

SILVIA TAVEIRA ELIAS

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO DE  
PLANTAS DO CERRADO EM CARCINOMA DE CABEÇA E  
PESCOÇO**

BRASÍLIA  
DEZEMBRO, 2014

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

SILVIA TAVEIRA ELIAS

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO DE  
PLANTAS DO CERRADO EM CARCINOMA DE CABEÇA E  
PESCOÇO**

Tese apresentada como requisito para obtenção do  
Título de Doutora em Ciências da Saúde pelo  
programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde  
da Universidade de Brasília.

Orientadora: Professora. Dra. Eliete Neves da Silva Guerra

BRASÍLIA  
DEZEMBRO, 2014

Trabalho realizado no Laboratório de Histopatologia Bucal em parceria com os Laboratórios de Farmacologia Molecular (FARMOL) da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília e Laboratório de Patologia da Universidade de Campinas (UNICAMP), com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Edital MCT/CNPq/FNDCT/FAPs/MEC/CAPES/PRO-CENTRO-OESTE Nº 031/2010. Projeto inserido na rede "Bioprospecção de plantas e microorganismos do Cerrado e Pantanal para o desenvolvimento de novos fármacos"

*Dedico este trabalho a minha família, meus pais Carlos e Norma, meu irmão Carlos Eduardo e meu noivo, Saulo. O estímulo, compreensão e apoio de vocês tornou esta pesquisa possível. Obrigada pelo apoio incondicional e confiança depositada em mim durante toda minha vida e em especial durante os últimos quatro anos.*

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Eliete Neves da Silva Guerra, que sempre foi mais do que uma orientadora, foi companheira, colega de horas de trabalho no laboratório, mas, sobretudo uma grande amiga. Obrigada pelo incentivo constante, pela inspiração e amor que nos passa pelo seu trabalho. Você é a grande responsável pelo crescimento e pelos frutos de toda nossa equipe.

Aos colegas de laboratório, alunos de iniciação científica, mestrandos e doutorandos, grandes amigos que com sua generosidade e disposição tornaram o ambiente de trabalho sempre agradável e prazeroso.

Aos mestrandos Gabriel A. Borges e Daniela F. Rêgo que participaram de maneira mais próxima dos meus experimentos. Obrigada pela colaboração e compreensão durante todo o meu trabalho.

Aos técnicos do laboratório pelo empenho em tornar nosso laboratório sempre funcional ao grupo.

Aos professores Adriana Lofrano, Dâmaris Silveira, Francisco A F Neves, Luiz A Simeone e Pérola O Magalhães que com seus conhecimentos e dedicação tornaram este trabalho melhor.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento sem o qual a pesquisa não seria possível.

Aos colaboradores externos do trabalho, professor Décio do Santos Pinto Júnior e professor Ricardo Della Coletta pela generosidade em disponibilizar seus laboratórios e conhecimento.

À minha família, meus pais Carlos Elias Neto e Norma Adorno Taveira Elias, meu irmão Carlos Eduardo Taveira Elias e meu noivo Saulo Fernando N Oliveira que souberam entender minha ausência e me incentivaram em todos os momentos a não desistir e perseverar na realização deste sonho.

Ao Programa de Pós-graduação em ciências de saúde da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

## RESUMO

As moléculas antineoplásicas derivadas de plantas têm ganhado atenção frente aos tratamentos convencionais do câncer. Assim, esse trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antineoplásica de extratos de plantas derivadas do Bioma Cerrado em linhagens de carcinoma de cabeça e pescoço (HNSCC). Também, objetiva-se averiguar a ação concomitante do tratamento radioterápico associado aos extratos de plantas do Cerrado e o possível sinergismo entre eles, além de identificar vias de ação e substâncias com potencial biológico nas linhagens de HNSCC. Para os experimentos foram usados extratos de folhas das espécies *Erythroxylum daphnites*, *E. suberosum*, *E. subrotundum*, *Pouteria ramiflora* e *P. torta* provenientes do bioma Cerrado. Para cada planta foram produzidos três diferentes extratos divididos de acordo com sua solubilidade e polaridade, são eles: aquoso, etanólico e hexânico. Os extratos com maior atividade citotóxica tiveram sua concentração de IC50 definidas e passaram por novos testes a fim de determinar o mecanismo de ação. Dentre os 15 extratos testados, o extrato hexânico de *E. daphnites* (EDH) foi o que apresentou maior toxicidade para a linhagem SCC-9 (carcinoma de língua) e extrato hexânico de *E. suberosum* (ESH) para a linhagem FaDu. De maneira geral os extratos induziram efeito citotóxico supraaditivo quando comparado às linhagens que receberam apenas irradiação. O extrato EDH apresentou ainda atividade antiproliferativa, estabilização do ciclo celular na fase G0/G1, diminuição de expressão das ciclinas D e E e aumento de expressão das proteínas p16 e p21, além de ter atividade apoptótica comprovada pela expressão de caspase 3. O extrato ESH, apesar de citotóxico, não possui efeito antiproliferativo para a linhagem FaDu e o perfil de morte descrito foi apenas o de necrose. Os triterpenos foram os principais constituintes encontrados nos extratos com melhor resposta citotóxica. Diante dos resultados obtidos, esse estudo demonstra a relevância biológica das substâncias advindas de plantas do Cerrado e destaca o extrato EDH como uma opção promissora para o tratamento do carcinoma de língua.

**PALAVRAS CHAVES:** Extratos, Cerrado, HNSCC, Apoptose, Ciclo celular

## ABSTRACT

Antineoplastic effects of molecules derived from plants have recently gained increased attention as an additive to traditional therapies. This study aims to investigate the antineoplastic activity of plant extracts derived from the Cerrado biome in head and neck carcinoma cell lines. It also investigates the concomitant activity of radiotherapeutic treatment associated with plant extracts and the possible synergism between them, identify action mechanisms and possible active substances with biological activity for HNSCC cells. For the experiments, leaf extracts of plant species *Erythroxylum daphnites*, *E. suberosum*, *E. subrotundum*, *Pouteria ramiflora* and *P. torta* from Cerrado Biome were used. Of each plant, three extracts were produced according to their solubility and polarity: aqueous, ethanolic and hexanic. Extracts with increased activity had the IC<sub>50</sub> concentration defined. New assays were done to determinate mechanism of action and probable constitution. Among 15 extracts tested, hexanic extract from *E. daphnites* (EDH) showed the highest toxicity for SCC-9 and hexanic extract from *E. suberosum* (ESH) for FaDu cells. Generally extracts induced supra-additive cytotoxic effect compared with cells that received only radiation. The extract EDH also showed antiproliferative effect, stabilization of cell cycle on G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase, decreased levels of cyclins D and E, and increased labeling of proteins p16 and p21, as well as apoptotic activity proven by expression of caspase 3. Extract ESH, despite cytotoxicity activity, didn't show antiproliferative result on FaDu cell line and the profile of cell death described is only necrosis. Triterpenes are major constituents found in both extracts with better cytotoxic index. Based on these dates, this study highlights the potential biological relevance of Cerrado plants and EDH emerges as a promising option for the treatment of tongue cancer.

KEY WORDS: Extracts, Cerrado, HNSCC, Apoptosis, Cell Cycle

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Representação esquemática do ciclo celular	Pag 16
Figura 02	Vias intrínseca e extrínseca da apoptose	Pag 17
Figura 03	Avaliação da toxicidade de dose-única de irradiação (2Gy/Min) nas linhagens de carcinoma de cabeça e pescoço e queratinócitos	Pag 40
Figura 04	Comparação da porcentagem de células viáveis após tratamento com extratos ou extratos + radioterapia após 24 horas de tratamento.	Pag 47
Figura 05	Curva dose-resposta dos extratos com melhor atividade citotóxica após 24 horas de tratamento	Pag.49
Figura 06	Gráfico de inibição de proliferação celular aferida por incorporação de BrdU	Pag 52
Figura 07	Avaliação do perfil de morte celular induzido pelos extratos de plantas do Cerrado	Pag 54
Figura 08	Western-blot para detecção da expressão de proteína caspase 3 e controle GADPH.	Pag 55
Figura 09	Distribuição dos eventos por fase do ciclo celular após 24 horas de tratamento com extrato EDH.	Pag 57
Figura 10	Expressão das proteínas do ciclo celular na linhagem SCC-9 tratadas com EDH	Pag 58
Figura 11	Avaliação do fechamento de ferida da linhagem SCC-9 pós tratamento com o extrato	Pag 60
Figura 12	Demonstração da inibição da migração celular das células SCC-9 tratadas com o extrato EDH	Pag 61
Figura 13	Citotoxicidade das frações nas linhagens SCC-9, SCC-25 e FaDu após 24 horas de tratamento	Pag 62
Figura 14	Cromatografia de camada delgada (CCD)	Pag 63

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Extratos de plantas testados nas linhagens de carcinoma de cabeça e pescoço	Pag 29
Tabela 02	Lista de anticorpos primários utilizados no estudo	Pag 37
Tabela 03	Avaliação da atividade citotóxica de 15 extratos de plantas do Cerrado em células de carcinoma de cabeça e pescoço.	Pag 43
Tabela 04	Avaliação da atividade citotóxica de 15 extratos de plantas do Cerrado associados à radioterapia em células de carcinoma de cabeça e pescoço	Pag 45
Tabela 05	IC50 dos extratos testados e seus respectivos IST para as linhagens de carcinoma de cabeça e pescoço	Pag 50

## LISTA DE ABREVIATURAS

OMS	Organização Mundial de Saúde
INCA	Instituto Nacional de Câncer
HNSCC	Carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço
HPV	Papiloma vírus humano
pRB	Proteína do retinoblastoma
CDK2	Ciclina dependente de quinase 2
PTEN	Homólogo de tensina e fosfatase
TP53	Tumor proteína p53
EGFR	Receptor de fator de crescimento epidermal
CDKs	Ciclina dependente de quinases
CKIs	Inibidores de quinases dependentes de ciclina
AKT	Proteína quinase B
PI3K	Phosphoinositide 3 quinase
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
ERK	Quinase reguladora de sinal extracelular
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
HIF-1 $\alpha$	Fator indutor de hipóxia 1 alfa
HSP90	Proteína de choque térmico 90
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
PLC- $\gamma$	Fosfolipase C gama
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear kappa B
COX-1	Ciclooxigenase 1
PR	<i>Pouteria ramiflora</i>
PT	<i>Pouteria torta</i>
ED	<i>Erythroxyllum daphnites</i>
ES	<i>Erythroxyllum suberosum</i>
ESO	<i>Erythroxyllum subrotundum</i>
ATCC	Coleção de tipos de cultura celular americana
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium

PBS	Solução tampão de fosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
DMSO	Dimetilsufóxido
HCl	Ácido clorídrico
CACON	Centro de alta complexidade em oncologia
HUB	Hospital Universitário de Brasília
IC50	Dose suficiente para induzir 50% de citotoxicidade
IST	Índice de seletividade tumoral
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
IP	Iodeto de propídeo
OS	Fosfatidilserina
NaCl	Cloreto de sódio
NaF	Fluoreto de sódio
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio de poliacrilamida
TBST	Tampão salino de tris com tween
CCD	Cromatografia de camada delgada
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

## SUMÁRIO

1. Introdução e revisão da literatura	Pag 14
1.1 Apoptose, ciclo celular e genes envolvidos na carcinogênese	Pag 15
1.2 Tratamento	Pag 19
1.3 Plantas no desenvolvimento dos fármacos	Pag 21
1.3.1 <i>Erythroxylaceae</i>	Pag 23
1.3.2 <i>Sapotaceae</i>	Pag 24
2. Objetivos	Pag 26
2.1 Objetivo geral	Pag 26
2.2 Objetivos específicos	Pag 26
3. Material e métodos	Pag 28
3.1 Obtenção dos extratos	Pag 28
3.2 Cultura de células	Pag 29
3.3 Teste de citotoxicidade celular (MTT)	Pag 30
3.4 Teste de citotoxicidade dos extratos associados à radioterapia	Pag 32
3.5 Curva dose-resposta	Pag 33
3.6 Ensaio de incorporação de BrdU	Pag 33
3.7 Citometria de fluxo	Pag 34
3.8 Western-blot	Pag 36
3.9 Teste de lesão em monocamada - Scratch assay	Pag 37
3.10 Avaliação da migração celular - Transwell assay	Pag 38
3.11 Cromatografia de camada delgada (CCD)	Pag 38
3.12 Análise estatística	Pag 39
4. Resultados	Pag 40
4.1 Avaliação do efeito citotóxico da irradiação	Pag 40
4.2 Avaliação da citotoxicidade induzida pelo tratamento com extratos do Cerrado nas linhagens de carcinoma de cabeça e pescoço	Pag 41
4.3 Avaliação da citotoxicidade induzida pela associação de extratos do Cerrado e irradiação e cisplatina e irradiação nas linhagens de HNSCC	Pag 44
4.4 Comparação da atividade citotóxica entre tratamento somente com extratos e extrato associado à radioterapia nas linhagens celulares	Pag 46
4.5 Curva dose-resposta dos extratos com maior ação citotóxica nas linhagens de HNSCC	Pag 48
4.6 Índice de seletividade tumoral (IST)	Pag 50
4.7 Ensaio de interferência do extrato na proliferação celular (BrdU)	Pag 51
4.8 Avaliação do perfil de morte celular induzido pelo tratamento com os extratos de plantas do Cerrado	Pag 52
4.9 Análise da interferência no ciclo celular da linhagem SCC-9 induzida pelo extrato EDH	Pag 55
4.10 Avaliação da interferência do extrato no ensaio de lesão em monocamada e migração celular	Pag 59
4.11 Identificação dos possíveis compostos presentes nos	Pag 62

extratos com maior atividade citotóxica

5. Discussão

Pag 64

6. Conclusão

Pag 73

Referências Bibliográficas

Pag 75

Apêndice

Pag 86

## 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

Segundo dados da OMS (Organização Mundial de Saúde) em 2012, mais de 8 milhões e 200 mil mortes foram provocadas por câncer. No Brasil, as estimativas para o ano de 2014 apontam a ocorrência de aproximadamente 18.150 novos casos de carcinoma de cabeça e pescoço em homens e 4.780 em mulheres, o que corresponde a um risco estimado de 11,54 e 7,03 novos casos a cada 100 mil homens e 3,92 e 0,75 a cada 100 mil mulheres de câncer de cavidade oral e laringe respectivamente (INCA). O carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (HNSCC) compreende tumores da mucosa do trato aereodigestivo superior como cavidade oral, orofaringe, laringe e faringe (Warnakulasuriya, 2009). Dentre este subtipo constata-se que 48% dos casos são de câncer de boca e que 90% podem ser classificados como carcinoma espinocelular (de células escamosas ou epidermóide) (Jemal *et al.*, 2009).

Os fatores de risco mais comuns para o desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço são o uso do tabaco e o consumo de álcool (Scully e Bagan 2007; Hecth *et al.*, 2003; Amarasinghe *et al.*, 2010; Belcher *et al.*, 2014). Juntos esses fatores têm um efeito mutagênico sinérgico e aumentam consideravelmente a chance de desenvolvimento do câncer. A infecção por HPV de alto risco também pode ser citada como um fator para o desenvolvimento desta doença, principalmente para os carcinomas em região de orofaringe, mas especificamente em tonsila (Thavaraj *et al.*, 2011).

Para os carcinomas HPV positivos o processo de cancerização está intimamente ligado à presença de dois oncogenes (E6 e E7) nos vírus chamados de alto-risco, principalmente o HPV 16. A presença desses oncogenes inativa p53 e a proteína do retinoblastoma (pRb) ocasionando alteração no ciclo celular e provável malignização das células infectadas. Por não ter o gene supressor de tumor, TP53, mutado e sim inativado, esses carcinomas definidos como HPV positivos parecem ter um melhor prognóstico do que os HPV negativos (Chung e Gilison, 2009). Os carcinomas HPV negativos não têm sua via de cancerização totalmente esclarecida, sendo que alguns genes já estão estabelecidos como participantes desse processo (CDKN2A, PTEN,

TP53, SMAD4, PIK3CA, EGFR, MET, CCND1), (Leemans *et al.*, 2011). Clinicamente a sobrevida global após 2 anos de tratamento com cisplatina e radioterapia em paciente com carcinoma de cabeça e pescoço HPV negativos é pior (65,8%) do que a observada em pacientes HPV positivos (87,9%). A afirmação também é válida ao avaliar a sobrevida livre de progressão da doença (Chung e Gilison, 2009).

### 1.1 Apoptose, ciclo celular e genes envolvidos na carcinogênese

Alterações genéticas são as grandes responsáveis pelo desenvolvimento do câncer, desse modo a expressão descontrolada de oncogenes e genes supressores de tumor assim como as mutações em genes envolvidos na via apoptótica levam à instabilidade genômica com conseqüente progressão para neoplasia (Malumbres e Barbacid, 2001). Muitas dessas mutações são encontradas em genes que regulam a progressão para a fase G1 do ciclo celular (Foster *et al.*, 2011; Masamha e Benbrook, 2009).

O ciclo celular compreende quatro fases distintas G1, S, G2 e M que culminam com a cópia do material genético celular seguido por posterior divisão de todos os componentes celulares em duas células idênticas (Malumbres e Barbacid, 2001). A transição pelas fases do ciclo se dá pela ativação coordenada das proteínas CDKs e seus ligantes. Complexos ciclinas-CDKs operam em diferentes pontos do ciclo celular (Carnero, 2002). As ciclinas dependentes de quinase (CDKs) são grupos de quinases serina/treonina que formam complexos heterodímeros ao se ligarem às ciclinas. As CDKs, CDK2, CDK4, CDK6 e possivelmente CDK3 são as principais responsáveis pela transição do ciclo da fase G1 para a fase S, para isso elas têm de se ligar às ciclinas D (CDK4, CDK6), E (CDK2) e A (CDK2), mas elas podem ter sua ação inibida por CKIs. Os CKIs (inibidores de ciclina), são divididos em dois grupos: membros da família INK4 (p16, p15, p18 e p19), que exercem sua atividade inibitória ligando-se às proteínas CDK4 e CDK6, o que previne a ligação destes à ciclina D; e os membros da família WAF/KIP (p21, p27, p57), que agem formando complexos heterodímeros com as CDKs da fase de transição G1/S) (Malumbres e Barbacid, 2001). Uma vez que a célula



neurodegenerativas, as autoimunes e o câncer (Park, 2012). Como o câncer é causado pela disfunção do processo apoptótico, o objetivo principal dos agentes antineoplásicos convencionais (quimioterápicos) ou não (extratos, “garrafadas”, chás caseiros) é a indução de morte celular nas células malignas, preferencialmente reativando os mecanismos apoptóticos (Sakagami *et al.*, 2007).

