

BRUNA LORENCINI DA SILVA

**O EFEITO DE TRITERPENOS QUINONAMETÍDEOS SOBRE
A REGULAÇÃO DE microRNAs ASSOCIADOS COM
PROLIFERAÇÃO E APOPTOSE NO CÂNCER DE CABEÇA E
PESCOÇO**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT,
para obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia

São Paulo
2016

BRUNA LORENCINI DA SILVA

**O efeito de triterpenos quinonametídeos sobre a
regulação de microRNAs associados com proliferação
e apoptose no câncer de cabeça e pescoço**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT,
para obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador(a): Dra. Patrícia Severino

Versão original

São Paulo
2016

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Lorencini da Silva, Bruna

O efeito de triterpenos quinonametídeos sobre a
regulação de microRNAs associados com proliferação e
apoptose no câncer de cabeça e pescoço / Bruna
Lorencini da Silva; orientadora Patrícia Severino. -
- São Paulo, 2016.

87 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço.
2. Regulação de microRNAs. 3. Compostos isolados
de plantas. I. Severino, Patrícia, orientador.
II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Bruna Lorencini da Silva

Título da Dissertação: O efeito de triterpenos quinonametídeos sobre a regulação de microRNAs associados com proliferação e apoptose no câncer de cabeça e pescoço

Orientador(a): Dra. Patrícia Severino

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° 682/14 referente ao projeto intitulado: “*O efeito de triterpenos de origem vegetal sobre a regulação de microRNAs associados com proliferação e apoptose no câncer de cabeça e pescoço*” sob a responsabilidade de **Bruna Lorencini da Silva**, 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°466 de 2012.

São Paulo, 21 de agosto de 2014.

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

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

“Às vezes precisamos
morrer um pouco por
dentro para que então
possamos renascer...

... e crescer mais fortes
e sábios, numa nova
versão de nós mesmos.”

Rodrigo de Abreu

**A meus queridos pais Selma e José,
pelo apoio incondicional, pelo amor inestimável
e por nunca me deixarem desistir.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram para este trabalho e principalmente aqueles que contribuíram para o meu crescimento pessoal. A Deus, pois sem ele nada é possível. A minha família que inúmeras vezes vieram a São Paulo para me amparar e nunca me permitiram desistir. Aos meus amados pais, Selma e José e ao meu irmão Filipe por sempre se fazerem presentes em minha vida. A minha orientadora Patrícia, por todo o ensinamento e por compreender e me apoiar nos momentos difíceis. A minha co-orientadora Camila, por todo o aprendizado e companheirismo. Aos meus queridos amigos do laboratório Ísis, Évellyn, Larissa, Bruno, Aline, Ana Paula, Elisangela e Eliéser pelos conselhos e carinho. As minhas queridas vizinhas Mary e Carine por me amparem e sempre se mostrarem presentes e dispostas a me ajudar.

Aos ex-colegas de trabalho Flávia e Jean por todo o suporte e aprendizado, as novas integrantes do grupo, Bárbara, Mariana e Raphaela, ou também conhecidas como as Brunets, meu apelido carinhoso a essas pessoas maravilhosas. Não poderia deixar de agradecer a técnica do laboratório Marta, que além de excelente profissional se mostrou uma grande amiga.

As secretárias da pós-graduação de Biotecnologia/USP, Fábía e Eliane, pela atenção, dedicação, paciência e claro pelo bom-humor.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

A equipe Albert Einstein e principalmente do Instituto de Ensino e Pesquisa pelo acolhimento e aprendizado. A todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho.

“Se eu pudesse deixar algum presente a você, deixaria aceso o sentimento de amar a vida dos seres humanos. A consciência de aprender tudo o que foi ensinado pelo tempo afora. Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais se repetissem. A capacidade de escolher novos rumos. Deixaria para você, se pudesse, o respeito aquilo que é indispensável. Além do pão, o trabalho. Além do trabalho, a ação. E, quando tudo mais faltasse, um segredo: o de buscar no interior de si mesmo a resposta e a força para encontrar a saída.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

SILVA, B. L. **O efeito de triterpenos quinonametídeos sobre a regulação de microRNAs associados com proliferação e apoptose no câncer de cabeça e pescoço.** 2016. 87 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2016.

Um dos tipos de câncer mais frequente no mundo é o carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP), o qual está principalmente associado ao uso abusivo de tabaco e álcool. Apesar dos avanços nos tratamentos cirúrgicos e radioterápicos, mais de 50% dos pacientes com CECP são acometidos por recidiva em 2 anos após tratamento, e a taxa de mortalidade é uma das mais altas dentre os tumores mais incidentes. A dificuldade de resposta eficiente aos tratamentos está relacionada à complexidade molecular deste tumor. A regulação realizada por pequenas moléculas de RNA não codificantes de proteínas, denominadas microRNAs, também contribui para esta complexidade. MicroRNAs regulam uma parte significativa dos genes humanos, dentre os quais genes responsáveis por controlar proliferação e apoptose, caracterizando seu papel na progressão tumoral e resistência a quimioterápicos. O entendimento sobre como moléculas com ação antineoplásica atuam sobre a regulação de microRNAs pode contribuir para a compreensão de resultados terapêuticos. Neste estudo avaliamos a ação de dois triterpenos quinonametídeos, maitenina e 22- β -hidroximaitenina, compostos isolados a partir da planta brasileira *Maytenus ilicifolia*, sobre a regulação de microRNAs associados com proliferação e apoptose em CECP. O efeito destas moléculas foi avaliado frente a linhagens tumorais derivadas de CECP e em queratinócitos orais derivados de cultura primária livres de tumor. Observou-se maior sensibilidade das células derivadas de tumor quando comparadas aos queratinócitos. Por análise utilizando microarranjos de DNA observou-se que a maitenina altera a expressão de 101 microRNAs em SCC25 após 24 horas de tratamento. Dentre estes microRNAs, 15 haviam sido previamente associados com a proliferação celular e apoptose em CECP. O microRNA miR-196b apresentou maior regulação de expressão. Este resultado foi confirmado em duas outras linhagens derivadas de CECP, e observou-se ainda efeito semelhante para a 22- β -hidroximaitenina. Os resultados indicam que os dois triterpenos quinonametídeos avaliados reduzem eficazmente a viabilidade das células do câncer de cabeça e pescoço e a regulação de microRNAs faz parte dos mecanismos envolvidos neste efeito.

Palavras-chave: 22- β -hidroximaitenina. Maitenina. Cavidade oral. Orofaringe. Queratinócitos.

ABSTRACT

SILVA, B. L. **The effect of triterpenoids quinonamethide on the regulation of microRNAs associated with proliferation and apoptosis in head and neck cancer.** 2016. 87 p. Dissertation (Master thesis in Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2016.

Head and neck squamous cell carcinoma of head and neck (HNSCC) is one of the most frequent cancer types in the world. It is mainly associated with the abuse of tobacco and alcohol. Despite advances in surgical and radiotherapy treatments, more than 50% of patients with HNSCC are affected by relapse within 2 years after treatment, and the mortality rate is one of the highest among the most incidents tumors. The difficulty of effective response to treatment is related to the molecular complexity of this tumor. The regulation performed by microRNAs small non-coding RNA molecules, also adds to this complexity. MicroRNAs regulate a significant proportion of human genes, among which genes involved in cell growth and apoptosis, characterizing an important role in tumor progression. The comprehension of how anticancer molecules interfere with microRNA expression should contribute to the understanding of treatment outcome. This study evaluated the effect of two quinonamethide triterpenoids, maytenin and 22- β -hidroxymaytenin, compounds isolated from the Brazilian plant *Maytenus ilicifolia*, on the regulation of microRNAs associated with proliferation and apoptosis in HNSCC. The effect of these molecules was evaluated in tumor cell lines derived from HNSCC and oral keratinocytes derived from primary tumor-free culture. A higher sensitivity of tumor-derived cells as compared to keratinocytes was observed. It was found that maitenin regulated the expression of 101 microRNAs, of which 15 had been previously associated with cell proliferation and apoptosis in HNSCC. MicroRNA-196b was the most regulated upon a 24h treatment of SCC25 cell line. This effect was confirmed in two additional HNSCC cell lines and a similar result was observed for 22- β -hidroxymaytenin. Taken together the results show that the two triterpenoids quinonamethide studied here effectively reduced cell viability of HNSCC-derived cell lines and that microRNA regulation is one of the mechanisms involved in this effect.

Keywords: 22- β -hidroxymaytenin. Maytenin. Oral cavity. Oropharynx. Keratinocytes.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Anatomia do carcinoma de cabeça e pescoço; A (Anatomia geral de CECP); B (Anatomia dos seios paranasais); C (Anatomia da cavidade oral); D (Anatomia da laringe)..... 18
- Figura 2-** Tamanho dos tumores comparado com os tamanhos de ervilha, amendoim, noz e limão 21
- Figura 3-** Biogênese do microRNAs 28
- Figura 4-** Fórmula estrutural, molecular, e massa molecular de Maitenina 34
- Figura 5-** Fórmula estrutural, molecular, e massa molecular de 22- β -hidroximaitenina 34
- Figura 6-** Esquema representativo do experimento de padronização do cultivo das linhagens celulares pelo método MTT37
- Figura 7-** Esquema representativo do experimento de padronização do cultivo dos queratinócitos orais normais por contagem celular 38
- Figura 8-** MTT. Transformação do MTT em Formazan 39
- Figura 9-** Câmara de Neubauer 40
- Figura 10-** Perfil de crescimento das culturas celulares ao longo do tempo, contados a partir do período de plaqueamento. a) SCC-9; b) SCC-25, c) FaDu e d) queratinócitos orais não tumorais. Para as linhagens celulares o perfil de crescimento foi avaliado pela absorbância em 570 nm transformados em LN (logaritmo natural) enquanto que para os queratinócitos foi pelo número de células/mL transformados em LN (logaritmo natural). Barra de erro = erro padrão. 48
- Figura 11-** IC₅₀ dos triterpenos (maitenina e 22- β -hidroximaitenina) após 24 horas de tratamento para as linhagens tumorais (SCC-9; SCC-25 e FaDu). Houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Barra de erro = erro padrão. Teste ANOVA 2 fatores e p valor corrigido por Bonferroni * $p < 0,05$ 49
- Figura 12-** IC₅₀ dos triterpenos (maitenina e 22- β -hidroximaitenina) após 24 horas de tratamento para as linhagens tumorais (SCC-9; SCC-25 e FaDu) e queratinócitos orais normais derivados de cultura primária. Houve diferença estatística significativa ($p < 0,001$) entre as linhagens tumorais (SCC-9; SCC-25; FaDu) e os queratinócitos orais não tumorais tratados com maitenina, ($p < 0,001$) entre as linhagens tumorais (SCC-9; SCC-25; FaDu) e os queratinócitos orais não tumorais tratados com 22- β -hidroximaitenina e ($p < 0,001$) entre os tratamentos. Barra de erro = erro padrão. Teste ANOVA 2 fatores e p valor corrigido por Bonferroni. *** $p < 0,001$ 51
- Figura 13-** Índice de seletividade para as substâncias maitenina, 22- β -hidroximaitenina e cisplatina em linhagens tumorais (SCC-9; SCC-25 e FaDu) avaliadas em relação aos queratinócitos orais normais derivados de cultura primária. Houve diferença estatística significativa entre os tratamento de 22- β -hidroximaitenina e cisplatina para a linhagem SCC-9 ($p < 0,01$) e entre os tratamento de maitenina e cisplatina para SCC-9 ($p < 0,05$). Barra de erro = erro padrão. Teste ANOVA 2 fatores e p valor corrigido por Bonferroni. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$... 52
- Figura 14-** Viabilidade da linhagem SCC9 analisada pelo método MTT. As células foram submetidas ao tratamento com 2 μ M de maitenina e 2 μ M de 22- β -hidroximaitenina por 6, 24, 48 e 72 horas. Houve diferença estatística significativa ($p < 0,001$) entre os tratamentos de 6 e 24 horas, 6 e 48 horas, 6 e 72 horas e entre 24 e 48 horas e 24 e 72 horas. Teste ANOVA 2 fatores e p valor corrigido por Bonferroni. *** $p < 0,001$ 53

- Figura 15-** Viabilidade da linhagem SCC25 analisada pelo método MTT. As células foram submetidas ao tratamento com 2µM de maitenina e 2 µM de 22-β-hidroximaitenina por 6, 24, 48 e 72 horas. Houve diferença estatística significativa ($p < 0,001$) entre o tratamento com maitenina de 6 e 24 horas, 6 e 48 horas, 6 e 72 horas e entre 24 e 48 horas e 24 e 72 horas. Com relação ao tratamento com 22-β-hidroximaitenina houve diferença estatística significativa ($p < 0,01$) entre 24 e 48 horas e 24 e 72 horas. Barra de erro = erro padrão. Teste ANOVA 2 fatores e p valor corrigido por Bonferroni.....54
- Figura 16-** Viabilidade da linhagem FaDu analisada pelo método MTT. As células foram submetidas ao tratamento com 2 µM de maitenina e 3 µM de 22-β-hidroximaitenina por 6, 24, 48 e 72 horas. Houve diferença estatística significativa ($p < 0,001$) entre os tratamentos de 6 e 24 horas, 6 e 48 horas, 6 e 72 horas e entre 24 e 48 horas e 24 e 72 horas e ($p < 0,05$) entre 48 e 72 horas. Teste ANOVA 2 fatores e p valor corrigido por Bonferroni. *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$ 55
- Figura 17-** Viabilidade de queratinócitos orais normais derivados de cultura primária pelo método MTT. As células foram submetidas ao tratamento com 6µM de maitenina e 11 µM de 22-β-hidroximaitenina por 24, 48 e 72 horas. Não houve diferença estatística significativa entre os tempos dos tratamentos. Barra de erro = erro padrão. Teste ANOVA 2 fatores e p valor corrigido por Bonferroni..... 56
- Figura 18-** Perfil morfológico das linhagens derivadas de CECP após 6 horas de tratamento. A: SCC-9, B: FaDu, C: SCC-25; 1: controle, 2: maitenina, 3: 22-β-hidroximaitenina. (As linhagens SCC-9, FaDu e SCC-25 foram submetidas ao tratamento com 2; 2 e 2 µM de maitenina respectivamente e 2; 3 e 2 µM de 22-β-hidroximaitenina respectivamente) 5×10^3 células/poço. Imagens obtidas com microscópio óptico FSX-100 (Olympus®), aumento de 10x.....57
- Figura 19-** Perfil morfológico das linhagens derivadas de CECP após 24 horas de tratamento. A: SCC-9, B: FaDu, C: SCC-25; 1: controle, 2: maitenina, 3: 22-β-hidroximaitenina (As linhagens SCC-9, FaDu e SCC-25 foram submetidas ao tratamento com 2; 2 e 2 µM de maitenina respectivamente e 2; 3 e 2 µM de 22-β-hidroximaitenina respectivamente). 5×10^3 células/poço. Imagens obtidas com microscópio óptico FSX-100 (Olympus®), aumento de 10x 58
- Figura 20-** Perfil morfológico de queratinócitos orais não tumorais após 24 horas de tratamento 1: controle, 2: maitenina, 3: 22-β-hidroximaitenina (Os queratinócitos orais foram submetidas ao tratamento com 6 µM de maitenina e 12 µM de 22-β-hidroximaitenina) $1,5 \times 10^4$ células/poço. Imagens obtidas com microscópio óptico FSX-100 (Olympus®), aumento de 10x 59
- Figura 21-** Seleção de microRNAs que demonstraram alteração significativa na expressão entre o células tratadas como maitenina e células não tratadas identificados por *microarray* e relacionados com o iGrowth e proliferação e apoptose segundo a literatura 60
- Figura 22-** Alvos validados envolvidos com proliferação e apoptose com base no DIANA-TarBase v7.0. Azul: genes envolvidos apenas com apoptose, roxo: genes envolvidos apenas em proliferação e preto: genes envolvidos em proliferação e apoptose 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Incidência e Mortalidade Mundial dos 6 tipos de tumores mais frequentes	19
Tabela 2- Incidência e Mortalidade Mundial de CECP separadas por sítios.....	20
Tabela 3- Expressão de microRNAs em diferentes tumores	29
Tabela 4- Expressão de microRNAs em tumores de cabeça e pescoço.....	30
Tabela 5- Triterpenos relacionados à regulação de microRNAs em diferentes tumores	32
Tabela 6- IC ₅₀ de maitenina, 22-β-hidroximaitenina e cisplatina para as linhagens derivadas de CECP SCC-9, SCC-25 e FaDu e para queratinócitos orais derivados de cultura primária de pacientes saudáveis após 24 horas de tratamento.....	48
Tabela 7- Índice de seletividade para as substâncias avaliadas em relação aos queratinócitos orais normais derivados de cultura primária.....	51
Tabela 8- MiRNAs com expressão alterada entre a linhagem SCC-25 tratada com maitenina e células não tratadas. 101 miRNAs foram encontrados desregulados após tratamento com maitenina por 24, 48 e 72 horas (p < 0,05).....	56
Tabela 9- MiRNAs diferencialmente expressos entre SCC25 tratada com maitenina e células não-tratadas relacionados com crescimento intrínseco (iGrowth) ou com proliferação e apoptose em CECP	58
Tabela 10- Validação dos resultados do <i>microarray</i> da linhagem SCC-25 para o miRNA-196b. Valores positivos de fold-change indicam maior expressão nas células tratadas e valores negativos indicam maior expressão nas células não tratadas.....	61

LISTA DE ABREVIações

3'UTR	do inglês, <i>3' untranslated region</i> / região 3' não-traduzida
AHR	do inglês, <i>aryl hydrocarbon receptor</i> / hidrocarboneto de aril receptor
AKIRIN2	do inglês, <i>akirin 2</i> / akirin 2
AKT	do inglês, <i>protein kinase B</i> / proteína kinase B
ANXA1	do inglês, <i>annexin A1</i> / anexina A1
AXL	do inglês, <i>AXL receptor tyrosine kinase</i> / AXL receptor da tirosina quinase
BAP1	do inglês, <i>annexin A1</i> / anexina A1
BIRC6	do inglês, <i>BRCA1 associated protein 1</i> / BRCA1 proteína associada 1
BMPR1A	do inglês, <i>bone morphogenetic protein receptor type 1A</i> / osso morfogenético proteína do receptor de tipo 1A
CCND2	do inglês, <i>cyclin D2</i> / ciclina D2
CDK	do inglês, <i>cyclin-dependent kinase</i> / quinase dependente de ciclina
CDKN2A dependente	do inglês, <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i> / inibidor de quinase de ciclina 2A
CDKN1B dependente	do inglês, <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i> / inibidor de quinase de ciclina 1B
cDNA	DNA complementar
CECP	Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço
COL8A2	do inglês, <i>collagen type VIII alpha 2</i> / colágeno tipo VIII alfa 2
Ct	do inglês, <i>cycle threshold</i> / limiar de ciclo
CDK	do inglês, <i>cyclin-dependent kinase</i> / quinase dependente de ciclina
CSNK2A1	do inglês, <i>casein kinase 2 alpha 1</i> / caseína quinase 2 alfa 1
DERL2	do inglês, <i>derlin 2</i> / derlin 2
DFFA	do inglês, <i>DNA fragmentation factor subunit alpha</i> / fragmentação de DNA do fator de subunidade alfa
E2F2	do inglês, <i>E2F transcription fator 2</i> / E2F fator de transcrição 2
EGFR	do inglês, <i>epidermal growth fator receptor</i> / receptor do fator de crescimento epidérmico
EPHA7	do inglês, <i>EPH receptor A7</i> / EPH receptor A7
FKTN	do inglês, <i>fukutin</i>

Fold-change	razão entre a expressão gênica de duas condições distintas
G2E3	do inglês, <i>G2/M-phase specific E3 ubiquitin protein ligase</i>
GATA6	do inglês, <i>GATA binding protein 6</i> / GATA ligação da proteína 6
GNG5	do inglês, <i>G protein subunit gamma 5</i> / proteína G subunidade gama 5
H3F3B	do inglês, <i>H3 histone, Family 3B</i> / histona H3, família 3B
HELLS	do inglês, <i>helicase, lymphoid-specific</i> / helicase, linfoide específico
HOXA5	do inglês, <i>homeobox A5</i> / homeobox 5
HPV	do inglês, <i>human papillomavirus</i> / papiloma vírus humano
IGF2BP1	do inglês, <i>insulin like growth fator 2 mRNA binding protein 1</i>
ING5	do inglês, <i>inhibithor of growth Family member 5</i> / inibidor do crescimento F5
KMT2D	do inglês, <i>lysine methyltransferase 2D</i> / lisina metiltransferase 2D
LAMTOR5	do inglês, <i>late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and mTOR activator 5</i>
MAPK	do inglês, <i>mitogen-activated protein kinase</i> / proteína quinase ativada por mitógenos
miR	microRNA
miRNA	microRNA
MMP	do inglês, <i>metalloproteinase matrix</i> / metaloproteinase de matriz
MOAP1	do inglês, <i>modulator of apoptosis 1</i> / modulador de apoptose 1
mRNA	do inglês, <i>messenger RNA</i> / RNA mensageiro
PCR	do inglês, <i>polymerase chain reaction</i> / reação em cadeia da polimerase
PI3K	do inglês, <i>phosphoinositide 3-kinase</i> / fosfoinosítídeo 3-quinase
PH	cologarítmo de concentração hidrogênionica de uma solução
<i>Primer</i>	oligonucleotídeo iniciador
PTEN	do inglês, <i>phosphatase and tensin homolog deleted on chromossome 10</i> / homólogos de fosfatase e tensina deletados no cromossomo 10
RNA	ácido ribonucleico
Rpm	rotação por minuto
siRNA	do inglês, <i>short-interference RNAs</i> / pequeno RNA de interferência
SCC	do inglês, <i>squamous cell carcinoma</i> / carcinoma de células escamosas
STAT3	do inglês, <i>signal transducer and activator of transcription 3</i> / transdutor de sinal e ativador da transcrição 3

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço	18
1.2 Agentes quimioterápicos e terapias-alvo disponíveis para o CECP	23
1.3 Produtos naturais e seus derivados isolados de plantas utilizados no tratamento do câncer	24
1.4 MicroRNAs	26
1.5 MicroRNAs em câncer	30
2 OBJETIVO	34
2.1 Objetivos específicos	34
3 METODOLOGIA	35
3.1 Preparo de soluções de maitenina e 22-β-hidroximaitenina	35
3.2 Linhagens tumorais	35
3.2.1 Cultivo das linhagens tumorais	35
3.3 Cultura primária de queratinócitos orais não tumorais	36
3.3.1 Cultivo de queratinócitos	36
3.4 Padronização de crescimento das linhagens celulares	37
3.4.1 Padronização de crescimento dos queratinócitos orais normais	38
3.5 Avaliação da viabilidade celular pelo método MTT	39
3.5.1 Avaliação da viabilidade celular pelo método contagem celular	40
3.5.2 Determinação da IC ₅₀	41
3.5.3 Índice de Seletividade	41
3.5.4 Avaliação do efeito de triterpenos (IC ₅₀) ao longo do tempo	41
3.6 Extração de RNA	42
3.6.1 microRNAs relacionados à proliferação celular e apoptose	42
3.6.2 Análise de expressão de miRNAs por microarray	43
3.6.3 Detecção de miRNA específico por PCR em tempo real	44
4 RESULTADOS	47
4.1 Determinação da IC ₅₀ e índice de seletividade	48
4.2 Avaliação do efeito de triterpenos (IC ₅₀) ao longo do tempo em linhagens celulares e queratinócitos orais	52
4.3 Expressão de miRNAs em células SCC-25 tratadas com maitenina	56

4.4 Validação da expressão de miR-196b após tratamento por maitenina e 22 β por RT-PCR real time	59
4.5 Possível efeito funcional de miR-196b com base em seus alvos	60
5 DISCUSSÃO	62
6 CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIAS	69
APÊNDICE A – MiRNAs relacionados com proliferação e apoptose em CECP	82
ANEXO A - MiRNAs correlacionado com o iGrowth	85
ANEXO B - Resumo submetido a congresso científico internacional	87

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença complexa caracterizada pelo crescimento celular anormal. Durante esse processo as células normais adquirem resistência a sinais que controlam seu crescimento, resultando em distúrbios na proliferação, diferenciação e apoptose celular. Tal processo é associado à desregulação de genes específicos, como oncogenes e supressores tumorais (CAMPISI, 2003).

Dos diversos tipos de tumores existentes, um dos mais frequentes é o carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP), o qual inclui tumores de cavidade oral, laringe e faringe, sendo a sexta neoplasia mais comum no mundo (FERLAY et al., 2015). Dentre os principais fatores de risco estão o uso abusivo de álcool, tabaco e exposição ao papiloma vírus (HPV), este último principalmente para tumores de orofaringe (LEEMANS; BRAAKHUIS; BRAKENHOFF, 2011).

O tratamento padrão para carcinomas de cabeça e pescoço depende da localização do tumor, seu estágio e da idade do paciente, e inclui a cirurgia, terapia de radiação, quimioterapia, ou uma combinação de tratamentos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015). As taxas de sobrevida relativa para pacientes com CECP é de 63% em 5 anos, porém menos de um terço dos casos (31%) são diagnosticados na fase inicial, para o qual a sobrevida é de 83% em 5 anos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015). Cerca de 50% dos pacientes são acometidos por recidiva geralmente nos dois primeiros anos após tratamento com taxas de resposta entre 10 e 35% e sobrevida média de 6 a 12 meses (SUH et al., 2014). Sabe-se que um grande número de mutações associadas a este carcinoma está vinculado à resposta aos quimioterápicos (OCK et al., 2015), tornando a busca por novas terapias uma necessidade urgente.

A regulação realizada por pequenas moléculas de RNA não codificantes de proteínas, denominadas microRNAs, contribui para a complexidade molecular do CECP. MicroRNAs regulam uma parte significativa dos genes humanos, dentre os quais genes responsáveis por controlar proliferação e apoptose, o que caracteriza seu papel na progressão tumoral. Desta forma, moléculas que atuem na regulação da expressão desses microRNAs, podem ser fontes alternativas de novas terapias. Neste estudo avaliamos a ação de dois triterpenos quinonametídeos, maitenina e 22- β -hidroximaitenina, compostos isolados a partir da planta brasileira *Maytenus*

ilicifolia, sobre a regulação de microRNAs associados com proliferação e apoptose em CECP.

1.1 Carcinoma Epidermoide de Cabeça e Pescoço

O carcinoma de cabeça e pescoço é a sexta neoplasia mais comum no mundo, sendo contabilizados 686.328 novos casos por ano (TORRE et al., 2015). É um termo amplo que abrange carcinomas epiteliais da mucosa que surgem nas vias aerodigestivas (cavidade oral, fossas nasais, seios paranasais, faringe e laringe) (Figura 1) dos quais 90% são epidermóides (BOSE, BROCKTON; DORT, 2013).

