Leitão A, Reina BCL, et al. Cancer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química. Nova.* 2005;28(1):118-29.
- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell.* 1996; 87(2):171.
- Amarante-Mendes GP, Green DR. The regulation of apoptotic cell death. *Braz J Med Biol Res.* 1999;32(9):1053-61.
- Andersen M H, Becker CJ, Straten P. Regulators of apoptosis: suitable targets for immune therapy of cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 4(5):399-409.
- Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science.* 1998;281(5381):1305-8.
- Basu A, Krishnamurthy S. Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage. *J Nucleic Acids* 2010.
- Bauer JA, Kumar B, Cordell KG, et al. Targeting apoptosis to overcome cisplatin resistance: a translational study in head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007;69(2 Suppl):S106-8.
- Boxem M. Cyclin-dependent kinases in *C. elegans*. *Cell Div.* 2006;1:6.
- Braakhuis BJ, Brakenhoff RH, Leemans CR, et al. Treatment choice for locally advanced head and neck cancers on the basis of risk factors: biological risk factors. *Ann Oncol.* 2012;23Suppl 10:x173-7.
- Bruce WR, Lin H. An empirical cellular approach to the improvement of cancer chemotherapy. *Cancer Res.* 1969;29(12):2308-13.
- Brumatti G, Weinlich R, Chehab CF, et al. Comparison of the anti-apoptotic effects of Bcr-Abl, Bcl-2 and Bcl-x(L) following diverse apoptogenic stimuli. *FEBS Lett.* 2003;541(1-3):57-63.
- Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999;15:269-90.

*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Chen KJ, Chen WY, Chen X, et al. Increased elimination of paclitaxel by magnesium isoglycyrrhizinate in epithelial ovarian cancer patients treated with paclitaxel plus cisplatin: a pilot clinical study. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2013.

Chen L, Park SM, Tumanov AV, et al. CD95 promotes tumour growth. *Nature*. 2010;465(7297):492-6.

Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, et al. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*. 1995;81(4):505-12.

Colombo J, Rahal P. Alterações genéticas em cancer de cabeça e pescoço. *Rev brasileira de cancerologia*. 2009;55(2):165-74.

Coultas L, Huang DCS, Adams JM, et al. Pro-apoptotic BH3-only Bcl-2 family members in vertebrate model organisms suitable for genetic experimentation. *Cell Death Differ*. 2002;9(11):1163-6.

Du C, Fang M, Li Y, et al. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 2000;102(1):33-42.

Duvall E, Wyllie AH, Morris RG. Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). *Immunology*. 1985;56(2):351-8.

Festjens N, Cornelis S, Lamkanfi M, et al. Caspase-containing complexes in the regulation of cell death and inflammation. *Biol Chem*. 2006;387(8):1005-16.

Funato M, Fukao T, Sasai H, et al. Paclitaxel-based chemotherapy for aggressive kaposiform hemangioendothelioma of the temporomastoid region: Case report and review of the literature. *Head Neck*. 2012.

Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*. 2012;31(15):1869-83.

Gao J, Panizza B, Johnson NW, et al. Basic consideration of research strategies for head and neck cancer. *Front Med*. 2012;6(4):339-53.

Giam M, Huang DC, Bouillet P. BH3-only proteins and their roles in programmed cell death. *Oncogene*. 2008;27 Suppl 1:S128-36.

Grivicich I, Regner A, Rocha AB. Morte celular por apoptose. *Rev brasileira de cancerologia*. 2007;53(3):335-43.

Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*. 1999;13(15):1899-1911.

Guia farmacoterapêutico; p. 204 e 235. [cited from 18 jun. 2013;]. Disponível em: http://www.erastogaertner.com.br/arquivos/farmacia/guia_farmaco_web.pdf

Hackenberg S, Scherzed A, Harnisch W, et al. Antitumor activity of photo-stimulated zinc oxide nanoparticles combined with paclitaxel or cisplatin in HNSCC cell lines. *J Photochem Photobiol B*. 2012;114:87-93.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000;407(6805):770-6.

Hsiao JR, Leu SF, Huang BM. Apoptotic mechanism of paclitaxel-induced cell death in human head and neck tumor cell lines. *J Oral Pathol Med*. 2009;38(2):188-197.

Hu W, Wang F, Tang J, et al. Proapoptotic protein Smac mediates apoptosis in cisplatin-resistant ovarian cancer cells when treated with the anti-tumor agent AT101. *J Biol Chem*. 2012;287(1):68-80.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). TNM: classificação de tumores malignos; 6. ed. 2004. p. 29. [cited from 18 jun. 2013]. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/tratamento/tnm/tnm2.pdf>

Instituto Nacional do Câncer (INCA). [cited from 18 jun. 2013]. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/laringe>

Johnstone RW, Frew AJ, Smyth MJ. The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(10):782-98.

Kaufmann T, Strasser A, Jost PJ. Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell Death Differ*. 2012;19(1):42-50.

Kemper K, Rodermond H, Colak S, et al. Targeting colorectal cancer stem cells with inducible caspase-9. *Apoptosis*. 2012;17(5):528-37.

Koberle B, Tomicic MT, Usanova S, et al. Cisplatin resistance: preclinical findings and clinical implications. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1806(2):172-82.

Korsmeyer SJ. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res*. 1999;59(7 Suppl):1693s-1700s.

Kotowski U, Heiduschka G, Brunner M, et al. Arsenic trioxide enhances the cytotoxic effect of cisplatin in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Oncol Lett*. 2012;3(6):1326-30.

Kutuk O, Letai A. Alteration of the mitochondrial apoptotic pathway is key to acquired paclitaxel resistance and can be reversed by ABT-737. *Cancer Res*. 2008;68(19):7985-94.

Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH, et al. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(1):9-22.