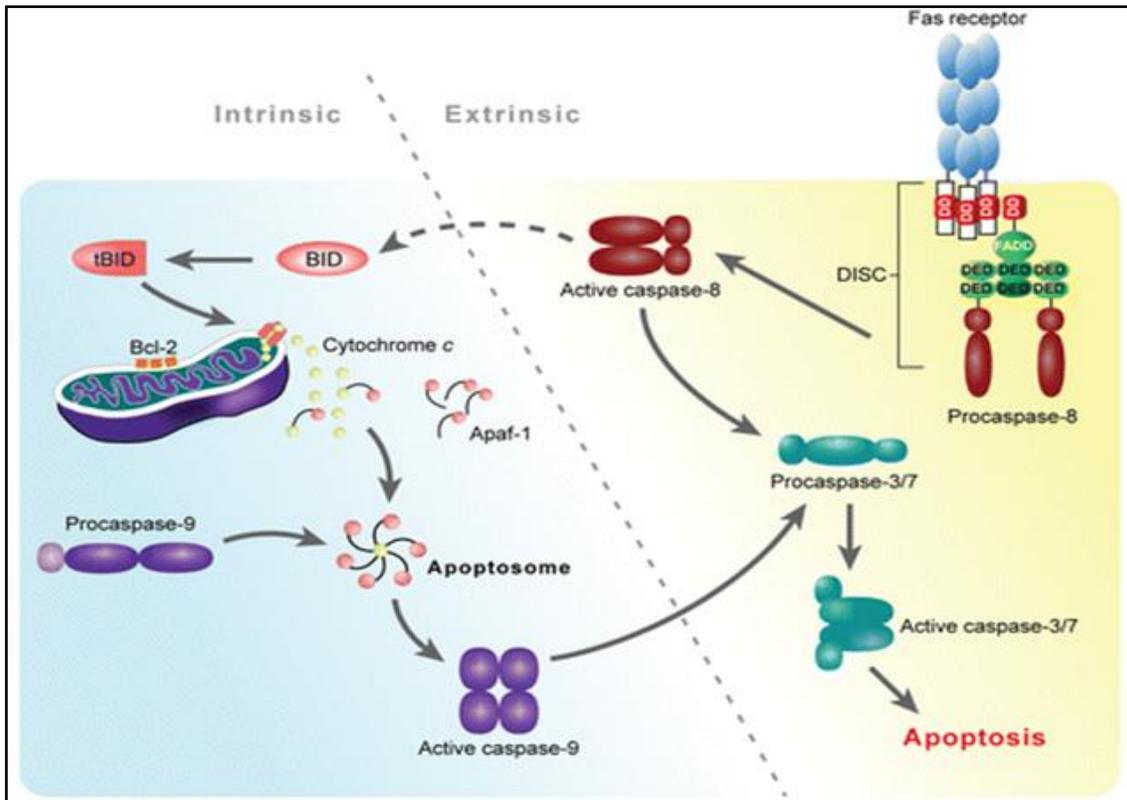


Figura 02: Vias intrínseca e extrínseca da apoptose e sua interconexão (Best SM, 2008).

Os principais genes envolvidos nos processos que desencadeiam a cascata apoptótica são PI3K/AKT, mTOR, ERK, MAPK, STAT, HIF-1 $\alpha$ , HSP90, Bcl2, EGFR e VEGF (Kanwar *et al.*, 2012). A superexpressão de EGFR está relacionada ao desenvolvimento de vários tumores epiteliais. Em relação ao carcinoma de cabeça e pescoço, já está descrito que o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) é superexpresso em 95% dos casos, e geralmente está associado ao pior prognóstico e resistência ao tratamento (Freudlsperger *et al.*, 2011). A cascata de sinalização ativada por EGFR inclui STAT1, fosfatidilinositol-3-quimiase (PI3K), com consequente ativação

de AKT, da cascata Ras/MAPk/ERK e da fosfalipase c-Y (PLC-Y), e contribui significativamente para a sobrevivência, proliferação e tumorigênese de cabeça e pescoço (Williams, 2010; Brand *et al.*, 2011). A via PI3K/AKT/mTOR também tem fundamental importância para o estudo do desenvolvimento desse tipo de carcinoma (Zhou *et al.*, 2010). Essa via desempenha um papel crítico na sobrevivência e crescimento de células neoplásicas (Martelli *et al.*, 2010). Pelo controle da ativação do mTOR quinase e seus efetores, esta rede celular, em última análise, regula a tradução do mRNA de genes que codificam proteínas pró-oncogênicas e, assim, promovem a sobrevivência de células neoplásicas. Assim sendo, inibidores de mTOR como a ranpamicina, tem sido um importante alvo no tratamento do câncer (Zhou *et al.*, 2010).

A angiogênese também desponta como um fator primordial para a manutenção das células neoplásicas. A superexpressão de fator de crescimento vascular (VEGF) e interleucina 8 (IL-8) está associada ao carcinoma espinocelular. A hipóxia atua como fator estimulante de angiogênese e por isso, altos índices de HIF-1 $\alpha$  (fator indutor de hipóxia-1) também estão presentes no carcinoma de cabeça e pescoço (Williams, 2010). A citocina MIF (fator inibitório de migração de macrófago) é conhecida como citocina chave de ligação entre a inflamação e a tumorigênese. Esta citocina atua no estroma tumoral promovendo angiogênese e escape do sistema-imune, principalmente através de sua ligação ao receptor CD74 (Girard *et al.*, 2012). Outro importante mecanismo de estimulação da angiogênese em carcinoma de cabeça e pescoço é mediado por GALR2 (receptor de galanina 2) que através da via p38-MAPK estimula a secreção de citocinas pro angiogênicas, VEGF e IL-6 (Banerjee *et al.*, 2014).

A deficiência funcional de PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*), gene supressor tumoral, também é bastante encontrada nos casos de câncer de cabeça e pescoço (Freudlsperger *et al.*, 2011). Outro gene bastante estudado é o P53, cuja inativação em um dos componentes de sua cascata leva à perda funcional e conseqüentemente ao desenvolvimento e maior agressividade tumoral. Já a deleção de P53 ou a expressão alterada de proteínas (mutação apenas no gene) está relacionada à resistência quimio e/ou radioterápica (Ota *et al.*, 2012). A HSP90 (proteína de choque-térmico 90) também está relacionada à resistência aos tratamentos quimio e radioterápicos. O uso de inibidor de HSP90 em carcinoma de cabeça e pescoço

melhorou significativamente a resposta aos tratamentos propostos (Friedman *et al.*, 2013)

A família Bcl exerce importante papel no controle da apoptose. Essa família possui membros anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-x e Mcl-1), pró-apoptóticos (Bax e Bak) e sensores de lesão (Bim, Bid, Bad). Frente a uma agressão os sensores de lesão reconhecem o estímulo e promovem a liberação de membros pró-apoptóticos da família Bcl, permitindo assim o aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial, com subsequente extravasamento da proteína citocromo c e apoptose. Assim sendo a superexpressão de membros anti-apoptóticos ou a subexpressão dos membros pró-apoptóticos da família Bcl contribuem significativamente para o desenvolvimento do carcinoma (Riedl e Shi, 2004).

Conhecer os genes e as proteínas que participam tanto do processo de divisão celular, como na indução apoptótica é de fundamental importância para entender o processo de carcinogênese. Uma vez que a mutação ou deleção de um ou mais desses genes está diretamente relacionada à instalação e progressão de uma infinidade de tipos tumorais. Esses genes constituem importantes alvos terapêuticos na busca de novas drogas mais eficazes e com menores efeitos colaterais em pacientes portadores de algum tipo de neoplasia (Kanwar *et al.*, 2012).

## 1.2 Tratamento

Apesar da alta incidência do carcinoma de cabeça e pescoço, as terapias não são muito eficazes. Pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço recorrentes ou metastáticos têm prognóstico ruim e opções limitadas para tratamento que dependem, basicamente, da extensão da lesão e das condições sistêmicas do paciente. Dentre as opções terapêuticas destacam-se a cirurgia para ressecção da área tumoral, a radioterapia, a quimioterapia ou a associação de quimioterapia e radioterapia. Para os pacientes em que não é possível fazer nenhum dos tratamentos supracitados a única alternativa é oferecer cuidados paliativos e de suporte para melhorar a qualidade de vida (Massa *et al.*, 2010; Belcher *et al.*, 2014). De qualquer maneira antes de se indicar um tratamento específico para o câncer de cabeça e pescoço deve-se balancear os

efeitos positivos do tratamento e os efeitos adversos causados por estes nos pacientes (Scully e Bagan, 2009).

A cirurgia para ressecção tumoral continua sendo o tratamento mais bem estabelecido, inicial e definitivo para a maioria das pessoas portadoras de câncer de cabeça e pescoço. A escolha pelo tratamento cirúrgico depende muito do tamanho, local, profundidade, infiltração e envolvimento ósseo do tumor (Shah e Gil, 2009). É importante salientar que sempre que o tratamento escolhido for a cirurgia é necessário não só remover o tumor, mas também o tecido marginal adjacente (possíveis “sítios de cancerização”). Além disso, na maioria dos casos também deve ser removida toda a cadeia linfática cervical, visto que essa corresponde a 80% dos casos de via de disseminação metastática associados ao carcinoma de cabeça e pescoço (Pagedar *et al.*, 2009). Por isso o tratamento cirúrgico é considerado bastante agressivo e mutilante para os pacientes submetidos a ele, diminuindo consideravelmente a qualidade de vida dos afetados (Shah e Gil, 2009).

A radioterapia é uma opção terapêutica para os pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço em estágios iniciais, e pode ser associada ou não à cirurgia ou à quimioterapia (Bourhis *et al.*, 2006). É importante lembrar que a radioterapia é a modalidade que pode causar o maior número de efeitos adversos como alterações mucocutâneas, perda do paladar, xerostomia, osteorradionecrose e necrose dos tecidos moles. Cáries dentárias, candidíase e dificuldade de alimentação podem ocorrer principalmente devido à xerostomia induzida pela radiação (Vissink *et al.*, 2003). O fracionamento da radioterapia e a associação à quimioterapia ampliam as taxas de sucesso do tratamento sem aumentar significativamente a toxicidade aos pacientes (Scully e Bagan, 2009). Essa terapia concomitante tem como vantagem a preservação de órgãos e aumenta a taxa de sobrevivência dos pacientes (Klug *et al.*, 2008). Nesse sentido os taxanos e os componentes de base-platino têm se mostrado uma boa opção para a associação quimio/radioterapia. O uso de inibidores de EGFR, como o cetuximab, também tem apresentado bons resultados para o controle loco regional do carcinoma de cabeça e pescoço, principalmente em pacientes com comorbidades médicas (Bourhis *et al.*, 2009). Atualmente a cisplatina é bastante utilizada no tratamento do câncer de cabeça e pescoço, no entanto as células

neoplásicas têm desenvolvido certa resistência a esse quimioterápico (Abuzeid *et al.*, 2011). Como toda droga a cisplatina causa alguns efeitos adversos destacando-se como principais a nefrotoxicidade, neurotoxicidade, ototoxicidade além de náuseas e vômitos (Peres e Cunha, 2013). A quimioterapia configura uma terceira opção terapêutica, podendo ser utilizada de diferentes formas para o tratamento do carcinoma de cabeça e pescoço, principalmente em pacientes com HNSCC loco regional associado à radiação. Pode também ser administrada como tratamento prévio à cirurgia, ou tratamento paliativo para pacientes com câncer recorrente e/ou metastático (Specenier e Vermoken, 2009). O uso concomitante de quimioterapia e radioterapia no pós-operatório de pacientes com tumores avançados de cavidade oral aumenta significativamente a sobrevida desses pacientes, entre 2 e 5 anos em comparação com o uso da radioterapia isolada. Ao optar pelo tratamento quimioterápico, a cisplatina continua sendo a droga padrão a ser utilizada (Belcher *et al.*, 2014).

### **1.3 Plantas no desenvolvimento dos fármacos**

Produtos da biodiversidade correspondem a 31% das exportações brasileiras, mas esse número ainda pode ser ampliado se a biodiversidade for considerada fonte de recurso para a descoberta e comercialização de inúmeras drogas (Ministério do Meio Ambiente). Uma importante fonte de informações pode ser a própria cultura popular, já que grande parte da população brasileira faz uso de plantas medicinais para tratar suas doenças (Ministério do Meio Ambiente). Nas quatro edições vigentes da Farmacopeia Brasileira existem no total 321 diferentes espécies catalogadas como plantas medicinais ou produtos vegetais (Brandão *et al.*, 2006). Esse dado comprova que o estudo das espécies vegetais brasileiras ainda está longe de ser esgotado, representando um grande potencial farmacêutico e econômico para o país.

O uso de plantas para desenvolvimento de fármacos não é novo. Muitos dos fármacos encontrados hoje no mercado são derivados de plantas (com atividade popular medicinal ou não) e aqui pode-se destacar a camptotecina, vincristina, vimblastina, taxol, podofilotoxina, combredastatina entre outros (Srivastava *et al.*, 2005). Apesar do grande número de fármacos hoje existentes, que tiveram suas

substâncias ativas encontradas em plantas, muitas são as espécies que ainda não tiveram seu potencial farmacológico explorado.

Dentre as plantas medicinais utilizadas para o tratamento ou prevenção do câncer foram encontradas um total de 84 espécies. As espécies citadas com maior frequência foram a *Aloe Vera*, a *Euphorbia tirucalli* e a *Tabebuia impertiginosa*. Desse total de plantas, apenas 35,71% tiveram pelo menos um estudo farmacológico para testar sua atividade (Melo *et al.*, 2011). A atividade de extratos metanólicos derivados das folhas de 51 plantas diferentes, colhidas na região de Minas Gerais, em linhagens de leucemia, câncer de mama e colo de útero foi avaliada. Dentre todos os extratos, os pertencentes às espécies *Agrimonia eupatoria*, *Arctium lappa*, *Calendula officinalis*, *Cecropia pachystachya*, *Copaifera langsdorffii*, *Lantana camara*, *L. fucata* e *Momordica charantina* se destacaram como os mais citotóxicos, inibindo aproximadamente 90% do crescimento das células tumorais estudadas em um “screening” inicial. Ao final do trabalho as espécies *L. fucata*, *C. langsdorffii* e *M. Charantia* obtiveram melhor resposta antitumoral, com valores de IC50 menores do que 30 µg/mL em pelo menos uma das linhagens tumorais estudadas (Santos Júnior *et al.*, 2010). As espécies *Toulicia cf pulvinata*, *Ampirrhox SP.*, *Macoubea sprucei*, *Calophyllum brasiliense*, *Vismia guianensis*, *Caryocar microcarpum*, *Xylopia aromática* e *Distctella magnoliifolia* também apresentaram atividade citotóxica nas células de carcinoma de pulmão (Suffredini *et al.*, 2007).

A prevenção do câncer compreende uma estratégia promissora. Assim como existem vários estudos que comprovam a atividade antineoplásica de extratos de plantas medicinais, também existem plantas com atividade quimioprotetora. A *Hancornia speciosa*, a *Mansoa hirsuta* e o *Jacarandá canoa* são três espécies que apresentaram forte atividade quimioprotetora inibindo o NF-KB, a COX-1 e induzindo elementos de resposta antioxidante (Entringer *et al.*, 2010). O chá verde também parece ter atividade quimioprotetora para o câncer de próstata, apresentando atividade antioxidante, diminuindo o estresse oxidativo ao DNA (Henning *et al.*, 2011).

Pacientes em tratamento para o câncer claramente apresentam uma debilidade no sistema imune o que os torna fortes candidatos a infecções secundárias, que diminuem ainda mais a qualidade de vida desses pacientes. As plantas, mais uma vez,

parecem ser um importante recurso no tratamento desses pacientes. Panghal *et al.*, 2011, confirmaram a atividade antimicrobiana, de 8 plantas medicinais, que podem ser usadas para tratamento de patógenos encontrados em sangue e saliva de pacientes em tratamento para câncer de boca, são elas: *A. ternuifolius*, *A. racemosus*, *B. aegyptiaca*, *E. alba*, *M. koenigii*, *P. murex*, *R. comunis* e *T. foenum graecum*.

Dentre os vários biomas existentes no nosso país, o Cerrado abrange cerca de 2 milhões de Km<sup>2</sup>, o que corresponde a aproximadamente 23% do território nacional (Ratter *et al.*, 1997). Assim sendo, o Cerrado constitui uma importante fonte de recursos para o desenvolvimento de drogas, sendo muitas espécies do Cerrado, já utilizadas popularmente para o tratamento de várias doenças, incluindo-se entre elas o câncer. Mesmo tendo poucas pesquisas na área, já existem trabalhos que apontam as plantas do Cerrado com atividade citotóxica em linhagens de carcinoma (Elias *et al.*, 2013; Elias *et al.*, 2014; Toledo *et al.*, 2010; Mesquita *et al.*, 2009).

### 1.3.1 Erythroxylaceae

A família *Erythroxylaceae* é extensa, compreende quatro gêneros aos quais pertencem 240 espécies de distribuição diversa podendo ser encontrada endemicamente em países como Venezuela, Brasil e Madagascar (Daly *et al.*, 2004). O Brasil é o país que abriga a maior diversidade das espécies de *Erythroxylum* (Oliveira *et al.*, 2010). A *Erythroxylum daphnites* é uma das espécies pertencentes a essa família, típica do bioma Cerrado, no Distrito Federal pode ser encontrada nas chamadas matas de galeria não inundáveis. Popularmente é conhecida como fruta-de-pomba, mas esse nome é dado a várias espécies da família *Erythroxylum* (RIAC Assentamento Monjolo, 2009). Ao testar possível atividade biológica dessa espécie, comprovou-se que o extrato hexânico apresenta forte atividade citotóxica e efeito indutor de apoptose para uma linhagem de câncer de boca (Elias *et al.*, 2014). Existem vários tipos de flavonoides encontrados em *E. daphnites* como o kampferol, a quercetina, a ombuina, os monoglicosídeos e os diglicosídeos (Bohm *et al.*, 1988). Dentre as espécies encontradas no país podemos destacar o *Erythroxylum suberosum*,

planta do tipo arbusto, endêmica da região do Cerrado, popularmente conhecida como “cabelo-de-negro” (Nascimento *et al.*, 2012). Os alcaloides se destacam como componentes mais presentes nessa espécie, correspondendo a cerca de 20% do total (Henrique e Simões, 1999). Os alcaloides de tropano têm sido usados como anestésicos, anti-heméticos, anti-hipertensivos e anticolinérgicos (Khattak *et al.*, 2002). O extrato etanólico dos galhos de *E. suberosum* apresentou atividade no bioensaio de toxicidade para *Artemia salina*, o mesmo não foi comprovado no extrato etanólico proveniente das folhas, que parece ser inativo (Nascimento *et al.*, 2012). Este teste é usado como uma importante ferramenta, em estudos químicos biomonitorados, para detectar possível atividade antitumoral de extratos. O extrato hexânico dessa espécie mostrou ser bastante citotóxico para linhagens de HNSCC associado ou não à radioterapia, induzindo necrose em linhagem de carcinoma de orofaringe (Elias *et al.*, 2014).

A planta *Erythroxylum subrotundum* é facilmente reconhecida pelas folhas membranáceas, obovadas a largamente elípticas, às vezes suborbiculares, com ápice arredondado. Essa espécie pode ser encontrada em vários estados brasileiros como Alagoas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Rio de Janeiro (Loiola *et al.*, 2007). Essa espécie apresenta alto potencial antioxidante, sendo os valores mais significativos encontrados na fração hexânica (Araujo *et al.*, 2012).

### 1.3.2 Sapotaceae

O gênero *Pouteria* pertence à família *Sapotaceae*, compreende aproximadamente 430 espécies que podem ser encontradas em diversas regiões do país (Almeida *et al.*, 1998). As plantas pertencentes às espécies *ramiflora* e *gardnerii* são encontradas basicamente na região do Cerrado, mais especificamente no Distrito Federal.

A *Pouteria ramiflora* é uma espécie frutífera do tipo arbustivo-arbóreo, sendo conhecida popularmente como “grão de galo”, “massaranduba” ou “pitomba de leite”. A frutificação ocorre entre os meses de novembro e janeiro, época em que a espécie é

bastante visitada pela fauna devido ao cheiro forte e sabor agradável do fruto (Dalponte e Lima, 1999). A população residente na região endêmica dessa planta tem costume de se alimentar com o fruto dela que tem coloração esverdeada. As raízes e casca dessa planta são utilizadas na medicina popular como remédio para disenteria ou vermífugo (Castro *et al.*, 2001).

Quanto às possíveis atividades biológicas encontradas nos extratos dessa espécie, o que se tem definido atualmente é que o extrato bruto etanólico de *P. ramiflora* apresenta atividade antioxidante, o que pode ser um indicativo de atividade quimioprotetora (Castro *et al.*, 2001). A *Pouteria torta* é uma espécie arbórea, originária da região amazônica, nos limites entre Brasil, Colômbia e Venezuela que apesar de ser pouco explorada comercialmente é bastante conhecida nos trópicos, ao lado de outras sapotáceas (Santana *et al.*, 2008). Popularmente é conhecida como “guapeva”, “curiola”, “aça ferro”, “abiu do cerrado” e “grão de galo”, e sua casca é utilizada como remédio para disenteria. Seu fruto de coloração amarela é bastante apreciado pela população (Castro *et al.*, 2001).