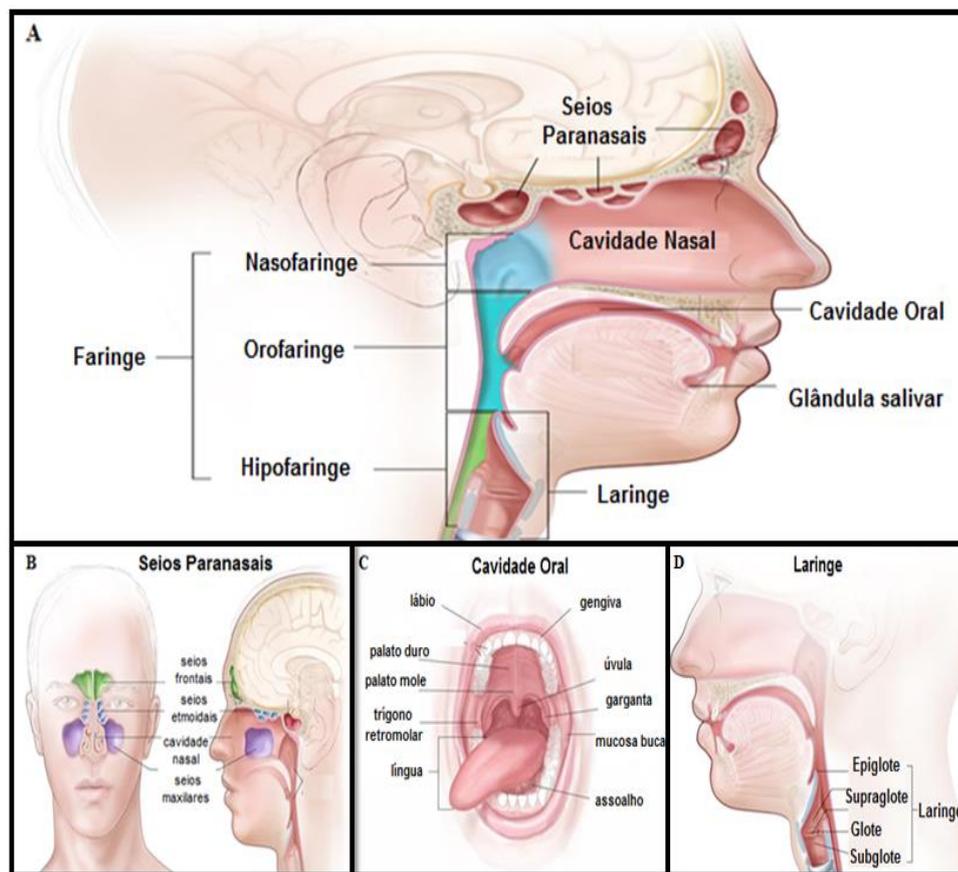


Figura 1- Anatomia do carcinoma de cabeça e pescoço; A (Anatomia geral de CECP); B (Anatomia dos seios paranasais); C (Anatomia da cavidade oral); D (Anatomia da laringe). Fonte: Adaptado de (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2015).

Trata-se de uma doença agressiva responsável por 5% de todos os diagnósticos de câncer (SHETH et al., 2015). Dentre os carcinomas epidermóides

75% tem início na cavidade oral (DOUGLAS, 2015), o qual se manifesta a partir de lesões que podem surgir na língua, mucosa bucal, gengiva, lábios, assoalho da boca e palato duro.

No Brasil, no ano de 2014, foram estimados 15.290 novos casos de câncer oral com maior incidência em homens (73.77%). Registros epidemiológicos apontam a região sudeste e a nordeste com a maior incidência de novos casos, ocupando a quinta posição entre as neoplasias mais frequentes em homens, quando os cânceres de pele não melanoma são excluídos. (INCA, 2014). Com relação aos dados mundiais CECP apresenta incidência de aproximadamente 700.000 novos casos (tabela 1 e 2), isso de acordo com o último relatório da IARC (do inglês: *International Agency for Research on Cancer*) denominado de GLOBOCAN 2012 (TORRE et al., 2015). A mortalidade por CECP (55%) é a terceira causa de morte mundial entre os carcinomas mais incidentes, considerado portanto pior do que carcinomas mais frequentes como mama (taxa de mortalidade de 31%), colorretal (51%) e próstata (27%).

Tabela 1- Incidência e Mortalidade Mundial dos 6 tipos de tumores mais frequentes para ambos os sexos (exceto câncer de mama e próstata) de acordo com a GLOBOCAN, 2012. Fonte: Adaptado de (TORRE et al., 2015; GLOBOCAN, 2012).

Incidência e Mortalidade Mundial		
Câncer	Incidência	Mortalidade
Pulmão	1.824.700	1.589.900
Mama	1.676.600	521.900
Colorretal	1.360.600	693.900
Próstata	1.111.700	307.500
Estômago	951.600	723.100
Cabeça e Pescoço	686.328	375.665

Tabela 2- Incidência e Mortalidade Mundial de CECP para ambos os sexos, separadas por sítios, de acordo com a GLOBOCAN, 2012. Fonte: Adaptado de (TORRE et al., 2015; GLOBOCAN, 2012).

Incidência e Mortalidade Mundial de CECP		
Localidade	Incidência	Mortalidade
Lábio e Cavidade Oral	300.373	145.353
Laringe	156.877	83.376
Orofaringe e Hipofaringe	142.387	96.105
Nasofaringe	86.691	50.831

O carcinoma de cabeça e pescoço tem sido associado a uma variedade de agentes etiológicos, dos quais o consumo excessivo de álcool, tabaco e a exposição ao papiloma vírus humano (HPV), particularmente HPV tipo 16 (HPV16) e HPV tipo 18 (HPV18) se encontram entre os principais fatores de risco. Em 2009, Hashibe et al. revisaram 17 estudos de casos pertencentes ao INHANCE (*International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium*) e identificaram que o tabaco e o consumo de álcool representam 72% dos casos deste carcinoma na Europa, América do Norte e América Latina. Dos quais 4% estão associados apenas ao álcool, 33% ao tabaco e 35% se combinados (HASHIBE et al., 2009). A prevalência de HPV positivos em pacientes com câncer de cabeça e pescoço corresponde a 22% dos casos (DAYYANI et al., 2010) porém se levado em consideração apenas os tumores de orofaringe pode chegar a até 90% (CASTRO et al., 2009; KELLOKOSKI et al., 1992; YOUNG et al., 2015). Outros fatores de risco, como a falta de higiene bucal, má alimentação e hereditariedade, apesar de menos recorrentes, podem também desempenhar um papel na carcinogênese (KUNDU; NESTOR, 2012).

O prognóstico para pacientes com CECP é de difícil avaliação e hoje é avaliado apenas em função do tamanho do tumor, à presença de nódulos linfáticos, metástases e metástase à distância (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015). No momento do diagnóstico, são utilizados sistemas de classificação a fim de definir o estágio e o grau de disseminação do tumor. Este sistema varia de fase 0,

classificado como tumor *in situ* (o câncer presente apenas na camada de origem) até fase IV (doença avançada) (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2015).

Na fase I ocorre a formação do tumor que não deve ultrapassar 2 centímetros de extensão. Já no estágio II, o tumor se encontra entre 2 a 4 centímetros e não atingiu os gânglios linfáticos. Na fase III, o tumor se espalhou para um linfonodo ou é maior do que 4 centímetros. Quando o câncer se encontra avançado é denominado de fase IV podendo ser dividido em estágios IVa (o câncer se espalhou para tecidos próximos e/ou se encontra entre 4 e 6 centímetros), IVb (o tumor é maior do que 6 centímetros e se espalhou para um ou mais nódulos linfáticos) e IVc (o câncer se espalhou para partes distantes do corpo) (NIH, 2015). A figura 2 ilustra o tamanho dos tumores nos estágios de desenvolvimento descritos acima.



Figura 2- Tamanho dos tumores comparado com os tamanhos de ervilha, amendoim, noz e limão.
Fonte: Adaptado de (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2015).

Aproximadamente um terço dos pacientes diagnosticados no estágio inicial da doença é submetido a tratamento cirúrgico e/ou radioterápico com sobrevivência de 70-90% dependendo do local do tumor primário (ZHANG et al., 2015a). Todavia a maioria dos pacientes é diagnosticada quando já se encontram em estágios avançados da doença. Nestes casos, o tratamento envolve cirurgia complexa seguida de radioterapia ou quimioterapia.

A cirurgia pode ser por ampla excisão local (remoção do tumor e do tecido saudável em torno) seguida ou não por esvaziamento cervical (remoção dos gânglios linfáticos e outros tecidos do pescoço, necessário quando o câncer se espalhou para áreas adjacentes) (NIH, 2015).

A radioterapia consiste no uso da radiação, principalmente raios-X, para matar as células cancerosas. Na terapia de radiação hiperfracionada, a radiação é dividida em pequenas doses, mais de uma vez ao dia. Existe ainda a hipertermia terapêutica, tratamento em que o corpo é submetido a aquecimento a fim de danificar e matar as células cancerígenas ou torná-las mais sensíveis aos efeitos da radiação e de fármacos anticâncer (NIH, 2015).

A quimioterapia é um tratamento que consiste no uso de fármacos que bloqueiam o crescimento celular, seja matando-as ou impedindo a divisão celular. Compreende a quimioterapia sistêmica (via oral ou injetada) onde os medicamentos atingem a corrente sanguínea e atuam nas células cancerosas por todo o corpo, e a quimioterapia regional, quando os medicamentos afetam principalmente as células tumorais naquelas áreas (NIH, 2015).

Os tratamentos hoje disponíveis incorrem em grande perda na qualidade de vida dos pacientes, que frequentemente passam a apresentar dificuldades na deglutição, fala e respiração, além de sério comprometimento estético (RATHOD et al., 2015). O impacto na qualidade de vida desses pacientes torna o CECP um fator de risco de suicídio importante entre os sobreviventes de câncer (KAM et al., 2015; OSAZUWA-PETERS et al., 2016).

Apesar de avanços consideráveis nos tratamentos quimioterápicos, radioterápicos e cirúrgicos durante as últimas décadas, a taxa de morbidade de CECP não foi significativamente reduzida (DENARO et al., 2012). Uma das explicações para este resultado é certamente a complexidade molecular deste tumor, que dificulta a resposta aos tratamentos. Múltiplos eventos genéticos estão presentes neste tipo de carcinoma e promovem a desregulação de cascatas de sinalização que incluem EGFR, Ras, NFkB, Stat, Wnt/B-catenina, TGF- β , PI3k/AKT/mTOR, PTEN e Notch. De uma forma geral, estas alterações genéticas estão relacionadas à regulação do ciclo celular, crescimento, motilidade celular, apoptose e angiogênese (SUH et al., 2014). A compreensão de mecanismos moleculares envolvidos na progressão da doença pode levar ao desenvolvimento de terapias mais específicas, as chamadas terapias-alvo.

1.2 Agentes Quimioterápicos e terapias-alvo disponíveis para o CECP

As terapias atuais disponíveis para o tratamento do câncer de cabeça e pescoço se remetem a quimioterapias convencionais, principalmente compostos a base de platina, taxanos e fluorouracil (5-FU). Os medicamentos mais ativos são o metotrexato, cisplatina, fluorouracil, bleomicina, paclitaxel e docetaxel (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2015). A quimioterapia geralmente é administrada como uma combinação de fármacos de docetaxel, cisplatina e 5-FU, conhecida como TPF (taxotere, platinol e fluorouracil) e apresenta melhores resultados quando comparada aos fármacos individuais (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2015). Muitas vezes, esses agentes quimioterápicos refletem em melhorias clínicas significativas em CECP (HIGGINS et al., 2015).

Uma vez que estes fármacos não agem apenas sobre o tumor observa-se também um aumento significativo da toxicidade no tecido normal (HIGGINS et al., 2015). Neste cenário surgiram as terapias alvo-molecular visando agir de forma mais específica no tecido tumoral ou ainda apresentar efeito diferenciado de acordo com as características moleculares do tumor. Agentes sob investigação para utilização em CECP incluem anticorpos monoclonais para EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico) como cetuximab, panitumumab, zalutumumab, nimotuzumab; inibidores de tirosina quinase para EGFR (gefitinib, erlotinib, lapatinib, afatanib, dacomitinib) e inibidores do receptor do fator de crescimento endotelial vascular, VEGFR (bevacizumab, sorafenibe, sunitinib, vandetanib) (DORSEY; AGULNIK, 2013).

O principal alvo são os receptores de tirosina quinase, predominantemente para o EGFR. O EGFR é considerado um marcador precoce da carcinogênese e se encontra sobre-expresso em até 90% dos casos de CECP (MADOZ-GURPIDE et al., 2015). A ativação da via mediada por EGFR é responsável por regular a progressão do ciclo celular e morte celular, o que o torna um alvo atrativo para a terapia do câncer (CUNEO et al., 2015). Entretanto, apenas o cetuximab foi recentemente aprovado para o tratamento de CECP (BOECKX et al., 2013) e o resultado da administração concomitante de cetuximab e quimioterápicos tradicionais nem sempre demonstra benefício significativo para os pacientes (HIGGINS et al., 2015). Com eventos adversos sérios, custo elevado e ausência de superioridade

consistente na sobrevida global, a relação custo-eficácia do cetuximab para o tratamento do CECP tem sido seriamente questionada (EKBLAD et al., 2015) e a CONITEC (Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologia no SUS) optou por unanimidade não incorporar cetuximab no tratamento do câncer de cabeça e pescoço recidivante/metastático no Brasil (CONITEC, 2015).

Portanto, opções adicionais de tratamento que contribuam na melhora do quadro clínico dos pacientes e que também estejam associadas a baixo perfil de toxicidade se tornam iminentes.

1.3 Produtos naturais isolados de plantas, e seus derivados, utilizados no tratamento do câncer

Os produtos naturais bioativos à base de plantas representam uma fonte valiosa de agentes terapêuticos utilizados desde os primórdios da humanidade. Porém sua aplicação como composto isolado de uso medicinal teve início apenas no século 19. Estima-se que até 70% dos fármacos aprovados nos últimos anos, ao longo da década de 1940 até 2014, são de forma direta ou indireta a partir de produtos naturais, incluindo plantas, organismos marinhos, microrganismos e mais de 3.000 espécies de plantas são utilizadas para o tratamento do câncer (DESAI et al., 2008; NEWMAN; CRAGG, 2016). Medicamentos à base de plantas como vimblastina (Velban®), vincristina (Oncovin®), paclitaxel (Taxol®), camptotecina, podofilotoxina e os análogos, etoposídeo (Etopophos®) e teniposídeo (Vumon®) movimentam um mercado anual em torno de 50 bilhões de dólares (PINTO et al., 2002).

O paclitaxel (Taxol) é um importante fármaco antineoplásico produzido de forma semi-sintética. Originalmente isolada a partir da casca de *Taxus brevifolia* (Teixo ocidental) em 1962 (HOWAT et al., 2014) teve aprovação pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento do câncer metastático do ovário apenas em 1992 (FRIDLENDER; KAPULNIK; KOLTAL, 2015). Atualmente é aprovado para o tratamento do câncer de mama e pulmão, porém utilizado como tratamento em outros carcinomas como exemplo o câncer de cabeça e pescoço. A principal atuação desse fármaco é através da desmontagem dos microtúbulos e consequentemente inibição do fuso mitótico (FRIDLENDER; KAPULNIK; KOLTAL,

2015). O paclitaxel é um fármaco bem sucedido com um valor de mercado anual superior a US\$1 bilhão (HOWAT et al., 2014).

Vimblastina e vincristina são fármacos anticancerígenos de origem vegetal hoje produzidas de forma sintética que atuam inibindo a formação dos microtúbulos (ISHIKAWA et al., 2009). Originalmente isolados das folhas de *Catharanthus roseus* (Vinca), foram aprovados como agentes anticancerígenos pela FDA em 1963 e 1965 respectivamente. Vincristina é aplicada como terapia de combinação para o tratamento de leucemias agudas e linfomas. Enquanto vimblastina é utilizada em combinação para o tratamento de câncer de bexiga e de mama (ISHIKAWA et al., 2009). Ambos são considerados compostos lucrativos do ponto de vista econômico com valores de mercado estimados em US\$ 6.000 e US\$ 12.000/g, respectivamente (PEIXOTO NETO; CAETANO, 2005).

O sucesso desses compostos é interessante para o mercado de biofármacos e servem de incentivo para a descoberta de novas moléculas derivadas de plantas.

Atualmente uma classe de compostos tem se destacado por sua ação em diversos tipos de tumores. São os triterpenos, metabólitos secundários pertencentes à classe dos terpenos, caracterizados pela estrutura de base formada por moléculas de isoprenos de 30 carbonos (PETRONELLI et al., 2009). Os triterpenos exibem uma vasta gama de atividades biológicas, tais como anti-inflamatório, antioxidante, antifúngico, antimicrobiano e ação antitumoral (PAZ et al., 2013).

A atividade anti-cancerígena deste grupo está atrelada à capacidade destes metabólitos secundários de induzir apoptose, inibir a proliferação celular, suprimir a angiogênese e causar disfunção na mitocôndria (YAN et al., 2014).

Entre os triterpenos com atividade antineoplásica encontram-se os triterpenos quinonametídeos, os quais são produzidos exclusivamente por espécies da família Celastraceae. O Brasil possui 132 espécies nativas de Celastraceae, sendo a *Maytenus ilicifolia* (Schrad.) uma das espécies mas abundantes (COPPEDE et al., 2014). Popularmente conhecida como espinheira-santa, é uma árvore perenifólia, com distribuição subtropical, no Brasil ocorre em São Paulo, Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, e também no Uruguai, Paraguai e Argentina (NIERO et al., 2011).

A atuação dos triterpenos quinonametídeos no tratamento do câncer tem sido avaliada principalmente quanto às atividades anti-proliferativas e pró-apoptóticas. As duas moléculas mais estudadas são o celastrol e a pristimerina.

O efeito do celastrol foi avaliado em linhagens celulares de câncer de cabeça e pescoço, câncer de próstata, hepatocelular, mama, células de pulmão, pâncreas e leucemia e modelos animais em osteossarcoma, colorretal e glioma (FAN et al., 2014; FRIBLEY et al. 2015; JI et al., 2015; LI et al., 2015; LI et al., 2015c; LIN et al., 2015; SHRIVASTAVA et al., 2015; WANG et al., 2010a; YADAV et al., 2010; ZHOU; HUANG, 2009). A pristimerina foi estudada em células de câncer de colorretal, pâncreas, ovário e câncer de mama e modelos animais de glioma e próstata (DEEB et al., 2015; GAO et al., 2014a; HUANG et al., 2015; LEE et al., 2013; YOUSEF et al., 2016; ZHAO et al., 2016). Estudos em CECP são raros e pouco conclusivos (KANNAIYAN et al., 2011).

Apesar de celastrol e pristimerina serem produzidos por *Maytenus ilicifolia*, outros dois triterpenos quinonametídeos, maitenina (tingenona) e 22- β -hidroximaitenina (22- β -hidroxitingenona), são isolados em quantidades superiores e ainda são pouco estudados quanto a sua atividade citotóxica em câncer (COPPEDE et al., 2014).

Um estudo clínico envolvendo a maitenina foi realizado em 1971, no Instituto de Antibióticos de Pernambuco. Neste estudo, 25 pacientes portadores de neoplasias em estados avançados foram tratados com 150 μ g/kg/dia de maitenina por via intravenosa durante 10 dias sucessivos. Os melhores resultados foram apresentados por 4 pacientes com carcinoma epidermoide oral havendo uma redução de 40 a 60% no tamanho das lesões (SANTANA; ASFORA; COTIAS, 1971). Em outro estudo clínico a maitenina foi purificada e utilizada em associação com outras substâncias anticancerígenas de origem natural (MELO et al., 1974). Os pacientes com carcinoma de células basais avançado apresentaram redução superior a 50% no tamanho das lesões. A maitenina apresentou baixa toxicidade com prolongado efeito residual, uma vez que as lesões continuaram a regredir por vários dias, mesmo após a suspensão do triterpeno. Apesar desse efeito ainda não existem outros estudos envolvendo o uso de maitenina no tratamento de cânceres.

Em um estudo recente com triterpenos quinonametídeos, 9 compostos foram identificados como potentes agentes antiproliferativos ($IC_{50} < 10\mu$ M) contra células

tumorais. Dentre estes, 22- β -hidroximaitenina foi reconhecida como um novo fármaco antitumoral no tratamento do câncer de colo de útero por inibir a atividade de ChoKa descrito como oncogene. Relatou-se que o tratamento com 22- β -hidroxitingenona inibiu o crescimento do tumor em 75%. Esse estudo foi realizado em camundongos xenotransplantados com células de adenocarcinoma de colo de útero humano. (ESTÉVEZ-BRAUN et al., 2015).

1.4 MicroRNAs

Os microRNAs constituem uma classe de pequenos RNAs endógenos não codificantes de aproximadamente 22 nucleotídeos de comprimento que atuam principalmente no silenciamento gênico pós transcricional. Participam como reguladores da expressão gênica interagindo com a região 3' UTR do mRNA (BARTEL, 2009) que codificam para proteínas envolvidas na manutenção de processos fisiológicos normais, sendo conservados ao longo da evolução (LENKALA et al., 2014). Inicialmente descoberto em 1993 em *Caenorhabditis elegans* quando Rosalind Lee et al. identificaram um pequeno RNA que modulava a proteína-lin 14, responsável pelo tempo de desenvolvimento deste nematelminto (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993). Em seguida, diversos microRNAs foram identificados em diferentes espécies o que comprova seu papel como componente essencial na regulação da expressão gênica (LAGOS-QUINTANA et al., 2001). Atualmente, recursos de bioinformática estão disponíveis e podem ser explorados para definir a associação entre o microRNA e seu alvo. O banco de dados de sequências de microRNAs (miRBase) tem registrados 2588 microRNAs maduros em humanos (www.mirbase.org) em 20 de outubro de 2016.

O mecanismo pelo qual o microRNA regula ou reprime o mRNA depende da complementariedade entre ambos. Desta forma, caso a complementariedade venha a ser perfeita, a molécula de mRNA é degradada através um mecanismo semelhante ao descrito para siRNAs (do inglês *small interfering RNA*) (ZENG et al., 2003). Porém se essa interação ocorrer de forma parcial haverá o bloqueio da tradução da sequência codificadora alvo (FILIPOWICZ; BHATTACHARYYA; SONENBERG, 2008).

A maioria dos genes que codificam microRNAs são transcritos pela RNA polimerase II no núcleo em microRNAs primários (pri-microRNAs). Posteriormente estas moléculas são clivadas pela RNase III DROSHA e seu cofator essencial, a proteína de ligação DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region 8 protein). A DROSHA contém 2 domínios de RNase III (RNase IIIa e RNase IIIb) responsáveis pela clivagem em pontos específicos na base do *loop* para liberar o precursor do microRNA (pre-microRNAs) em uma estrutura na forma de hairpin de aproximadamente 60-70 nucleotídeos (LIN; GREGORY, 2015). Por fim essa estrutura é exportada do núcleo para o citoplasma pela exportina 5 e processada pela DICER para produzir o “microRNA duplex” de aproximadamente 22 nucleotídeos de comprimento. As proteínas catalíticas Argonautas direcionam uma das fitas ao complexo RISC (do inglês *RNA-Induced Silencing Complex*) para promover o silenciamento gênico pós-transcricional (Figura 3) (LIN; GREGORY, 2015).

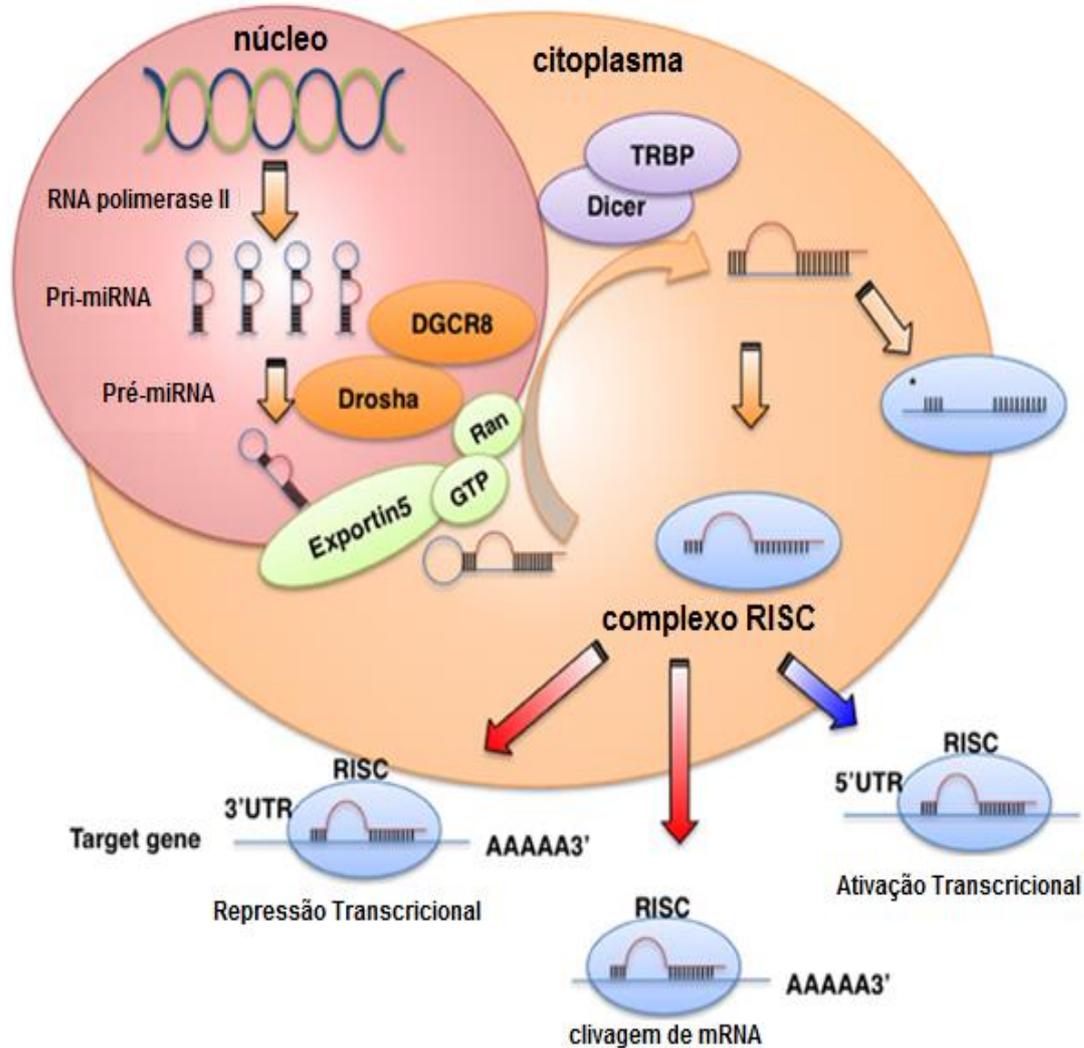


Figura 3- Biogênese do microRNA. Fonte: Adaptado de (TAKAHASHI et al., 2014).

A interação entre microRNAs e seus alvos constitui um sistema complexo onde um único microRNA pode interagir e regular diversos alvos e, por outro lado, diversos microRNAs podem controlar um mesmo alvo. Os microRNAs regulam uma grande fração de genes codificadores de proteínas, e estima-se que cerca de 30% dos genes humanos identificados possam ser alvos de microRNAs (LEWIS; BURGE; BARTEL, 2005), como genes responsáveis por controlar o crescimento celular, diferenciação e a apoptose, o que caracteriza seu papel no desenvolvimento e progressão tumoral (KLOOSTERMAN; PLASTERK, 2006).

Expressões aberrantes de microRNAs foram identificados em diversos tumores e apresentam perfil dependente do tipo de célula e tecido específico (BEUVINK et al., 2007).