Leite ICG, Nunes LC, Moreira RC, et al. Mortalidade por cancer de boca e faringe em cidade de médio porte da região sudeste do Brasil, 1980-2005. *Rev brasileira de cancerologia*. 2010;56(1):17-23.

Levy-Nissenbaum E, Khan W, Pawar RP, et al. Pharmacokinetic and efficacy study of cisplatin and paclitaxel formulated in a new injectable poly(sebacic-co-ricinoleic acid) polymer. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012;82(1):85-93.

Lin YC, Wu MH, Wei TT, et al. Degradation of epidermal growth factor receptor mediates dasatinib-induced apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma Cells. *Neoplasia.* 2012;14(6):463-75.

Liu J, Uematsu H, Tsuchida N, et al. Essential role of caspase-8 in p53/p73-dependent apoptosis induced by etoposide in head and neck carcinoma cells. *Mol Cancer.* 2011;10:95.

Logue SE, Martin SJ. Caspase activation cascades in apoptosis. *Biochem Soc Trans.* 2008;36(Pt 1):1-9.

Ma J, Lu S, Yu L, et al. FaDu cell characteristics induced by multidrug resistance. *Oncol Rep.* 2011;26(5):1189-95.

Mao L, Hong WK, Papadimitrakopoulou VA. Focus on head and neck cancer. *Cancer Cell.* 2004;5(4):311-6.

Nimmanapalli R, Perkins CL, Orlando M, et al. Pretreatment with paclitaxel enhances apo-2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of prostate cancer cells by inducing death receptors 4 and 5 protein levels. *Cancer Res.* 2001;61(2):759-63.

Odoux C, Albers A, Amoscato AA, et al. TRAIL, FasL and a blocking anti-DR5 antibody augment paclitaxel-induced apoptosis in human non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer.* 2002;97(4):458-65.

Ota I, Okamoto N, Yane K, et al. Therapeutic strategies for head and neck cancer based on p53 status. *Exp Ther Med.* 2012;3(4):585-91.

Panchagnula R. Pharmaceutical aspects of paclitaxel. *International Journal of Pharmaceutics.* 1998;172:1-15.

Pereira WO, Amarante-Mendes GP. Apoptosis: a programme of cell death or cell disposal?. *Scand J Immunol.* 2011;73(5):401-7.

Pergolizzi S, Santacaterina A, Adamo B, et al. Induction chemotherapy with paclitaxel and cisplatin to concurrent radiotherapy and weekly paclitaxel in the treatment of loco-regionally advanced, stage IV (M0), head and neck squamous cell carcinoma. Mature results of a prospective study. *Radiat Oncol.* 2011;6:162.

Rangan SR. A new human cell line (FaDu) from a hypopharyngeal carcinoma. *Cancer.* 1972;29(1):117-21.

Ranjan K, Surolia A, Pathak C. Apoptotic potential of Fas-associated death domain on regulation of cell death regulatory protein cFLIP and death receptor mediated apoptosis in HEK 293T cells. *J Cell Commun Signal.* 2012;6(3):155-68.

Rao SD, Fury MG, Pfister DG, et al. Molecular-targeted therapies in head and neck cancer. *Semin Radiat Oncol*. 2012;22(3):207-13.

Rodriguez-Antona C. Pharmacogenomics of paclitaxel. *Pharmacogenomics*. 2010;11(5):621-3.

Roth W, Wagenknecht B, Grimm C, et al. Taxol-mediated augmentation of CD95 ligand-induced apoptosis of human malignant glioma cells: association with bcl-2 phosphorylation but neither activation of p53 nor G2/M cell cycle arrest. *Br J Cancer*. 1998;77(3):404-11.

Sasi N, Hwang M, Jaboin J, et al. Regulated cell death pathways: new twists in modulation of BCL2 family function. *Mol Cancer Ther*. 2009;8(6):1421-9.

Sociedade Brasileira de Cancerologia (Sbcancer). [cited from 18 jun. 2013]. Disponível em: http://www.sbcancer.org.br/home2/site/index.php?option=com_content&view=article&id=114:cancer-de-cabeca-e-pescoco&catid=29:artigos-sobre-cancer&Itemid=123.

Scanlon CS, Van Tubergen EA, Inglehart RC, et al. Biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma. *J Dent Res*. 2013;92(2):114-21.

Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell*. 2002;9(3):459-70.

Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*. 2003;22(47):7265-79.

Strasser A. The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(3):189-200.

Ulukaya E, Acilan C, Yilmaz Y, et al. Apoptosis: why and how does it occur in biology?. *Cell Biochem Funct*. 2011;29(6):468-80.

Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell*. 1999;96(2):245-54.

Wilson L, Jordan MA. New microtubule/tubulin-targeted anticancer drugs and novel chemotherapeutic strategies. *J Chemother*. 2004;16Suppl 4:83-5.

Wyllie AH. "Where, O death, is thy sting?" A brief review of apoptosis biology. *Mol Neurobiol*. 2010;42(1):4-9.

Yang XH, Feng ZE, Yan M, et al. XIAP is a predictor of cisplatin-based chemotherapy response and prognosis for patients with advanced head and neck cancer. *PLoS One*. 2012;7(3):e31601.

Yoo GH, Washington J, Piechocki M, et al. Progression of head and neck cancer in an in vitro model. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2000;126(11):1313-18.

Zhao L, He F, Liu H, et al. Natural diterpenoid compound elevates expression of Bim protein, which interacts with antiapoptotic protein Bcl-2, converting it to proapoptotic Bax-like molecule. *J Biol Chem*. 2012;287(2):1054-65.

Zhou J, Giannakakou P. Targeting microtubules for cancer chemotherapy. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 2005;5(1):65-71.