Estudos apontam que os extratos brutos aquoso e etanólico dessa espécie apresentam atividade antioxidante (Castro *et al.*, 2001). Especificamente, acetato de lupeol e  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina têm sido isolados a partir do extrato hexânico da planta (Silva *et al.*, 2009). Os extratos derivados dessa espécie já mostraram citotoxicidade para linhagens de carcinoma de mama (Elias *et al.*, 2013) e também de carcinoma de cabeça e pescoço quando associados à radioterapia (Elias *et al.*, 2014). O extrato hexânico foi capaz de induzir apoptose e o extrato aquoso induziu necrose para linhagem de carcinoma de boca (Elias *et al.*, 2013).

A espécie *Pouteria torta* deu origem a uma proteína purificada, a pouterina, que possui característica de lectina. As substâncias com essas características são associadas à indução de atividade apoptótica, por isso Boleti *et al.*, 2008, avaliaram a atividade dessa proteína em células neoplásicas de mamíferos. A pouterina apresentou atividade citotóxica dose-dependente nas linhagens HeLa (carcinoma de colo de útero), Hep-2 (carcinoma alveolar) e HT-29 (carcinoma de cólon), induzindo essas linhagens a apoptose (Boleti *et al.*, 2008).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar o potencial antineoplásico de plantas do Cerrado em linhagens celulares de carcinoma de cabeça e pescoço.

### **2.2 Objetivos específicos**

1- Avaliar comparativamente a atividade citotóxica de 15 extratos de folhas de plantas nativas do Cerrado em linhagens de células de HNSCC;

2- Comparar a atividade citotóxica induzida por cada um dos extratos de plantas do Cerrado nas linhagens de HNSCC com a citotoxicidade induzida em uma linhagem de queratinócitos humanos;

3- Comparar o efeito citotóxico dos extratos de plantas do Cerrado com a citotoxicidade induzida por quimioterápico convencional;

4- Avaliar a atividade citotóxica de cada um dos extratos de plantas e do quimioterápico associados à radiação ionizante nas linhagens de HNSCC;

5- Definir o índice de seletividade tumoral dos extratos com maior citotoxicidade para as linhagens de carcinoma de cabeça e pescoço;

6- Avaliar a interferência dos extratos mais citotóxicos na proliferação das células de carcinoma de cabeça e pescoço;

7- Caracterizar o perfil de morte celular induzido pelos extratos das espécies nativas do Cerrado nas linhagens de células de HNSCC;

8- Identificar a(s) via(s) de morte celular induzida pelos extratos das espécies nativas do Cerrado com melhor atividade citotóxica;

9- Detectar as alterações provocadas pelos extratos do Cerrado no ciclo celular das linhagens em estudo;

10- Avaliar a interferência dos extratos na migração das células de linhagens de HNSCC;

11- Identificar as classes de substâncias presentes nos extratos com maior atividade citotóxica;

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção dos extratos

Para o estudo foram utilizados extratos provenientes das famílias *Erythroxylaceae* e *Sapotaceae* (tabela 01). Todas as plantas usadas, *Erythroxylum daphnites*, *Erythroxylum suberosum*, *Erythroxylum subrotundum*, *Pouteria ramiflora* e *Pouteria torta* são pertencentes ao bioma Cerrado. Os extratos, provenientes das folhas das plantas, são apresentados em fração aquosa, etanólica e hexânica. As espécies de *Erythroxylum* e *Pouteria* foram obtidas por meio de sucessivas coletas realizadas em áreas de Cerrado do Distrito Federal pelos Botânicos: Christopher W. Fagg (Professor da Universidade de Brasília, Campus Ceilândia - DF) e Suely Maria Gomes (Professora da Universidade de Brasília – Campus Darcy Ribeiro). Exsiccatas foram depositadas no Herbário da Universidade de Brasília e aguardam catalogação. Todos os extratos são oriundos da coleção de extratos do grupo de pesquisa “Desenvolvimento e Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos”, Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, sob a coordenação da Professora Dâmaris Silveira.

A obtenção dos extratos brutos ocorreu após secagem à temperatura ambiente, e pulverização. O material botânico foi submetido à extração por maceração passiva, utilizando hexano seguido de etanol, como solventes, para obtenção dos extratos brutos hexânico e etanólico. As soluções extrativas obtidas foram concentradas à secura a vácuo, a uma temperatura de aproximadamente 40° C em rotaevaporador. O extrato aquoso foi obtido por infusão do material botânico, seco e pulverizado, em água destilada (3,0L) à aproximadamente 70°C. A mistura foi deixada arrefecer até aproximadamente 40°C, sendo então submetida à filtração. A solução extrativa resultante foi mantida à temperatura de -30°C e submetida ao processo de liofilização.

**Tabela 01.** Extratos de plantas testados nas linhagens de carcinoma de cabeça e pescoço.

<b>Espécie da planta</b>	<b>Solvente do extrato</b>	<b>Número do Comprovante</b>
<b>Sapotaceae</b>		
<i>Pouteria ramiflora</i> (PR)	A, E, H	(UB) 3671
<i>Pouteria torta</i> (PT)	A, E, H	(UB) 3674
<b>Erythroxylaceae</b>		
<i>Erythroxylum suberosum</i> (ES)	A, E, H	(UB) 2192
<i>Erythroxylum daphnites</i> (ED)	A, E, H	(UB) 2193
<i>Erythroxylum subrotundum</i> (ESO)	A, E, H	(UB) 2194

Extratos brutos das folhas das plantas: (A) Aquoso; (E) Etanólico; (H) Hexânico.

### 3.2 Cultura de células

Foram utilizadas linhagens de células imortalizadas provenientes de culturas celulares humanas de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço além de uma linhagem de queratinócito humano, usada como controle para os experimentos. Dentre as linhagens de carcinoma selecionamos as linhagens SCC-9 e SCC-25 provenientes de carcinoma espinocelular de língua e a linhagem FaDu derivada de carcinoma espinocelular de hipofaringe. Como controle foi utilizada a linhagem HaCat queratinócito humano. As linhagens utilizadas nesse projeto estão descritas na ATCC, The Global Bioresource Center, e foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Décio do Santos Pinto Júnior da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP).

Para o cultivo das linhagens SCC-9 e SCC-25 utilizou-se o meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) acrescido de meio F12, na proporção 1:1, adicionado soro fetal bovino a 10%, antibióticos penicilina e estreptomicina nas concentrações finais de 100ng/mL e 1µg/mL respectivamente e hidrocortisona 400ng/mL. Para as linhagens FaDu e HaCat o meio de cultura utilizado foi o DMEM também complementado com soro fetal bovino à 10% e penicilina e estreptomicina à

1%. Os meios de cultura foram esterilizados por filtração em membrana de 0,2µm e mantidos a 4°C, sendo aquecidos em banho-maria à temperatura de 37°C por aproximadamente 10 minutos, antes do uso. Todos os reagentes utilizados foram comprados da empresa Sigma Aldrich®. As células foram mantidas em condições ideais, em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> e temperatura de 37°C e em média a cada dois dias era realizado o repique celular.

Para o repique, o meio de cultivo era descartado, e as células lavadas uma vez com PBS pré-aquecido, sendo em seguida tratadas com solução de tripsina 0,25% acrescida de EDTA 5%, por 5 minutos, à temperatura de 37°C. Após o desprendimento das células da placa de cultivo por digestão enzimática, a tripsina era inativada por adição de 5 mL de meio de cultura completo. As células foram coletadas por centrifugação a 2.000 rpm por 5 minutos, sendo o sobrenadante descartado, e o *pellet* de células ressuspenso em meio de cultivo completo. Dessa solução, foram utilizados 10µL para a contagem de células em câmara de Neubauer, sob microscópio óptico invertido. O número total de células era calculado por meio da razão entre o número total das células contadas nos quatro quadrantes x fator de diluição da suspensão de células x 10<sup>4</sup>, dividido por quatro, conforme a fórmula:

$$\frac{(\text{n}^\circ \text{ total células X fator de diluição X } 10^4)}{4}$$

A partir do número obtido por essa fórmula determinamos a quantidade necessária de solução celular a ser plaqueada para obter a densidade desejada em cada experimento.

### **3.3 Teste de citotoxicidade celular (MTT)**

A citotoxicidade ocasionada pelo tratamento com os extratos brutos foi aferida pelo teste de avaliação da atividade mitocondrial das células. Esse teste avalia a capacidade das enzimas mitocondriais, das células tratadas, em reduzir MTT (brometo

de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil) tetrazólio) em formazam. Assim somente as células viáveis têm a capacidade de fazer essa redução e por isso a absorvância medida corresponde às células viáveis, ou às células que não sofreram toxicidade suficiente para reduzir sua atividade mitocondrial. O produto de formazam apresenta uma coloração arroxeadada diferente da cor inicial dos sais de tetrazólio que, após serem diluídos em solvente de veículo alcoólico podem ter sua absorvância aferida em uma leitora de microplaca (Thermo Plate TP reader) a 570 nm e comparada à absorvância dos devidos controles.

Para a realização desse experimento todas as linhagens foram plaqueadas em placas de 96 poços (TPP, Suíça) na densidade de 5.000 células por poço e mantidas em incubadora em condições ideais por 24 horas. Após esse período as células foram tratadas com os extratos brutos das folhas das espécies *Erythroxyllum daphnites*, *Erythroxyllum suberosum*, *Erythroxyllum subrotundum*, *Pouteria torta* e *Pouteria ramiflora*. Os extratos foram diluídos em meio de cultura (respectivo para cada linhagem celular) para obter uma concentração final de 500 µg/mL. Cada espécie apresenta 03 extratos diferenciados de acordo com o solvente em que foram diluídos (aquoso, hexânico e etanólico), totalizando um número final de 15 extratos. As células também foram tratadas com os devidos controles negativos (água milliQ, para o extrato aquoso e DMSO/Etanol na proporção de 2:3 para os extratos hexânico e etanólico). Como controle positivo utilizou-se a cisplatina na concentração de 50 µg/mL.

Após 24 e 48 horas de tratamento as células eram retiradas da incubadora e para cada 100 µL de meio com extrato foram adicionados 10µL de solução MTT (Sigma – Aldrich, EUA). As placas foram recobertas com papel alumínio e retornavam a incubadora. Após 4 horas era aspirado o meio de cultura com a solução de MTT e acrescentado 100 µL de isopropanol acidificado (25 mL de isopropanol + 104 µL de HCl 100%). As placas foram agitadas por 10 minutos à velocidade média. Finalmente a absorvância das células foi verificada em uma leitora de microplaca a 570 nm. Para obter a citotoxicidade induzida pelo tratamento a absorvância das células foi comparada a absorvância de seu devido controle negativo, estabilizado como 100% de células viáveis.

Os extratos com melhor atividade para cada célula de carcinoma (língua e hipofaringe) foram fracionados com diferentes solventes para separação das substâncias presentes por sua polaridade e posteriormente passaram por novo teste de citotoxicidade para definir fração com maior atividade citotóxica.

### **3.4 Teste de citotoxicidade dos extratos associados à radioterapia**

As células das linhagens SCC-9, SCC-25, FaDu e HaCat foram plaqueadas em 02 placas distintas de 96 poços na densidade de 5.000 células por poço. As células foram mantidas nas condições ideais de crescimento em incubadora. Após 24 horas do tempo de plaqueamento, o meio de cultura foi removido e foram acrescentados 100 µL de PBS em cada um dos poços. As placas foram transportadas para o Centro de Alta Complexidade em Oncologia do Hospital Universitário de Brasília (CACON-HUB), sendo, uma das placas irradiada a 2 Gy/min com o equipamento acelerador linear Siemens Primus linear com 6MV photon beams. A outra placa foi armazenada em meio ambiente sem irradiação. Após a radioterapia as placas retornavam ao laboratório, o PBS era aspirado e as células mantidas em 100 µL de meio de cultura em condições ideais por 24 horas. Decorrido esse tempo as células foram submetidas ao teste MTT e a absorvância das células foi aferida e comparada à absorvância das células que não sofreram radiação.

Para averiguar uma possível atividade sinérgica entre os extratos e radioterapia ou cisplatina mais radioterapia o mesmo experimento foi repetido com as células pré-tratadas com os 15 extratos de plantas do Cerrado na concentração de 500 µg/mL seus devidos controles negativos (solventes em que os extratos foram diluídos) ou controle positivo cisplatina a 50 µg/mL. Decorridas 24 horas de tratamento o meio de cultura com o tratamento em que as células estavam foi removido, as células imersas em 100 µL de solução de PBS 1x e irradiadas a 2 Gy. Para finalizar o experimento o PBS foi aspirado e um novo meio de cultura (sem tratamento) adicionado às células que permaneceram na incubadora por mais 24 ou 48 horas, às células foram então submetidas ao teste MTT e a absorvância das células aferida.

### 3.5 Curva dose-resposta

A fim de determinar se a resposta citotóxica é dose-dependente, foram realizadas curvas dose-resposta de citotoxicidade de células tratadas com concentrações decrescentes dos extratos com maior atividade citotóxica para as linhagens FaDu, SCC-9, SCC-25 além da linhagem HaCat. Para isso determinamos 15 pontos de concentrações com intervalos de 75 µg/mL (1.050, 975, 900, 825, 750, 675, 600, 525, 450, 375, 300, 225, 150, 75 e 0 µg/mL), a partir da solução mais concentrada 1.050 µg/mL até o controle negativo em que foi adicionado ao meio de cultura apenas a quantidade máxima de solvente utilizada para a diluição dos extratos. A concentração de “zero” µg/mL (adição de solvente, apenas) do extrato foi considerada 100% de viabilidade. Após 24 horas de tratamento, as células viáveis remanescentes na placa de cultivo foram submetidas ao teste MTT e a absorvância a 570nm aferida em leitora de microplaca.

A concentração necessária de extrato capaz de induzir 50% de citotoxicidade celular (IC50) foi calculada e os dados obtidos permitiram estimar o índice de seletividade tumoral (IST) para o qual foi realizada a razão entre o IC50 obtido para a célula controle (HaCat) e as células neoplásicas, FaDu e SCC-9 conforme publicado anteriormente por Horri, *et al* 2012, segundo a fórmula:

$$\text{IST} = \frac{(\text{IC50 células controle})}{(\text{IC50 células neoplásicas})}$$

### 3.6 Ensaio de Incorporação de BrdU

Com o objetivo de avaliar se os extratos com maior atividade citotóxica também têm ação na proliferação celular, o teste de incorporação de BrdU foi realizado. Para isso as células SCC-9 e FaDu foram plaqueadas na densidade de  $1 \times 10^4$  células por poço em placas de 96 poços e mantidas em condições ideais. Após 24 horas do plaqueamento o meio de cultura com soro fetal bovino foi removido e acrescido novo meio de cultura sem soro para proporcionar o cadenciamento celular. Transcorrido 24

horas do cadenciamento, o meio sem soro foi aspirado e acrescido 100 µL de meio de cultura com soro em cada poço por 12 horas. Após, foi acrescido o devido extrato na concentração referente ao IC50 por mais 12 horas. Finalmente o BrdU foi adicionado na concentração final de 10 µM por poço e as células foram incubadas por 2 horas. Após o período de incubação, o meio contendo o BrdU foi removido e as células foram fixadas por 30 min à temperatura ambiente com etanol 70% gelado. Em seguida, a incorporação de BrdU nas células em proliferação foi quantificada pelo ensaio de ELISA como descrito pelo fabricante (Kit Cell Proliferation ELISA, BrdU colorimetric, Roche, Alemanha). Após terminar a reação acrescentando 25 µL de solução 1 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por poço, a absorvância foi lida em comprimento de onda de 450 nm (referência: 690 nm) em leitor de ELISA (Ultramark™ Microplate Imaging System, Bio-Rad, EUA).

### **3.7 Citometria de fluxo**

A citometria de fluxo é uma técnica que permite examinar e classificar partículas microscópicas suspensas em meio líquido em fluxo através da utilização de um feixe luminoso e por isso é possível utilizá-la para várias finalidades. No presente trabalho utilizamos duas aplicações diferentes da técnica, a primeira com objetivo de identificar a ação dos extratos nas fases do ciclo celular das linhagens de carcinoma de cabeça e pescoço. A segunda aplicação tinha como objetivo identificar o provável perfil de morte celular induzido pelos tratamentos propostos.

Para a avaliação do ciclo celular a linhagem na qual foi identificada interferência na proliferação celular no ensaio de BrdU (SCC-9) foi plaqueada na densidade de  $2 \times 10^5$  células/poço em placa de 6 poços e mantidas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por 24 horas. O processo de cadenciamento e tratamento foi o mesmo proposto para o experimento de incorporação de BrdU. Após 24 horas de tratamento com o extrato e controle negativo as células foram recolhidas, fixadas com etanol 70% e mantidas à temperatura de -20°C por 12 horas. Para a marcação das fases do ciclo celular, as células foram coradas com 50 µg/mL de iodeto de propídeo (Sigma-Aldrich, EUA) e mantidas no escuro à 4°C por pelo menos 1 hora. As amostras devidamente marcadas foram examinadas em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences, EUA). Um mínimo de

10.000 eventos foi analisado para cada amostra. Para a determinação da porcentagem de células em cada fase do ciclo, utilizou-se o programa ModFit LTTM (BD Biosciences, EUA).

Com o objetivo de identificar o perfil de morte celular induzido pela ação dos extratos, as linhagens SCC-9 e FaDu foram plaqueadas na concentração de  $5 \times 10^5$  células por poço em placa de 6 poços e mantidas em condições ideais por 24 horas. Após 2 e 6 horas de exposição das células ao tratamento com os extratos e controle negativo o meio de cultura em que as células estavam foi armazenado em tubos falcon de 15 mL, as células tripsinizadas e armazenadas no mesmo tubo que continha o meio de tratamento e centrifugadas a 2.000 rpm por 5 minutos. Finalmente, o meio de cultura foi aspirado, as células lavadas com 1 mL de PBS 1x gelado, divididas em 03 tubos eppendorf e novamente centrifugadas (2500 rpm, 5 minutos). Por fim o *pellet* foi ressuspenso em 100  $\mu$ L de tampão de ligação 1x. No tubo1 foi realizada leitura em citômetro sem nenhuma marcação a fim de determinar a fluorescência natural das células. No tubo 2 foi acrescido 5  $\mu$ L de solução de anexina e aguardado por 15 minutos para proceder à leitura. Finalmente no tubo 3 foi acrescido a essa solução celular 1  $\mu$ L de solução de iodeto de propídeo (100  $\mu$ g/mL). No tubo 2 que já apresentava anexina também foi acrescentado 1  $\mu$ L de solução de IP, aguardado 5 minutos e posteriormente a morte celular foi aferida no citômetro de fluxo (Cytomax partec). Para a realização do experimento foi utilizado o kit Annexin V-FITC da marca Invitrogen. A marcação das células com anexina permite detectar a presença de apoptose pela dosagem de fosfatidilserina (PS) que predominantemente é observada na superfície interna da bicamada lipídica celular, voltada para o citosol. Nas células em processo inicial de apoptose, quando a membrana celular ainda permanece intacta, mas sofre uma desorganização, a PS é translocada para a superfície exterior da bicamada. A anexina V é uma proteína que se liga aos fosfolipídios e possui alta afinidade pela PS na presença de íons de cálcio. Ao conjugar a Anexina V ao FITC (Isotiocianato de fluoresceína) é possível identificar e quantificar as células apoptóticas em citometria de fluxo. O marcador nuclear fluorescente, Iodeto de Propídeo (IP), é utilizado para distinguir células apoptóticas de células necróticas visto que ele tem capacidade de se intercalar em qualquer DNA, desde que a membrana celular esteja permeável. Desse

modo, corar células simultaneamente com Anexina V-FITC (fluorescência verde) e com o corante IP (fluorescência vermelha) permite a discriminação de células intactas, viáveis (FITC - IP-), no início de apoptose (FITC + IP -), células tardiamente apoptóticas (FITC + IP +) ou necróticas (FITC- IP+) (Hawley e Hawley, 2004).