1.5 MicroRNAs em câncer

Os microRNAs estão envolvidos em vários processos biológicos e patológicos, dentre eles o câncer. Aproximadamente 30% dos genes que codificam microRNAs estão localizados em sítios frágeis ou em regiões que são deletadas, amplificadas ou translocadas em câncer (CALIN et al., 2004). Os mecanismos responsáveis pelas alterações na expressão dos microRNAs no câncer são diversos. Em sua maioria estão associadas a alterações epigenéticas ou modificações na sequência de DNA, como ampliações, deleções, translocações e mutações pontuais (COWLAND; HOTHER; GRONBAEK, 2007). Essas variações genômicas alteram a transcrição do gene que codifica o microRNA, o que conduz a regulação também alterada de seus mRNAs alvos, podendo promover a iniciação e a progressão do tumor (ZHANG et al., 2006).

Sendo assim, microRNAs podem atuar como oncogenes ou supressores de tumor, como exemplificado na tabela 3. MicroRNAs supressores de tumor podem prevenir o desenvolvimento do tumor por inibir negativamente oncogenes e apresentam expressão reduzida em tumores malignos, enquanto que microRNAs cuja expressão é aumentada em tumores podem ser considerados como oncogenes, os denominados “oncomiR” (BARTEL, 2009).

Tabela 3- Expressão de microRNAs em diferentes tumores.

microRNAs	Menor expressão no tumor comparado com o normal	Maior expressão no tumor comparado com o normal	Referência
let-7	câncer de próstata, hepatocarcinoma, colo de útero, câncer esofágico, ovário, câncer gástrico, mama e CECP	câncer pancreático	AYUB; KAUL; AYUB, 2015; HUANG et al., 2014; ORANG; BARZEGARI, 2014; TANG et al., 2014; XIE et al., 2014; NOHATA et al., 2013; ANDORFER et al., 2011; DAHIYA; MORIN, 2010; WANG et al., 2010
miR-15/16	câncer de próstata, hepatocarcinoma	câncer pancreático	AYUB; KAUL; AYUB, 2015; TANG et al., 2014; XIE et al., 2014
miR-21	câncer de ovário	câncer de próstata, hepatocarcinoma, colo de útero, câncer esofágico, gástrico, mama e CECP	AYUB; KAUL; AYUB, 2015; ORANG; BARZEGARI, 2014; HUANG et al., 2014; XIE et al., 2014; NOHATA et al., 2013; ANDORFER et al., 2011; DAHIYA; MORIN, 2010; WANG et al., 2010
miR-31	câncer de próstata	câncer de colo de	AYUB; KAUL; AYUB, 2015;

		útero, esofágico, CECP	ORANG; BARZEGARI, 2014; HUANG et al., 2014; NOHATA et al., 2013
miR-222	câncer de ovário	câncer de próstata, hepatocarcinoma, colo de útero, câncer esofágico	AYUB; KAUL; AYUB, 2015; HUANG et al., 2014; ORANG; BARZEGARI, 2014; XIE et al., 2014; DAHIYA; MORIN, 2010;

Inúmeros estudos já avaliaram o papel dos microRNAs em carcinomas epidermoides de cabeça e pescoço, conforme exemplificado na tabela 4.

Tabela 4- Expressão de microRNAs em tumores de cabeça e pescoço.

Expressão de microRNAs em tumores de cabeça e pescoço							
miRNA	Expressão em tumores	Câncer	Referência	miRNA	Expressão em tumores	Câncer	Referência
miRNA-1	menor	CECP	NOHATA et al., 2011; WU et al., 2011	miRNA-144	maior	carcinoma de nasofaringe	ZHANG et al., 2013 ^a
miRNA-9	menor	carcinoma oral	YU et al., 2014	miRNA-146a	menor	CECP	LERNER et al., 2016,
miRNA-10b	menor	câncer de laringe; carcinoma oral	ZHANG et al., 2015b; SEVERINO et al., 2013	miRNA-148a-3p	menor	câncer de laringe	WU et al., 2016
miRNA-18a	maior	carcinoma de nasofaringe	LUO et al., 2013	miRNA-155	menor	CECP e carcinoma oral	ZENG et al., 2016, LERNER et al., 2016
miRNA-18b	maior	carcinoma de nasofaringe	YU et al., 2013a	miRNA-184	maior	carcinoma de células escamosas da língua	WONG et al., 2008
miRNA-19a	maior	câncer de laringe	WU et al., 2014a	miRNA-188	menor	carcinoma oral	WANG; LIU, 2015
miRNA-21	maior	CECP	SUN et al., 2014	miRNA-195	menor	carcinoma de células escamosas de língua	JIA et al., 2013
miRNA-22	menor	câncer de língua	QIU et al., 2016	miRNA-196a	maior	CECP	DARDA et al., 2015; SUH et al., 2014 ^a
miRNA-24	menor	carcinoma oral, câncer de laringe	SUN et al., 2016; XU et al., 2015; GUO et al., 2012	miRNA-196b	maior	carcinoma oral	LIU et al., 2013
miRNA-26a	menor	câncer de língua	JIA et al., 2014	miRNA-205	menor	câncer de laringe; carcinoma oral	TIAN et al., 2014; KIM et al., 2014a
miRNA-31*	maior	carcinoma oral	CHANG et al., 2013	miRNA-206	menor	câncer de laringe	YU et al., 2015

miRNA-34a	menor	câncer de laringe; CECP	LI; MA; SUN, 2014; KUMAR et al., 2012; SHEN et al., 2012	miRNA-221	maior	câncer de laringe; carcinoma oral	SUN et al., 2015; YANG et al., 2011
miRNA-93	maior	câncer de laringe, CECP	XIAO et al., 2015; LI et al., 2015b	miRNA-222	maior	carcinoma oral	JIANG et al., 2014; YANG et al., 2011
miRNA-99a	menor	carcinoma oral	YAN et al., 2012	miRNA-223	menor	carcinoma de nasofaringe	YANG et al., 2015
miRNA-100	menor	carcinoma oral	HENSON et al., 2009	miRNA-329	menor	carcinoma oral	SHIAH et al., 2014
miRNA-106b	maior	câncer de laringe	CAI; WANG; BAO, 2011	miRNA-375	menor	carcinoma oral	SHI et al., 2015
miRNA-107	menor	CECP	DATTA et al., 2012	miRNA-410	menor	carcinoma oral	SHIAH et al., 2014
miRNA-124	menor	carcinoma oral	ZHANG et al., 2015d	miRNA-423-3p	maior	câncer de laringe	GUAN et al., 2014
miRNA-125b	menor	carcinoma oral	HENSON et al., 2009	miRNA-451	menor	CECP	WANG et al., 2015a
miRNA-126	menor	carcinoma de língua	HAN et al., 2016	miRNA-483-3p	menor	carcinoma oral	BERTERO et al., 2013
miRNA-128	menor	CECP	HAUSER et al., 2015	miRNA-497	menor	carcinoma de nasofaringe	WANG et al., 2015c
miRNA-129-5p	menor	câncer de laringe	SHEN; HUANG; LI, 2015	miRNA-506	menor	carcinoma oral	DENG; LIU, 2015
miRNA-135	maior	CECP	ZHANG et al., 2013	miRNA-512-5p	menor	CECP	LI et al., 2015
miRNA-143	menor	carcinoma oral	NI et al., 2015	let-7b	menor	carcinoma oral	GAO et al., 2014

Estudos recentes relatam que triterpenos quinonametídeos, em especial o celastrol, podem alterar a expressão de miRNAs (Tabela 5). Recentemente, Cao et al. identificaram que o celastrol regula o miR-223 no câncer de mama e próstata, através de NFκ-B e mTOR, ambos relacionados a sobrevivência. A inibição de miR-223 aumentou a capacidade anti-proliferativa de celastrol (CAO et al., 2015). Foi demonstrado que celastrol induz a autofagia em câncer de próstata (GUO et al., 2016). Tal fato é desempenhado pela regulação negativa do miRNA-17 sobre seu alvo, o ATG7, gene relacionado ao processo autofágico (GUO et al., 2016).

Em células de câncer gástrico, o miR-21, encontrava-se super-expresso, e o uso de celastrol diminuiu a expressão deste, com consequente efeito sobre a expressão de AKT e NF- κ B, aumentando a apoptose (SHA et al., 2014). Já em carcinoma hepatocelular foi demonstrado que miR-224 é fundamental na inibição da proliferação celular induzida por celastrol. Este triterpeno diminuiu a expressão do miRNA, inibindo a expressão de genes MMP-9 e MMP-2, componentes importantes na invasão celular (LI et al., 2013a).

Tabela 5- Triterpenos relacionados à regulação de miRNAs em diferentes tumores.

Interação de Celastrol com miRNAs			
miRNA	Câncer	Resultado	Referência
miR-17	próstata	induz autofagia	Guo et al., 2016
miR-223	mama e próstata	reduz viabilidade	CAO et al., 2015
miR-21	gástrico	induz apoptose	SHA et al., 2014
miR-224	hepatocelular	inibe migração e invasão	LI et al., 2013a
miR-146a	gástrico	induz apoptose	SHA et al., 2013

Uma vez que miRNAs podem regular a resposta celular a tratamentos que tenham como alvo a proliferação e a morte celular, pretendemos neste estudo avaliar o efeito de dois triterpenos quinonametídeos, a maitenina e a 22- β -hidroximaitenina, sobre a proliferação e a morte celular em linhagens derivadas de CECP, e avaliar seu efeito sobre a regulação de miRNAs nestes modelos celulares.

2 OBJETIVO

Avaliar o efeito dos triterpenos quinonametídeos maitenina e 22- β -hidroximaitenina na regulação de miRNAs envolvidos na proliferação celular e apoptose em diferentes linhagens celulares derivadas de tumores de cabeça e pescoço.

2.1 Objetivos específicos

- Padronizar o crescimento das culturas celulares;
- Determinar a IC₅₀ de maitenina e 22- β -hidroximaitenina em linhagens derivadas de CECP e queratinócito oral normal derivado de cultura primária.
- Avaliar o efeito de maitenina e 22- β -hidroximaitenina sobre a expressão de miRNAs envolvidos na proliferação celular e apoptose em linhagens celulares de tumores de cabeça e pescoço.

3 METODOLOGIA

Os triterpenos maitenina (Figura 4) e 22-β-hidroximaitenina (Figura 5) foram obtidos a partir de culturas de células de raízes de *Maytenus ilicifolia in vitro*. Os triterpenos quinonametídeos foram purificados por cromatografia líquida de alta eficiência em escala preparativa, e submetidos à técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), para confirmação da identificação dos compostos (COPPEDE et al.,2014). Estes procedimentos foram realizados no Departamento de Biotecnologia Vegetal da Universidade de Ribeirão Preto, sob a coordenação da Dra. Ana Maria Soares Pereira. Para a pesquisa com espécies de *M. ilicifolia* possuímos autorização especial de acesso ao patrimônio genético expedida pelo IBAMA (processo número 010019/2015-4, validade: 30/01/2015 a 30/01/2017), em nome da Dra. Ana Maria Soares Pereira (UNAERP).

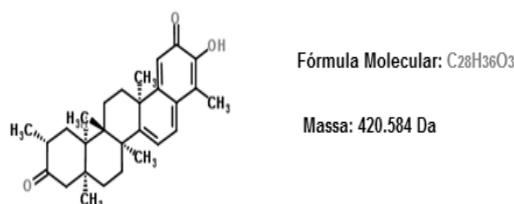


Figura 4- Fórmula estrutural, molecular, e massa molecular de Maitenina. Fonte: Adaptado de (CHEMSPIDER - CHEMICAL STRUCTURE, 2016).

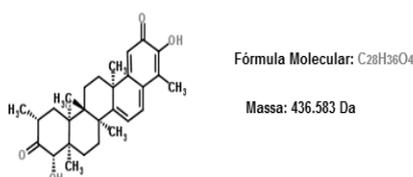


Figura 5- Fórmula estrutural, molecular, e massa molecular de 22-β-hidroximaitenina. Fonte: Adaptado de (CHEMSPIDER - CHEMICAL STRUCTURE, 2016).

3.1 Preparo de soluções de maitenina e 22-β-hidroximaitenina

Maitenina e 22-β-hidroximaitenina foram dissolvidas em DMSO (dimetilsulfóxido), obtendo-se solução estoque de 5 mM, com subsequente diluição

em água miliQ estéril, obtendo-se soluções de 500 μ M (solução de trabalho). Uma solução de controle para o veículo DMSO (DMSO a 10%) também foi preparada em água.

3.2 Linhagens tumorais

A linhagem SCC-9 (CRL1629) é proveniente de tumor de língua, e possui mutações nos genes CDKN2A, HRAS, NSD1 e TP53 (MARTIN et al., 2014). SCC-25 (CRL1628), derivada de língua, possui CDKN2A, PIK3CA, RIPK4 e TP53 (MARTIN et al., 2014). A linhagem FaDu (HTB-43) é derivada de tumor de orofaringe, e possui mutações em CDKN2A, NOTCH 1, PIK3CA, EGFR, MYC, SOX2, TP53 e SMAD4 (GARNETT et al., 2012). Essas linhagens celulares foram genotipadas e confirmou-se que mantinham as características descritas na American Type Culture Collection® (ATCC) (ANDREGHETTO et al., 2011).

3.2.1 Cultivo das linhagens tumorais

Após o descongelamento, as células foram transferidas para garrafas de cultura de 75 cm² contendo 10 mL de meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco® Califórnia, USA) e meio Ham's F-12 Nutrient Mixture (Gibco®, Califórnia, USA) na proporção de 1:1 (v:v), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco®, Califórnia, USA) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Gibco®, Califórnia, USA). Posteriormente as garrafas foram incubadas em atmosfera úmida a 37 °C, 5% de CO₂ e 95% de umidade. O crescimento celular foi monitorado em microscópio invertido e o meio trocado a cada 2-3 dias. Ao atingirem confluência de 70%, as células foram destacadas da garrafa, através do processo de tripsinização. Para tal, o meio foi aspirado e as células lavadas com 5 mL de PBS (do inglês: *Phosphate Buffered Saline*- tampão fosfato salino) 1X estéril de pH 7,2. As garrafas foram então incubadas com 6 mL de tripsina (0,05 % Gibco®, Califórnia, USA) por 5 minutos. Após este período de ação da tripsina, adicionou-se 6 mL de meio de cultura (DMEM/F12 acrescido de SFB) para inativação da enzima. As células em suspensão foram centrifugadas a temperatura ambiente a 1500 rpm (rotações por minuto) por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, e o

pellet (precipitado de células) ressuspendido em 5 mL de meio de cultura. As células foram então contadas em câmara de Neubauer e utilizadas nos experimentos de viabilidade celular e extração de RNA.

3.3 Cultura primária de queratinócitos orais não tumorais

Queratinócitos orais humanos não tumorais, derivados de culturas primárias foram utilizados como modelo de células normais. As células foram originalmente concedidas para a pesquisa por doadores voluntários, submetidos a cirurgias odontológicas e armazenados em biobanco pelo Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP).

3.3.1 Cultivo de queratinócitos

O cultivo de queratinócitos foi realizado no laboratório da Profa. Dra. Mônica Beatriz Mathor no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP). Para a obtenção de quantidades suficientes, as células foram cultivadas sobre camada de sustentação em um meio de cultura composto de DMEM e F-12 (2:1; v:v), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Hyclone®, Omaha, USA), penicilina (100 U.mL^{-1}), estreptomicina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), gentamicina ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), anfotericina B ($2.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$), glutamina (4 mM), adenina (0.18 mM) (Sigma- Aldrich®, St. Louis, USA), insulina ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA), hidrocortisona ($0.4 \mu\text{g. mL}^{-1}$) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA), toxina colérica (0.1 nM) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA), triiodotironina (20 pM) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) e fator de crescimento epidermal (EGF) (10 ng.mL^{-1}) (R&D Systems®, Goodhue, USA).

3.4 Padronização de crescimento das linhagens tumorais

Para a determinação do perfil de crescimento das linhagens tumorais SCC-9, SCC-25 e FaDu, as células foram cultivadas conforme descrito no item 3.3.1.1, e plaqueadas nas concentrações de 5.000; 10.000 e 15.000 células por poço, em microplacas de 96 poços. As placas foram incubadas em atmosfera úmida a 37°C e

5% de CO₂ e a viabilidade celular avaliada após 24 (T=0h), 48 (T=24h), 72 (T= 48h) e 96 (T=72h) horas de plaqueamento (Figura 6). Em cada um dos tempos de avaliação a viabilidade celular foi avaliada pelo métodos MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio; Sigma-Aldrich®), conforme descrito no item 3.5.1 e contagem celular, conforme item 3.5.2. Para o MTT o meio de cultura foi retirado e foram adicionados 200 µL de meio novo contendo 0,5 mg.mL⁻¹ de MTT. As placas foram incubadas por 4 horas, centrifugadas a 2.000 rpm por 5 minutos, e em seguida, retirados o meio de cultivo. Para a leitura adicionou-se aos poços 100 µL de DMSO. Após 1 hora de incubação, a placa foi lida em comprimento de onda de 570 nm, em uma leitora de microplaca (Spectra max i3), obtendo-se a densidade óptica (DO) de cada poço, correspondendo a concentração de sais de MTT que foram convertidos em azul de formazan pelas células viáveis. O perfil de crescimento das linhagens também foi avaliado através de microscopia óptica de contraste de fase, utilizando-se microscópio FSX-100 (Olympus®).

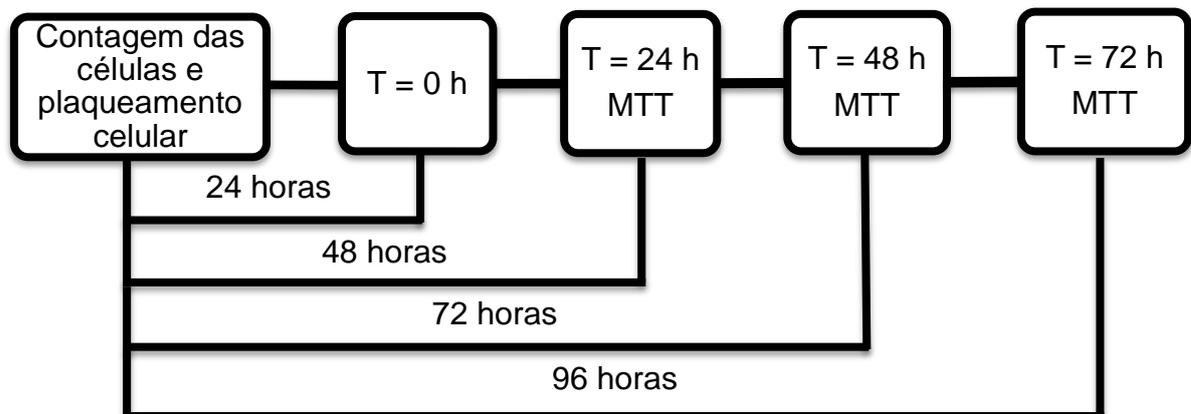


Figura 6- Esquema representativo do experimento de padronização das linhagens celulares por MTT.

3.4.1 Padronização de crescimento dos queratinócitos orais normais

Para a determinação do perfil de crescimento de queratinócitos orais normais, as células foram crescidas conforme descrito no item 3.3.2.1, e plaqueadas em microplacas de 96 poços nas concentrações de 5.000; 15.000; 30.000 e 60.000 células por poço. As placas foram incubadas em atmosfera úmida a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 (T=0h), 48 (T=24h), 72 (T= 48h) e 96 (T=72h) horas de plaqueamento,

o meio de cultura foi retirado, e as células foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em meio de cultura para contagem em câmara de Neubauer de acordo com o item 3.5.2 (Figura 7). O perfil de crescimento dos queratinócitos também foi avaliado através de microscopia óptica de contraste de fase, utilizando-se microscópio FSX-100 (Olympus®).

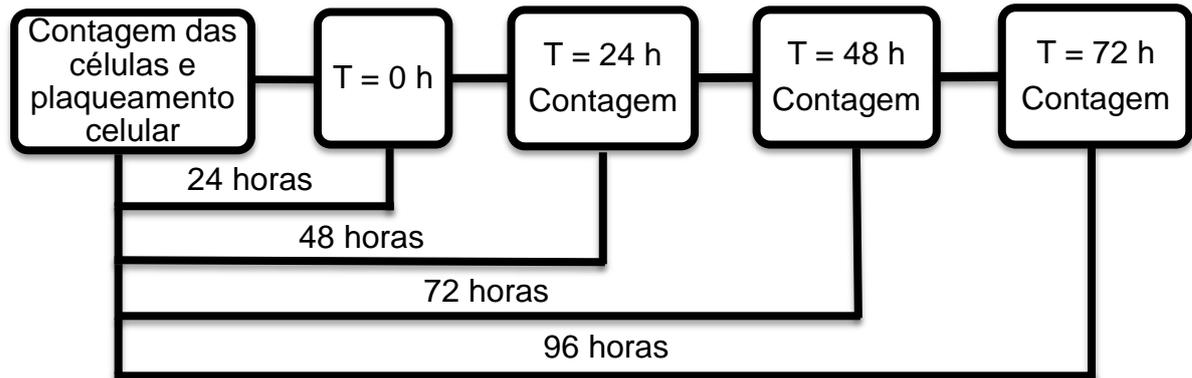


Figura 7- Esquema representativo do experimento de padronização dos queratinócitos orais normais por contagem celular.

A concentração de células por mL foi determinada pela contagem do número de células dividido pelo número de quadrantes contados e multiplicado pelo fator de conversão da câmara de Neubauer, como exemplificado abaixo:

$$\text{Número de células/mL} = (\text{contagem de células} / \text{número de quadrantes}) \times 10000$$

3.5 Avaliação da viabilidade celular pelo método MTT

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados pelo método colorimétrico MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio; Sigma-Aldrich®). Este método de análise de viabilidade celular consiste na avaliação da conversão (redução) do sal de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio; Sigma-Aldrich®) de coloração amarela e solúvel em água pelas células no interior das mitocôndrias a um produto denominado formazan (insolúvel em água de

coloração arroxeadada) pelas enzimas dehidrogenase presentes nas mitocôndrias (figura 8). Desta forma, apenas as células com mitocôndrias viáveis serão capazes de converter o corante. Este produto, acumulado no interior da célula, pode ser extraído por meio da adição de um solvente apropriado, no caso o DMSO (MOSMANN, 1983) e quantificado através de espectrofotometria.

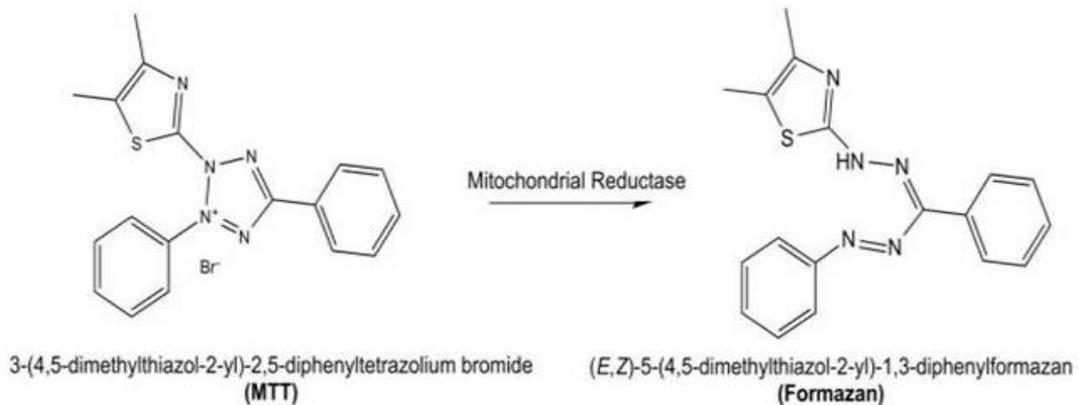


Figura 8- MTT. Transformação do MTT em Formazan.

As células tumorais e queratinócitos normais foram cultivadas em placas de 96 poços (5.000 células/poço e 15.000 células/poço, respectivamente), em meios específicos contendo 10% de SFB, sem adição de solução antibiótica/antimicótica. As placas foram incubadas por 24 horas em estufa a 37 °C, contendo 5% de CO₂ para aderência das células. Decorridas 24 horas, retirou-se o meio de cultura, e adicionou-se 200 µL das substâncias maitenina e 22-β-hidroxi-maitenina em concentrações de 1,2 a 12 µM. Como controle positivo, utilizou-se a cisplatina a qual foi testada nas concentrações de 10 a 100 µM. As placas foram então incubadas por mais 24, 48 e 72 horas. Foram incluídos nos ensaios poços controle contendo células, meio de cultura e DMSO. Após os períodos de tratamento o meio contendo as substâncias foi retirado, e em seguida foram adicionados 100 µL de solução de MTT em meio de cultura (0,5 mg.mL⁻¹), inclusive nos poços controle. As placas foram incubadas por mais 4 horas, centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos, e em seguida retirados o meio de cultivo. Para a leitura adicionou-se aos poços 100 µL de DMSO. Após 1 hora de incubação a 37 °C, a placa foi lida em comprimento de onda de 570 nm, em leitora de microplaca Spectra max i3 (Molecular Devices®). Após a

realização das leituras, a densidade óptica obtida para cada tratamento foi utilizada para a determinação da porcentagem de viabilidade celular, através da fórmula descrita abaixo:

$$\% \text{ viabilidade celular} = (\text{DO células tratadas} / \text{DO células não tratadas}) \times 100$$

3.5.1 Avaliação da viabilidade celular pelo método contagem celular

Os resultados de viabilidade celular por MTT foram confirmados por contagem celular. Após o tratamento as células foram destacadas com tripsina, centrifugadas, ressuspensas em meio de cultura e contadas em câmara de hemocítômetro (figura 9).

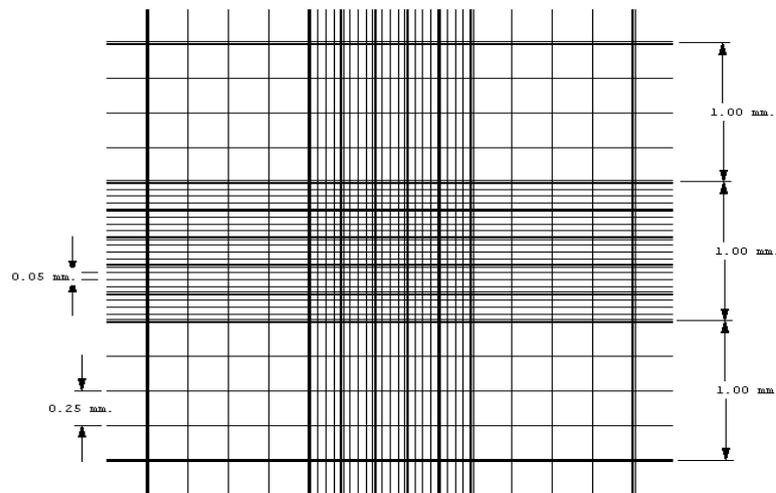


Figura 9- Câmara de Neubauer.

O ensaio foi realizado em triplicata e a média, bem como o erro padrão, foram calculados através do programa (GRAPHPAD PRISM, 2007).

As células também foram avaliadas através de microscopia de contraste de fase, utilizando-se microscópio óptico FSX-100 (Olympus®).