### 3.8 Western Blot

Para a análise da expressão das proteínas de interesse, placas 100 mm<sup>2</sup> contendo 1x10<sup>6</sup> células/placa foram preparadas seguindo o mesmo padrão utilizado para o teste de incorporação de BrdU. Para proteínas do ciclo celular utilizamos apenas a linhagem SCC-9, por terem apresentado alteração na proliferação celular e estabilização do ciclo. Para a detecção de proteínas relacionadas ao perfil de morte celular foram utilizadas as linhagens SCC-9 e FaDu. Após 12 horas de tratamento o meio em que as células estavam foi descartado e as placas lavadas com 5 mL de PBS gelado. As células foram destacadas por tripsinização, transferidas para tubos de 15 mL e centrifugadas a 2.000 rpm por 5 min. Os precipitados celulares foram incubados com 100 µL de tampão de lise contendo 10% de sacarose, 1% de NP40, 20 mM de Tris (pH 8,0), 137 mM de NaCl, 10% de glicerol, 2 mM de EDTA, 10 mM de NaF e inibidores de proteases (Roche, Alemanha) no gelo por 30 min, sendo homogenizados a cada 10 min. Após este período, o material foi centrifugado a 14.000 rpm por 15 min a 4°C e os sobrenadantes coletados. As concentrações de proteína total foram quantificadas pelo método de Bradford (Sigma-Aldrich, EUA) com comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro Nanodrop 2.000c. Quarenta (40) µg de proteína total para as reações de cada anticorpo foram separadas eletroforéticamente em um gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio a 10% (SDS-PAGE), para as proteínas do ciclo celular e gel 12% para proteínas relacionadas à morte celular com tampão redutor e foram transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas *overnight* com 10% de leite desnatado em TBST 1x e incubadas com um dos anticorpos primários, de acordo com as concentrações descritas na tabela 02, por 2 horas. Após 3 lavagens consecutivas com solução de TBST 1x por 10 minutos, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado à peroxidase por

1 hora. Os anticorpos foram diluídos em solução de 5% de leite desnatado em TBST. Após uma nova série de lavagens, as membranas foram reveladas usando o ECL kit de quimioluminescência para Western blot (GE Healthcare, Áustria) em fotodocumentador Uvitec Cambridge e quantificadas pelo software Uvitec. As membranas incubadas com o anticorpo caspase-3 foram reveladas em filmes radiográficos. A listagem dos anticorpos utilizados no presente trabalho esta descrita na tabela 02.

**Tabela 02** Lista de anticorpos primários utilizados no estudo.

<b>Anticorpo</b>	<b>Clone</b>	<b>Fornecedor</b>	<b>Diluição</b>
p21 <sup>WAF1/Cip1</sup>	C-19	Santa Cruz	1:200
p27 <sup>Kip 1</sup>	57	BD Biosciences	1:500
p16 <sup>Ink4a</sup>	G-6	Santa Cruz	1:100
Ciclina E	M-20	Santa Cruz	1:1000
Ciclina D1	DSC-6	Calbiochem	1:200
Caspase-3	Sc-7148	Santa Cruz	1:500
$\beta$ – actina	AC-15	Sigma-Aldrich	1:30000
GADPH	Ab9843-200	Abcam	1:6000

### **3.9 Teste de lesão em monocamada – *Scratch assay***

Para realizar o ensaio de fechamento da ferida,  $1 \times 10^6$  células/poço foram plaqueadas em placas de 6 poços revestidas com 10  $\mu\text{g/mL}$  de fibronectina e mantidas *overnight*. A monocamada de células foi riscada manualmente com uma ponta de pipeta de plástico amarelo (200 $\mu\text{L}$ ), lavada com PBS e tratadas com uma solução de extrato na concentração referente ao IC50 e controle negativo. Os poços foram fotografados nos tempos de 0, 12, 24 e 36 horas em um microscópio invertido (Zeiss

Primo Vert, Göttingen, Alemanha), equipado com câmera digital (Zeiss ERC 5s, Göttingen, Alemanha) em objetiva de 4x. As taxas relativas de fechamento das feridas foram medidas e expressas como porcentagem do comprimento inicial no momento zero do extrato em comparação com o controle. Para essa medida foram utilizadas áreas de 3 poços independentes para cada tratamento.

### **3.10 Avaliação da migração celular – *Transwell assay***

A capacidade dos extratos para alterar a migração celular foi avaliada pelo ensaio de migração (Transwell). As câmaras Transwell 6,5 milímetros (Corning Costar, Cambridge, MA, EUA), com inserções de membrana de policarbonato (tamanho de poro de 8  $\mu\text{m}$ ), foram depositadas em placas de 24 poços contendo 600 $\mu\text{L}$  de DMEM/F12 por poço. As células ( $2 \times 10^4$ ) foram semeadas no compartimento superior de cada câmara e incubadas a 37 °C durante 24 h. Após este período, as células foram tratadas com extrato na concentração referente ao IC50 e controle negativo. Setenta e duas horas após o tratamento, as células que migraram através da membrana para o compartimento inferior foram fixadas em metanol durante 20 minutos, coradas com cristal violeta 0,2% durante 5 min, e posteriormente lavadas com PBS 1x por 10 vezes. Após a última lavagem, as células marcadas foram vistas sob microscópio de luz (Zeiss Primo Vert, Göttingen, Alemanha), equipado com câmera digital (Zeiss ERC 5s, Göttingen, Alemanha). As fotomicrografias foram tomadas com ampliação de 4x para a contagem do número de células que migraram, utilizando o software de análise de imagem ZEN (Carl Zeiss Microscopia GmbH, Göttingen, Alemanha).

### **3.11 Cromatografia de camada delgada (CCD)**

Com o objetivo de separar os possíveis componentes integrantes dos extratos de plantas do Cerrado com boa atividade citotóxica nas linhagens de carcinoma, optamos por fazer a cromatografia de camada delgada. A técnica consiste na separação de componentes de uma mistura sólido-líquido em que a fase móvel líquida migra sobre uma camada delgada de adsorvente retido em uma superfície plana (fase

estacionária sólida). Para estes experimentos foram selecionados as frações com maior atividade citotóxica nas linhagens estudadas (acetato de etila derivada dos extratos hexânicos de *E. suberosum* e *E. subrotundum* e hexano (1): acetato de etila(1) e acetato de etila derivada do extrato de *E. daphnites*). As frações foram diluídas em diclorometano e aplicadas através de um capilar em sílica 4x e mantidas em becker com os seguintes diluentes hexano(9):acetato de etila(1); hexano(7):acetato de etila(3). A revelação foi realizada com solução de anisaldeído.

### 3.12 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com pelo menos três triplicadas independentes para os testes de citotoxicidade e em triplicatas independentes para os demais experimentos, Os testes de citotoxicidade seguiram análise One-way ANOVA, teste de comparação múltipla de Tukey's. Para a análise da proliferação celular (BrdU) e análise de tipo de morte celular (citometria de fluxo com anexina V-FITC) optou-se por aplicar o teste T de Student. As curvas dose-resposta foram feitas por regressão não linear, com variável slope da dose de inibição versus resposta e cálculo do IC50. Na análise de comparação entre as fases do ciclo celular foi utilizado o teste de comparação para grupos Two-way ANOVA, seguida pela análise de Bonferroni. Para todas as análises usamos o programa GraphPadPrism versão 5.0. Os valores com  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Avaliação do efeito citotóxico da irradiação

Após 24 e 48 horas da irradiação com 2 Grays por minuto (Gy/min) em dose única, realizou-se o teste de citotoxicidade celular. O teste deixa evidente que uma dose única de irradiação não foi suficiente para induzir morte celular nas linhagens irradiadas. Observa-se que os queratinócitos apresentaram um aumento do número de células viáveis (Figura 03).

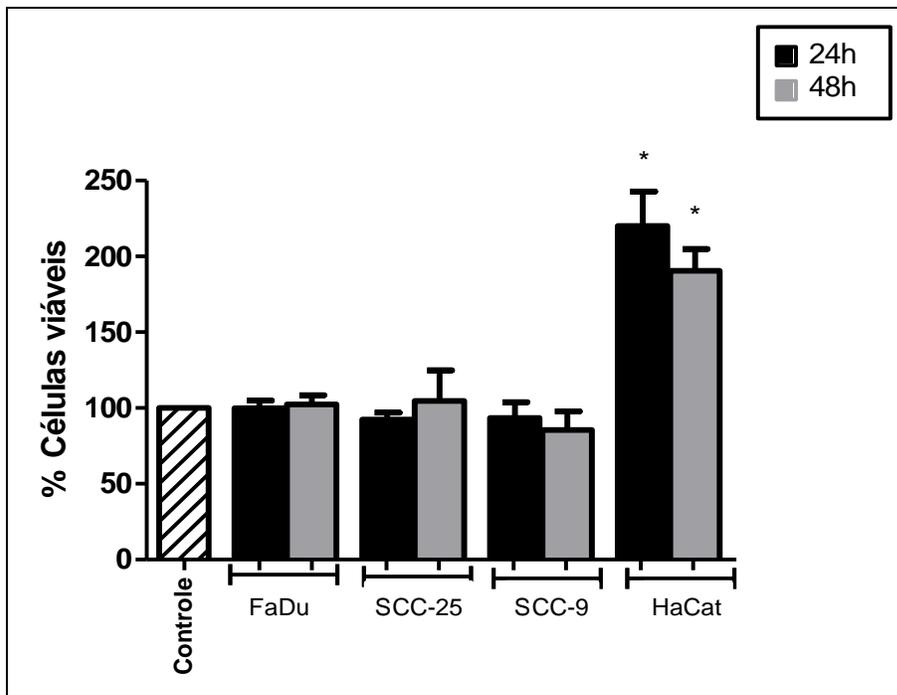


Figura 03: Avaliação da toxicidade de dose única de irradiação (2Gy/min) nas linhagens de carcinoma de cabeça e pescoço e queratinócitos. FaDu = carcinoma de hipofaringe; SCC-25 = carcinoma de língua; SCC-9 = Carcinoma de língua e HaCat = Queratinócitos imortalizados (\*  $p < 0,05$  versus grupo controle).

## 4.2 Avaliação da citotoxicidade induzida pelo tratamento com extratos do Cerrado nas linhagens de carcinoma de cabeça e pescoço

A ação citotóxica foi obtida comparando-se a toxicidade do extrato em relação às células tratadas apenas com os solventes (controle) após 24 e 48 horas de tratamento. Para efeito comparativo estabelecemos que os extratos que induziram viabilidade celular de 50 a 21 % foram considerados de toxicidade moderada, já os que provocaram viabilidade de 20% ou menos foram considerados extratos de toxicidade severa. Dentre os 15 extratos testados, 10 foram capazes de induzir toxicidade igual ou maior do que 50% na linhagem de carcinoma de hipofaringe (FaDu), 3 desses apresentaram toxicidade intensa, ESA, ESE e ESH. Após 24 horas de tratamento com o extrato ESH restaram apenas 13,2% de células FaDu viáveis. A linhagem de hipofaringe foi a mais sensível ao tratamento com as plantas do Cerrado, sendo que oito extratos testados PRA, PRE, PTE, ESA, ESE, ESH, EDE e EDH foram mais citotóxicos à linhagem do que o quimioterápico cisplatina, utilizado como controle positivo. Apesar de muitos dos extratos testados serem mais citotóxicos após 48 horas de tratamento para a linhagem FaDu, esses resultados não foram estatisticamente significantes e por isso não podemos dizer que a ação citotóxica é tempo-dependente.

As linhagens correspondentes ao carcinoma de língua não responderam de maneira tão positiva, apenas os extratos aquoso de *Erythroxylum suberosum* (ESA) e hexânico de *Erythroxylum subrotundum* (ESOH) foram capazes de induzir aproximadamente 50% de morte celular na linhagem SCC-25, resultado bastante semelhante ao observado no tratamento com cisplatina que apresentou 54,8% de células viáveis após 24 horas. Para a linhagem SCC-9, apenas os extratos hexânicos conseguiram induzir toxicidade moderada. O tratamento com ESH (extrato de *Erythroxylum suberosum* hexânico) resultou em 33% de células viáveis após 48 horas e o ESOH (*Erythroxylum subrotundum* hexânico) 49%. Com 24 horas de tratamento, o extrato EDH foi o que apresentou maior toxicidade, reduzindo a viabilidade da linhagem SCC-9 para 47,6%. Esse resultado é bastante expressivo ao compararmos com a cisplatina, que após 24 horas de tratamento apresentou 70% de células viáveis. Os

queratinócitos foram mais afetados que as células de carcinoma de língua, porém apenas quatro extratos induziram toxicidade moderada nos queratinócitos, demonstrando que alguns extratos como os PTE, PTH, ESE, EDE, EDH apresentam seletividade para o carcinoma de hipofaringe. Já o extrato EDH mostrou ser mais seletivo para uma das linhagens de carcinoma de língua, a SCC-9. Quando comparada ao tratamento com cisplatina, os extratos com atividade foram, em sua maioria, mais citotóxicos do que o tratamento quimioterápico convencional. Esses dados já foram publicados no artigo de Elias *et al.*, 2014 e podem ser observados na tabela 03.

Tabela 03: Avaliação da atividade citotóxica de 15 extratos de plantas do Cerrado em células de carcinoma de cabeça e pescoço

Plantas	Extrato Solvente	Células Viáveis (%)							
		FaDu		SCC-25		SCC-9		HaCat	
		24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
<i>Pouteria ramiflora</i> (PR)	A	42,3	33,3	107,3	84,3	113,9	65,6	41,9	36,1
	E	38,3*	40,5*	123,9	131,1	102,4	99,7	46,0*	33,6*
	H	108,5	139,3	106,4	86,1	70,8	71,0	107,7	103,3
<i>Pouteria torta</i> (PT)	A	75,5	54,7	74,9	62,0	124,2	73,0	101,6	68,3
	E	38,7*	66,9	75,2	69,9	90,4	73,0	74,1	73,0
	H	79,9	47,3	68,0	72,8	83,4	61,5	87,6	68,0
<i>Erythroxylum suberosum</i> (ES)	A	45,1*	17,7*	78,3	50,0*	75,0	66,7*	61,1*	35,4*
	E	46,4*	16,4*	99,9	100,8	170,1*	71,0	70,7	58,1*
	H	13,2*	27,4*	78,9	64,1	49,3*	33,3*	53,6*	44,4*
<i>Erythroxylum daphnites</i> (ED)	A	61,1	52,5	90,3	80,2	112,7	100,5	114,0	80,2
	E	30,7*	33,2	97,2	97,4	120,2	131,4	91,9	76,0
	H	36,8	29,7	61,8	52,9	47,6	75,1	94,4	69,5
<i>Erythroxylum subrotundum</i> (ESO)	A	103,4	101,9	127,5	109,0	133,8	116,8	114,7	97,1
	E	56,0	50,3	89,5	71,4	66,8	66,5	77,9	58,1
	H	76,0	80,2	59,0	47,9*	52,5*	49,6*	78,9	69,3
Cisplatina		41,6		54,8		70,0		56,0	

Extratos: (E) etanol; (H) hexânico; (A) aquoso. Os resultados representam a média de células viáveis tratadas com extratos à concentração de 500 µg/mL (\* p < 0,05 versus controle negativo; teste One-way ANOVA, Postest Tukey's).

### **4.3 Avaliação da citotoxicidade induzida pela associação de extratos do Cerrado e irradiação e cisplatina e irradiação nas linhagens de HNSCC**

A associação de irradiação à cisplatina na concentração de 50 µg/mL provocou efeito citotóxico supra-aditivo nas linhagens de HNSCC, reduzindo intensamente a viabilidade celular (Tabela 04). Todos os extratos, com exceção de PTH foram capazes de induzir 50% ou mais de citotoxicidade na linhagem FaDu, sendo que apenas os extratos PTH e ESH apresentaram melhores resultados quando tratados exclusivamente com os extratos. O mesmo aconteceu para a linhagem de queratinócitos, HaCat. Esse dado mostra que a associação extratos e radioterapia é bastante eficaz, porém não é seletiva, atingindo tanto as células neoplásicas quanto os queratinócitos. Surpreendentemente, a associação extrato e radioterapia apresentou intenso efeito citotóxico para as linhagens de carcinoma de língua. Dentre os 15 extratos, apenas dois extratos, o EDA e o ESOA, não apresentaram atividade citotóxica intensa ou moderada para a linhagem SCC-9 e três extratos PTA, EDA e ESOA para a linhagem SCC-25. Sete dos extratos (PRA, PRE, ESA, ESE, EDA, EDE, ESOE) quando associados à irradiação tiveram citotoxicidade similar ou melhor do que a apresentada pela associação cisplatina e radioterapia para a linhagem FaDu. Para a linhagem SCC-25 apenas três extratos, o ESA, o ESOE e o ESOH, apresentaram citotoxicidade semelhante à encontrada pela associação cisplatina e radioterapia. Quatro extratos (ESA, ESE, EDE, ESOE) tiveram citotoxicidade similar à associação quimio e radioterapia na linhagem SCC-9. Novamente, a resposta citotóxica não parece ser tempo-dependente já que não houve diferença significativa da redução da viabilidade celular para os tratamentos de 24 e 48 horas (Tabela 04). Resultados já publicados em Elias *et al.*, 2014.

Tabela 04: Avaliação da atividade citotóxica de 15 extratos de plantas do Cerrado associados à radioterapia em células de carcinoma de cabeça e pescoço.

Plantas	Extrato Solvente	Células Viáveis (%)							
		FaDu		SCC-25		SCC-9		HaCat	
		24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
<i>Pouteria ramiflora</i> (PR)	A	13,4*	14,6*	28,9*	27,1*	29,1*	28,1*	17,3*	14,5*
	E	12,6*	10,1*	39,2*	70,4*	47,4*	75,9	14,1*	16,4*
	H	40,9*	74,9	46,5	58,1	48,6	42,5*	43,2*	46,7
<i>Pouteria torta</i> (PT)	A	25,8*	22,1*	79,3	62,1	93,1	43,9*	40,5*	42,6*
	E	27,1*	20,3*	42,7*	58,6*	45,7*	46,7*	37,3*	38,2*
	H	68,1*	76,2	42,5*	53,7	36,5*	35,5*	30,6*	36,3*
<i>Erythroxylum suberosum</i> (ES)	A	11,0*	12,0*	52,5*	19,3*	18,2*	26,5*	22,8*	35,8*
	E	12,3*	12,2*	27,6*	44,8*	32,9*	11,3*	21,0*	30,9*
	H	32,4*	30,3*	47,5*	38,3*	31,5*	26,3*	39,0*	49,4*
<i>Erythroxylum daphnites</i> (ED)	A	28,5*	15,5*	94,3	99,1	70,1	62,9	32,0*	35,8*
	E	21,9*	9,6*	59,7	38,7	78,6	12,7*	29,8*	27,3*
	H	34,5*	24,6*	74,7	42,1	56,9	27,1*	30,2*	32,1*
<i>Erythroxylum subrotundum</i> (ESO)	A	32,4*	42,4*	73,6	80,2	68,1	70,7	26,8*	21,7*
	E	16,9*	19,5*	17,1*	17,4*	27,1*	15,5*	21,0*	18,0*
	H	47,6*	54,1*	18,3*	20,6*	27,4*	24,5*	31,6*	44,9*
Cisplatina		19,1*	13,0*	5,4*	15,3*	7,3*	17,6*	16,5*	8,4*

Extratos: (E) etanólico; (H) hexânico; (A) aquoso. Os resultados representam a média de células viáveis tratadas com extratos à concentração de 500 µg/mL (\*p<0,05 versus controle negativo; teste One-way ANOVA, Postest Tukey's).

#### **4.4 Comparação da atividade citotóxica entre tratamento somente com extratos e extrato associado à radioterapia nas linhagens celulares**

A fim de verificar qual a melhor opção terapêutica em relação aos tratamentos testados foram feitos gráficos comparando a atividade citotóxica induzida pelo tratamento unicamente com os extratos e a citotoxicidade induzida pelos extratos associados à radioterapia.

De maneira geral os extratos foram mais citotóxicos a todas as linhagens (FaDu, SCC-25, SCC-9 e HaCat) quando associados à radioterapia, mesmo os extratos que não apresentavam atividade citotóxica no tratamento isolado para as linhagens estudadas.

Quatorze extratos associados à radioterapia induziram toxicidade igual ou maior a 50% na linhagem de carcinoma de hipofaringe. A única exceção foi o extrato PTH. Na linhagem SCC-25, os únicos extratos que não apresentaram citotoxicidade quando associados à radioterapia após 24 horas de tratamento foram os extratos PTA, EDA, EDE, EDH e ESOA, os demais apresentaram no mínimo toxicidade moderada. O mesmo ocorreu para a linhagem SCC-9. Todos os quinze extratos quando associados à radioterapia foram citotóxicos em relação aos queratinócitos, perdendo assim a ação “seletiva” apresenta por alguns extratos quando usados como tratamento único (Figura 04).

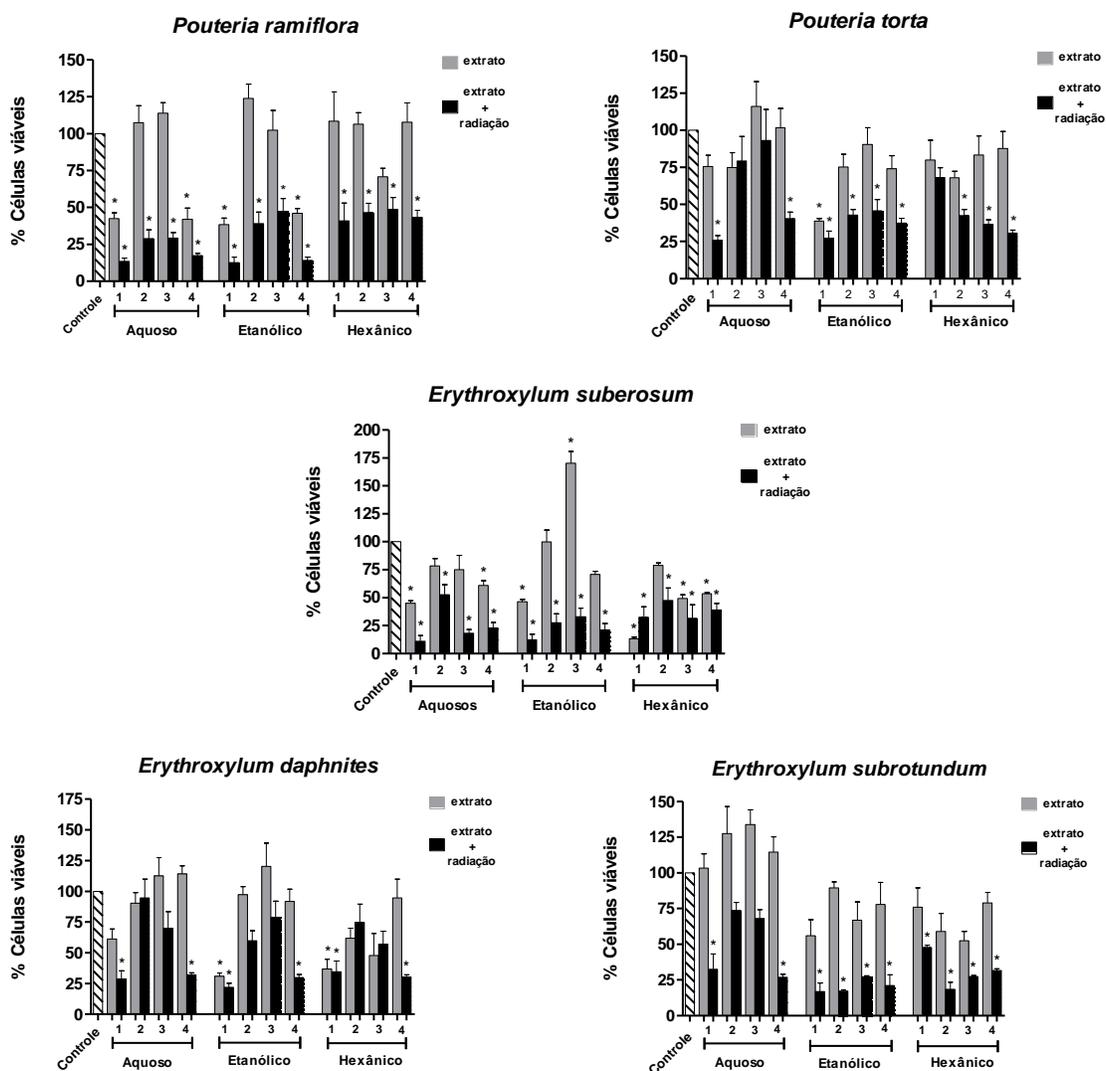


Figura 04: Comparação da porcentagem de células viáveis após tratamento com extratos ou extratos + radioterapia, após 24 horas de tratamento. 1 corresponde à linhagem FaDu, 2 - SCC-25, 3 - SCC-9 e 4 - HaCat, \*  $p < 0,05$  versus controle segundo teste One-way ANOVA, postest Tukey's.

#### 4.5 Curva dose-resposta dos extratos com maior ação citotóxica nas linhagens de HNSCC

Com o objetivo de averiguar qual a concentração ideal de extrato necessária para induzir toxicidade considerável, o IC<sub>50</sub> foi calculado nas linhagens estudadas. Para isso as células foram tratadas com 15 concentrações decrescentes com intervalo de 75 µg/mL entre elas. Após 24 horas de tratamento, a absorvância das células foi aferida. Para cada linhagem testada foi selecionado apenas o extrato que apresentou maior toxicidade após 24 horas de tratamento para as linhagens FaDu e SCC-9 e 48 horas de tratamento para a linhagem SCC-25. Coincidentemente, todos os extratos eram derivados do solvente hexânico e pertenciam a um dos componentes da espécie *Erythroxylaceae*. A linhagem FaDu foi tratada com o extrato ESH, a SCC-9 com EDH e a SCC-25 com ESOH. A linhagem de queratinócito (HaCat) foi utilizada como controle e por isso foi tratada com todos os extratos supracitados.

A partir desses resultados foi possível calcular a dose necessária para induzir 50% de morte celular (IC<sub>50</sub>) nas linhagens. O extrato ESH apresentou curva de toxicidade crescente sem formação de platô aparente nas maiores concentrações, reforçando a hipótese de que sua ação é dose-dependente. O ESH também foi o extrato que induziu maior toxicidade, com IC<sub>50</sub> de 288,3 µg/mL para a linhagem de carcinoma de hipofaringe e 269 µg/mL em queratinócitos (Figura 05 A). Já o extrato EDH apresentou toxicidade moderada para a linhagem de carcinoma de língua (SCC-9) com IC<sub>50</sub> de 448,9 µg/mL (Figura 05 B)

Dentre os extratos estudados, o ESOH foi o que apresentou comportamento anormal para a linhagem SCC-25 com curva de toxicidade decrescente a partir do sétimo ponto. A triplicata da curva não apresentou reprodutibilidade o que justifica os grandes erros encontrados. Para a linhagem HaCat o extrato ESOH apresentou IC<sub>50</sub> de 567,7 µg/mL. Esses resultados estão apresentados na Figura 05 C.

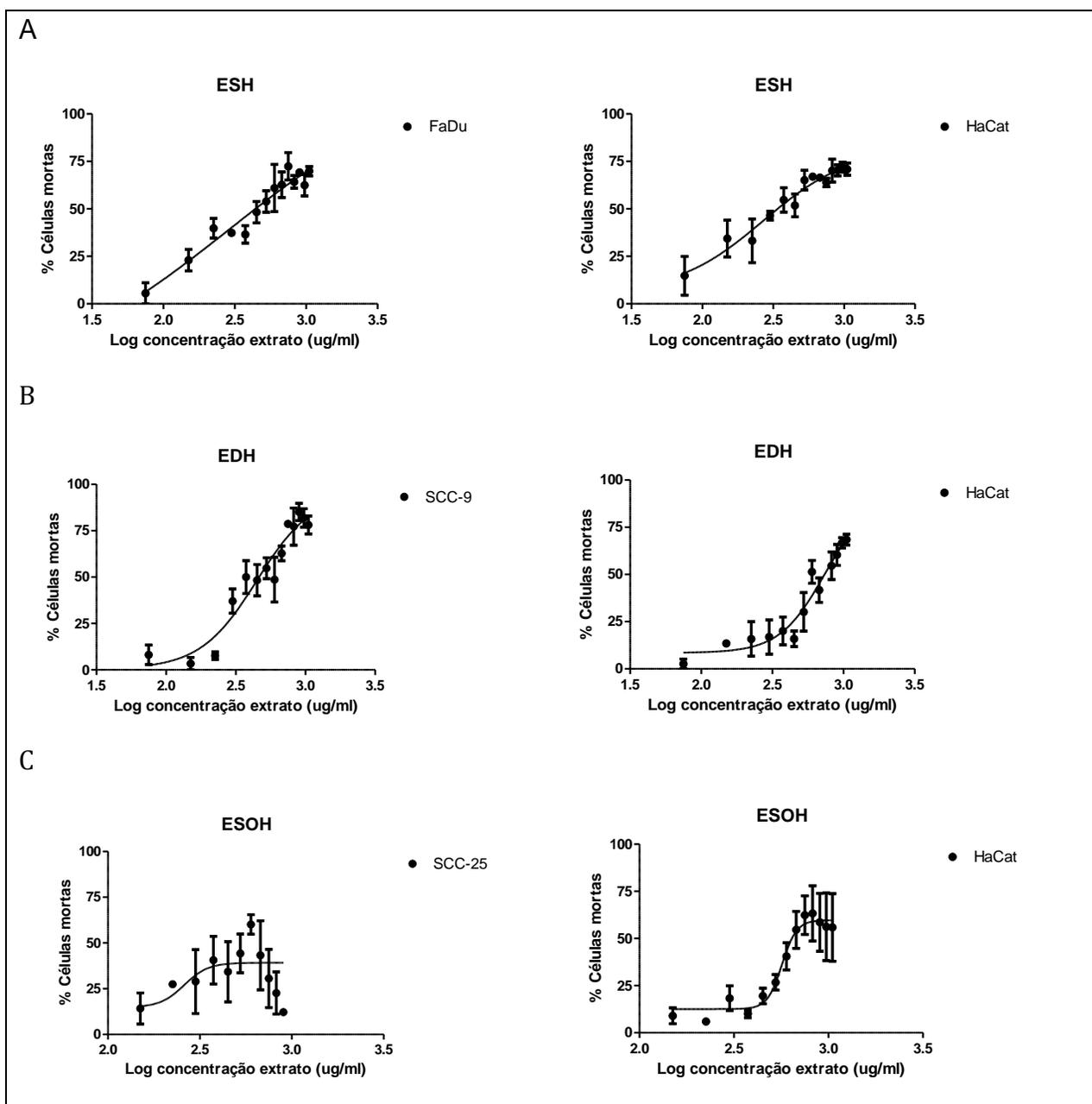


Figura 05: Curva dose-resposta dos extratos com melhor atividade citotóxica após 24 horas de tratamento. A: Curva dose-resposta do extrato ESH para FaDu e Hacat; B: Curva dose-resposta do extrato EDH para SCC-9 e HaCat e C: Curva dose-resposta do extrato ESOH para SCC-25 e HaCat.

#### 4.6 Índice de seletividade tumoral (IST)

Os valores de IC50 permitiram calcular o índice de seletividade tumoral (IST) para o qual foi feita a razão entre o IC50 da célula controle (HaCat) e as células neoplásicas, FaDu e SCC-9 conforme proposto por Horri, *et al.* 2012. Os valores obtidos estão descritos na Tabela 05.

**Tabela 05.** IC50 dos extratos testados e seus respectivos IST para as linhagens de carcinoma de cabeça e pescoço.

Linagem celular	Tratamento	IC50	IST
FaDu	ESH	288,3 µg/mL	HaCat/FaDu = 0,93
HaCat	ESH	269,0 µg/mL	
SCC-9	EDH	448,9 µg/mL	HaCat/SCC-9 = 1,64
HaCat	EDH	737,1 µg/mL	

O índice de seletividade igual a 1 significa que não há seletividade entre as linhagens estudadas, menor que 1, significa que o tratamento é mais seletivo para a linhagem de queratinócitos do que para a linhagem neoplásica e maior que 1, significa que há seletividade para a linhagem tumoral estudada. Assim podemos concluir que apesar de tóxico para a linhagem FaDu, o extrato ESH não mostrou ser um tratamento seletivo, sendo ainda mais agressivo para a linhagem de queratinócitos que para o carcinoma. O tratamento com o extrato EDH mostrou ser seletivo para a linhagem de carcinoma de língua (SCC-9) apresentando IST de 1,64 (Tabela 05) Esse resultado é bastante expressivo já que a cisplatina (quimioterápico utilizado como controle) na dosagem de 50 µg/mL induziu maior taxa de toxicidade celular, com 56% de células viáveis em HaCat do que em SCC-9, 70 % de viabilidade celular (Tabela 03).

Por não apresentar reprodutibilidade nos resultados, o IST do extrato ESOH não foi calculado e ele foi excluído dos demais experimentos.

#### **4.7 Ensaio de interferência do extrato na proliferação celular (BrdU)**

Com o objetivo de identificar possível interferência dos extratos estudados na proliferação das linhagens de carcinoma de cabeça e pescoço, realizou-se o ensaio de incorporação de BrdU. Para isso as linhagens FaDu e SCC-9 foram plaqueadas em placas de 96 poços, cadenciadas por 24 horas de tratamento com meio de cultura sem soro fetal bovino e tratadas com seus respectivos extratos por 12 horas. Os resultados estão expressos na Figura 06. O extrato de *E. daphnites* reduziu significativamente a proliferação celular, em aproximadamente 31%, o que sugere que além de apresentar ação citotóxica o extrato interfere no crescimento das células de carcinoma de língua com provável ação no ciclo celular. O extrato ESH não foi capaz de inibir a proliferação celular da linhagem FaDu.

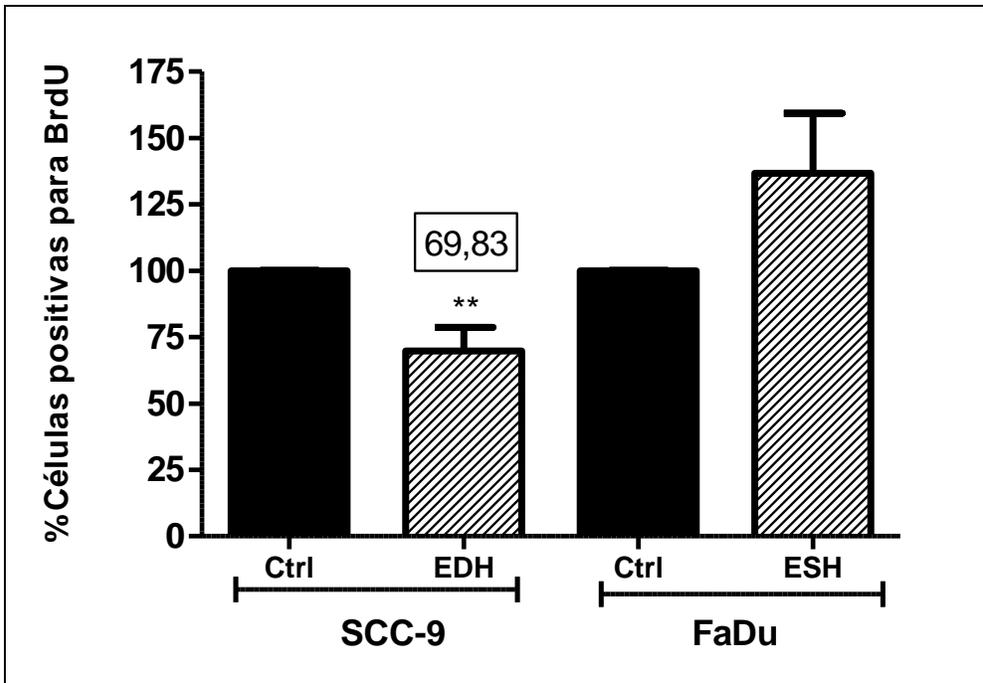


Figura 06: Gráfico de inibição de proliferação celular aferida por incorporação de BrdU nas linhagens de carcinoma de língua (SCC-9) e carcinoma de hipofaringe (FaDu) tratadas com os extratos hexânicos de *E. daphnites* (EDH) e *E. suberosum* (ESH) respectivamente. \*\*  $p < 0,01$  versus controle segundo teste T de Student.

#### 4.8 Avaliação do perfil de morte celular induzido pelo tratamento com os extratos de plantas do Cerrado

O perfil de morte celular induzido pelo tratamento com os extratos hexânico de *E. suberosum* e *E. daphnites* foi identificado pelo ensaio de citometria de fluxo com marcação por anexina V-FITC e iodeto de propídeo. Sabe-se que a apoptose pode ser identificada em fase inicial, com apenas 2 horas de tratamento, porém um tempo de tratamento mais prolongado seria capaz de identificar um maior número de células apoptóticas. Por não conhecer o comportamento celular diante dos extratos selecionados, optamos por fazer a aferição da marcação em dois tempos distintos de tratamento, 2 e 6 horas.

Após 2 horas de tratamento a linhagem de carcinoma de boca (SCC-9) tratada com o extrato EDH apresentou aumento expressivo (2,1 vezes) de eventos positivos

apenas para anexina (A+ I-) que corresponde a apoptose quando comparada às células controle. Também houve aumento de 1,5 vezes dos eventos com marcação dupla A+ I+, também chamada de apoptose tardia e de 5 vezes na marcação apenas para iodeto A- I+, significando necrose celular (Figura 07). Esses dados mostram que mesmo em um tempo de tratamento curto o extrato foi capaz de induzir morte celular com perfis variados, tanto apoptose quanto necrose. Com o tempo de tratamento mais longo, 6 horas, o extrato EDH não foi capaz de aumentar a marcação exclusiva para anexina, havendo até diminuição da marcação exclusiva para 1,2 vezes. Conseqüentemente a marcação dupla para anexina e iodeto, caracterizada como apoptose tardia e a marcação exclusiva com iodeto, aumentaram aproximadamente 80% em relação ao controle. Esses resultados comprovam que o extrato EDH apresenta forte toxicidade para a linhagem SCC-9 com perfil de morte inicial de apoptose e tendência à evolução para necrose após exposição prolongada ao tratamento.

O tratamento com ESH, mesmo em curto período de tempo, não foi capaz de induzir morte por apoptose na linhagem de carcinoma de hipofaringe. Após 2 horas de tratamento houve aumento considerável apenas nos eventos com dupla marcação (A+ I+). O aumento do tempo de tratamento (6 horas) permitiu observar que houve uma migração de eventos com dupla marcação A+I+ para 3,4 vezes em relação ao grupo controle e de 6,4 vezes para os marcados exclusivamente com iodeto A- I+, comprovando claramente que o perfil de morte celular induzido pelo extrato ESH foi de necrose celular (Figura 07).