3.5.2 Determinação da IC₅₀

Através dos ensaios de viabilidade celular, determinou-se a IC_{50} (do inglês: *Inhibitory Concentration*), concentração do fármaco necessária para inibir 50% da viabilidade celular. A IC_{50} foi determinada a partir de uma curva de dose-resposta, através de uma curva de interpolação, correlacionando o percentual médio de células viáveis em relação ao controle. Após a obtenção do gráfico, traçou-se uma linha de tendência polinomial de ordem 2, a qual gerou uma equação de segundo grau, onde $y = 50$ (relacionando com 50% de viabilidade celular) e o valor obtido para x corresponde a IC_{50} . A média, bem como o erro padrão obtidos de cada tratamento em triplicata foram calculados através do programa (GRAPHPAD PRISM, 2007).

3.5.3 Índice de Seletividade

O índice de seletividade (IS) foi utilizado para avaliar a diferença entre a ação de um composto em linhagens tumorais e célula não tumoral. O IS é calculado dividindo-se o valor da IC_{50} de cada composto obtido para a linhagem tumoral pelo valor da IC_{50} de cada composto obtido para as células normais (queratinócitos orais não tumorais) ($IS = IC_{50}$ linhagens tumorais de CECP / IC_{50} dos queratinócitos orais normais). Foi considerado significativo um valor de IS maior ou igual a 2,0, significando que o composto testado é duas vezes mais ativo nas linhagens tumorais.

3.5.4 Avaliação do efeito de triterpenos (IC_{50}) ao longo do tempo

Após a obtenção dos valores de IC_{50} , as células foram tratadas nas concentrações determinadas a fim de avaliar o que ocorre com as células tratadas ao longo do tempo. Os tratamentos foram realizados por 6, 24, 48 e 72 horas, e a viabilidade celular avaliada por MTT, contagem celular e análise por microscopia óptica de contraste de fase, conforme descritos no item 3.5. Análises estatísticas foram realizadas através do programa Graphpad Prism (versão 5.0), aplicando-se teste ANOVA fator 1 (teste paramétrico) e Tukey (correção de p valor para comparação múltipla); ANOVA fator 2 (teste paramétrico) e Bonferroni (correção de p valor para comparação múltipla). Os valores de p menores do que 0.05 foram considerados estatisticamente significativos.

3.6 Extração de RNA

As células tratadas com a IC_{50} das substâncias maitenina e 22- β -hidroximaitenina foram submetidas à extração de RNA seguindo o protocolo de extração do AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini kit Qiagen ou pelo método com Trizol (TRIzol® Reagent) de acordo com as instruções do fabricante. No caso da extração por trizol o meio de cultura foi aspirado e as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x. Adicionou-se 400 μ L de solução de lise e agitou-se vigorosamente por 10 segundos no vórtex a fim de obter um lisado homogêneo. Adicionou-se clorofórmio (com base na quantidade de trizol) e incubou-se a temperatura ambiente por 2 a 3 minutos. O lisado foi então centrifugado a 12000xg por 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e então adicionou-se 5 μ L de glicogênio, seguida de adição de 125 μ L de isopropanol. Incubou-se por 10 minutos a temperatura ambiente e em seguida centrifugou-se a 12000xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e adicionou-se 250 μ L de etanol a 75%. O material foi centrifugado a 7500xg por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante removido, adicionou-se 15 μ L de água livre de RNase ao precipitado e o mesmo foi incubado a 55 °C por 10 minutos.

O RNA extraído foi avaliado quanto à sua qualidade e concentração por meio do espectrofotômetro NanoVue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare Life Sciences™) e guardado a -80oC até sua utilização.

3.6.1 miRNAs relacionados à proliferação celular e apoptose

Para a seleção de miRNAs relacionados com proliferação celular utilizamos inicialmente o artigo de Lenkala et al., 2014. Neste artigo examinam a relação entre a expressão de miRNAs e o crescimento celular intrínseco (iGrowth) em linhagens celulares linfoblastóides (LCLs) derivadas de indivíduos saudáveis de diferentes origens étnicas. Para tal, utilizaram um modelo matemático de efeito misto (MEM) para controlar diversas condições ambientais (dentre elas, a passagem de células, tempo de experimento, lote de soro) o que permitiu reunir dados de várias replicatas ao longo de 5 anos. Foi possível obter um fenótipo de crescimento celular intrínseco

(iGrowth) em mais de 500 LCLs (IM et al., 2012). Para detectar correlações significativas entre o iGrowth e a expressão de miRNAs, realizaram uma análise conjunta para duas populações: caucasianos de ascendência europeia e norte americana (CEU) e indivíduos de Ibadan, Nigéria (YRI), utilizando o Exiqon miRCURY LNA arrays v.10.0 (Exiqon array) em 107 LCLs (53 CEU e 54 YRI) (GAMAZON et al., 2012). Uma análise de regressão linear foi executada através do pacote de R entre os 201 miRNAs expressos de forma confiável em LCLs e o iGrowth das amostras CEU e YRI, conjunto ou separadamente. Como resultado, encontraram 53 miRNAs que foram significativamente correlacionado com o iGrowth (LENKALA et al., 2014) (Anexo A: MiRNAs correlacionado com o iGrowth (LENKALA et al., 2014)). Para este resultado utilizaram p valor corrigido (FDR) <0,05 como limite de significância (LENKALA et al., 2014). Em uma segunda abordagem a partir de uma busca na literatura por miRNAs comprovadamente associados com proliferação e apoptose celular, através de estudos funcionais, em tumores epidermóides de cabeça e pescoço. Consultou-se para tanto o banco de dados *PubMed* (National Center for Biotechnology Information, 2016).

3.6.2 Análise de expressão de miRNAs por *microarrays*

O microarranjo de DNA (*microarray*) é uma técnica que permite medir os níveis de expressão de uma grande quantidade de transcritos, ou de todos os transcritos humanos conhecidos, simultaneamente, através de um pareamento específico entre alvos e sondas. Consiste num arranjo pré-definido de moléculas de DNA (sondas) quimicamente ligadas a uma superfície sólida que servirão como *template* para a hibridação de alvos marcados com fluoróforos. A intensidade de fluorescência emitida pelos alvos hibridados em cada sonda é proporcional à quantidade de RNA correspondente a aquele alvo na amostra inicial sendo analisada. Ela será determinada utilizando-se um leitor de lâminas que incide luz no comprimento de onda de excitação de cada fluoróforo e detecta a luz emitida. Neste trabalho analisamos a expressão de miRNAs com o microarranjo de DNA SurePrint G3 Unrestricted miRNA 8x60K e o *miRNA Complete Labeling and Hybridization kit* (Agilent, EUA) para a marcação dos alvos seguimos estritamente os protocolos do fabricante. As amostras de RNA de cada célula (células tratadas durante 24, 48 e 72

horas com maitenina, bem como células cultivadas sem tratamento durante estes tempos) foram marcadas com o fluoróforo Cy3 e hibridizadas individualmente. As intensidades de fluorescência foram capturadas através do equipamento SureScan (Agilent) e processadas com auxílio do programa Feature Extraction (Agilent) para a análise da qualidade dos resultados e correção do *background*. A normalização dos dados e comparação dos resultados entre as amostras foi realizada pelo *software* Genespring (Agilent). Os resultados neste trabalho foram apresentados sob a forma de *fold-change* e p valor < 0.05 determinado por ANOVA foi considerado como significativo.

3.6.3 Detecção de miRNA específico por PCR em tempo real

A partir de 100ng de RNA total foi efetuada a síntese de cDNA por *TaqMan miRNA Reverse Transcription kit* (Life Technologies™) utilizando-se *primer* específico para o miRNA-196b (000496) e para o gene de referência *RNU48* (pequenos RNA nuclear utilizado para a normalização dos resultados (WONG et al., 2007) (001006). Para cada reação utilizou-se 20x RT primer, 100mM dNTP, MultiScribe Reverse Transcriptase (50U/μL), 10x RT Buffer, RNase inhibitor (20U/μL), amostra e água livre de nuclease para completar o volume de 15 μL. A síntese foi realizada no termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient) sob as condições de 16°C por 30 minutos, 42 °C por 30 minutos e 85 °C por 5 minutos.

A PCR em tempo real foi realizada por TaqMan® Universal PCR Master Mix (Life Technologies™, New York, USA), de acordo com as instruções do fabricante utilizando-se primers e sondas específicos para miR-196b (000496) e RNU48 (001006). As reações de amplificação foram preparadas em tubos ópticos, em duplicata, contendo TaqMan® 2x Master Mix, TaqMan® Small RNA assay 20x, produto da reação RT (cDNA) e água livre de nuclease. Em seguida as reações foram levadas ao Termociclador 7500 Real Time PCR Systems (Life Technologies) e submetidas às seguintes condições de ciclagem: 95 °C por 10 minutos, 45 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 minuto, com volume final de 20 μL.

A análise dos resultados da PCR em tempo real foi realizada através de quantificação relativa segundo o modelo matemático de Pfaffl (2001) conhecido como “método $\Delta\Delta Ct$ ”. O cálculo baseia-se na comparação dos valores de Ct (do

inglês, *cycle threshold*) normalizado pela expressão de um gene referência entre dois grupos de amostras no momento em que a PCR atinge a fase exponencial de amplificação. Ainda de acordo com este modelo a diferença de expressão será representada por uma razão entre os valores normalizados calculados obtida através da fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

A significância estatística foi determinada comparando-se os valores de delta Ct das amostras, através do software (GRAPHPAD PRISM, 2007). Utilizamos o paramétrico t de Student e os valores de p menores do que 0.05 foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

Com o objetivo de padronizar o número de células a serem inicialmente plaqueadas de forma a permanecerem em fase exponencial de crescimento durante os intervalos de tempo a serem testados (24h, 48h e 72h), avaliou-se o perfil de crescimento das linhagens celulares. A fase exponencial é a fase de maior atividade metabólica das células e optamos por avaliar o efeito das duas substâncias neste momento.

Conforme ilustrado na figura 10, células tumorais SCC-25 e FaDu quando plaqueadas na concentração de 5.000 células/poço apresentaram crescimento exponencial até o período T=72 horas. Em todas as concentrações testadas, a linhagem SCC-9 apresentou perfil de crescimento exponencial até o período de 48 horas, quando as células começaram então a entrar em fase estacionária. O ideal, portanto seria utilizar um número menor de células para esta linhagem, todavia, quando um número menor de células é plaqueado, o crescimento é muito mais lento quando comparado às outras linhagens tumorais (dados não apresentados). Acredita-se que para estas células o contato de adesão célula-célula seja fator relevante para o crescimento celular.

Em relação aos queratinócitos, a diferença no plaqueamento celular não mostrou diferença estatística significativa, desta forma, optou-se por dar sequência aos ensaios com a concentração de 15.000 células/poço, por apresentarem perfil de crescimento visual muito próximo ao das linhagens tumorais a 5.000 células/poço.

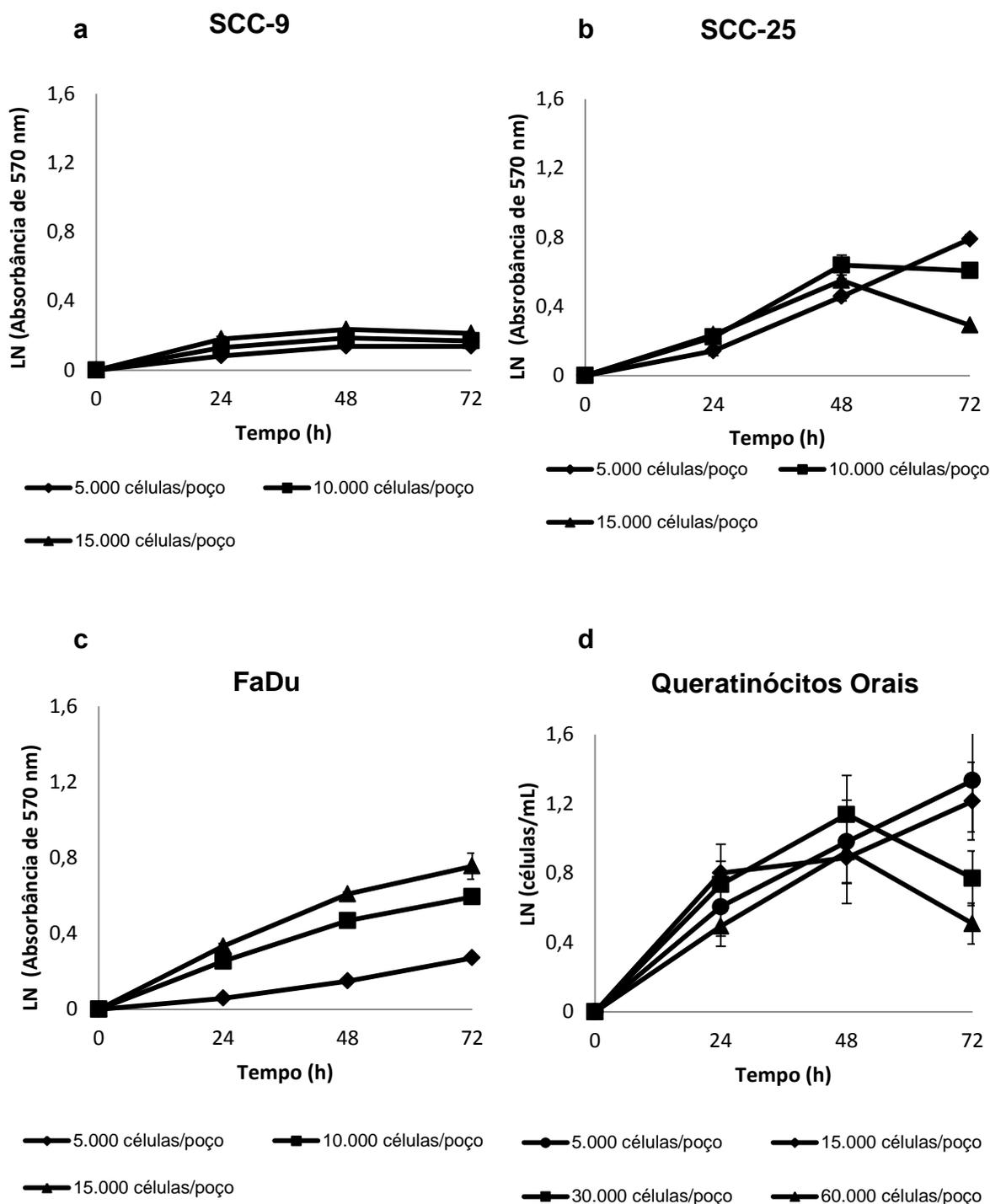


Figura 10- Perfil de crescimento das culturas celulares ao longo do tempo, contados a partir do período de plaqueamento. a) SCC-9; b) SCC-25, c) FaDu e d) queratinócitos orais não tumorais. Para as linhagens celulares o perfil de crescimento foi avaliado pela absorbância em 570 nm transformados em LN (logaritmo natural) enquanto que para os queratinócitos foi pelo número de células/mL transformados em LN (logaritmo natural). Barra de erro = erro padrão.

Com estes resultados encontramos que as melhores concentrações de células a serem utilizadas no experimentos são de 5.000 e 15.000 células/poço para linhagens tumorais e queratinócitos normais, respectivamente.

4.1 Determinação da IC₅₀ e índice de seletividade

A partir dos ensaios de viabilidade celular, determinou-se para cada linhagem a IC₅₀ dos triterpenos (maitenina e 22-β-hidroximaitenina) e da cisplatina (droga comercial) após 24 horas de tratamento (tabela 6). Os fármacos (maitenina, 22-β-hidroximaitenina e cisplatina) se mostraram mais tóxicos às linhagens celulares derivadas de CECP quando comparadas às células não tumorais (tabela 6).

Tabela 6- IC₅₀ de maitenina, 22-β-hidroximaitenina e cisplatina para as linhagens derivadas de CECP SCC-9, SCC-25 e FaDu e para queratinócitos orais derivados de cultura primária de pacientes saudáveis após 24 horas de tratamento.

Linhagens	IC ₅₀ (μM) dos fármacos		
	IC ₅₀ maitenina	IC ₅₀ 22-β-hidroximaitenina	IC ₅₀ cisplatina
SCC-9	1,5± 0,2	1,9± 0,2	59,1± 9,1
SCC-25	1,5± 0,3	1,9± 0,1	21± 3
FaDu	1,6± 0,2	2,5± 0,3	33,5± 0,6
Queratinócitos	6± 0,2	10,2± 0,4	85,6± 2,1

Comparamo-se os os resultados para maitenina e 22-β-hidroximaitenina para cada linhagem observou-se que o tratamento com maitenina se mostrou mais tóxico para a linhagem FaDu se comparada ao tratamento com 22-β-hidroximaitenina (figura 11).

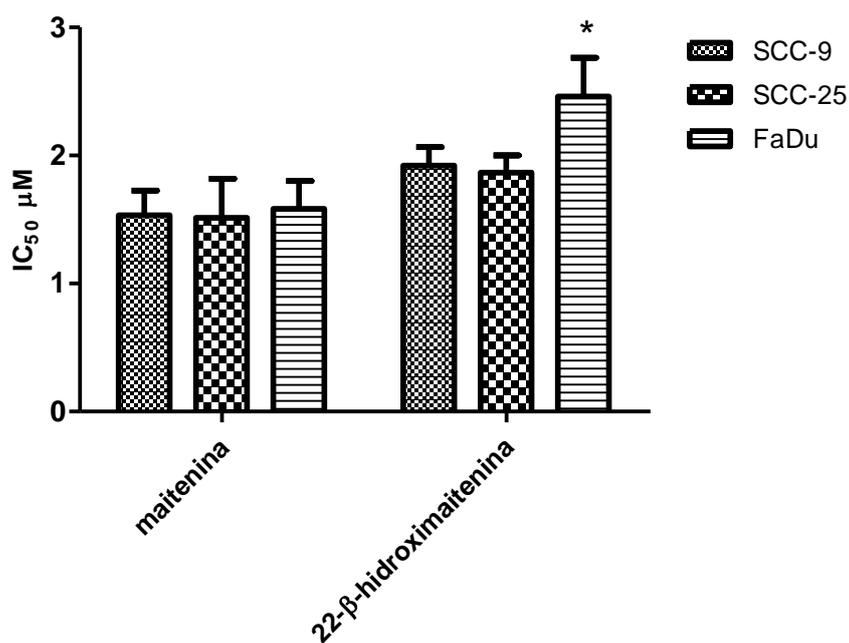


Figura 11- Comparação entre a IC₅₀ dos triterpenos (maitenina e 22-β-hidroxi-maitenina) após 24 horas de tratamento para as linhagens tumorais (SCC-9; SCC-25 e FaDu). Houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Barra de erro = erro padrão. Teste ANOVA 2 fatores e p valor corrigido por Bonferroni. * $p < 0,05$.

As linhagens derivadas de CECP apresentaram maior sensibilidade aos tratamentos com os triterpenos em relação aos queratinócitos orais não tumorais (figura 12). Os queratinócitos orais se mostraram menos sensíveis ao tratamento com 22-β-hidroxi-maitenina se comparado ao tratamento com maitenina.

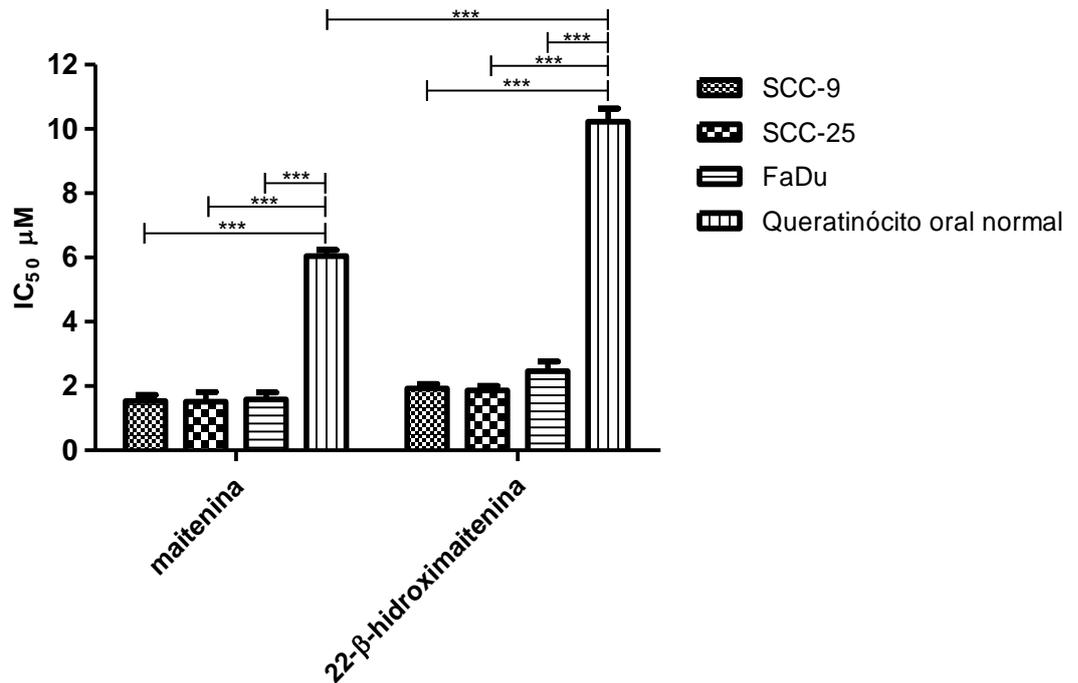


Figura 12- IC₅₀ dos triterpenos (maitenina e 22-β-hidroxi-maitenina) após 24 horas de tratamento para as linhagens tumorais (SCC-9; SCC-25 e FaDu) e queratinócitos orais normais derivados de cultura primária. Houve diferença estatística significativa ($p < 0,001$) entre as linhagens tumorais (SCC-9; SCC-25; FaDu) e os queratinócitos orais não tumorais tratados com maitenina, ($p < 0,001$) entre as linhagens tumorais (SCC-9; SCC-25; FaDu) e os queratinócitos orais não tumorais tratados com 22-β-hidroxi-maitenina e ($p < 0,001$) entre os tratamentos. Barra de erro = erro padrão. Teste ANOVA 2 fatores e p valor corrigido por Bonferroni. *** $p < 0,001$.

O cálculo de seletividade demonstrou que os dois triterpenos possuem maior atividade citotóxica em linhagens celulares derivadas de CECP quando comparadas com queratinócitos normais quando utilizada a IC₅₀ (tabela 7 e figura 13). A seletividade é igual ou superior quando comparada aos resultados para cisplatina em todas as situações. O triterpeno 22-β-hidroxi-maitenina apresentou a maior diferença com relação em seu efeito citotóxico entre linhagens tumorais e queratinócitos orais, de acordo com o índice de seletividade (IS), entre os compostos testados (tabela 7 e figura 13).

Tabela 7- Índice de seletividade para as substâncias avaliadas em relação aos queratinócitos orais normais derivados de cultura primária.

Índice de seletividade dos fármacos			
Linhasgens	IS maitenina	IS 22-β-hidroximaitenina	IS cisplatina
SCC-9	4,1± 0,6	5,3± 0,2	1,5± 0,3
SCC-25	4,3± 0,9	5,6± 0,6	4,3± 0,7
FaDu	3,9± 0,5	4,3± 0,7	2,6± 0,2

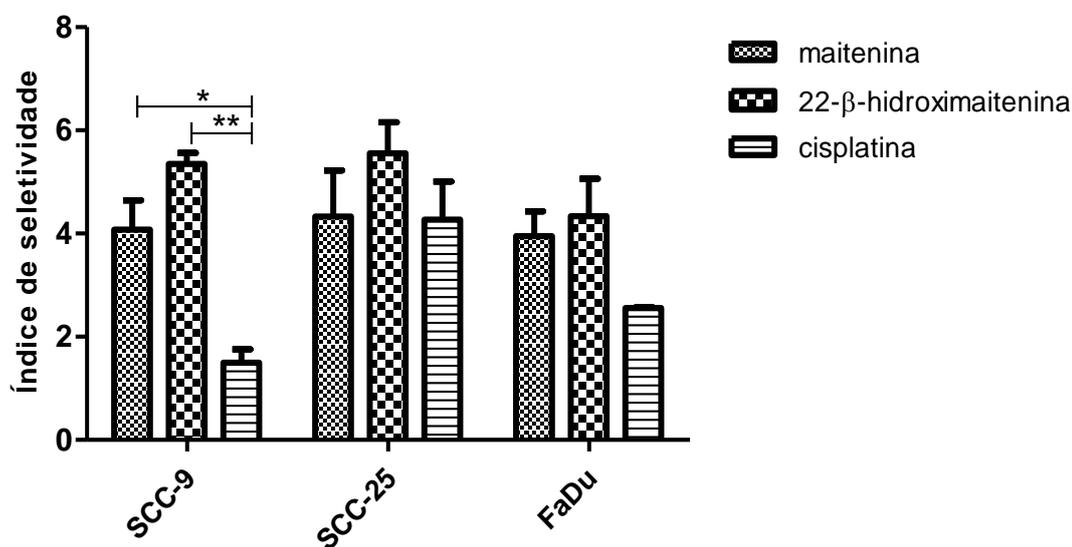


Figura 13- Índice de seletividade para as substâncias maitenina, 22-β-hidroximaitenina e cisplatina em linhagens tumorais (SCC-9; SCC-25 e FaDu) avaliadas em relação aos queratinócitos orais normais derivados de cultura primária. Houve diferença estatística significativa entre os tratamentos de 22-β-hidroximaitenina e cisplatina para a linhagem SCC-9 ($p < 0,01$) e entre os tratamentos de maitenina e cisplatina para SCC-9 ($p < 0,05$). Barra de erro = erro padrão. Teste ANOVA 2 fatores e p valor corrigido por Bonferroni. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

4.2 Avaliação do efeito de triterpenos (IC₅₀) ao longo do tempo em linhagens celulares e queratinócitos orais

Para avaliar a resposta das células ao tratamento com os triterpenos quinonametídeos ao longo do tempo, as mesmas foram tratadas na IC₅₀ correspondente e avaliadas pelo método MTT e contagem celular.

Como observamos nas figura 14, 15 e 16 houve diminuição da viabilidade celular ao longo do tempo para todos os tratamentos e linhagens celulares, ou seja, o efeito permaneceu durante 72 horas, aparentemente sem retomada do crescimento por parte das células remanescentes após 24 horas (figura 14 a 16).