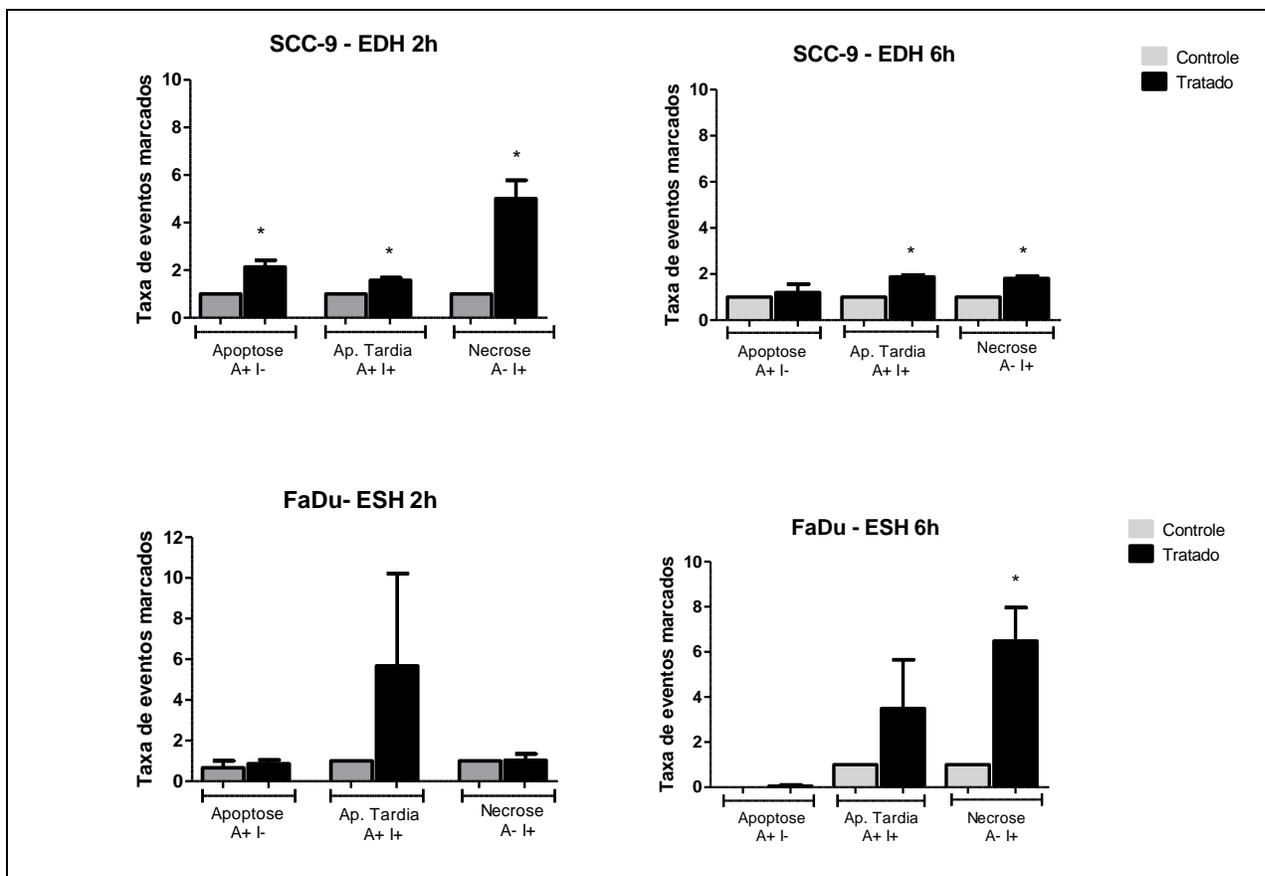


Figura 07: Avaliação do perfil de morte celular induzido pelos extratos de plantas do Cerrado. Marcação de eventos com anexina e/ou iodeto após 2 e 6 horas de tratamento com os extratos.\*  $p < 0,05$  versus controle segundo teste T de Student (Ap = apoptose; A+ = positivo para anexina, A - = negativo para anexina; I+ = positivo para iodeto, I- = negativo para iodeto).

Para confirmar o perfil de morte celular induzido pelo tratamento com os extratos do Cerrado nas linhagens SCC-9 e FaDu, foi realizado também o ensaio de Western-blot para avaliação da clivagem de procaspase 3. Assim, a marcação de banda de caspase-3 confirma que ocorreu processo apoptótico. Na parte superior da Figura 08 é possível encontrar a banda de caspase íntegra (procaspase) em todas as amostras, porém a banda de caspase clivada (17 Kda) só é vista após tratamento da linhagem SCC-9 com extrato EDH. Na linhagem FaDu é possível identificar as bandas de caspase (íntegra e clivada) tanto para as células controle quanto para as células tratadas, sendo que o controle apresenta maior intensidade (Figura 08). Com isso

conclui-se que o tratamento de SCC-9 com EDH induz morte por apoptose, já o tratamento de FaDu por ESH não foi capaz de induzir aumento da apoptose, corroborando assim com os resultados observados na citometria de fluxo.

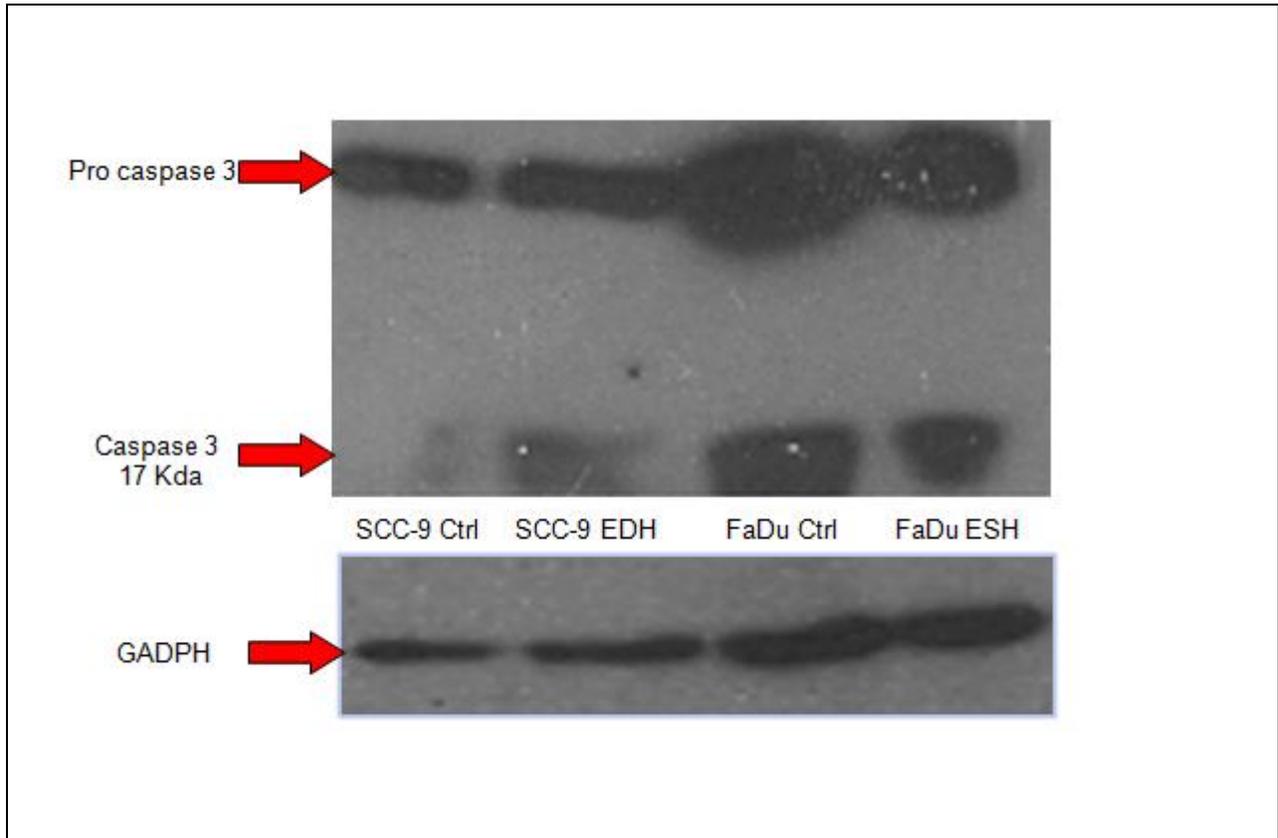


Figura 08: Western-blot para detecção da clivagem da proteína caspase 3 e controle com GADPH nas linhagens SCC-9 (carcinoma de língua) e FaDu (carcinoma de hipofaringe) após 12 horas de tratamento com os extratos EDH e ESH (Ctrl = controle).

#### 4.9 Análise da interferência no ciclo celular da linhagem SCC-9 induzida pelo extrato EDH

Uma vez sugerido que o tratamento da linhagem de carcinoma de língua com EDH reduz de maneira significativa a proliferação celular, confirmado pelo ensaio de BrdU, fez-se necessário identificar possíveis interferências do extrato EDH no ciclo celular. A citometria de fluxo das células, controle e tratadas, fixadas em etanol e

marcadas exclusivamente com Iodeto de Propídeo permite identificar o número de eventos em cada fase do ciclo celular. Na Figura 09A observa-se que no grupo controle, 27% dos eventos foram marcados na fase G0/G1, 69% na fase S e 3% na fase G2/M. Porém as células tratadas com EDH, após 24 horas, migraram significativamente da fase S para a fase G0/G1 (75% de eventos em G0/G1, 21% em S e 4% em G2/M). As alterações de marcação nas fases do ciclo celular também podem ser visualizadas na figura 09 B. Esse dado deixa claro que o tratamento da linhagem SCC-9 com o extrato EDH paralisa o ciclo celular e reafirma a redução da proliferação das células de carcinoma de língua.

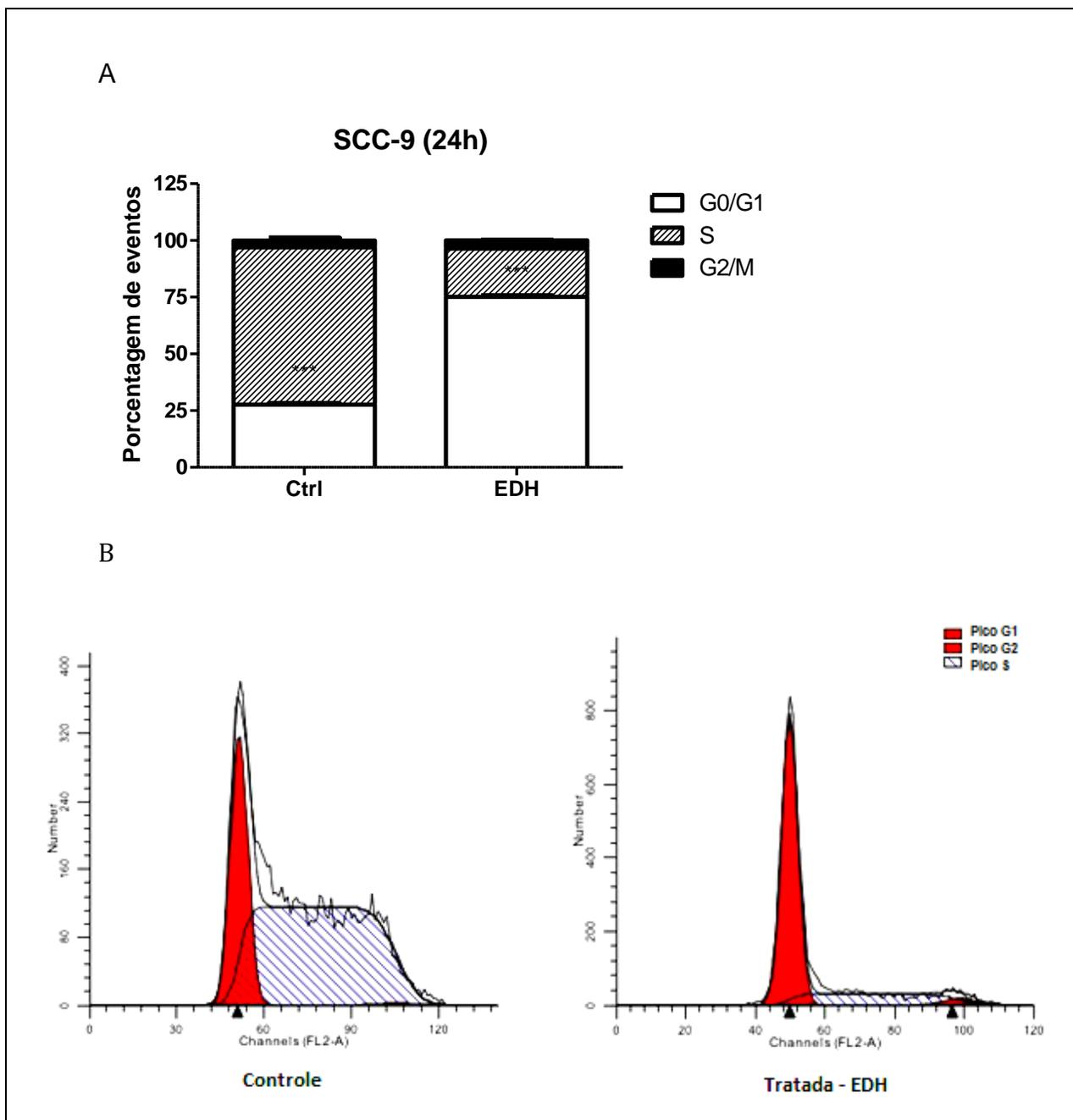


Figura 09: A - Distribuição dos eventos por fase do ciclo celular após 24 horas de tratamento com extrato EDH. \*\*\*  $p < 0,0001$  (diferença entre distribuição das células na fase G0/G1 e S). B- Distribuição dos eventos marcados com Iodeto de Propídeo no histograma: o primeiro pico vermelho representa os eventos na fase G0/G1, o segundo pico vermelho (à direita) representa os eventos na fase G2/M, a região tracejada representa o número de eventos na fase S.

A Figura 10 demonstra que há alteração na expressão das proteínas envolvidas no processo de transição das fases do ciclo celular. Dentre as proteínas estudadas, (Ciclina D, Ciclina E, p16, p21, p27) observou-se que o tratamento com o extrato EDH provoca diminuição da expressão de Ciclina D (88% de redução em relação ao grupo controle) e Ciclina E (24% de redução), aumento de aproximadamente 20% na expressão de p21 e 13% da expressão de p16. Também observou-se redução da expressão de p27 (37%). O cálculo da expressão das proteínas foi realizado pelo software Uvitec (Cambridge).

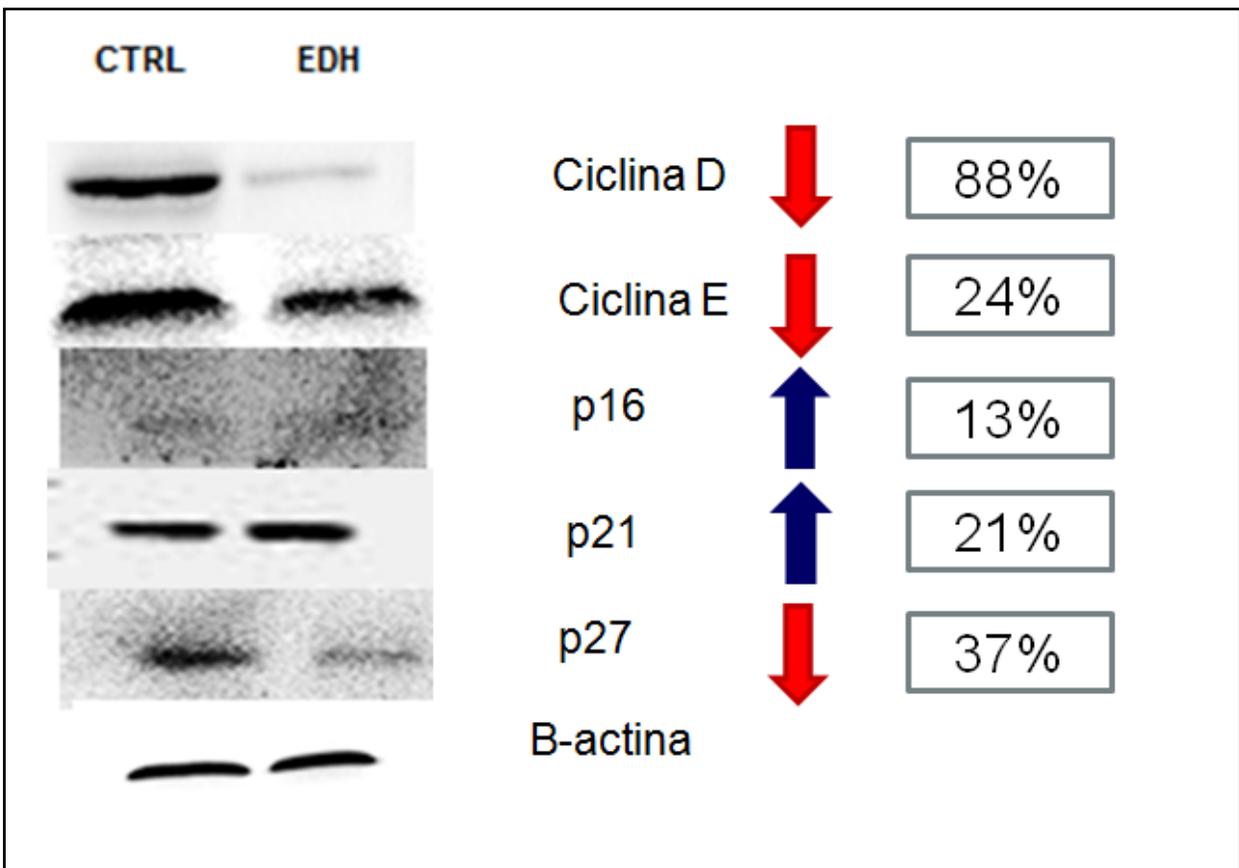


Figura 10: Expressão das proteínas do ciclo celular na linhagem SCC-9 após 12 horas de tratamento com o extrato EDH.

#### **4.10 Avaliação da interferência do extrato no ensaio de lesão em monocamada e migração celular**

O teste de fechamento de ferida demonstrou que nas horas iniciais, o tratamento com extrato EDH influenciou a migração celular evitando com que a linhagem SCC-9 migrasse e fosse capaz de fechar a “ferida” aberta na placa (Figuras 11A, 11B e 11C). Esse fato pode ser observado até 12 horas pós-tratamento com EDH. Nas células controle houve 21% a mais de área fechada do que nas células tratadas com extrato EDH na concentração do IC50 (Figura 11C). Após 24 horas de tratamento já há pequeno aumento na área inicial da ferida, que passa a ser de 101,04%, indicando perda celular. Com 36 horas o grupo controle apresenta praticamente o fechamento total da ferida. Nos poços tratados com EDH, após 36 horas de tratamento, já não é mais possível identificar as margens da ferida de maneira clara e a imagem é sugestiva de aumento desta área para aproximadamente 123,7% (Figura 11C).

O extrato EDH também mostrou ser capaz de influenciar a capacidade das células de carcinoma de língua em atravessarem o compartimento superior da câmara e chegar à camada inferior do poço. Houve redução de aproximadamente 71% na migração celular (Figuras 12A e 12B). Esse resultado sugere que o extrato EDH pode reduzir a capacidade de invasão das células neoplásicas e conseqüentemente inibir metástase.

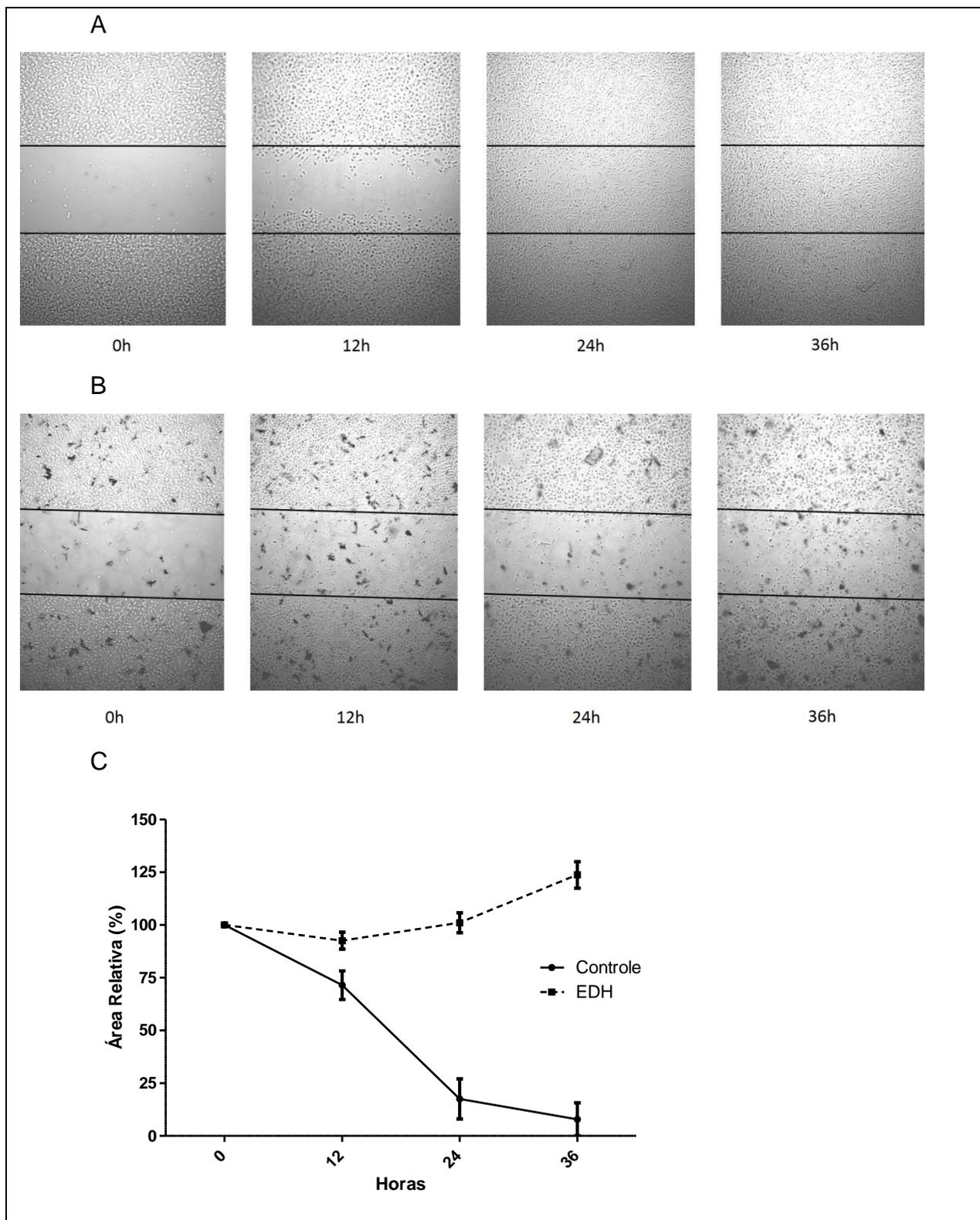


Figura 11: Avaliação do fechamento de lesão em monocamada da linhagem SCC-9 pós-tratamento com o extrato EDH. A: Células controle, tratadas apenas com o solvente do extrato. B: células tratadas com o extrato EDH. C: Cálculo do tamanho da área da ferida expresso em porcentagem.

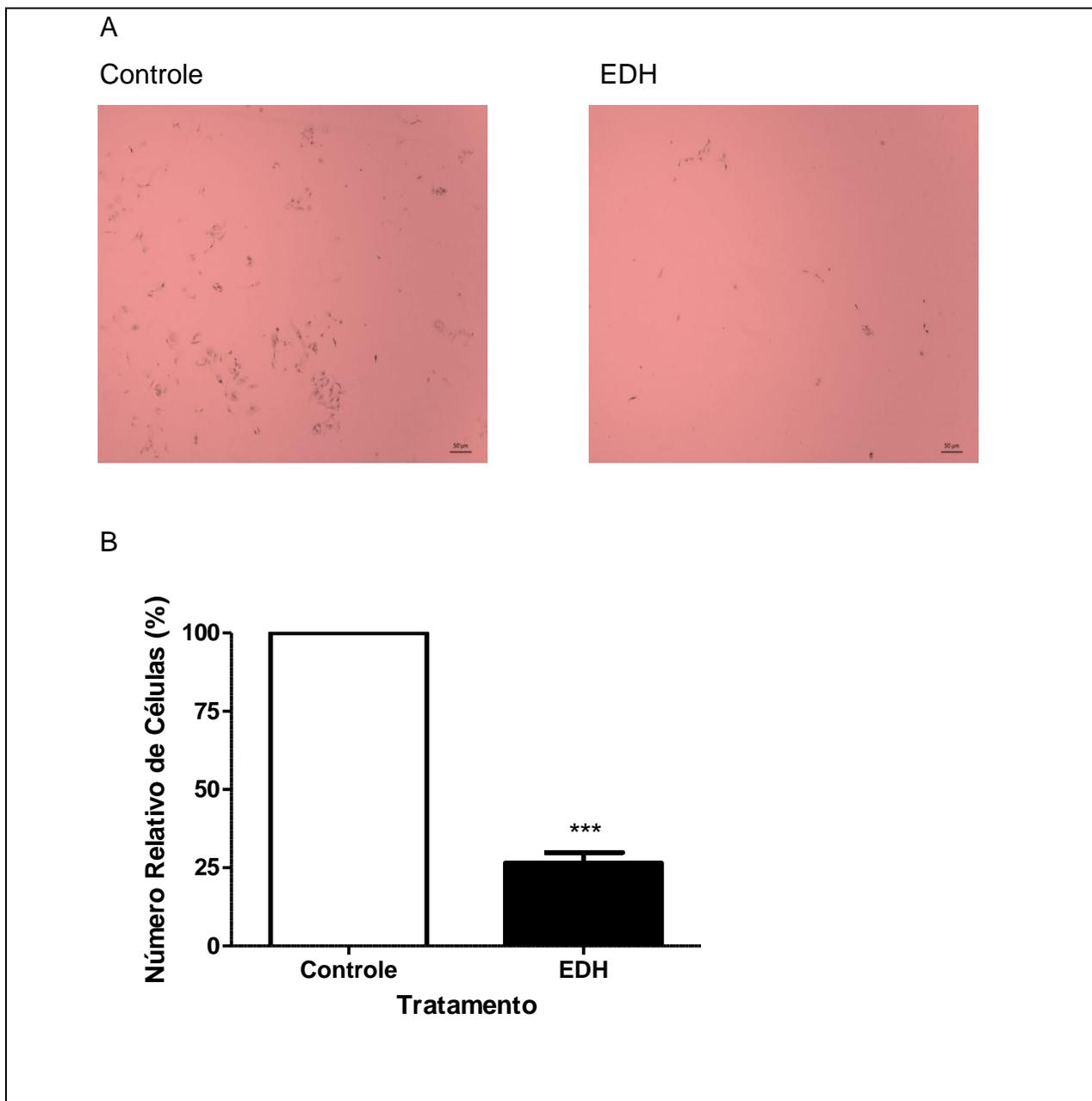


Figura 12: Demonstração da inibição da migração celular das células SCC-9 tratadas com o extrato EDH. A: Imagens representativas das células que atravessaram a membrana e localizam-se no compartimento inferior da câmara. As células controle e tratadas foram coradas com cristal violeta e fotografadas com e sem tratamento pelo extrato EDH. B: Representação do percentual de células que migraram para o compartimento inferior da câmara.

#### 4.11 Identificação dos possíveis compostos presentes nos extratos com maior atividade citotóxica

A fim de identificar a provável substância ou composto com atividade citotóxica para as linhagens SCC-9, SCC-25 e FaDu, os extratos EDH, ESH e ESOH foram fracionados em cinco frações: hexano: acetato de etila (1:1), acetato de etila: metanol (1:1), acetato de etila, metanol e hexano. Após tratamento das linhagens celulares com cada uma das frações na concentração de 500 µg/mL, a citotoxicidade foi averiguada.

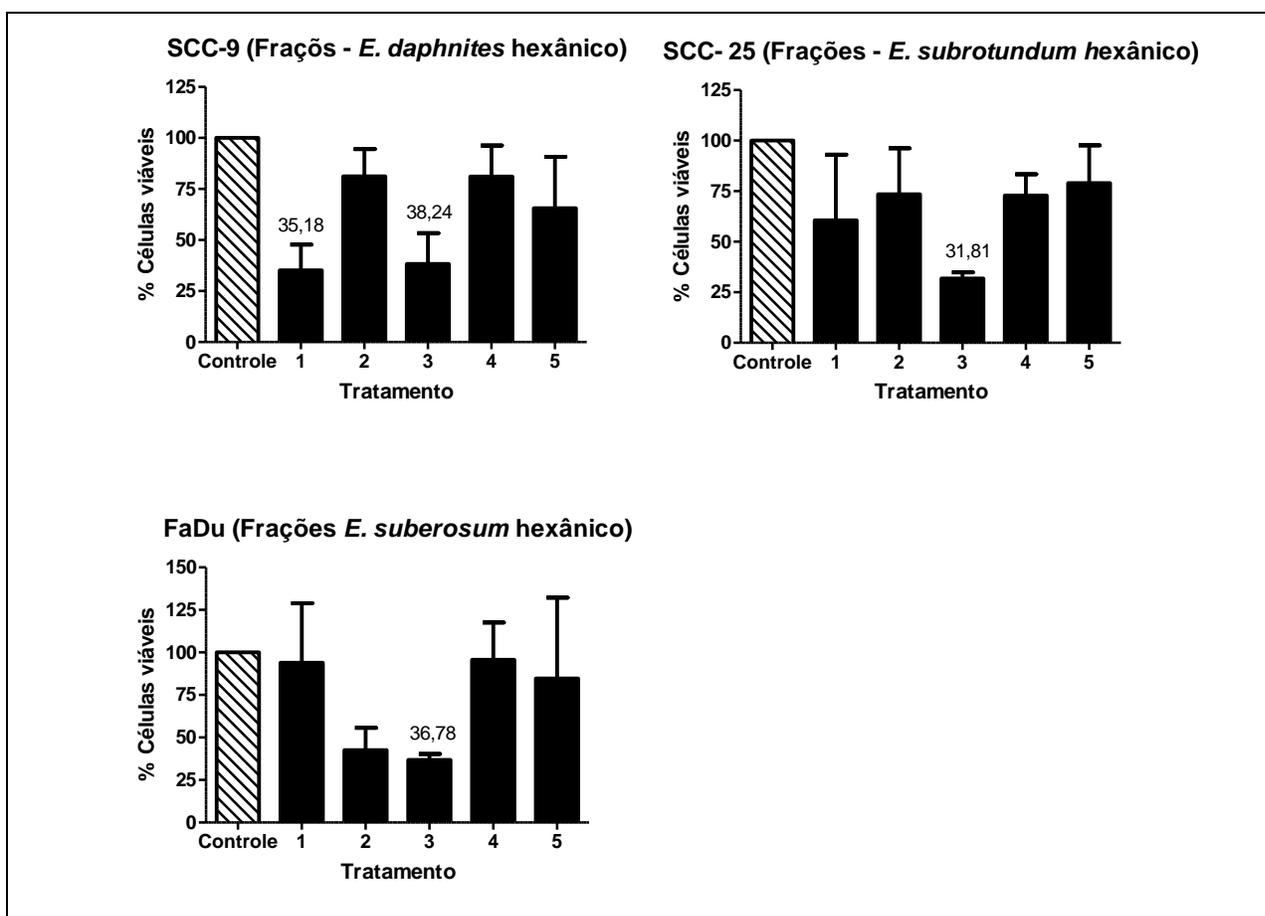


Figura 13: Citotoxicidade das frações nas linhagens SCC-9, SCC-25 e FaDu após 24 horas de tratamento. 1 - Fração hexano: acetato de etila (1:1); 2 - Fração acetato de etila: metanol (1:1); 3 - Acetato de etila; 4 - Metanol; 5 - Hexano.

Os testes de citotoxicidade anteriores demonstraram que dentre as espécies estudadas, o extrato hexânico foi o que apresentou maior toxicidade para as linhagens de carcinoma e por isso apenas os extratos hexânicos foram fracionados. Para os extratos ESH e ESOH as frações com maior atividade citotóxica foram às frações acetato de etila. No extrato EDH, duas frações tiveram atividade citotóxica bastante semelhante, a fração hexano: acetato de etila (1:1) e a fração acetato de etila, mas a primeira delas apresentou citotoxicidade um pouco maior, demonstrando 35,18% de células viáveis (Figura 13).

Para detectar a classe de substâncias mais presentes nestas frações, realizamos o teste da cromatografia de camada delgada (CCD) em placa de sílica. Como solução eluente foi utilizado o hexano (7): acetato de etila (3) e anisaldeído como revelador. A Figura 14 demonstra que todas as frações apresentaram padrão compatível com triterpenos.

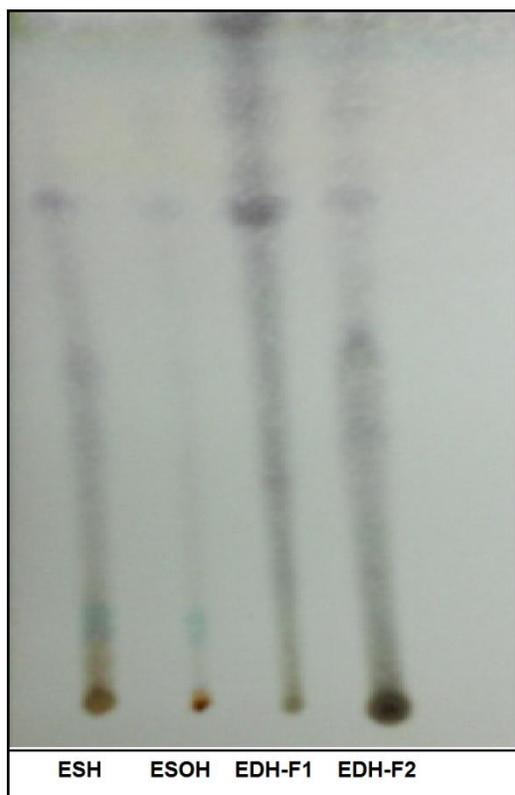


Figura 14: Cromatografia de camada delgada (CCD) com as frações: acetato de etila dos extratos ESH e ESOH, hexano: acetato de etila (1:1) para EDH (EDH-F1) e acetato de etila do extrato EDH (EDH-F2).

## 5. DISCUSSÃO

O tratamento do câncer de cabeça e pescoço é um grande desafio para a oncologia. Dois terços dos pacientes são diagnosticados em estágios loco regional avançados da doença e por isso a estimativa de vida permanece em 5 anos para 30 a 60% dos pacientes (Zaboli *et al.*, 2012). Enquanto em estágios iniciais a cirurgia apresenta-se como melhor opção terapêutica, casos mais avançados requerem tratamentos complexos com associação de radioterapia e quimioterapia. Os pacientes que se submetem ao tratamento quimiorradioterápico apresentam uma série de efeitos adversos como mielossupressão, dermatite, mucosite e diarreia o que diminui consideravelmente a qualidade de vida desses pacientes (Sclumpf *et al.* 2013). Agentes de base-platina, como a cisplatina fazem parte dos regimes quimioterápicos convencionais (Abuzeid *et al.*, 2010). Mesmo sendo o quimioterápico de escolha a cisplatina não apresenta bons resultados no tratamento do HNSCC. No presente trabalho verificou-se que o uso da cisplatina na concentração de 50 µg/mL induziu aproximadamente 58% de citotoxicidade para a linhagem FaDu. Nas linhagens de carcinoma oral a cisplatina não foi capaz de induzir 50% de citotoxicidade. Outro problema identificado no tratamento com a cisplatina é que a repetição de vários ciclos gera resistência nas células de carcinoma de cabeça e pescoço (Abuzeid *et al.*, 2010). Por isso a busca por novas associações quimioterápicas são constantes. Já em 2004, Huang *et al.* constataram que havia um benefício em incorporar o taxol ao tratamento dos pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço. Clinicamente, a combinação quimioterápica (taxol, cisplatina e 5-FU) tem sido utilizada no tratamento dos pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço no Hospital Universitário de Brasília (HUB). Cognatti *et al.*, 2008 em sua revisão de literatura apontam três estudos que indicam que o uso dessa combinação pode aumentar a sobrevida dos pacientes.

Zheng, *et al.* 2010 afirmam em seu trabalho que para a radioterapia ser efetiva é necessário que a radiação ao qual a célula foi exposta seja capaz de causar lesão subletal suficiente para que a célula entre em processo de apoptose. De fato, dose única de radiação (2Gy/min), não induziu morte celular nas linhagens FaDu, SCC-9, e SCC-25, além de estimular o crescimento celular na linhagem de queratinócitos. Para

obter lesão subletal suficiente, seria necessário expor as células a um maior número de doses, procedimento realizado no tratamento de pacientes.

Mesmo sendo classificados em um mesmo subtipo de tumor e tendo a mesma origem epitelial, os carcinomas de boca e de orofaringe comportam-se de maneira diferentes (Leemans *et al.*, 2011, Belcher *et al.*, 2014). Sabe-se que as alterações em genes e as vias moleculares variam de tumor para tumor, o que pode ser uma justificativa para a diferença de comportamento diante do mesmo tratamento (Chatelain *et al.*, 2011). As linhagens SCC-9 e SCC-25 derivadas de tumor de língua se mostraram menos sensíveis aos tratamentos com os extratos de plantas do Cerrado e ao quimioterápico convencional (cisplatina) quando comparadas à linhagem FaDu, (carcinoma de hipofaringe). Tal diferença em relação ao tratamento quimioterápico também foi observada no estudo de Howard *et al.*, 2012. O tratamento prévio com cisplatina (50 µg/mL) seguido por irradiação (2 Gy) aumentou significativamente a citotoxicidade observada nas linhagens celulares. A combinação destes tratamentos induziu 85% de citotoxicidade na linhagem FaDu, 83% de citotoxicidade em SCC-25 e 80% na linhagem SCC-9. O uso conjunto de quimioterapia, convencional ou associada à radioterapia melhora a resposta ao tratamento em pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço (Bachaud *et al.*, 1996; Pignon *et al.*, 2009; Argiris *et al.*, 2010; Zaboli *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, plantas de vários países têm recebido atenção especial para a sua utilização no tratamento e quimioprevenção de tumores (Suffredini *et al.*, 2007; Kwiecinski *et al.*, 2008; Chia *et al.*, 2010; Endringer *et al.*, 2010; Santos Junior *et al.*, 2010; Melo *et al.*, 2011; Henning *et al.*, 2011). Ao averiguar o potencial citotóxico de plantas do Bioma Cerrado em linhagens de HNSCC observou-se que a linhagem de carcinoma de hipofaringe FaDu foi mais sensível aos tratamentos propostos, sendo que 9 extratos geraram 50% ou mais de citotoxicidade celular. A linhagem SCC-25 foi sensível a dois extratos, e a linhagem SCC-9 a 3 extratos. Destaca-se que a linhagem HaCat foi sensível, com toxicidade maior ou igual a 50%, em apenas quatro tratamentos o que sugere possível seletividade dos extratos etanólicos para a linhagem FaDu e de EDH e ESOH para a SCC-9. A ação citotóxica da planta *Pouteria torta* em linhagens de câncer já foi demonstrada em outros trabalhos (Boleti *et al.*, 2008; Elias *et*

*al.*, 2013). A pouterina, uma proteína com atividade tipo lectina, isolada a partir de sementes de *Pouteria torta*, foi capaz de induzir apoptose em células neoplásicas de mamíferos (Boleti *et al.*, 2008).

Além de apresentarem atividade citotóxica para as linhagens de HNSCC, os extratos testados também demonstraram ter efeito radiosensibilizante. O pré-tratamento das células com 500 µg/mL dos extratos de plantas do Cerrado, seguido por tratamento radioterápico (2 Gy) apresentou melhores resultados de citotoxicidade celular que a radioterapia isolada, demonstrando forte efeito aditivo, dados já publicados no artigo de Elias *et al.*, 2014. Estes resultados são semelhantes aos achados de Kotowski *et al.* (2011) e Eder Czemberek *et al.* (2010) que detectaram efeito aditivo do ácido betulínico e sulforafano, respectivamente, à irradiação de células de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço em ensaios clonogênicos.