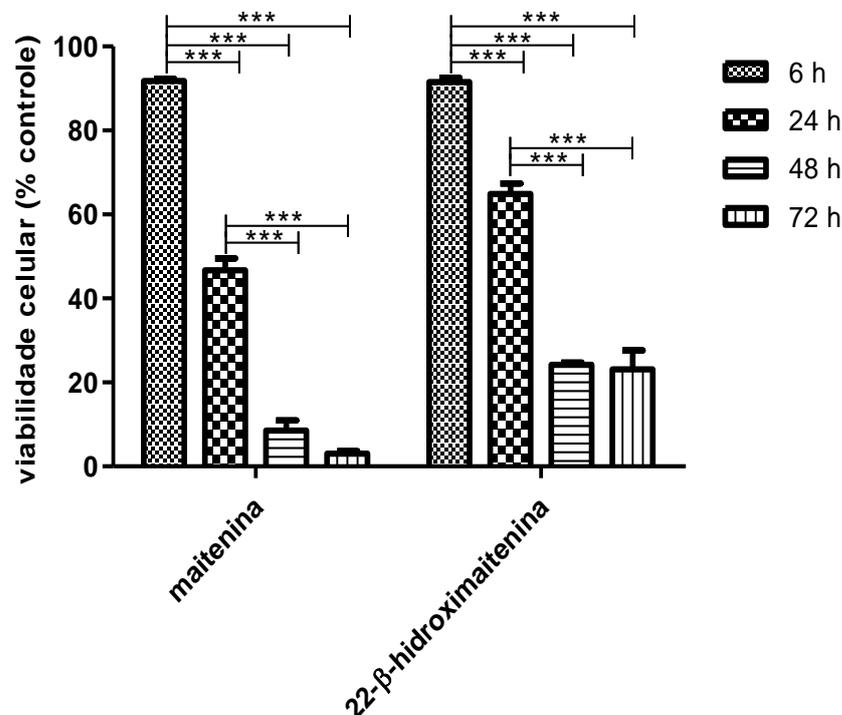


Figura 14- Viabilidade celular pelo método MTT de células de CECp derivadas de tumor de língua (SCC-9) submetidas ao tratamento com 2 μM de maitenina e 2 μM de 22-β-hidroxi-maitenina por 6, 24, 48 e 72 horas. Houve diferença estatística significativa ($p < 0,001$) entre os tratamentos de 6 e 24 horas, 6 e 48 horas, 6 e 72 horas e entre 24 e 48 horas e 24 e 72 horas. Teste ANOVA 2 fatores e p valor corrigido por Bonferroni. *** $p < 0,001$.

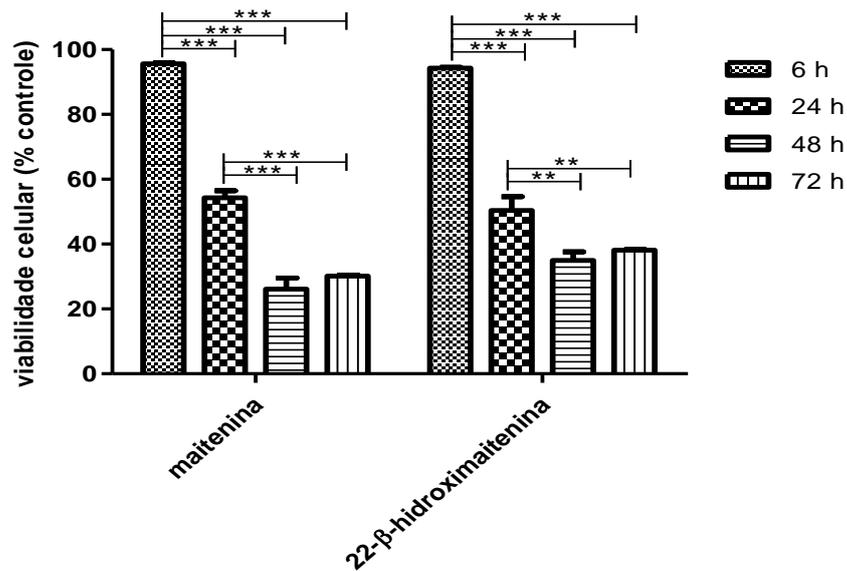


Figura 15- Viabilidade celular pelo método MTT de células de CECP derivadas de tumor de língua (SCC-25) submetidas ao tratamento com 2 μ M de maitenina e 2 μ M de 22- β -hidroximaitenina por 6, 24, 48 e 72 horas. Houve diferença estatística significativa ($p < 0,001$) entre o tratamento com maitenina de 6 e 24 horas, 6 e 48 horas, 6 e 72 horas e entre 24 e 48 horas e 24 e 72 horas. Com relação ao tratamento com 22- β -hidroximaitenina houve diferença estatística significativa ($p < 0,01$) entre 24 e 48 horas e 24 e 72 horas. Barra de erro = erro padrão. Teste ANOVA 2 fatores e p valor corrigido por Bonferroni. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

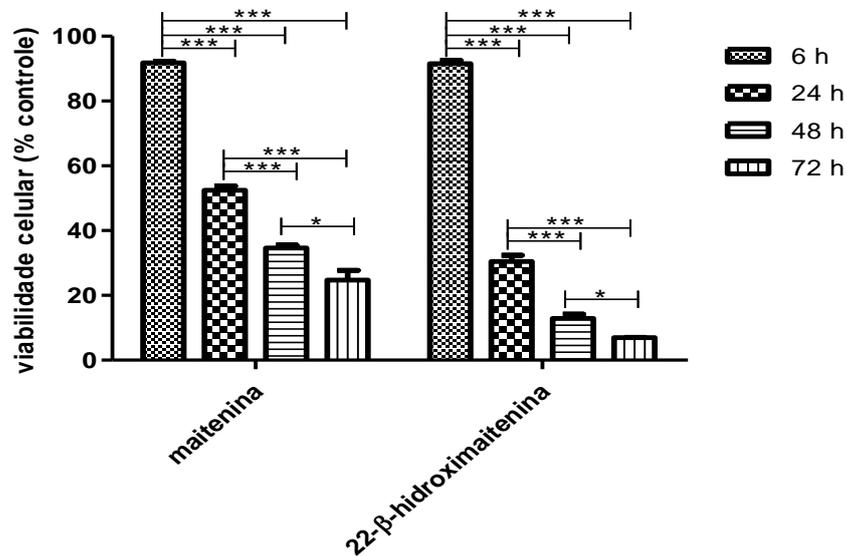


Figura 16- Viabilidade celular pelo método MTT de células de CECP derivadas de tumor de orofaringe (FaDu) submetidas ao tratamento com 2 μ M de maitenina e 3 μ M de 22- β -hidroximaitenina por 6, 24, 48 e 72 horas. Houve diferença estatística significativa ($p < 0,001$) entre os tratamentos de 6 e 24 horas, 6 e 48 horas, 6 e 72 horas e entre 24 e 48 horas e 24 e 72 horas e ($p < 0,05$) entre 48 e 72 horas. Teste ANOVA 2 fatores e p valor corrigido por Bonferroni. *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$.

Diferente do que ocorreu com as linhagens tumorais, quando as células de queratinócitos orais normais foram tratadas com os triterpenos não houve diminuição na viabilidade celular ao longo do tempo (figura 17).

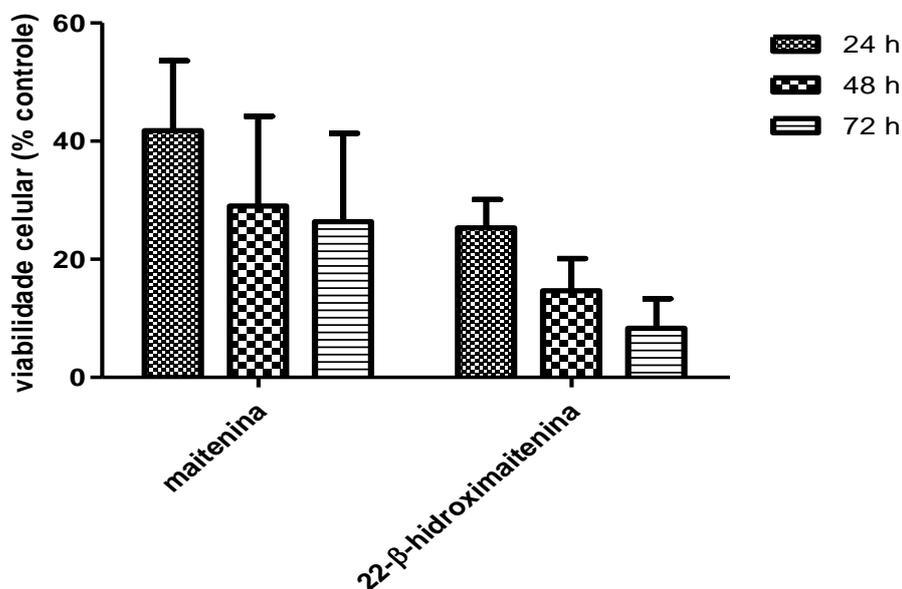


Figura 17- Viabilidade celular pelo método MTT de queratinócitos orais normais derivados de cultura primária submetidas ao tratamento com 6 μ M de maitenina e 11 μ M de 22- β -hidroximaitenina por 24, 48 e 72 horas. Não houve diferença estatística significativa entre os horários dos tratamentos. Barra de erro = erro padrão. Teste ANOVA 2 fatores e p valor corrigido por Bonferroni.

Através de imagens adquiridas em microscópio óptico observamos que não há alteração morfológica quando as células são tratadas por 6 horas (figura 18), porém observamos alterações com 24 horas de tratamento, quando as células passam a apresentar morfologia mais arredondada (figura 19). O mesmo efeito não foi observado em queratinócitos não tumorais (figura 20).

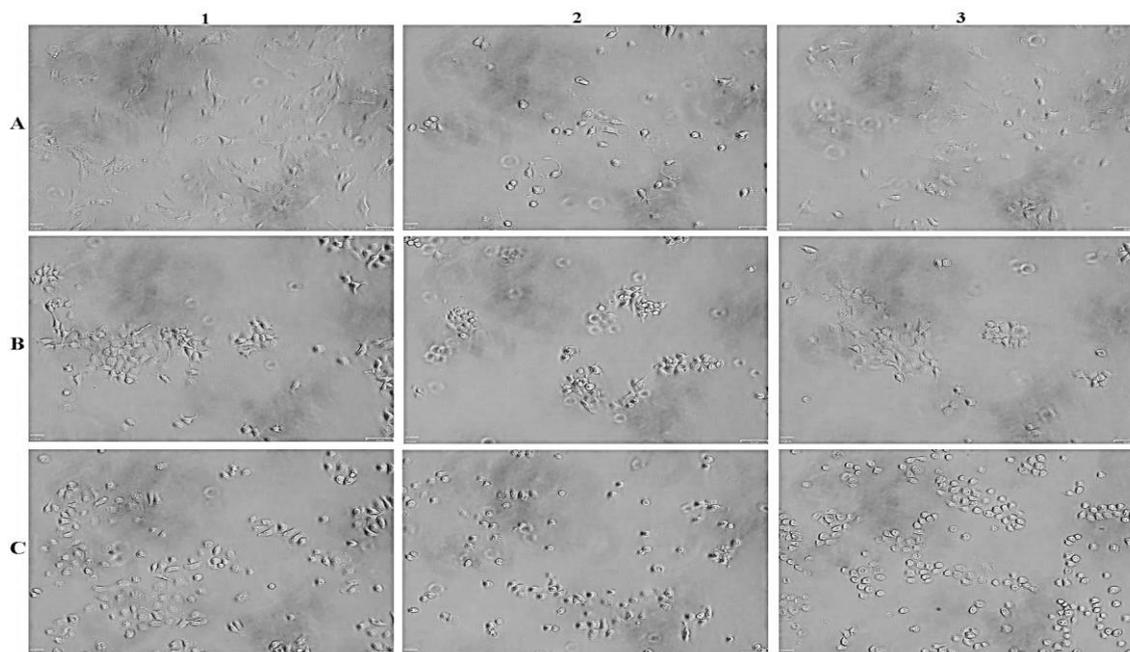


Figura 18- Perfil morfológico das linhagens derivadas de CECP após 6 horas de tratamento. A: SCC-9, B: FaDu, C: SCC-25; 1: controle, 2: maitenina, 3: 22-β-hidroximaitenina. (As linhagens SCC-9, FaDu e SCC-25 foram submetidas ao tratamento com 2; 2 e 2 μM de maitenina respectivamente e 2; 3 e 2 μM de 22-β-hidroximaitenina respectivamente) 5×10^3 células/poço. Imagens obtidas com microscópio óptico FSX-100 (Olympus®), aumento de 10x.

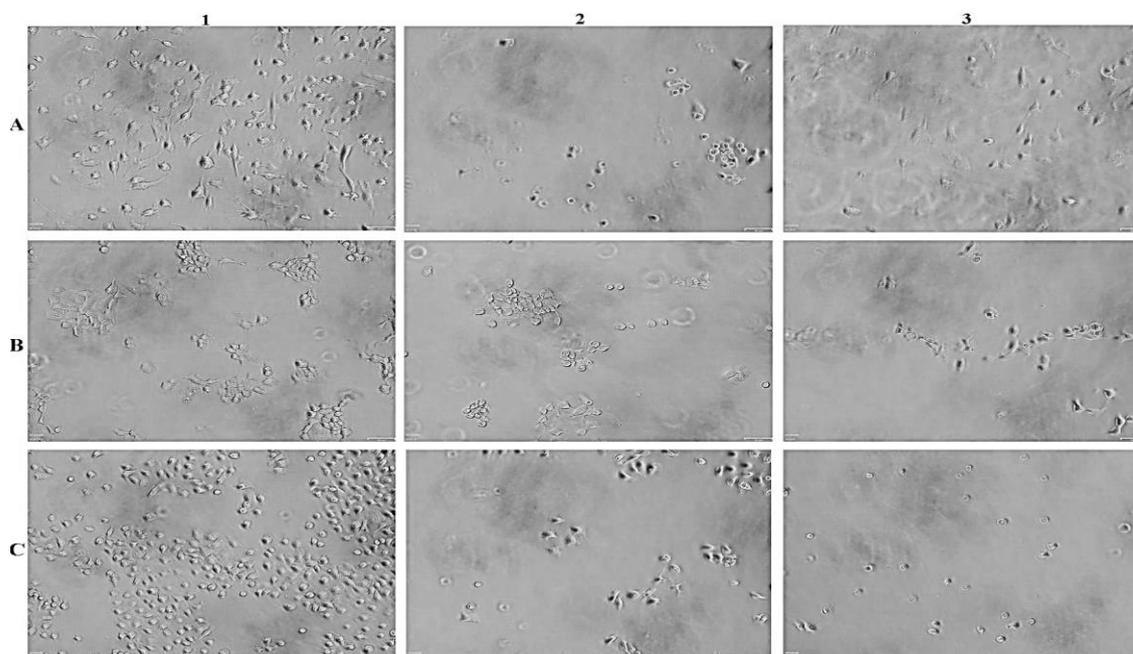


Figura 19- Perfil morfológico das linhagens derivadas de CECP após 24 horas de tratamento. A: SCC-9, B: FaDu, C: SCC-25; 1: controle, 2: maitenina, 3: 22-β-hidroximaitenina. (As linhagens SCC-9, FaDu e SCC-25 foram submetidas ao tratamento com 2; 2 e 2 μM de maitenina respectivamente e 2; 3 e 2 μM de 22-β-hidroximaitenina respectivamente). 5×10^3 células/poço. Imagens obtidas com microscópio óptico FSX-100 (Olympus®), aumento de 10x.

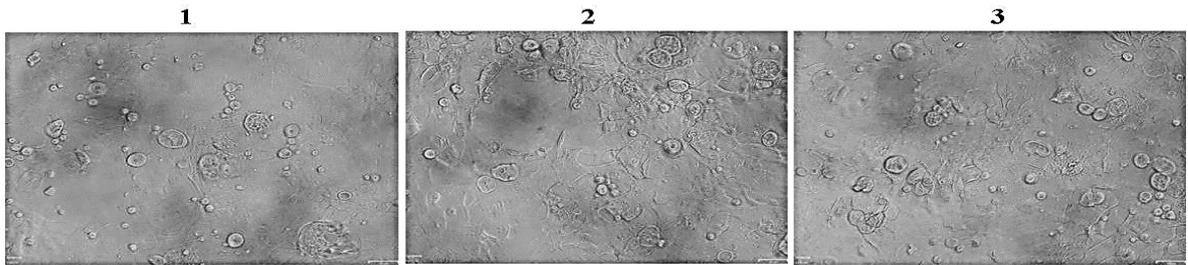


Figura 20- Perfil morfológico de queratinócitos orais não tumorais após 24 horas de tratamento 1: controle, 2: maitenina, 3: 22-β-hidroximaitenina (Os queratinócitos orais foram submetidas ao tratamento com 6 μM de maitenina e 12 μM de 22-β-hidroximaitenina) $1,5 \times 10^4$ células/poço. Imagens obtidas com microscópio óptico FSX-100 (Olympus®), aumento de 10x.

O perfil de seletividade encontrado para os triterpenos estudados aponta para a primeira característica positiva desses compostos, uma vez que o grande problema hoje com os quimioterápicos além da questão da resistência, são os efeitos em tecido normal.

4.3 Expressão de miRNAs em células SCC-25 tratadas com maitenina

Com o intuito de avaliar o efeito do tratamento sobre a expressão de miRNAs, realizamos um ensaio por *microarray* comparando a expressão de miRNAs em células SCC-25 tratadas com maitenina com a expressão de miRNAs expressos em células não tratadas. Os miRNAs que apresentaram diferença de expressão significativa entre células tratadas e não tratadas estão listados na Tabela 8. Cento e um miRNAs apresentaram regulação significativa considerando os 3 tempos ($p < 0.05$). Dentre esses, 62 miRNAs apresentaram maior expressão nas células não tratadas se comparadas às tratadas, indicando que o tratamento reduziu a expressão destes miRNAs. Entre eles, existem miRNAs com funções ainda desconhecidas de acordo com a literatura.

Tabela 8- MiRNAs com expressão alterada entre a linhagem SCC-25 tratada com maitenina e células não tratadas. 101 miRNAs foram encontrados desregulados após tratamento com maitenina por 24, 48 e 72 horas ($p < 0,05$). Valores positivos (up) de fold-change indicam maior expressão nas células não tratadas e valores negativos (down) indicam maior expressão nas células tratadas.

miRNA	Regulação não tratado vs tratado	p-valor	miRNA	Regulação não tratado vs tratado	p-valor	miRNA	Regulação não tratado vs tratado	p-valor
hsa-let-7b-5p	up	4,64E-02	hsa-miR-210	Up	4,67E-02	hsa-miR-4486	down	4,83E-02
hsa-let-7c	up	1,39E-03	hsa-miR-211-3p	up	1,19E-02	hsa-miR-4515	down	3,25E-02
hsa-let-7d-5p	up	2,07E-02	hsa-miR-212-3p	up	1,10E-03	hsa-miR-4516	down	4,08E-04
hsa-let-7g-5p	up	4,87E-02	hsa-miR-23b-3p	up	4,04E-02	hsa-miR-451b	down	6,01E-03
hsa-let-7i-5p	up	2,02E-02	hsa-miR-24-3p	up	1,01E-02	hsa-miR-4687-3p	down	5,87E-03
hsa-miR-103a-3p	up	1,03E-02	hsa-miR-25-3p	up	1,77E-02	hsa-miR-4701-3p	up	5,36E-04
hsa-miR-106b-5p	up	2,05E-02	hsa-miR-26a-5p	up	8,44E-04	hsa-miR-4701-5p	up	8,35E-04
hsa-miR-107	up	1,16E-02	hsa-miR-27b-3p	up	3,85E-02	hsa-miR-4713-3p	up	5,63E-03
hsa-miR-1207-5p	down	4,42E-02	hsa-miR-2861	down	2,40E-02	hsa-miR-4716-3p	up	2,83E-02
hsa-miR-1229-5p	down	3,62E-02	hsa-miR-30b-5p	up	3,86E-02	hsa-miR-4728-5p	up	9,87E-04
hsa-miR-1233-1-5p	up	1,36E-02	hsa-miR-3125	up	2,32E-03	hsa-miR-4730	down	4,55E-03
hsa-miR-1234-5p	down	2,69E-02	hsa-miR-3198	up	3,55E-02	hsa-miR-4741	down	3,07E-02
hsa-miR-1246	down	3,88E-03	hsa-miR-320a	up	7,67E-03	hsa-miR-4750-5p	up	2,63E-03
hsa-miR-1268a	down	9,32E-04	hsa-miR-320b	up	1,31E-02	hsa-miR-487b	up	3,36E-04
hsa-miR-1275	down	1,73E-02	hsa-miR-320c	down	1,34E-02	hsa-miR-5010-3p	down	2,87E-02
hsa-miR-1290	down	4,06E-06	hsa-miR-324-3p	up	4,81E-03	hsa-miR-5703	down	3,52E-03
hsa-miR-135b-5p	up	4,22E-03	hsa-miR-342-3p	up	2,98E-02	hsa-miR-572	down	1,81E-02
hsa-miR-148b-3p	up	1,88E-02	hsa-miR-34a-5p	up	1,78E-02	hsa-miR-5787	down	3,09E-04
hsa-miR-149-5p	up	2,88E-02	hsa-miR-361-5p	up	2,55E-02	hsa-miR-6068	down	1,69E-02
hsa-miR-1587	down	4,13E-02	hsa-miR-3651	up	2,91E-02	hsa-miR-6076	up	2,69E-02
hsa-miR-16-2-3p	up	2,80E-02	hsa-miR-3676-5p	up	7,29E-03	hsa-miR-6085	up	4,97E-02
hsa-miR-17-3p	up	2,05E-02	hsa-miR-3679-5p	down	1,64E-04	hsa-miR-6087	down	1,26E-02
hsa-miR-181d	up	2,50E-03	hsa-miR-374b-5p	up	1,84E-03	hsa-miR-6089	down	5,37E-03
hsa-miR-185-5p	up	2,33E-02	hsa-miR-378a-3p	up	8,96E-03	hsa-miR-6090	down	7,04E-03
hsa-miR-188-5p	down	1,96E-02	hsa-miR-3940-5p	down	2,38E-02	hsa-miR-630	down	9,58E-03
hsa-miR-1914-3p	up	4,06E-02	hsa-miR-3960	down	7,15E-03	hsa-miR-638	down	4,43E-02
hsa-miR-193b-3p	up	4,27E-02	hsa-miR-423-5p	up	2,34E-02	hsa-miR-642b-3p	down	2,63E-02
hsa-miR-196b-5p	up	3,48E-03	hsa-miR-4261	up	9,96E-04	hsa-miR-6510-5p	down	8,27E-03
hsa-miR-197-3p	up	3,17E-02	hsa-miR-4270	down	3,89E-02	hsa-miR-664b-3p	up	2,63E-02
hsa-miR-200b-3p	up	1,38E-02	hsa-miR-4281	down	4,27E-02	hsa-miR-6716-3p	down	5,43E-03
hsa-miR-200c-3p	up	1,08E-02	hsa-miR-4433-5p	down	2,89E-03	hsa-miR-6717-5p	up	9,74E-03
hsa-miR-205-5p	up	2,80E-02	hsa-miR-4459	down	7,48E-03	hsa-miR-93-5p	up	1,08E-02
hsa-miR-20b-5p	up	1,23E-02	hsa-miR-4466	down	3,39E-02	hur_5	up	1,25E-04
hsa-miR-21-3p	up	1,13E-04	hsa-miR-4484	up	4,97E-02			

Para a interpretação deste resultado com relação à regulação de proliferação celular e apoptose, processos essenciais na progressão tumoral, comparamos os miRNAs diferencialmente expressos entre células tratadas e não tratadas com maitenina (Anexo A), bem como com miRNAs associados com proliferação e apoptose em CECP segundo estudos funcionais da literatura (Apêndice A). A tabela 9 reporta os 15 miRNAs comuns a estes 3 conjuntos de dados.

Tabela 9- MiRNAs diferencialmente expressos entre SCC25 tratada com maitenina e células não-tratadas relacionados com crescimento intrínseco (iGrowth) ou com proliferação e apoptose em CECP. Valores positivos de fold-change indicam maior expressão nas células não tratadas e valores negativos indicam maior expressão nas células tratadas.

miRNA	Fold-change 24h (não tratado vs tratado)	Fold-change 48h (não tratado vs tratado)	Fold-change 72h (não tratado vs tratado)	p-valor	Associado ao iGrowth	Associado a estudos funcionais
miR-21	2,32	3,16	2,06	1,13E-04		✓
miR-24	6,89	2,30	5,93	1,01E-02		✓
miR-26a	4,57	2,48	2,08	8,44E-04		✓
miR-34a	36,82	23,58	9,66	1,78E-02	✓	✓
miR-93	2,45	2,85	2,03	1,08E-02	✓	✓
miR-106b	2,21	3,43	2,20	2,05E-02	✓	✓
miR-107	2,20	2,52	1,95	1,16E-02		✓
miR-135	40,85	21,16	2,53	4,22E-03		✓
miR-148	42,30	30,78	10,89	1,88E-02	✓	✓
miR-188	-7,12	-16,54	-5,89	1,96E-02		✓
miR-196b	43,30	26,88	3,38	3,48E-03		✓
miR-205	2,58	24,44	26,15	2,80E-02		✓
miR-423	14,94	12,94	5,78	2,34E-02	✓	✓
miR-451	-15,98	-2,27	-9,61	6,01E-03		✓
let-7	2,28	2,03	1,72	2,07E-02	✓	✓

Dentre os miRNAs selecionados, o tratamento com maitenina regulou negativamente a expressão do miRNA-21, miRNA-24, miRNA-26a, miRNA-34a, miRNA-93, miRNA-106b, miRNA-107, miRNA-135, miRNA-148, miRNA-196b, miRNA-205, miRNA-423 e let-7, enquanto que regulou positivamente miRNA-188 e miRNA-451 (figura 21).

Observa-se que a expressão de miR-196b foi a que apresentou maior variação. Por este motivo este miRNA foi escolhido para validações em outras

linhagens e para avaliar se o efeito após tratamento com 22- β -hidroximaitenina seria similar.

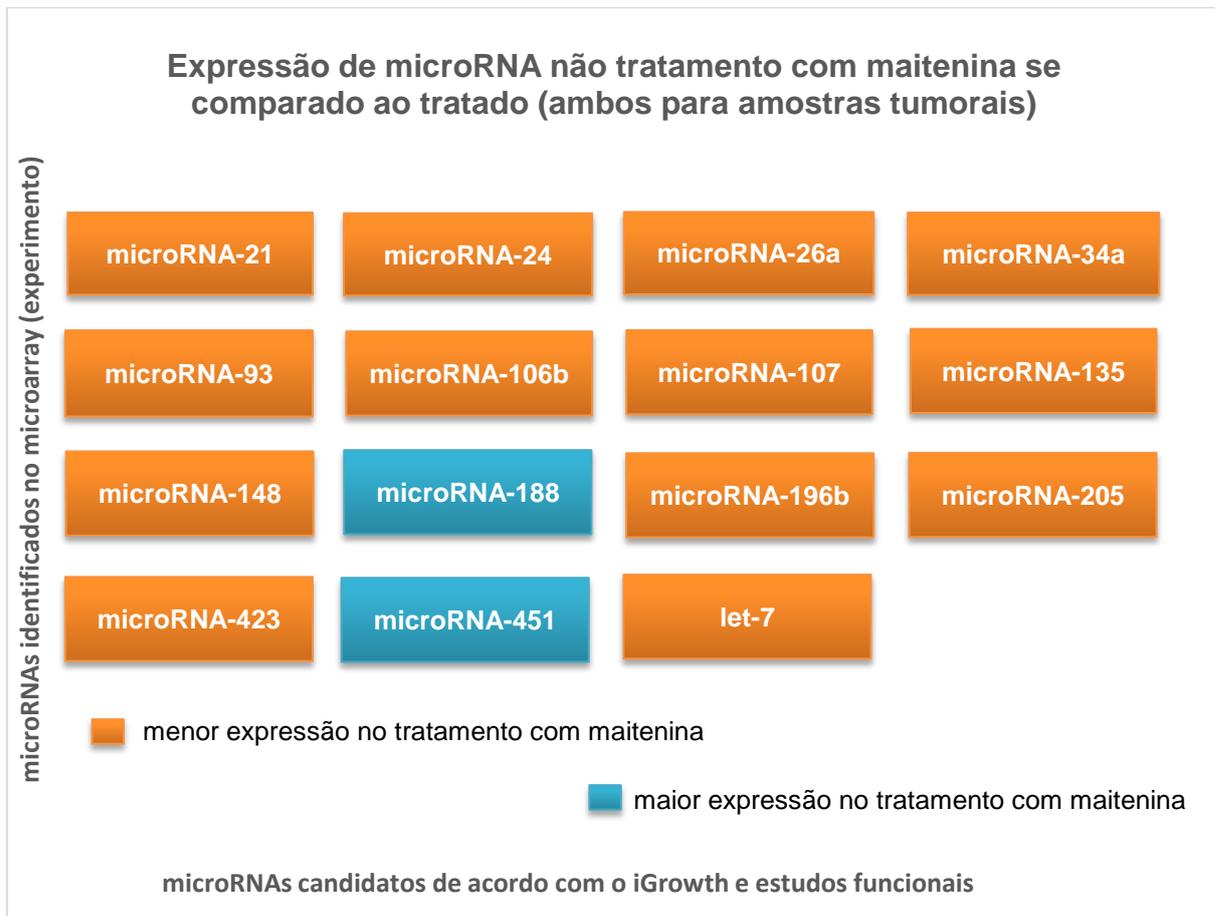


Figura 21- Seleção de miRNAs que demonstraram alteração significativa na expressão entre o células tratadas com maitenina e células não tratadas identificados por *microarray*, e/ou relacionados com o iGrowth e proliferação e apoptose segundo a literatura.

4.4 Validação da expressão de miR-196b após tratamento por maitenina e 22 β por RT-PCR real time

Com o propósito de confirmarmos o efeito de maitenina sobre a expressão de miR-196b validamos seus resultados por RT-PCR em tempo real após 24 horas de tratamento em réplicas biológicas de SCC25, em SCC9 e FaDu submetidas ao mesmo tratamento, bem como nas mesmas linhagens tratadas com 22- β -hidroximaitenina e em queratinócitos orais não tumorais (tabela 10).

Tabela 10- Validação dos resultados do microarray da linhagem SCC-25 para o miRNA-196b. Valores positivos de fold-change indicam maior expressão nas células não tratadas e valores negativos indicam maior expressão nas células tratadas.

Validação dos resultados do microarray da linhagem SCC-25 para o miRNA-196b em diferentes réplicas biológicas, em diferentes linhagens celulares de CECP e em queratinócitos orais não tumorais submetidos a tratamento com maitenina e 22-β-hidroximaitenina.						
Célula	Microarray fold-change (não tratado x tratado)	Viabilidade celular (%)	Réplica biológica	Tratamento	RT-PCR Fold-change (tratado x não tratado)	Viabilidade celular (%)
SCC-25	43,30	15,7%	Réplica biológica 1	Maitenina	2,0	12,3%
				22- β	2,2	43,74%
			Réplica biológica 2	Maitenina	1,75	30,8%
				22- β	1,76	29%
SCC-9				Maitenina	2,05	49%
				22- β	1,62	50%
FaDu				Maitenina	1,64	48%
				22- β	1,66	50%
Queratinócito				Maitenina	-10,32	25,87%
				22- β	-7,50	20,48%

4.5 Possível efeito funcional de miR-196b com base em seus alvos

De acordo com o DIANA-TarBase (v7.0) existem 239 alvos diretos validados para o miR-196b, dentre os quais 45 genes estão relacionados com morte celular e proliferação (figura 22).

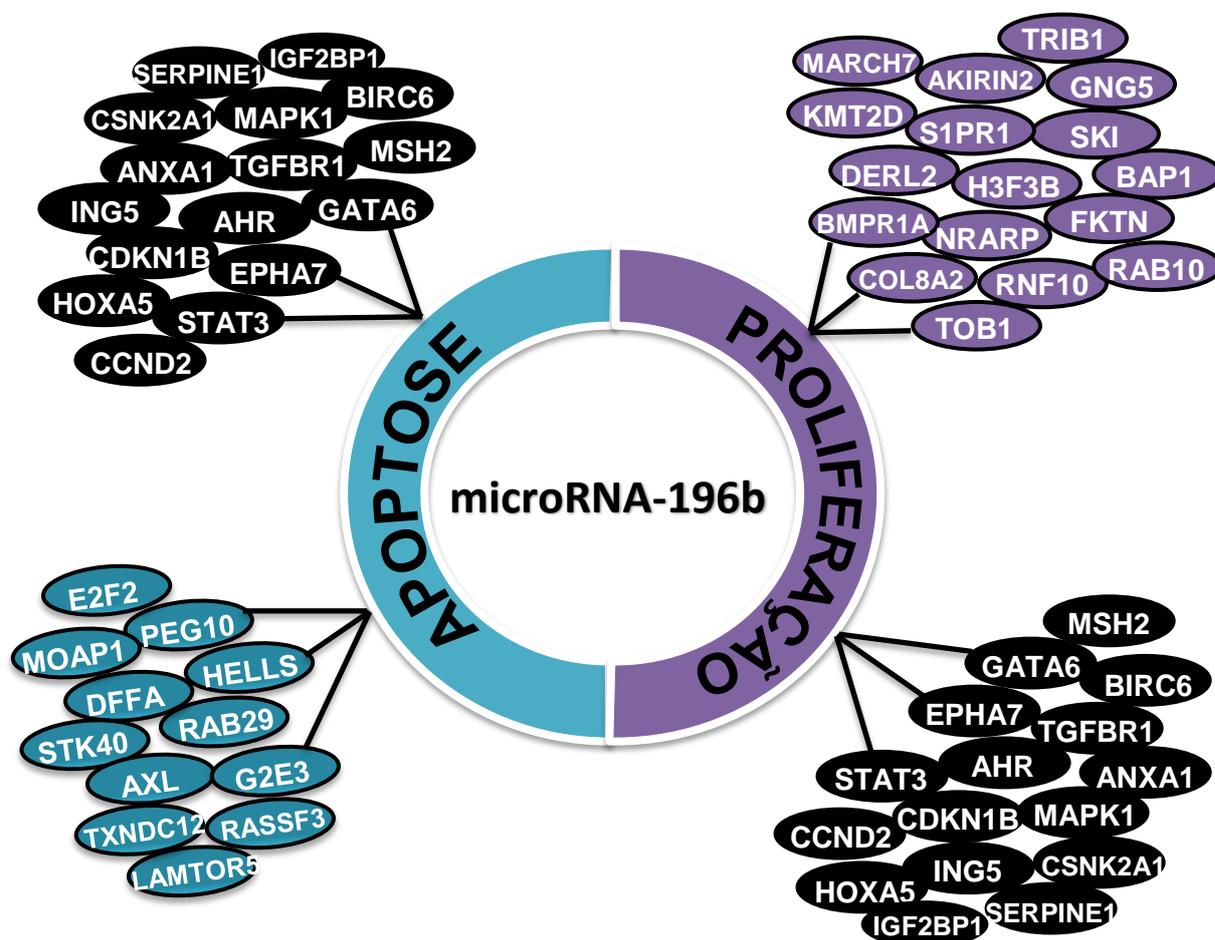


Figura 22- Alvos validados envolvidos com proliferação e apoptose com base no DIANA-TarBase v7.0 para o miR-196b-5p. azul: genes envolvidos apenas com apoptose, roxo: genes envolvidos apenas em proliferação e preto: genes envolvidos em proliferação e apoptose.

5 DISCUSSÃO

Diante da necessidade de encontrar novas alternativas terapêuticas para o tratamento de CECP, avaliamos o efeito de moléculas obtidas a partir de *Maytenus ilicifolia*, uma planta da família Celastraceae conhecida por produzir compostos com potencial ação antitumoral, sobre linhagens tumorais derivadas de CECP e queratinócitos orais derivados de culturas primárias livres de tumor.

A *Maytenus ilicifolia*, popularmente conhecida como espinheira-santa, é utilizada na medicina tradicional brasileira desde a década de 20. A ela foram atribuídas diversas atividades biológicas, estando entre as 12 espécies de plantas medicinais introduzidas no Sistema Único de Saúde através do Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. Seu potencial antineoplásico é estudado principalmente com relação à ação de quatro triterpenos quinonametídeos produzidos em suas raízes: celastrol, pristimerina, maitenina e 22- β -hidroximaitenina.

Celastrol e pristimerina são triterpenos quinonametídeos amplamente conhecidos e vendidos comercialmente a um custo de R\$ 126,60/mg e R\$ 268,00/mg respectivamente (Sigma Aldrich®, St Louis, USA). Tais compostos são extraídos a partir do *Trypterygium sp*, planta tradicionalmente utilizada na medicina chinesa, que produz maior quantidade destas duas substâncias. Já *Maytenus ilicifolia* produz maiores quantidades de maitenina e 22- β -hidroximaitenina, porém em quantidades pequenas para extração direta. Com o cultivo *in vitro* de raízes a produção em escala se torna possível, hoje a um custo de extrato bruto de R\$ 0,50/mg utilizado para a obtenção das substâncias para este projeto.

Determinou-se a IC₅₀ desses compostos através de testes de viabilidade celular por MTT e contagem celular. Em relação às linhagens celulares (SCC-9, SCC-25 e FaDu) os valores de IC₅₀ obtidos se mantiveram em torno de 2 a 2,8 μ M enquanto que para os queratinócitos os valores obtidos foram em torno de 6 a 11 μ M para maitenina e 22- β -hidroximaitenina, respectivamente. Tais resultados foram semelhantes aos encontrados na literatura para outros triterpenos, como por exemplo quando o celastrol foi avaliado em linhagens derivadas de CECP, no qual apresentou resultados sobre inibição de proliferação e indução de apoptose em concentrações variando de 0,4 a 2,8 μ M (FREUDLSPERGER et al., 2013; FRIDLEY

et al., 2015; KANNAIYAN et al., 2011), ou quando avaliado em outros tumores sólidos, apresentando efeitos sobre proliferação e apoptose em concentrações variando de 0,5 a 2,5 μM (JI et al., 2015; LEE et al., 2014; LI et al., 2015). O tratamento com pristimerina, após 72 horas, apresentou concentrações de IC_{50} entre 1,25 e 2,5 μM em células derivadas de câncer de pâncreas, ovário e próstata (DEEB et al., 2015; GAO et al., 2014a; LIU et al., 2014).

Maitenina e 22- β -hidroximatenina apresentam uma hidroquinona em suas estruturas e são diferentes quanto à presença de uma hidroxila, o que poderia dar à 22- β -hidroximatenina um caráter mais básico. Dentre os mecanismos de resistência das células tumorais aos quimioterápicos, podemos mencionar o controle do pH (intra e extracelular) e o potencial de membrana que são responsáveis pela baixa absorção intracelular de quimioterápicos (JUNIOR, 2010; MALO; FLIEGEL, 2006; MURAKAMI et al., 2001; TANNOCK; ROTIN, 1989). Uma vez que o pH_i (pH intracelular) dessas células é mais alcalino comparado às células normais quiescentes, fármacos como a cisplatina poderiam se encontrar na sua forma inativa e portanto incapaz de atuar sobre o DNA (MURAKAMI et al., 2001). Além disso, o pH_i alcalino confere um caráter proliferativo as células, por ativar a fosfofrutoquinase (PFK) o que favorece a via glicolítica (principal enzima da glicólise); acionar as fases S e G2/M do ciclo celular e aumentar a atividade de fatores de crescimento (JUNIOR, 2010; MALO; FLIEGEL, 2006). Por outro lado, o pH_e (pH extracelular) das células neoplásicas é ácido, o que impede a atuação dos linfócitos T citotóxicos e células NK (do inglês *natural killer*) e inativa as MMP's (metaloproteinases de matriz) que desestabiliza a matriz extracelular e propicia a metástase (CROWTHER, 2001; VERMEEULEN, 2004). Desta forma, moléculas que contribuíssem para tornar o meio extracelular mais alcalino, como a 22- β -hidroximatenina, também poderiam atuar contra os mecanismos de resistência das células tumorais.

Diversos estudos tem abordado o papel de microRNAs na resistência a drogas, sendo responsáveis pela regulação de genes importantes em mecanismos de resistência a quimioterápicos. Em hepatocarcinoma, por exemplo, a ação de um microRNA está relacionada à resistência ao tratamento por gemcitabine (WANG et al., 2015b), enquanto que em câncer de mama estudos já pontuam que tratamentos que associem microRNAs e quimioterapias tradicionais poderão ser considerados

como uma nova abordagem inovadora para o controle de tumores de mama resistentes (KUTANZI et al., 2011). Em estudo recente, um microRNA (miR-374b) foi associado a resistência a cisplatina em células derivadas de câncer de pâncreas (SCHREIBER et al., 2016), um resultado de grande interesse em CECP tendo em vista a importância desta droga para o tratamento destes pacientes. Dentro deste contexto, neste estudo avaliamos a regulação desses pequenos RNAs não codificantes durante o tratamento com triterpenos.

Nosso estudo demonstrou pela análise de *microarray* a regulação de 101 microRNAs, dentre estes selecionamos 15 microRNAs com base na sua associação com a proliferação e CECP segundo a literatura. Os microRNAs miR-21, miR-24, miR-26a, miR-34a, miR-93, miR-106b, miR-107, miR-135, miR-148, miR-196b, miR-205, miR-423 e let-7 revelaram maior expressão nas células não tratadas se comparada as tratadas com maitenina (Tabela 9), indicando que o tratamento diminuiu a expressão desses microRNAs.

Todos estes microRNAs já foram estudados em diversos tipos de tumores, com resultados diversificados de acordo com o tipo de câncer e as ferramentas utilizadas. O microRNA-21 é amplamente estudado, sendo considerado supostamente como um microRNA oncogênico (CHAN; KRICHEVSKY; KOSIK, 2005; ESQUELA-KERSCHER; SLACK, 2006; ZHANG et al., 2007) com implicações na resistência a 5-FU (ROSSI; BONMASSAR; FARAONI, 2007). Corroborando nossos resultados com maitenina sobre SCC25, no estudo de Li et al, (2009) observou-se que a inibição do miR-21 induziu apoptose em linhagens celulares de carcinoma oral e Yin et al. 2016 notaram o mesmo efeito no carcinoma hepatocelular.

O miR-34a, é um regulador chave da supressão tumoral, sendo um componente importante na transcrição da p53 (RAVER-SHAPIRA et al., 2007). Dentre seus alvos incluem fatores necessários para a transição G1/S (c-Myc, E2F, CDK4, CDK6), proteínas anti-apoptóticas (Bcl2, SIRT1) e proteínas envolvidas na invasão (c-Met) (MISSO et al., 2014). Entretanto, em células de câncer gástrico, observou-se inibição de proliferação e indução de apoptose pela superexpressão do microRNA-34a (HU et al., 2015), resultado que parece estar de acordo com a sua maior expressão em células tratadas com maitenina neste estudo. O microRNA-135 é encontrado mais expresso em diversos tumores quando comparado a tecidos

livres de tumor (HE et al., 2012; REN et al., 2015, XIAO et al., 2014,)), atuando sobre a proliferação celular no câncer de colorretal (Valeri et al., 2014), carcinoma de cabeça e pescoço (ZHANG et al., 2013), osteossarcoma (PEI et al., 2015) e câncer de bexiga (MAO et al., 2015). Também está envolvido em invasão e migração celular no câncer de pulmão (LIN et al., 2013) e no câncer de colorretal (WU et al., 2014b). No câncer de colo de útero a inibição do microRNA-135 inibiu o crescimento celular diretamente pela segmentação de FOXO1 (XU et al., 2015a), ao passo que a superexpressão induziram proliferação e migração através da ativação de HIF-1 α no câncer de cabeça e pescoço (ZHANG et al., 2013). Estes resultados também estão de acordo com a diminuição da sua expressão após tratamento de células derivadas de CECF com maitenina.

Dentre os microRNAs regulados de forma diferencial após tratamento com triterpenos, o microRNA-196b foi o que apresentou maior nível de inibição (43 vezes menos expresso em SCC-25 tratada com maitenina. A inibição da expressão deste microRNA com o tratamento com maitenina observado por *microarrays* em SCC-25 foi confirmado em duas réplicas biológicas (experimentos realizados em datas diferentes para a mesma linhagem) bem como com duas outras linhagens derivadas de CECF, SCC-9 e FaDu. Avaliamos ainda se este efeito seria também observado após tratamento com 22- β -hidroximaitenina, e o resultado se confirmou em todos os casos (Tabela 10). O microRNA-196b é um membro da subfamília do miR-196, a qual compreende o miR-196a e o miR-196b. Eles se diferenciam apenas por um nucleotídeo (CHEN et al., 2011). O miR-196b está mais expresso no câncer gástrico (TSAI et al., 2010), pancreático (SZAFRANSKA et al., 2007), glioblastoma (LAKOMY et al., 2011) e câncer oral (HOU et al., 2016) quando comparados a tecidos livre de tumor, e em estudo anterior do nosso grupo também observamos sua superexpressão em carcinoma epidermoide de cavidade oral (SEVERINO et al., 2013). Observa-se que a alta expressão do microRNA contribui para a proliferação e migração no câncer gástrico, e seu mecanismo está relacionado a interferência da via de sinalização de PI3K/AKT/mTOR (LI et al., 2016a). Rebutti et al 2015, determinaram que IGF2BP1 é um alvo direto do microRNA-196b, que atua na regulação da progressão tumoral (OHDAIRA et al., 2012; REBUCCI et al., 2015; ZHOU et al., 2016). A superexpressão do miR-196b silencia o IGF2BP1 que por sua vez inibe proliferação e induz apoptose através da indução de PARP e clivagem de

caspace 3 (MONGROO et al., 2011). Diversos outros estudos confirmam o papel do microRNA-196b na regulação de genes relacionados com proliferação celular e apoptose, conforme resumo apresentado na Figura 22.

Interessante notar que o efeito do tratamento com os triterpenos sobre miRNA-196b em queratinócitos foi diferente, e oposto, ao observado para as linhagens (Tabela 10). Em queratinócitos o tratamento aumentou a expressão do microRNA. Em estudo anterior do nosso grupo também observamos que a super-expressão de um outro microRNA desta mesma família (microRNA-196a) reduziu a proliferação de queratinócitos orais, conforme observado por expressão da proteína Ki67 (SEVERINO et al., 2013). Estes resultados apontam para um efeito distinto do tratamento com os triterpenos sobre linhagens celulares e sobre queratinócitos normais, porém com consequência final semelhante: redução da proliferação e morte celular. Pensando-se em quimioterapias com efeitos indesejáveis reduzidos em células normais, o fato da IC_{50} ser significativamente mais elevada em células normais e que exista, possivelmente, um efeito distinto em nível molecular, podemos considerar que os triterpenos avaliados neste estudo são moléculas promissoras.

Ainda não possuímos informações suficientes para deduzir o papel de miR-196b, bem como de outros processos moleculares, a partir dos resultados obtidos neste estudo. Entretanto, foi possível concluir que a desregulação de microRNAs é consistente após este tipo de tratamento e pode ter papel significativo na resposta.

6 CONCLUSÃO

O tratamento com maitenina interfere na regulação de microRNAs envolvidos com proliferação celular e apoptose em CECp. O microRNA que apresentou maior regulação após o tratamento de SCC-25 com maiteína foi o microRNA-196b e este resultado foi confirmado em réplicas biológicas e diferentes linhagens. O efeito sobre queratinócitos orais normais foi inverso e aponta para um mecanismo molecular diferente da ação entre linhagens derivadas de câncer e células normais, um resultado desejável considerando-se quimioterápicos. Observamos ainda que o efeito sobre o microRNA-196b foi semelhante tratando-se as linhagens com 22- β -hidroximaitenina, sugerindo que o efeito seja compartilhado por diferentes triterpenos quinonametídeos.

REFERÊNCIAS

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures 2015 [Internet]. Disponível em: <<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@editorial/documents/document/acspc-044552.pdf>>. Acesso em: 16 de fevereiro de 2016.

ANDORFER, C. A. et al. MiRNA signatures: clinical biomarkers for the diagnosis and treatment of breast cancer. **Trends. Mol. Med.**, v. 17, n. 6, p. 313-319, 2011.

ANDREGHETTO, F. M. et al. Evaluation of miRNA expression in head and neck squamous cell carcinoma cell lines and in primary culture of oral keratinocytes. **Einstein**, v. 9, n. 4, p. 442-448, 2011.

AYUB, S. G.; KAUL, D.; AYUB, T. Microdissecting the role of miRNAs in the pathogenesis of prostate cancer. **Cancer Genet.**, v. 208, n. 6, p. 289-302, 2015.

BAO, L. et al. MiRNA-21 suppresses PTEN and hSulf-1 expression and promotes hepatocellular carcinoma progression through AKT/ERK pathways. **Cancer Lett.**, v. 337, n. 2, p. 226-236, 2013.

BARTEL, D. P. MiRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**, v. 136, n. 2, p. 215-233, 2009.

BERTERO, T. et al. Tumor suppressor function of miR-483-3p on squamous cell carcinomas due to its proapoptotic properties. **Cell Cycle**, v. 12, n. 14, p. 2183-2193, 2013.

BEUVINK, I. et al. A novel microarray approach reveals new tissue-specific signatures of known and predicted mammalian miRNAs. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 35, n. 7, p. e52, 2007.

BOECKX, C. et al. Anti-epidermal growth factor receptor therapy in head and neck squamous cell carcinoma: focus on potential molecular mechanisms of drug resistance. **Oncologist**, v. 18, n. 7, p. 850-864, 2013.

BOMMER, G. T. et al. p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. **Curr. Biol.**, v. 17, n. 15, p. 1298-1307, 2007.

BOSE, P.; BROCKTON, N. T.; DORT, J. C. Head and neck cancer: from anatomy to biology. **Int. J. Cancer.**, v. 133, n. 9, p. 2013-2023, 2013.

BRENNECKE, J. et al. Principles of miRNA-target recognition. **PLoS Biol.**, v. 3, n. 3, p. e85, 2005.

BUSCAGLIA, L. E.; LI, Y. Apoptosis and the target genes of miRNA-21. **Chin. J. Cancer.**, v. 30, n. 6, p. 371-380, 2011.

CAI, K.; WANG, Y.; BAO, X. MiR-106b promotes cell proliferation via targeting RB in laryngeal carcinoma. **J. Exp. Clin. Cancer Res.**, v. 30, p. 73, 2011.

CALIN, G. A. et al. Human miRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 101, n. 9, p. 2999-3004, 2004.

CAMPISI, J. Cancer and ageing: rival demons? **Nat. Rev. Cancer**, v. 3, n. 5, p. 339-349, 2003.

CAO, L. et al. Inhibiting inducible miR-223 further reduces viable cells in human cancer cell lines MCF-7 and PC3 treated by celastrol. **BMC Cancer**, v. 15, p. 873, 2015.

CASTRO, T. M. et al. HPV detection in the oral and genital mucosa of women with positive histopathological exam for genital HPV, by means of the PCR. **Braz. J. Otorhinolaryngol**, v. 75, n. 2, p. 167-171, 2009.

CHAN, J. A.; KRICHEVSKY, A. M.; KOSIK, K. S. MiRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. **Cancer Res.**, v. 65, n. 14, p. 6029-6033, 2005.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- CHANG, K. W. et al. Passenger strand miRNA miR-31* regulates the phenotypes of oral cancer cells by targeting RhoA. **Oral Oncol.**, v. 49, n. 1, p. 27-33, 2013.
- CHEN, C. et al. MiRNA-196: critical roles and clinical applications in development and cancer. **J. Cell Mol. Med.**, v. 15, n. 1, p. 14-23, 2011.
- CHEN, L. et al. Upregulation of miR-107 Inhibits Glioma Angiogenesis and VEGF Expression. **Cell Mol. Neurobiol.**, v. 36, n. 1, p. 113-120, 2016.
- CHEN, L. et al. MiR-24 regulates the proliferation and invasion of glioma by ST7L via β -catenin/Tcf-4 signaling. **Cancer Lett.**, v. 329, n. 2, p. 174-180, 2013.
- CHENG, Y. et al. MiRNA-106b is involved in transforming growth factor β 1-induced cell migration by targeting disabled homolog 2 in cervical carcinoma. **J. Exp. Clin. Cancer Res.**, v. 35, p. 11, 2016.
- COMISSÃO NACIONAL DE INCORPORAÇÃO DE TECNOLOGIA NO SUS. [Internet]. Cetuximabe no Tratamento do Câncer de Cabeça e Pescoço Recidivado/Metastático 2015. Disponível em: <http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2015/Relatorio_Cetuximabe_MetastaseCeP_final.pdf>. Acesso em: 15 de março de 2016.
- COPPEDE, J. S. et al. Cell cultures of *Maytenus ilicifolia* Mart. are richer sources of quinone-methide triterpenoids than plant roots in natura. **Plant. Cell., Tissue and Organ Culture.**, v. 118, n. 1, p. 33-43, 2014.
- COWLAND, J. B.; HOTHER, C.; GRØNBAEK, K. MiRNAs and cancer. **A.P.M.I.S.**, v. 115, n. 10, p. 1090-1106, 2007.
- CUNEO, K. C. et al. EGFR targeted therapies and radiation: Optimizing efficacy by appropriate drug scheduling and patient selection. **Pharmacol. Ther.**, 2015.
- DAHIYA, N.; MORIN, P. J. MiRNAs in ovarian carcinomas. **Endocr. Relat. Cancer**, v. 17, n. 1, p. F77-89, 2010.
- DARDA, L. et al. The role of HOXB9 and miR-196a in head and neck squamous cell carcinoma. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0122285, 2015.
- DATTA, J. et al. Suberoylanilide hydroxamic acid inhibits growth of head and neck cancer cell lines by reactivation of tumor suppressor miRNAs. **Oral Oncol.**, v. 56, p. 32-39, 2016.
- DATTA, J. et al. MiRNA-107 functions as a candidate tumor-suppressor gene in head and neck squamous cell carcinoma by downregulation of protein kinase C ϵ . **Oncogene**, v. 31, n. 36, p. 4045-4053, 2012.
- DAYYANI, F. et al. Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). **Head Neck Oncol.**, v. 2, p. 15, 2010.
- DEEB, D. et al. Inhibition of hTERT/telomerase contributes to the antitumor activity of pristimerin in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. **Oncol. Rep.**, v. 34, n. 1, p. 518-524, 2015.
- DENARO, N. et al. The role of antiangiogenic agents in the treatment of head and neck cancer. **Oncology**, v. 83, n. 2, p. 108-116, 2012.
- DENG, L.; LIU, H. MiRNA-506 suppresses growth and metastasis of oral squamous cell carcinoma via targeting GATA6. **Int. J. Clin. Exp. Med.**, v. 8, n. 2, p. 1862-1870, 2015.
- DESAI, A. G. et al. Medicinal plants and cancer chemoprevention. **Curr. Drug Metab.**, v. 9, n. 7, p. 581-91, 2008.
- DIANA-TarBase v7.0 [Internet]. Disponível em: <<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=tarbase/index>>, Acesso em: 9 de outubro de 2016.

DORSEY, K.; AGULNIK, M. Promising new molecular targeted therapies in head and neck cancer. **Drugs**, v. 73, n. 4, p. 315-325, 2013.

DOUGLAS, L. Making oral cancer screening a routine part of your patient care. **B.D.J. Team**, 2015, In press.

DU, L. et al. miR-93-directed downregulation of DAB2 defines a novel oncogenic pathway in lung cancer. **Oncogene**, v. 33, n. 34, p. 4307-4315, 2014.

EKBLAD, L. et al. Anti- or pro-proliferation—conditional options for TGF- α and cetuximab in head and neck squamous cell carcinoma. **Oral Oncol.**, v. 51, n. 1, p. 46-52, 2015.

ESQUELA-KERSCHER, A.; SLACK, F. J. Oncomirs - miRNAs with a role in cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 6, n. 4, p. 259-269, 2006.

ESTÉVEZ-BRAUN, A. et al. A new family of choline kinase inhibitors with antiproliferative and antitumor activity derived from natural products. **Clin. Transl. Oncol.**, v. 17, n. 1, p. 74-84, 2015.

FAN, X. X. et al. Celastrol induces apoptosis in gefitinib-resistant non-small cell lung cancer cells via caspases-dependent pathways and Hsp90 client protein degradation. **Molecules**, v. 19, n. 3, p. 3508-3522, 2014.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int. J. Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-386, 2015.

FILIPOWICZ, W.; BHATTACHARYYA, S. N.; SONENBERG, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by miRNAs: are the answers in sight? **Nat. Rev. Genet.**, v. 9, n. 2, p. 102-114, 2008.

FREUDLSPERGER, C. et al. TGF- β and NF- κ B signal pathway cross-talk is mediated through TAK1 and SMAD7 in a subset of head and neck cancers. **Oncogene**, v. 32, n. 12, p. 1549-1559, 2013.

FRIBLEY, A. M. et al. Celastrol induces unfolded protein response-dependent cell death in head and neck cancer. **Exp. Cell. Res.**, v. 330, n. 2, p. 412-422, 2015.

FRIDLENDER, M.; KAPULNIK, Y.; KOLTAL, H. Plant derived substances with anti-cancer activity: from folklore to practice. **Front. Plant. Sci.**, v. 6, p. 799, 2015.

GAO, J.; LIU, Q. G. The role of miR-26 in tumors and normal tissues (Review). **Oncol. Lett.**, v. 2, n. 6, p. 1019-1023, 2011.

GAO, L. et al. IGF-1R, a target of let-7b, mediates crosstalk between IRS-2/Akt and MAPK pathways to promote proliferation of oral squamous cell carcinoma. **Oncotarget**, v. 5, n. 9, p. 2562-2574, 2014.

GAO, X. et al. Anticancer activity of pristimerin in ovarian carcinoma cells is mediated through the inhibition of prosurvival Akt/NF- κ B/mTOR signaling. **J. Exp. Ther. Oncol.**, v. 10, n. 4, p. 275-283, 2014a.

GARNETT, M. J. et al. Systematic identification of genomic markers of drug sensitivity in cancer cells. **Nature**, v. 483, n. 7391, p. 570-575, 2012.

GLOBOCAN 2012 [Internet]. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. V.1.0. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>>. Acesso em: 10 de janeiro de 2016.

GONG, C. et al. MiR-106b expression determines the proliferation paradox of TGF- β in breast cancer cells. **Oncogene**, v. 34, n. 1, p. 84-93, 2015.

GUAN, G. et al. miRNA-423-3p promotes tumor progression via modulation of AdipoR2 in laryngeal carcinoma. **Int. J. Clin. Exp. Pathol.**, v. 7, n. 9, p. 5683-5691, 2014.

GUO, J. et al. Downregulation of miR-17-92a cluster promotes autophagy induction in response to celastrol treatment in prostate cancer cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 2016.

GUO, Y. et al. miR-24 functions as a tumor suppressor in Hep2 laryngeal carcinoma cells partly through down-regulation of the S100A8 protein. **Oncol. Rep.**, v. 27, n. 4, p. 1097-1103, 2012.

GUTSCHNER, T. et al. Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1 (IGF2BP1) is an important protumorigenic factor in hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 59, n. 5, p. 1900-1911, 2014.

HAN, J. et al. Downregulation of MiRNA-126 Contributes to Tumorigenesis of Squamous Tongue Cell Carcinoma via Targeting KRAS. **Med. Sci. Monit.**, v. 22, p. 522-529, 2016.

HAN, Z. B. et al. Identification of recurrence-related miRNAs in hepatocellular carcinoma following liver transplantation. **Mol. Oncol.**, v. 6, n. 4, p. 445-457, 2012.

HASHIBE, M. et al. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. **Cancer. Epidemiol. Biomarkers. Prev.**, v. 18, n. 2, p. 541-550, 2009.

HAUSER, B. et al. Functions of MiRNA-128 on the regulation of head and neck squamous cell carcinoma growth and apoptosis. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0116321, 2015.

HE, Y. Q. et al. Estradiol regulates miR-135b and mismatch repair gene expressions via estrogen receptor- β in colorectal cells. **Exp. Mol. Med.**, v. 44, n. 12, p. 723-732, 2012.

HENSON, B. J. et al. Decreased expression of miR-125b and miR-100 in oral cancer cells contributes to malignancy. **Gene Chromosome Canc.**, v. 48, n. 7, p. 569-582, 2009.

HIGGINS, G. S. et al. Drug radiotherapy combinations: review of previous failures and reasons for future optimism. **Cancer Treat. Rev.**, v. 41, n. 2, p. 105-113, 2015.

HOU, Y. Y. et al. Aberrant DNA hypomethylation of miR-196b contributes to migration and invasion of oral cancer. **Oncol. Lett**, v. 11, n. 6, p. 4013-4021, 2016.

HOW, C. et al. MiRNA-196b regulates the homeobox B7-vascular endothelial growth factor axis in cervical cancer. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e67846, 2013.

HOWAT, S. et al. Paclitaxel: biosynthesis, production and future prospects. **N. Biotechnol.**, v. 31, n. 3, p. 242-245, 2014.

HU, Y. et al. MiRNA-34a inhibits tumor invasion and metastasis in gastric cancer by targeting Tgif2. **Int. J. Clin. Exp. Pathol.**, v. 8, n. 8, p. 8921-8928, 2015.

HUANG, J. et al. MiRNAs as oncogenes or tumour suppressors in oesophageal cancer: potential biomarkers and therapeutic targets. **Cell Prolif.**, v. 47, n. 4, p. 277-286, 2014.

HUANG, S. et al. Pristimerin Inhibits Prostate Cancer Bone Metastasis by Targeting PC-3 Stem Cell Characteristics and VEGF-Induced Vasculogenesis of BM-EPCs. **Cell Physiol. Biochem.**, v. 37, n. 1, p. 253-268, 2015.

HUI, A. B. et al. Comprehensive MiRNA profiling for head and neck squamous cell carcinomas. **Clin. Cancer Res.**, v. 16, n. 4, p. 1129-1139, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER [Internet]. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>>. Acesso em: 20 de novembro de 2015.

ISHIKAWA, H. et al. Total synthesis of vinblastine, vincristine, related natural products, and key structural analogues. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 131, n. 13, p. 4904-4916, 2009.

JAMIESON, N. B. et al. MiRNA molecular profiles associated with diagnosis, clinicopathologic criteria, and overall survival in patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. **Clin. Cancer. Res.**, v. 18, n. 2, p. 534-545, 2012.

- Ji, N. et al. Effect of celastrol on growth inhibition of prostate cancer cells through the regulation of hERG channel in vitro. **Biomed. Res. Int.**, v. 2015, p. 308475, 2015.
- JIA, L. F. et al. Expression, regulation and roles of miR-26a and MEG3 in tongue squamous cell carcinoma. **Int. J. Cancer**, v. 135, n. 10, p. 2282-2293, 2014.
- JIA, L. F. et al. Prognostic implications of microRNA miR-195 expression in human tongue squamous cell carcinoma. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e56634, 2013.
- JIANG, F. et al. miR-222 regulates the cell biological behavior of oral squamous cell carcinoma by targeting PUMA. **Oncol. Rep.**, v. 31, n. 3, p. 1255-1262, 2014.
- KAM, D. et al. Incidence of Suicide in Patients With Head and Neck Cancer. **JAMA Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v. 141, n. 12, p. 1075-81, 2015.
- KANNAIYAN, R. et al. Celastrol inhibits tumor cell proliferation and promotes apoptosis through the activation of c-Jun N-terminal kinase and suppression of PI3 K/Akt signaling pathways. **Apoptosis**, v. 16, n. 10, p. 1028-1041, 2011.
- KELLOKOSKI, J. et al. Dot blot hybridization in detection of human papillomavirus (HPV) infections in the oral cavity of women with genital HPV infections. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 7, n. 1, p. 19-23, 1992.
- KIM, J. et al. miRNA-148a is a prognostic oncomiR that targets MIG6 and BIM to regulate EGFR and apoptosis in glioblastoma. **Cancer Res.**, v. 74, n. 5, p. 1541-1553, 2014.
- KIM, J. H. et al. Celastrol suppresses breast cancer MCF-7 cell viability via the AMP-activated protein kinase (AMPK)-induced p53-polo like kinase 2 (PLK-2) pathway. **Cell. Signal.**, v. 25, n. 4, p. 805-813, 2013.
- KIM, J. S. et al. MiRNA-205 suppresses the oral carcinoma oncogenic activity via down-regulation of Axin-2 in KB human oral cancer cell. **Mol. Cell Biochem.**, v. 387, n. 1-2, p. 71-79, 2014a.
- KLOOSTERMAN, W. P.; PLASTERK, R. H. The diverse functions of miRNAs in animal development and disease. **Dev. Cell**, v. 11, n. 4, p. 441-450, 2006.
- KOZOMARA, A.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: annotating high confidence miRNAs using deep sequencing data. **Nucleic. Acids Res.**, v. 42, p. D68-73, 2014.
- KUMAR, B. et al. Dysregulation of miRNA-34a expression in head and neck squamous cell carcinoma promotes tumor growth and tumor angiogenesis. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e37601, 2012.
- KUNDU, S. K.; NESTOR, M. Targeted therapy in head and neck cancer. **Tumour Biol.**, v. 33, n. 3, p. 707-721, 2012.
- KUTANZI, K. R. et al. MicroRNA-mediated drug resistance in breast cancer. **Clin. Epigenetics**, v. 2, n. 2, p. 171-185, 2011.
- LAGOS-QUINTANA, M. et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. **Science**, v. 294, n. 5543, p. 853-858, 2001.
- LAKOMY, R. et al. MiR-195, miR-196b, miR-181c, miR-21 expression levels and O-6-methylguanine-DNA methyltransferase methylation status are associated with clinical outcome in glioblastoma patients. **Cancer Sci.**, v. 102, n. 12, p. 2186-2190, 2011.
- LEE, H. W. et al. Celastrol inhibits gastric cancer growth by induction of apoptosis and autophagy. **B.M.B Rep.**, v. 47, n. 12, p. 697-702, 2014.
- LEE, J. S. et al. Anticancer activity of pristimerin in epidermal growth factor receptor 2-positive SKBR3 human breast cancer cells. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 36, n. 2, p. 316-325, 2013.

- LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843-854, 1993.
- LEEMANS, C. R.; BRAAKHUIS, B. J.; BRAKENHOFF, R. H. The molecular biology of head and neck cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 11, n. 1, p. 9-22, 2011.
- LEI, L.; HUANG, Y.; GONG, W. miR-205 promotes the growth, metastasis and chemoresistance of NSCLC cells by targeting PTEN. **Oncol. Rep.**, v. 30, n. 6, p. 2897-2902, 2013.
- LENKALA, D. et al. The impact of miRNA expression on cellular proliferation. **Hum. Genet.**, v. 133, n. 7, p. 931-938, 2014.
- LERNER, C. et al. Characterization of miR-146a and miR-155 in blood, tissue and cell lines of head and neck squamous cell carcinoma patients and their impact on cell proliferation and migration. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 142, n. 4, p. 757-766, 2016.
- LI, B. K. et al. Upregulation of miRNA-106b is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. **Diagn. Pathol.**, v. 9, p. 226, 2014a.
- LI, H. et al. miR-224 is critical for celastrol-induced inhibition of migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells. **Cell Physiol. Biochem.**, v. 32, n. 2, p. 448-458, 2013a.
- LI, H. Y. et al. Celastrol induces apoptosis and autophagy via the ROS/JNK signaling pathway in human osteosarcoma cells: an in vitro and in vivo study. **Cell Death Dis.**, v. 6, p. e1604, 2015.
- LI, J.; LAM, M.; BIOLOGY, R. P. C. Registered report: the miRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44. **Elife**, v. 4, p. e06434, 2015.
- LI, J. et al. miR-512-5p suppresses tumor growth by targeting hTERT in telomerase positive head and neck squamous cell carcinoma in vitro and in vivo. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. e0135265, 2015.
- LI, J. et al. The role of miR-205 in the VEGF-mediated promotion of human ovarian cancer cell invasion. **Gynecol. Oncol.**, v. 137, n. 1, p. 125-133, 2015a.
- LI, M. et al. MiRNA-101 is a potential prognostic indicator of laryngeal squamous cell carcinoma and modulates CDK8. **J Transl. Med.**, v. 13, p. 271, 2015b.
- LI, N. A. et al. miR-196b regulates gastric cancer cell proliferation and invasion via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. **Oncol. Lett.**, v. 11, n. 3, p. 1745-1749, 2016a.
- LI, P. P. et al. Celastrol induces mitochondria-mediated apoptosis in hepatocellular carcinoma Bel-7402 cells. **Am. J. Chin. Med.**, v. 43, n. 1, p. 137-148, 2015c.
- LI, W.; MA, H.; SUN, J. MiRNA-34a/c function as tumor suppressors in Hep-2 laryngeal carcinoma cells and may reduce GALNT7 expression. **Mol. Med. Rep.**, v. 9, n. 4, p. 1293-8, 2014.
- LI, X. et al. MiRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor PDCD4 and promotes cell transformation, proliferation, and metastasis in renal cell carcinoma. **Cell Physiol. Biochem.**, v. 33, n. 6, p. 1631-1642, 2014b.
- LI, Z. et al. miR-196b directly targets both HOXA9/MEIS1 oncogenes and FAS tumour suppressor in MLL-rearranged leukaemia. **Nat. Commun.**, v. 3, p. 688, 2012.
- LIANG, H. et al. miR-93 functions as an oncomiR for the downregulation of PDCD4 in gastric carcinoma. **Sci Rep**, v. 6, p. 23772, 2016.
- LIN, C. W. et al. MiRNA-135b promotes lung cancer metastasis by regulating multiple targets in the Hippo pathway and LZTS1. **Nat. Commun.**, v. 4, p. 1877, 2013.

LIN, L. et al. Celastrol Ameliorates Ulcerative Colitis-Related Colorectal Cancer in Mice via Suppressing Inflammatory Responses and Epithelial-Mesenchymal Transition. **Front. Pharmacol.**, v. 6, p. 320, 2015.

LIN, S.; GREGORY, R. I. MiRNA biogenesis pathways in cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 15, n. 6, p. 321-333, 2015.

LIU, B. et al. MiR-26a enhances metastasis potential of lung cancer cells via AKT pathway by targeting PTEN. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1822, n. 11, p. 1692-1704, 2012.

LIU, C. J. et al. miR-196a overexpression and miR-196a2 gene polymorphism are prognostic predictors of oral carcinomas. **Ann. Surg. Oncol.**, v. 20 Suppl 3, p. S406-414, 2013.

LIU, Y. B. et al. Ubiquitin-proteasomal degradation of antiapoptotic survivin facilitates induction of apoptosis in prostate cancer cells by pristimerin. **Int. J. Oncol.**, v. 45, n. 4, p. 1735-1741, 2014.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LUO, Z. et al. miR-18a promotes malignant progression by impairing miRNA biogenesis in nasopharyngeal carcinoma. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 2, p. 415-425, 2013.

LÖFFLER, D. et al. Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of miRNA-21 through a highly conserved enhancer. **Blood**, v. 110, n. 4, p. 1330-1333, 2007.

MA, Y. et al. Identification of miR-423 and miR-499 polymorphisms on affecting the risk of hepatocellular carcinoma in a large-scale population. **Genet. Test. Mol. Biomarkers**, v. 18, n. 7, p. 516-524, 2014.

MADOZ-GURPIDE, J. et al. Activation of MET pathway predicts poor outcome to cetuximab in patients with recurrent or metastatic head and neck cancer. **J. Transl. Med.**, v. 13, p. 282, 2015.

MALLO, M.; WELLIK, D. M.; DESCHAMPS, J. Hox genes and regional patterning of the vertebrate body plan. **Dev. Biol.**, v. 344, n. 1, p. 7-15, 2010.

MAO, X. P. et al. Mir-135a enhances cellular proliferation through post-transcriptionally regulating PHLPP2 and FOXO1 in human bladder cancer. **J. Transl. Med.**, v. 13, p. 86, 2015.

MAO, Y. et al. MiR-205 promotes proliferation, migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells by activation of AKT signalling. **J. Int. Med. Res.**, v. 44, n. 2, p. 231-240, 2016.

MARTIN, D. et al. The head and neck cancer cell oncogenome: a platform for the development of precision molecular therapies. **Oncotarget**, v. 5, n. 19, p. 8906-8923, 2014.

MELO, A. M.; JARDIM, M. L.; DE SANTANA, C. F. Treatment of skin cancer by topical application of primin, plumbagin and maytenin (preliminary observations). **Rev. Inst. Antibiotic.**, v. 14, n. 1-2, p. 9-16, 1974.

MISSO, G. et al. Mir-34: a new weapon against cancer? **Mol. Ther. Nucleic. Acids**, v. 3, p. e194, 2014.

MONGROO, P. S. et al. IMP-1 displays cross-talk with K-Ras and modulates colon cancer cell survival through the novel proapoptotic protein CYFIP2. **Cancer Res.**, v. 71, n. 6, p. 2172-2182, 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods.**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NATIONAL CANCER INSTITUTE AT THE NATIONAL INTITUTES OF HEALTH. 2015. [Internet]. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/>>. Acesso em: 8 de fevereiro de 2016.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **J. Nat. Prod.**, v. 79, n. 3, p. 629-61, 2016.

NI, Z. Y. et al. Decreased miRNA-143 expression and its tumor suppressive function in human oral squamous cell carcinoma. **Genet. Mol. Res.**, v. 14, n. 2, p. 6943-6952, 2015.

NIERO, R.; DE ANDRADE, S. F.; CECHINEL FILHO, V. A review of the ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of plants of the Maytenus genus. **Curr. Pharm. Des.**, v. 17, n. 18, p. 1851-1871, 2011.

NOHATA, N. et al. Identification of novel molecular targets regulated by tumor suppressive miR-1/miR-133a in maxillary sinus squamous cell carcinoma. **Int. J. Oncol.**, v. 39, n. 5, p. 1099-1107, 2011.

NOHATA, N. et al. MiRNAs function as tumor suppressors or oncogenes: aberrant expression of miRNAs in head and neck squamous cell carcinoma. **Auris. Nasus. Larynx.**, v. 40, n. 2, p. 143-149, 2013.

OCK, C. Y. et al. Identification of genomic mutations associated with clinical outcomes of induction chemotherapy in patients with head and neck squamous cell carcinoma. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v.142, n. 4, p. 873-883, 2015.

OHDAIRA, H. et al. MiRNA-494 suppresses cell proliferation and induces senescence in A549 lung cancer cells. **Cell Prolif.**, v. 45, n. 1, p. 32-38, 2012.

OHTA, K. et al. MiRNA-93 activates c-Met/PI3K/Akt pathway activity in hepatocellular carcinoma by directly inhibiting PTEN and CDKN1A. **Oncotarget**, v. 6, n. 5, p. 3211-3224, 2015.

OSAZUWA-PETERS, N. et al. Suicide: A Major Threat to Head and Neck Cancer Survivorship. **J. Clin. Oncol.**, v. 34, n. 5, p. 1151, 2016.

PAZ, T. A. et al. Production of the quinone-methide triterpene maytenin by in vitro adventitious roots of peritassa campestris (Cambess.) A.C.Sm. (Celastraceae) and rapid detection and identification by APCI-IT-MS/MS. **BioMed Res. Int.**, vol.13, p. 1-7, 2013.

PEI, H. et al. MiR-135b promotes proliferation and invasion of osteosarcoma cells via targeting FOXO1. **Mol. Cell Biochem.**, v. 400, n. 1-2, p. 245-252, 2015.

PEIXOTO NETO, P. A. D. S.; CAETANO, L. C. O mercado e as plantas medicinais. In: **Plantas medicinais: do Popular ao Científico**. Maceió: Edufal, 2005. p. 32-35.

PETRONELLI, A.; PANNITTERI, G.; TESTA, U. Triterpenoids as new promising anticancer drugs. **Anticancer Drugs**, v. 20, n. 10, p. 880-892, 2009.

PINTO, C.A et al. Produtos naturais: Atualidades, desafios e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

QIU, K. et al. miR-22 regulates cell invasion, migration and proliferation in vitro through inhibiting CD147 expression in tongue squamous cell carcinoma. **Arch. Oral Biol.**, v. 66, p. 92-97, 2016.

QIU, X. et al. Expression and prognostic value of miRNA-26a and miRNA-148a in gastric cancer. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, doi: 10.1111/jgh.13533, 2016a.

RATHOD, S. et al. A systematic review of quality of life in head and neck cancer treated with surgery with or without adjuvant treatment. **Oral Oncol.**, 2015, In press.

RAVER-SHAPIRA, N. et al. Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. **Mol Cell**, v. 26, n. 5, p. 731-743, 2007.

REBUCCI, M. et al. miRNA-196b inhibits cell proliferation and induces apoptosis in HepG2 cells by targeting IGF2BP1. **Mol. Cancer.**, v. 14, p. 79, 2015.

REN, J. W.; LI, Z. J.; TU, C. MiR-135 post-transcriptionally regulates FOXO1 expression and promotes cell proliferation in human malignant melanoma cells. **Int. J. Clin. Exp. Pathol.**, v. 8, n. 6, p. 6356-6366, 2015.

RISTORI, E. et al. A Dicer-miR-107 Interaction Regulates Biogenesis of Specific miRNAs Crucial for Neurogenesis. **Dev. Cell**, v. 32, n. 5, p. 546-560, 2015.

ROSSI, L.; BONMASSAR, E.; FARAONI, I. Modification of miR gene expression pattern in human colon cancer cells following exposure to 5-fluorouracil in vitro. **Pharmacol. Res.**, v. 56, n. 3, p. 248-253, 2007.

ROYAL SOCIETY OF CHEMSPIDER [Internet]. Search and share chemistry. 2015. Disponível em: <<http://www.chemspider.com/>>. Acesso em: 4 de abril de 2016.

SAKAMOTO, N. et al. MiRNA-148a is downregulated in gastric cancer, targets MMP7, and indicates tumor invasiveness and poor prognosis. **Cancer. Sci.**, v. 105, n. 2, p. 236-243, 2014.

SALMINEN, A. et al. Celastrol: Molecular targets of Thunder God Vine. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 394, n. 3, p. 439-442, 2010.

SANTANA, C. F.; ASFORA, J. J.; COTIAS, C. T. Primeiras observações sobre o emprego da maitenina em pacientes cancerosos. **Rev. Inst. Antibiotic.** 37-49, 1971.

SCHREIBER, R. et al. Evidence for the role of microRNA 374b in acquired cisplatin resistance in pancreatic cancer cells. **Cancer Gene. Ther.**, v. 23, n. 8, p. 241-245, 2016.

SEVERINO, P. et al. MiRNA expression profile in head and neck cancer: HOX-cluster embedded miRNA-196a and miRNA-10b dysregulation implicated in cell proliferation. **B.M.C Cancer.** v.13, p.15, 2013.

SHA, M. et al. Celastrol induces apoptosis of gastric cancer cells by miR-146a inhibition of NF- κ B activity. **Cancer Cell. Int.**, v. 13, n. 1, p. 50, 2013.

SHA, M. et al. Celastrol induces apoptosis of gastric cancer cells by miR-21 inhibiting PI3K/Akt-NF- κ B signaling pathway. **Pharmacology**, v. 93, n.1-2, p. 39-46, 2014.

SHAH, N.; SUKUMAR, S. The Hox genes and their roles in oncogenesis. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 10, n. 5, p. 361-371, 2010.

SHEN, N.; HUANG, X.; LI, J. Upregulation of miR-129-5p affects laryngeal cancer cell proliferation, invasiveness, and migration by affecting STAT3 expression. **Tumour. Biol.**, v. 37, n. 2, p. 1789-1796, 2015.

SHEN, Z. et al. MiRNA-34a affects the occurrence of laryngeal squamous cell carcinoma by targeting the antiapoptotic gene survivin. **Med. Oncol.**, v. 29, n. 4, p. 2473-2480, 2012.

SHEN, Z. et al. Promoter hypermethylation of miR-34a contributes to the risk, progression, metastasis and poor survival of laryngeal squamous cell carcinoma. **Gene**, 2016.

SHETH, S. H. et al. Chemoprevention targets for tobacco-related head and neck cancer: past lessons and future directions. **Oral. Oncol.**, v. 51, n. 6, p. 557-564, 2015.

SHI, W. et al. Potential involvement of miR-375 in the premalignant progression of oral squamous cell carcinoma mediated via transcription factor KLF5. **Oncotarget**, v. 6, n. 37, p. 40172-40185, 2015.

SHIAH, S. G. et al. Downregulated miR329 and miR410 promote the proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma by targeting Wnt-7b. **Cancer Res.**, v. 74, n. 24, p. 7560-7572, 2014.

SHRIVASTAVA, S. et al. Anticancer effect of celastrol on human triple negative breast cancer: possible involvement of oxidative stress, mitochondrial dysfunction, apoptosis and PI3K/Akt pathways. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 98, n. 3, p. 313-327, 2015.

SINGH, B. et al. MiRNA-93 regulates NRF2 expression and is associated with breast carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 5, p. 1165-1172, 2013.

- SUH, Y. et al. Clinical update on cancer: molecular oncology of head and neck cancer. **Cell Death Dis.**, v. 5, p. e1018, 2014.
- SUH, Y. E. et al. MiRNA-196a promotes an oncogenic effect in head and neck cancer cells by suppressing annexin A1 and enhancing radioresistance. **Int. J. Cancer.**, p. 1021-1034, 2014a.
- SUN, X. et al. MiRNA-221 accelerates the proliferation of laryngeal cancer cell line Hep-2 by suppressing Apaf-1. **Oncol. Rep.**, v. 33, n. 3, p. 1221-1226, 2015.
- SUN, X. et al. miRNA-24-3p promotes cell proliferation and regulates chemosensitivity in head and neck squamous cell carcinoma by targeting CHD5. **Future. Oncol.**, 2016.
- SUN, Z. et al. miR-21 increases the programmed cell death 4 gene-regulated cell proliferation in head and neck squamous carcinoma cell lines. **Oncol. Rep.**, v. 32, n. 5, p. 2283-2289, 2014.
- SZAFRANSKA, A. E. et al. MiRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. **Oncogene**, v. 26, n. 30, p. 4442-4452, 2007.
- TAKAHASHI, R. U.; MIYAZAKI, H.; OCHIYA, T. The role of miRNAs in the regulation of cancer stem cells. **Front. Genet.**, v. 4, p. 295, 2014.
- TAKAHASHI, Y. et al. MiR-107 and MiR-185 can induce cell cycle arrest in human non small cell lung cancer cell lines. **PLoS One**, v. 4, n. 8, p. e6677, 2009.
- TANG, Y. T. et al. Role of non-coding RNAs in pancreatic cancer: the bane of the microworld. **World. J. Gastroenterol.**, v. 20, n. 28, p. 9405-9417, 2014.
- TIAN, L. et al. MiRNA-205 suppresses proliferation and promotes apoptosis in laryngeal squamous cell carcinoma. **Med. Oncol.**, v. 31, n. 1, p. 785, 2014.
- TORRE, L. A. et al. Global cancer statistics, 2012. **C.A. Cancer J. Clin.**, v. 65, n. 2, p. 87-108, 2015.
- TSAI, K. W. et al. Epigenetic regulation of miR-196b expression in gastric cancer. **Genes Chrom. Cancer**, v. 49, n. 11, p. 969-980, 2010.
- VALERI, N. et al. MiRNA-135b promotes cancer progression by acting as a downstream effector of oncogenic pathways in colon cancer. **Cancer Cell**, v. 25, n. 4, p. 469-483, 2014.
- VOLINIA, S. et al. A miRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. **Proc Natl Acad. Sci. USA.**, v. 103, n. 7, p. 2257-2261, 2006.
- WALKER, J. C.; HARLAND, R. M. miRNA-24a is required to repress apoptosis in the developing neural retina. **Genes Dev.**, v. 23, n. 9, p. 1046-1051, 2009.
- WANG, H. et al. MicoRNA-451 is a novel tumor suppressor via targeting c-myc in head and neck squamous cell carcinomas. **J. Cancer Res. Ther.**, v. 11 Suppl 2, p. C216-221, 2015a.
- WANG, J. et al. MiRNA expression and its implication for the diagnosis and therapeutic strategies of gastric cancer. **Cancer Lett**, v. 297, n. 2, p. 137-43, 2010.
- WANG, L.; LIU, H. miRNA-188 is downregulated in oral squamous cell carcinoma and inhibits proliferation and invasion by targeting SIX1. **Tumour Biol**, v. 37, n. 3, p. 4105-4113, 2015.
- WANG, R. et al. The PDGF-D/miR-106a/Twist1 pathway orchestrates epithelial-mesenchymal transition in gemcitabine resistance hepatoma cells. **Oncotarget**, v. 6, n. 9, p. 7000-7010, 2015b.
- WANG, S. et al. The potent tumor suppressor miR-497 inhibits cancer phenotypes in nasopharyngeal carcinoma by targeting ANLN and HSPA4L. **Oncotarget**, v. 6, n. 34, p. 35893-35907, 2015c.

WANG, X. N. et al. Effects of Celastrol on growth inhibition of U937 leukemia cells through the regulation of the Notch1/NF-kappaB signaling pathway in vitro. **Chin. J. Cancer.**, v. 29, n. 4, p. 385-390, 2010a.

WONG, L. et al [Internet]. Endogenous controls for real-time quantitation of miRNA using TaqMan® MiRNA Assays Applied Biosystems Application Note, Publication 127AP11-01. Disponível em: <www.appliedbiosystems.com>. Acesso em: 15 de maio de 2016.

WONG, T. S. et al. Mature miR-184 as Potential Oncogenic miRNA of Squamous Cell Carcinoma of Tongue. In: **Clin. Cancer. Res.**, v.14, 2008.

WU, C. D. et al. MiRNA-1 induces apoptosis by targeting prothymosin alpha in nasopharyngeal carcinoma cells. **J Biomed. Sci.**, v. 18, p. 80, 2011.

WU, C. W. et al. Identification of miRNA-135b in stool as a potential noninvasive biomarker for colorectal cancer and adenoma. **Clin. Cancer. Res.**, v. 20, n. 11, p. 2994-3002, 2014.

WU, T. et al. Increased expression of Lin28B associates with poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e83869, 2013.

WU, T. et al. Regulation of laryngeal squamous cell cancer progression by the lncRNA H19/miR-148a-3p/DNMT1 axis. **Oncotarget**, v.7, n.10, p. 11553-11566, 2016.

WU, T. Y. et al. MiR-19a is correlated with prognosis and apoptosis of laryngeal squamous cell carcinoma by regulating TIMP-2 expression. **Int. J. Clin. Exp. Pathol.**, v. 7, n. 1, p. 56-63, 2014a.

WU, W. et al. MiRNA-135b regulates metastasis suppressor 1 expression and promotes migration and invasion in colorectal cancer. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 388, n. 1-2, p. 249-59, 2014b.

WU, Y. et al. MiRNA-205 suppresses the growth of adrenocortical carcinoma SW-13 cells via targeting Bcl-2. **Oncol. Rep.**, v. 34, n. 6, p. 3104-3110, 2015.

XIA, H.; LI, Y.; LV, X. MiRNA-107 inhibits tumor growth and metastasis by targeting the BDNF-mediated PI3K/AKT pathway in human non-small lung cancer. **Int. J. Oncol.**, v. 49, n. 4, p. 1325-1333, 2016.

XIAO, S. et al. miR-135b contributes to the radioresistance by targeting GSK3 β in human glioblastoma multiforme cells. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e108810, 2014.

XIAO, X. et al. MiRNA-93 regulates cyclin G2 expression and plays an oncogenic role in laryngeal squamous cell carcinoma. **Int. J. Oncol.**, v. 46, n. 1, p. 161-174, 2015.

XIE, K. L. et al. MiRNAs associated with HBV infection and HBV-related HCC. **Theranostics**, v. 4, n. 12, p. 1176-1192, 2014.

XU, L. et al. MiRNA-24 inhibits growth, induces apoptosis, and reverses radioresistance in laryngeal squamous cell carcinoma by targeting X-linked inhibitor of apoptosis protein. **Cancer. Cell. Int.**, v. 15, p. 61, 2015.

XU, Y. et al. Down-regulation of miRNA-135b inhibited growth of cervical cancer cells by targeting FOXO1. **Int J Clin. Exp. Pathol.**, v. 8, n. 9, p. 10294-10304, 2015a.

YADAV, V. R. et al. Celastrol suppresses invasion of colon and pancreatic cancer cells through the downregulation of expression of CXCR4 chemokine receptor. **J. Mol. Med. (Berl)**, v. 88, n. 12, p. 1243-53, 2010.

YAN, B. et al. Downregulation of miRNA 99a in oral squamous cell carcinomas contributes to the growth and survival of oral cancer cells. **Mol. Med. Rep.**, v. 6, n. 3, p. 675-681, 2012.

YAN, X. J. et al. Triterpenoids as reversal agents for anticancer drug resistance treatment. **Drug. Discov. Today**, v. 19, n. 4, p. 482-488, 2014.

- YANAIHARA, N. et al. Unique miRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. **Cancer Cell**, v. 9, n. 3, p. 189-198, 2006.
- YANG, C. J. et al. miR-221 and miR-222 expression increased the growth and tumorigenesis of oral carcinoma cells. **J. Oral. Pathol. Med.**, v. 40, n. 7, p. 560-566, 2011.
- YANG, G. et al. MiR-205 functions as a tumor suppressor via targeting TGF- α in osteosarcoma. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 100, n. 1, p. 160-166, 2016.
- YANG, T. S. et al. MiRNA-106b in cancer-associated fibroblasts from gastric cancer promotes cell migration and invasion by targeting PTEN. **F.E.B.S Lett**, v. 588, n. 13, p. 2162-2169, 2014.
- YANG, W. et al. MiR-223 targeting MAFB suppresses proliferation and migration of nasopharyngeal carcinoma cells. **B.M.C Cancer**, v. 15, p. 461, 2015.
- YANG, Y. et al. Progress risk assessment of oral premalignant lesions with saliva miRNA analysis. **B.M.C Cancer**, v. 13, p. 129, 2013.
- YEKTA, S.; SHIH, I. H.; BARTEL, D. P. MiRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. **Science**, v. 304, n. 5670, p. 594-596, 2004.
- YIN, D. et al. HBx-induced miR-21 suppresses cell apoptosis in hepatocellular carcinoma by targeting interleukin-12. **Oncol. Rep.**, v. 36, n. 4, p. 2305-2312, 2016.
- YOUNG, D. et al. Increase in head and neck cancer in younger patients due to human papillomavirus (HPV). **Oral Oncol.**, v. 51, n. 8, p. 727-730, 2015.
- YOUSEF, B. A. et al. Pristimerin demonstrates anticancer potential in colorectal cancer cells by inducing G1 phase arrest and apoptosis and suppressing various pro-survival signaling proteins. **Oncol. Rep.**, v. 35, n. 2, p. 1091-1100, 2016.
- YU, L. et al. miR-26a inhibits invasion and metastasis of nasopharyngeal cancer by targeting EZH2. **Oncol. Lett.**, v. 5, n. 4, p. 1223-1228, 2013.
- YU, T. et al. MiRNA-9 inhibits the proliferation of oral squamous cell carcinoma cells by suppressing expression of CXCR4 via the Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Oncogene**, v. 33, n. 42, p. 5017-5027, 2014.
- YU, W. F. et al. miR-206 inhibits human laryngeal squamous cell carcinoma cell growth by regulation of cyclinD2. **Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.**, v. 19, n. 14, p. 2697-2702, 2015.
- YU, X. et al. Loss of connective tissue growth factor as an unfavorable prognosis factor activates miR-18b by PI3K/AKT/C-Jun and C-Myc and promotes cell growth in nasopharyngeal carcinoma. **Cell Death Dis.**, v. 4, p. e634, 2013a.
- ZENG, Q. et al. Overexpression of miR-155 promotes the proliferation and invasion of oral squamous carcinoma cells by regulating BCL6/cyclin D2. **Int. J. Mol. Med.**, v. 37, n. 5, p. 1274-1280, 2016.
- ZENG, Y.; YI, R.; CULLEN, B. R. MiRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 100, n. 17, p. 9779-9784, 2003.
- ZHANG, B. et al. miRNAs as oncogenes and tumor suppressors. **Dev. Biol.**, v. 302, n. 1, p. 1-12, 2007.
- ZHANG, J. J. et al. miR-107 promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation by targeting Axin2. **Int. J. Clin. Exp. Pathol.**, v. 8, n. 5, p. 5168-5174, 2015.
- ZHANG, L. et al. miRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, n. 24, p. 9136-9141, 2006.

ZHANG, L. et al. Induction chemotherapy with concurrent chemoradiotherapy versus concurrent chemoradiotherapy for locally advanced squamous cell carcinoma of head and neck: a meta-analysis. **Sci. Rep.**, v. 5, p. 10798, 2015a.

ZHANG, L. et al. MiR-107 down-regulates SIAH1 expression in human breast cancer cells and silencing of miR-107 inhibits tumor growth in a nude mouse model of triple-negative breast cancer. **Mol. Carcinog.**, v. 55, n. 5, p. 768-777, 2016.

ZHANG, L. et al. MiRNA-10b Triggers the Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) of Laryngeal Carcinoma Hep-2 Cells by Directly Targeting the E-cadherin. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 176, n. 1, p. 33-44, 2015b.

ZHANG, L. et al. MiRNA-135b acts as a tumor promoter by targeting the hypoxia-inducible factor pathway in genetically defined mouse model of head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Lett.**, v. 331, n. 2, p. 230-238, 2013.

ZHANG, L. Y. et al. MiRNA-144 promotes cell proliferation, migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma through repression of PTEN. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 2, p. 454-463, 2013a.

ZHANG, M. et al. miR-107 and miR-25 simultaneously target LATS2 and regulate proliferation and invasion of gastric adenocarcinoma (GAC) cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 460, n. 3, p. 806-812, 2015c.

ZHANG, P. et al. miR-205 acts as a tumour radiosensitizer by targeting ZEB1 and Ubc13. **Nat. Commun.**, v. 5, p. 5671, 2014.

ZHANG, X. et al. Regulation of the tumour suppressor PDCD4 by miR-499 and miR-21 in oropharyngeal cancers. **B.M.C Cancer**, v. 16, n. 1, p. 86, 2015d.

ZHANG, Z. et al. miR-107 regulates cisplatin chemosensitivity of A549 non small cell lung cancer cell line by targeting cyclin dependent kinase 8. **Int. J. Clin. Exp. Pathol.**, v. 7, n. 10, p. 7236-7241, 2014a.

ZHAO, H. et al. Pristimerin triggers AIF-dependent programmed necrosis in glioma cells via activation of JNK. **Cancer Lett.**, v.374 n.1, p, 136-148, 2016.

ZHAO, X. X. et al. MiRNA-26a inhibits proliferation by targeting high mobility group AT-hook 1 in breast cancer. **Int J. Clin. Exp. Pathol.**, v. 8, n. 1, p. 368-73, 2015.

ZHOU, C. et al. miR-107 activates ATR/Chk1 pathway and suppress cervical cancer invasion by targeting MCL1. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e111860, 2014.

ZHOU, P. et al. Correlation between mir-21 expression and laryngeal carcinoma risks. **J. Evid. Based. Med.**, v. 9, n. 1, p. 32-37, 2016.

ZHOU, Y. X.; HUANG, Y. L. Antiangiogenic effect of celastrol on the growth of human glioma: an in vitro and in vivo study. **Chin. Med. J. (Engl)**, v. 122, n. 14, p. 1666-1673, 2009.

ZHU, S. et al. MiRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 19, p. 14328-14336, 2007.

ZHU, S. et al. MiRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. **Cell. Res.**, v. 18, n. 3, p. 350-9, 2008.

APÊNDICE A- MiRNAs relacionados com proliferação e apoptose em CECp.

MiRNAs envolvidos em proliferação e apoptose em CECp					
miRNA	Expressão em tumores	Ensaio Funcional	Resultado	Câncer	Referência
miRNA-1	menor	superexpressão	inibe proliferação e induz apoptose	carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço	NOHATA et al., 2011; WU et al., 2011
miRNA-9	menor	superexpressão	inibe proliferação	carcinoma oral	YU et al., 2014
miRNA-10b	menor	superexpressão	inibe proliferação	câncer de laringe; carcinoma oral	ZHANG et al., 2015b; SEVERINO et al., 2013
miRNA-18a	maior	superexpressão e inibição	induz e inibe proliferação	carcinoma de nasofaringe	LUO et al., 2013
miRNA-18b	maior	superexpressão e inibição	induz e inibe proliferação	carcinoma de nasofaringe	YU et al., 2013a
miRNA-19a	maior	Inibição	inibe proliferação e induz apoptose	câncer de laringe	WU et al., 2014a
miRNA-21	maior	superexpressão e inibição	induz e inibe proliferação	carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço	SUN et al., 2014
miRNA-22	menor	superexpressão e inibição	inibe e induz proliferação	câncer de língua	QIU et al., 2016
miRNA-24	menor	superexpressão	inibe proliferação e induz apoptose	carcinoma oral, câncer de laringe	SUN et al., 2016; XU et al., 2015; GUO et al., 2012
miRNA-26a	menor	superexpressão	inibe proliferação e induz apoptose	câncer de língua	JIA et al., 2014
miRNA-31*	maior	Inibição	inibe proliferação	carcinoma oral	CHANG et al., 2013
miRNA-34a	menor	superexpressão	inibe proliferação	câncer de laringe; carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço	LI; MA; SUN, 2014; KUMAR et al., 2012; SHEN et al., 2012
miRNA-93	maior	superexpressão	induz proliferação e inibe apoptose	câncer de laringe, câncer de cabeça e pescoço	XIAO et al., 2015; LI et al., 2015b
miRNA-99a	menor	superexpressão	inibe proliferação e induz apoptose	carcinoma oral	YAN et al., 2012
miRNA-100	menor	superexpressão	inibe proliferação	carcinoma oral	HENSON et al., 2009
miRNA-106b	maior	Inibição	inibe proliferação	câncer de laringe	CAI; WANG; BAO, 2011
miRNA-107	menor	superexpressão	inibe proliferação	carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço	DATTA et al., 2012

miRNA-124	menor	superexpressão	Inibe proliferação	carcinoma oral	ZHANG et al., 2015d
miRNA-125b	menor	superexpressão	inibe proliferação	carcinoma oral	HENSON et al., 2009
miRNA-126	menor	superexpressão e inibição	inibe proliferação e induz apoptose e induz proliferação e inibe apoptose	carcinoma de língua	HAN et al., 2016
miRNA-128	menor	superexpressão	inibe proliferação	carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço	HAUSER et al., 2015
miRNA-129-5p	menor	superexpressão	inibe proliferação e induz apoptose	câncer de laringe	SHEN; HUANG; LI, 2015
miRNA-135	maior	superexpressão	induz proliferação	carcinoma de cabeça e pescoço	ZHANG et al., 2013
miRNA-143	menor	superexpressão	inibe proliferação e induz apoptose	carcinoma oral	NI et al., 2015
miRNA-144	maior	superexpressão e inibição	induz e inibe proliferação	carcinoma de nasofaringe	ZHANG et al., 2013a
miRNA-146a	menor	superexpressão e inibição	inibe e induz proliferação	carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço	LERNER et al., 2016,
miRNA-148a-3p	menor	superexpressão e inibição	inibe e induz proliferação	câncer de laringe	WU et al., 2016
miRNA-155	menor	superexpressão e inibição	inibe e induz proliferação	carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço carcinoma oral	ZENG et al., 2016, LERNER et al., 2016
miRNA-184	maior	inibição	inibe proliferação e induz apoptose	carcinoma de células escamosas da língua	WONG et al., 2008
miRNA-188	menor	superexpressão e inibição	inibe e induz proliferação	carcinoma oral	WANG; LIU, 2015
miRNA-195	menor	superexpressão	inibe proliferação e induz apoptose	carcinoma de células escamosas de língua	JIA et al., 2013
miRNA-196a	maior	inibição; inibição e superexpressão	inibe proliferação; inibe e induz proliferação	carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço	DARDA et al., 2015; SUH et al., 2014a
miRNA-196b	maior	superexpressão	induz proliferação	carcinoma oral	LIU et al., 2013
miRNA-205	menor	superexpressão	inibe proliferação e induz apoptose	câncer de laringe; carcinoma oral	TIAN et al., 2014; KIM et al., 2014a
miRNA-206	menor	superexpressão	inibe proliferação	câncer de laringe	YU et al., 2015

miRNA-221	maior	inibição; superexpressão	inibe proliferação e induz apoptose; promove proliferação	câncer de laringe; carcinoma oral	SUN et al., 2015; YANG et al., 2011
miRNA-222	maior	inibição; superexpressão	inibe proliferação e induz apoptose; promove proliferação	carcinoma oral	JIANG et al., 2014; YANG et al., 2011
miRNA-223	menor	superexpressão	inibe proliferação	carcinoma de nasofaringe	YANG et al., 2015
miRNA-329	menor	superexpressão	inibe proliferação	carcinoma oral	SHIAH et al., 2014
miRNA-375	menor	superexpressão e inibição	inibe e induz proliferação	carcinoma oral	SHI et al., 2015
miRNA-410	menor	superexpressão	inibe proliferação	carcinoma oral	SHIAH et al., 2014
miRNA-423- 3p	maior	inibição	inibe proliferação	câncer de laringe	GUAN et al., 2014
miRNA-451	menor	superexpressão e inibição	inibe e induz proliferação	carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço	WANG et al., 2015a
miRNA-483- 3p	menor	superexpressão	inibe proliferação e induz apoptose	carcinoma oral	BERTERO et al., 2013
miRNA-497	menor	superexpressão	inibe proliferação e induz apoptose	carcinoma de nasofaringe	WANG et al., 2015c
miRNA-506	menor	superexpressão	inibe proliferação	carcinoma oral	DENG; LIU, 2015
miRNA-512- 5p	menor	Superexpressão	inibe proliferação e induz apoptose	carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço	LI et al., 2015
let-7b	menor	superexpressão	inibe proliferação	carcinoma oral	GAO et al., 2014
lin-28b	maior	superexpressão	induz proliferação	carcinoma oral	WU et al., 2013

Fonte: (NCBI, 2016).

ANEXO A- MiRNAs correlacionado com o iGrowth.

miRNA	iGrowth correlação com p valor			
	Análise conjunta		YRI	CEU
	Valor de p	FDR		
hsa-miR-210	3.51E-09	7.05E-07	1.41E-06	4.31E-04
hsa-miR-768-5p	1.39E-07	1.40E-05	6.51E-06	2.44E-03
hsa-miR-18a	2.55E-07	1.71E-05	1.53E-06	9.21E-03
hsa-miR-106a	8.59E-07	4.32E-05	1.75E-08	1.75E-01
hsa-miR-22	1.70E-06	6.13E-05	9.83E-08	6.73E-02
hsa-miR-18b	1.83E-06	6.13E-05	2.48E-06	3.72E-02
hsa-miR-17	2.81E-06	8.07E-05	5.58E-08	2.37E-01
hsa-miR-765	4.18E-06	1.05E-04	4.72E-05	3.22E-02
hsa-miR-20a	1.04E-05	2.30E-04	3.93E-07	1.53E-01
hsa-miR-20b	1.14E-05	2.30E-04	6.86E-06	1.42E-01
hsa-miR-1	1.32E-05	2.41E-04	1.91E-05	1.16E-01
hsa-miR-148b	3.81E-05	6.39E-04	4.66E-03	2.93E-03
hsa-miR-130b	5.71E-05	8.82E-04	1.17E-04	9.05E-02
hsa-miR-600	8.09E-05	1.16E-03	1.05E-02	1.83E-03
hsa-miR-768-3p	1,10E-04	1.41E-03	5.80E-04	3.62E-02
hsa-miR-518a-5p / hsa-miR-527	1.14E-04	1.41E-03	4.16E-04	4.66E-02
hsa-miR-17 *	1.19E-04	1.41E-03	1.92E-07	9.62E-01
hsa-miR-198	1.38E-04	1.54E-03	1.77E-04	1.21E-01
hsa-miR-92a	2.29E-04	2.32E-03	3.29E-07	7.28E-01
hsa-miR-30b *	2.31E-04	2.32E-03	9.91E-05	2.13E-01
hsa-miR-33a	2.62E-04	2,50E-03	4.63E-06	7.53E-01
hsa-miR-103	3.20E-04	2.92E-03	5.85E-06	8.42E-01
hsa-miR-361-3p	3.49E-04	3.05E-03	2.95E-04	1.46E-01
hsa-miR-196a *	3.83E-04	3.20E-03	3.53E-02	4.78E-03
hsa-miR-19a	6.46E-04	5.19E-03	1.51E-06	3.43E-01
hsa-miR-516a-5p	6.90E-04	5.26E-03	7.53E-05	3.21E-01
hsa-miR-365	7.06E-04	5.26E-03	2.64E-02	1.01E-02
hsa-miR-19b	1.07E-03	7.71E-03	1.35E-05	2.73E-01
hsa-miR-519e *	1.12E-03	7.80E-03	4.90E-04	2.69E-01
hsa-miR-921	1.22E-03	8.03E-03	5.80E-04	2.99E-01
hsa-miR-146a	1.24E-03	8.03E-03	4.53E-04	3.38E-01
hsa-miR-193b	1.33E-03	8.36E-03	2.18E-02	2.72E-02
hsa-miR-185 *	1.55E-03	9.21E-03	3.98E-02	6.89E-03
hsa-miR-301a	1.59E-03	9.21E-03	2.21E-03	2.30E-01
hsa-miR-193b *	1.60E-03	9.21E-03	2.08E-03	1.70E-01
hsa-miR-518c *	1.79E-03	9.86E-03	1.56E-04	5.03E-01
hsa-miR-34a	1.81E-03	9.86E-03	8.21E-02	8.00E-03
hsa-miR-106b	2.54E-03	1.34E-02	7.70E-04	3.76E-01

hsa-miR-223	2.73E-03	1.41E-02	1.89E-02	6.38E-02
hsa-miR-146b-5p	2.94E-03	1.46E-02	1.98E-03	3.24E-01
hsa-miR-93	2.99E-03	1.46E-02	2.94E-04	6.92E-01
hsa-miR-483-5p	3.41E-03	1.63E-02	6.70E-05	4.87E-01
hsa-miR-132	4.99E-03	2.33E-02	1.24E-02	2.15E-01
hsa-miR-423-3p	5.38E-03	2.46E-02	5.03E-05	9.82E-01
hsa-miR-342-3p	6.00E-03	2.68E-02	3.93E-04	6.91E-01
hsa-miR-30c-2 *	7.80E-03	3.41E-02	1.47E-03	6.84E-01
hsa-miR-675	8.37E-03	3.58E-02	4.12E-03	4.20E-01
hsa-miR-637	8.89E-03	3.65E-02	5.49E-01	5.75E-03
hsa-let-7d	8.90E-03	3.65E-02	1.20E-01	2.83E-02
hsa-miR-129 *	9.51E-03	3.82E-02	6.01E-02	7.92E-02
hsa-miR-583	1.11E-02	4.36E-02	8.03E-04	9.82E-01
miRPlus_17952	1.18E-02	4.58E-02	7.13E-04	8.52E-01
hsa-miR-148a	1,30E-02	4.94E-02	4.31E-04	7.58E-01

Fonte: (LENKALA et al., 2014). Apenas os miRNAs cuja expressão estão correlacionados com o iGrowth (FDR <0,05) em amostras CEU e YRI são demonstrados. miRNAs em negrito apresentam correlação em ambas as amostras (CEU e YRI) com $p < 0,05$.

ANEXO B- Resumo submetido a congresso científico internacional:

AACR American Association for Cancer Research: April 1 – April 5, 2017, Washington, DC, USA

Avoiding chemotherapy resistance in squamous cell carcinomas: anticancer activities of terpenoids and their impact on the regulation of microRNAs

Camila Hernandez¹, Bruna Lorencini da Silva¹, Maria de Fatima Guarrido Klingbeil², Monica Beatriz Mathor², Ana Maria Soares Pereira³, Patricia Severino^{1§}

1 Albert Einstein Research and Education Institute, Hospital Israelita Albert Einstein, Sao Paulo, Brazil; 2 Radiation Technology Center (CTR), Nuclear and Energetic Research Institute IPEN/CNEN, Sao Paulo, Brazil; 3 Department of Biotechnology, Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, Brazil; §Corresponding author: patricia.severino@einstein.br

MicroRNAs are small noncoding RNAs that play important roles in cellular biology. They have been implicated in pharmacogenomics by down-regulating genes that are essential for drug function. In this work we verified the potential anticancer activity of the quinone methide triterpenes maytenin and 22- β -hydroxymaytenin, as well as of a quinone methide triterpene-rich extract obtained from cultivated *Maytenus ilicifolia* root cells, and evaluated the associated microRNA expression following half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) treatment. Standard selectivity index (SI) for the isolated compounds and the root cell extract was determined by the logarithmic shift in effective concentration (IC₅₀) between cancer cell lines and oral keratinocytes. Both isolated molecules as well as the root cell extract presented pronounced antiproliferative and pro-apoptotic activities in four cell lines derived from head and neck squamous cell carcinomas, including a metastasis-derived cell line. A positive SI, with an average 2-fold increase in potency, was detected for single agents and for the extract. MicroRNA expression profiles were assessed at 24h, 48h and 72h following treatment and an average of 100 molecules presented consistent marked variation in expression levels. Considering associations of microRNAs, genes they regulate, and the drugs effects dependent on these genes, the down-regulation of miR-193a-3p and miR-21 in treated cells is of particular interest. Both microRNAs have been involved in 5-fluorouracil and cisplatin resistance, current agents of standard chemoradiotherapy for locally advanced head and neck cancer. Squamous cell carcinoma of the head and neck is one of the most common cancer types worldwide whereas treatment options based on conventional therapies or targeted therapies under development have limited efficacy. Plant-derived products are valuable in the development of new therapeutic options for cancer treatment or as synergistic agents in existing regular care.