A forte toxicidade ocasionada pelo tratamento das linhagens de HNSCC por extratos do Cerrado levanta a questão da importância da toxicidade inespecífica. Grande parte dos efeitos adversos ocasionados pelos tratamentos quimioterápicos se dá pela inespecificidade dos seus alvos. Geralmente as células que estão em fase de proliferação são as mais atingidas, porém outros mecanismos podem justificar a toxicidade desses fármacos (Florea e Büsselberg, 2011; Peres e Cunha Júnior, 2013). Observou-se nesse trabalho que a atividade de ESH não é seletiva para as células de carcinoma de hipofaringe (FaDu) apresentando índice de seletividade tumoral (IST) de 0,93 em relação aos queratinócitos (HaCat). Já o extrato EDH apresentou resultado bastante promissor com IST de 1,64 para a linhagem SCC-9 em relação à HaCat. Resultado semelhante pode ser encontrado no estudo de Horri *et al.*, 2012 que verificou que o extrato de *Rhinacanthus nasutus* apresenta forte seletividade para linhagem de carcinoma oral quando comparado à ação em fibroblastos gengivais, células pulpares e células do ligamento periodontal.

Os agentes neoplásicos podem ser divididos em quimioterápicos, agentes hormonais e imunoterápicos. Dentre os quimioterápicos ainda existe uma subclassificação quanto a sua estrutura química ou seu mecanismo de ação. Muitos agentes são ciclo-celular específicos, exercem sua função em células que estão em processo de divisão, e outros são agentes ciclo-celular não específicos, que têm a

capacidade de eliminar células tumorais independentemente de estarem atravessando o ciclo ou de estarem em repouso no compartimento G0 (Espinosa E *et al.*, 2003). Os extratos EDH e ESH por apresentarem maior atividade citotóxica nas linhagens de HNSCC foram avaliados quanto à sua capacidade de interferir na proliferação celular. Apesar de pertencerem à mesma família os extratos apresentaram ação bastante distinta. O EDH reduziu aproximadamente em 30% a proliferação celular, já o extrato ESH, não apresentou redução da proliferação celular. Esse dado sugere a expectativa de diferentes vias de ação e por isso identificar o perfil de morte celular induzido por cada agente se fez necessário.

O extrato EDH apresentou perfil de morte celular misto com aumento de eventos marcados por anexina, anexina/iodeto e iodeto na análise de citometria de fluxo. Os resultados sugerem que o extrato EDH tem ação variada na linhagem de carcinoma oral, induzindo apoptose em fase inicial com progressão para necrose à medida que há aumento no tempo de tratamento. Efeito semelhante foi observado por Chia *et al.*, 2010, que constatou que o extrato das folhas de *Toona sinensis* induz morte por apoptose ou uma combinação de apoptose e necrose dependendo do tipo celular estudado. A identificação da expressão de caspase-3 nas células tratadas com EDH, confirma que a apoptose esta presente. Outros trabalhos ressaltam a importância da indução de apoptose por futuros candidatos a agentes antineoplásicos e utilizam o aumento de marcação da caspase-3 para definir sua presença (Elias *et al.*, 2010; Boubaker *et al.*, 2011; Chan *et al.*, 2012; Colquhoun *et al.*, 2012). Apesar do extrato ESH induzir necrose na linhagem de carcinoma de hipofaringe, este efeito não pode ser negligenciado. Evidências recentes sugerem que a necrose pode ser um processo controlado com envolvimento de mecanismos moleculares distintos. Especificamente, a necrose pode gerar o aumento nas citocinas de morte celular tipo-TNF na ausência de inibidores de caspase. Isso levaria a uma morte celular programada chamada de necroptose que se caracteriza por inchaço das organelas celulares seguida por ruptura da membrana plasmática (Cho *et al.*, 2011).

As ciclinas e CDKs são as principais responsáveis por tornar possível a progressão do ciclo celular da fase G0 para a entrada da fase G1 com subsequentes passagens pelas fases S, G2 e M. As alterações dos níveis de ciclina e CDKs permitem

a transição entre as fases que geram ao final do processo uma célula filha idêntica à célula mãe. Durante todo este processo existem os chamados pontos de checagem que verificam se a célula está apta a progredir pelo ciclo (Carneiro, 2002). O estudo da transição da fase G1 para a fase S é de fundamental importância uma vez que muitas alterações genéticas que levam à progressão do câncer provocam justamente a desregulação do ciclo nesta interface (Foster *et al.*, 2010). Com foco nos tumores que geram desregulação do ciclo celular, surgiram os agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos, dentre eles podemos citar os agentes antimetabólicos, agentes hormonais, produtos naturais como os alcaloides da vinca e o taxol (Johnson *et al.*, 1960; Wani *et al.*, 1971).

O tratamento com o extrato EDH na linhagem SCC-9, revelou alteração no ciclo, com retenção das células na fase G0/G1 e significativa redução do número de eventos na fase S. No grupo controle 27% dos eventos estavam na fase G0/G1 e 69% na fase S, comprovando processo de divisão celular. As células tratadas com o extrato EDH apresentaram 75% de marcação de eventos na fase G0/G1 e redução da fase S para aproximadamente 21%, que sugere retenção do ciclo. Efeito semelhante foi observado por Wang *et al.*, 2009, em relação aos extratos pertencentes ao gênero *Sinularia* na linhagem de carcinoma oral SCC-25. Ainda Chan *et al.*, 2012, observou o mesmo com a substância apigenina, um flavonoide.

Dentre as proteínas envolvidas no processo de progressão do ciclo as ciclinas D, E e A se destacam, pois a variação de seus níveis e a ligação delas às CDKs permite a transição pelas fases do ciclo celular. Ciclina D, codificada pelo gene CCND1, funciona basicamente como subunidade reguladora de Cdk4 e Cdk6. A atividade da Ciclina D é de fundamental importância para que ocorra a transição da fase G1 para a fase S. Por outro lado, a Ciclina E tem como alvo a Cdk2, e sua união permite a progressão de G1/S. O complexo CiclinaE/Cdk2 fosforila a proteína p27 (inibidor de ciclina D) e permite a expressão de Ciclina A, necessária para a entrada e progressão para a fase S. Além da p27, as ciclinas possuem outros reguladores naturais dentre eles podemos citar as proteínas p21 e a p16. Essas proteínas atuam como supressoras tumorais se ligando preventivamente às Ciclinas D e E, inibindo a ligação dessas às Cdk2 e Cdk4 (Carnero, 2002; Rigglelen e Felsher, 2010, Bertoli *et al.*, 2013).

Uma vez tratada com o extrato EDH, a linhagem SCC-9, de carcinoma de língua, apresentou mudanças no perfil de expressão das proteínas envolvidas na transição do ciclo celular. Observou-se que houve diminuição na expressão de Ciclinas D e E, assim como da proteína p27. Por outro lado, a expressão das proteínas p21 e p16 nas células tratadas revelaram bandas mais intensas do que as observadas no controle. Esses resultados em acordo com a literatura (Carnero, 2002; Howard *et al.*, 2012) justificam o acúmulo de eventos na fase G0/G1 e consequente diminuição da proliferação celular encontrada no experimento realizado.

Trabalhos recentes apontam que existe uma conexão entre diabetes e câncer. Pacientes que usam metformina para controle da diabetes parecem ter uma menor incidência de câncer por isso sua interferência em células neoplásicas tem sido testada (Chandel N, 2014; Gandini *et al.*, 2014). Ao avaliar a ação da metformina nas linhagens FaDu e Detroit 562, representantes de carcinoma de cabeça e pescoço, notou-se nítida interferência no ciclo celular, com paralisação das células na fase G1. A análise dos níveis das proteínas envolvidas no ciclo celular, das células tratadas com metformina, demonstra redução da expressão das proteínas Cdk2, Cdk4, Cdk6, Ciclinas D e E, e inibidores de CDK, como as proteínas p15, p16, p18 e p27 (Sikka *et al.*, 2014). Resultado semelhante ao encontrado nas células SCC-9 tratadas com o extrato EDH, discordando apenas na expressão de p16 que teve sua expressão aumentada em nosso trabalho e reduzida no tratamento com metformina. O agente antineoplásico flavopiridol também exerce função apoptótica em carcinoma de cabeça e pescoço através da paralisação do ciclo celular e redução da expressão de Ciclina D (Patel *et al.*, 1998).

Outro importante aspecto a ser avaliado nos possíveis candidatos a tratamentos antineoplásicos é o potencial de inibição de metástase. Medicamentos que são capazes de diminuir o tumor, por mecanismos de citotoxicidade, inibição da proliferação, indução de apoptose e redução da capacidade de metástase são importantes aliados no tratamento de pacientes oncológicos. No teste de fechamento de ferida, (scratch assay), a célula SCC-9 tratada com o extrato EDH, após 12 horas, já mostrou efeito inibidor da migração celular. Resultados semelhantes são vistos em outros trabalhos, que trataram a linhagem FaDu com MK2206 (inibidor de AKT) e

extrato de *Anisomeles indica* (Knowles *et al.*, 2011; Hsu *et al.*, 2012). Após 24 horas de tratamento a citotoxicidade celular causada na linhagem SCC-9, pelo extrato EDH, parece ser maior que a redução da migração. As imagens realizadas durante o teste de lesão de monocamada demonstram que 24 horas após o tratamento com o extrato EDH as células ao redor da ferida começam a morrer, evidenciando assim a atividade citotóxica do extrato. Nas imagens de 36 horas de tratamento, o controle está totalmente fechado, mas nas células tratadas já é difícil definir a linha de ferida. Associado a esses dados temos o resultado do teste Transwell que demonstra a redução da migração das células neoplásicas após o tratamento. Esses resultados em conjunto sugerem que além de atividade citotóxica, antiproliferativa, apoptótica e estabilizadora do ciclo celular, o extrato EDH também pode possuir atividade antimetastática. Similarmente, Yang *et al.* 2013, demonstrou que as células SCC-9 que superexpressam MT1-MMT apresentam menor capacidade de migração pelo teste do scratch, porém maior motilidade celular no teste transwell, apresentando característica semelhante às de células tronco neoplásicas.

Definir o potencial biológico de extratos de plantas é uma importante ferramenta na descoberta de novos agentes terapêuticos. Porém para que sua utilização comercial torne-se possível é necessário identificar e isolar possíveis substâncias ativas.

Os flavonoides são uma classe de compostos fenólicos difundidas no reino vegetal. Estes compostos apresentam várias atividades biológicas, incluindo atividade antioxidante e radioprotetora (Shimoi *et al.*, 1994; Pietta, 2000). No entanto, eles podem migrar para a atividade pró-oxidante, na presença de metais. Esta atividade pró-oxidante é responsável pela capacidade dos flavonoides em promover a toxicidade celular, principalmente causando lesões ao DNA. Como as células malignas têm um nível mais elevado de cobre intracelular, tem sido sugerido que o flavonoide-Cu (II) apresenta efeitos mais citotóxicos em células neoplásicas do que em células normais (Hosseimehr, 2010). Nos extratos etanólico e aquoso de *Erythroxylum suberosum* foram identificados catequinas, epicatequinas e rutinas, através da análise de HPLC, dados não apresentados neste estudo mas já publicados em Elias *et al.*, 2014. A presença de flavonoides nos extratos testados pode justificar o efeito radiosensibilizante encontrado (Elias *et al.*, 2014). Os flavonoides como a genisteína,

apigenina e quercetina derivados da espécie *Citrus SP* já demonstraram efeito radiosensibilizante, inibindo o reparo do DNA após exposição à radioterapia (Kandaswami *et al.*, 1991). Derivados de catequinas e epicatequinas, também presentes nos extratos aquoso e etanólico de *E. suberosum*, apresentaram atividade quimioprotetora, modulando a sinalização de várias vias, induzindo apoptose e arrasto do ciclo celular. Além de inibir a proliferação celular, a angiogênese e a metástase de células de carcinoma de cabeça e pescoço (Kim *et al.*, 2010).

É importante levar em consideração que os extratos de plantas são misturas muito complexas, apresentando-se com uma abundância de compostos ativos. Os mais polares, os quais são os extratos etanólicos e aquosos, são ricos em polifenóis, uma classe de substâncias com atividade antioxidante significativa. De fato, vários polifenóis são capazes de proteger as células contra os danos da radiação (Shimoi *et al.*, 1994). Ao fracionar o extrato hexânico de *Erythroxylum daphnites*, *Erythroxylum suberosum*, e *Erythroxylum subrotundum*, verificamos que em todos eles, ao serem testados nas linhagens de carcinoma de cabeça e pescoço, a fração que concentrou maior atividade citotóxica foi a acetato de etila. Para o extrato EDH, a fração hexano(1): acetato de etila(1) induziu citotoxicidade muito semelhante aquela encontrada nas células tratadas com a fração acetato de etila. Isso nos permite inferir que o provável componente ou composto ativo está presente em maior concentração na fração hexano(1): acetato de etila(1).

Ao fazer o experimento de cromatografia de camada delgada (CCD) nas frações com maior atividade citotóxica para as linhagens de HNSCC verificamos que a classe preponderante de substâncias encontrada é a classe dos triterpenos. Existem mais de mil estruturas diferentes de triterpenos que estão presentes em grande diversidade no reino vegetal. Dentre as principais classes encontradas podemos destacar o lupeol, o  $\alpha$ -amirina, o  $\beta$ -amirina, a friedelina e o lanostadiol (Olea e Roque, 1990). Diversos estudos têm demonstrado atividade biológica, como ação antiinflamatória e quimioprotetora, dessa classe de substâncias (Shi *et al.*, 2014; Olden e Vulimiri, 2014; Parra *et al.*, 2014; Manosroi *et al.*, 2013). O nimbolide, um triterpeno derivado da espécie *Azadiractha indica* foi capaz de inibir a proliferação celular, induzir apoptose, suprimir a atividade do NF- $\kappa$ B e proteínas reguladas pelo NF- $\kappa$ B em células de

carcinoma colorretal. Esses efeitos foram possíveis pela modulação do microambiente pró-inflamatório provocado por esse triterpeno (Gupta *et al.*, 2013). O *Phaseolideside E*, outro triterpeno derivado de espécie vegetal, apresentou forte atividade citotóxica em células de carcinoma de esôfago, induzindo apoptose, fragmentação do DNA e aumento da fase sub-G1 do ciclo-celular, bem como a diminuição do potencial de membrana e aumento de espécies reativas de oxigênio (Mo *et al.*, 2013). Assim os triterpenos encontrados em nossos extratos podem ser os responsáveis pela atividade citotóxica e antiproliferativa observada nos experimentos realizados.

Os resultados apresentados neste trabalho em concordância com outros observados na literatura sugerem que os extratos de plantas do Cerrado apresentam inúmeras atividades biológicas, destacando o potencial antineoplásico em células de carcinoma de cabeça e pescoço. A especificidade da ação do extrato hexânico da planta *Erythroxylum daphnites* (EDH) na linhagem de carcinoma de língua, induzindo apoptose, retenção das células na fase G1 e alteração das proteínas envolvidas no processo de progressão do ciclo-celular, além do possível perfil antimetastático demonstram que o extrato EDH é forte candidato a agente farmoquímico. Porém, mais estudos são necessários para isolar a substância ou componente ativo e tornar a utilização farmacológica desse agente possível.

## 6. CONCLUSÃO

Frente aos objetivos propostos, podemos concluir que:

- 1- Os extratos derivados de plantas do Cerrado estudados, em sua maioria, são citotóxicos às linhagens de carcinoma de cabeça e pescoço.
- 2- A linhagem de carcinoma de hipofaringe (FaDu) é a mais sensível aos tratamentos propostos. Dos extratos avaliados 05 deles têm ação específica na linhagem de carcinoma de hipofaringe em relação aos queratinócitos (HaCat). Dentre as linhagens de carcinoma de boca o extrato EDH é mais citotóxico para SCC-9 e ESOH para a linhagem SCC-25 do que para a linhagem HaCat.
- 3- Os extratos do Cerrado utilizados na pesquisa apresentam atividade citotóxica similar ou melhor do que a induzida por cisplatina nas linhagens de HNSCC.
- 4- Os extratos do Cerrado têm importante ação radiosensibilizante.
- 5- O extrato EDH é seletivo para a linhagem de carcinoma de língua. O mesmo não é observado nas células de hipofaringe tratadas com ESH.
- 6- O extrato EDH possui efeito antiproliferativo para a linhagem SCC-9 enquanto ESH não interfere na proliferação da linhagem FaDu.
- 7- O tratamento da linhagem SCC-9 com EDH ocasiona perfil de morte celular misto com marcação celular para apoptose e também para necrose. O extrato ESH provoca morte exclusiva por necrose na linhagem de carcinoma de hipofaringe.
- 8- O processo de morte celular ocasionado pelo extrato EDH se dá por sua interferência direta no ciclo celular da linhagem de carcinoma de língua.
- 9- Tratamento com o extrato EDH causa paralisação do ciclo na linhagem SCC-9, com diminuição da marcação de ciclinas (D e E) e aumento da expressão de supressores tumorais como p21 e p16.
- 10- O extrato EDH reduz consideravelmente a motilidade celular da linhagem SCC-9 nas 12 primeiras horas de tratamento.

**11-** Os extratos hexânicos apresentam maior citotoxicidade para as linhagens de HNSCC. As frações acetato de etila ou hexano(1): acetato de etila(1) são as mais citotóxicas. Triterpenos são as substâncias mais abundantes tanto no extrato EDH quanto no extrato ESH.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

1- Abuzeid WM, Davis S, Tang AI, Sounders L, Brenner JC, Lin J, Fuchs JR, Light E, Bradford CR, Prince MEP, Carey TE. Sensitization of head and neck cancer to cisplatin through the use of a novel curcumin analog. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2011 maio;137(5):499-07

2- Almeida SP, Proença CEB, Sano JM, Ribeiro JF. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: EMBRAPA - CPAC – DF, 1998, 464p.

3- Amarasinghe HK, Johnson NW, Lallo R, Kumaraarachchi M, Warnakulasuriya S. Derivation and validation of a risk-factor model for detection of oral potentially malignant disorders in populations with high prevalence. British Journal of Cancer 2010;103:303-09.

4- Araujo LDC, Filho JMDA, Silva EEDS, Oliveira AAP, Guimarães AL, Almeida JRGDS, Cavalcanti LS, Araújo ECDC. Avaliação da atividade antioxidante in vitro e determinação de fenóis totais em espécies do gênero *Erythroxylum*. VII Reunião Regional da FeSBE – Regional 2012.

5- Argiris A, Heron DE, Smith RP, Kim S, Gibson MK, Lai SY, Brasntetter BF, Posluszny DM, Wang L, Seethala RR, Dacic S, Gooding W, Grandis JR, Jonhson JT, Ferris RL. Induction docetaxel, cisplatin and cetuximab followed by concurrent radiotherapy, cisplatin, and cetuximab and maintenance cetuximab in patients with locally advanced head and neck cancer. Journal of Clinical Oncology 2010; 28(36): 5294-00.

6- Bachaud JM, Cohen-Jonathan E, Alzieu C, David JM, Serrano E, Daly-Schweitzer N. Combined postoperative radiotherapy and weekly cisplatin infusion for locally advanced head and neck carcinoma:final report of a randomized trial. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1996;36(5):999 - 04.

7- Banerjee R, Van Tubergen EA, SCalon CS, Vander Brock R, Lints JP, Russo N, Inglehart RC, Wang Y, Poverini PJ, Kirkwood KL, D'Silva NJ. The G protein-coupled receptor GALR2 promotes angiogenesis I head and neck cancer. Mol. Cancer Ther. 2014; 13(5):1323-33.

\* Referências descritas como na base de dados Pubmed

8- Belcher R, Hayes K, Fedewa S, Chen AY. Current treatment of head and neck squamous cell cancer. *J Surg Oncol* 2014;110(5):551-74.

9- Bertoli C, Skotheim JM, Robertus AMB. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature Reviews* 2013; 14: 518-28.

10- Best SM. Viral subversion of apoptotic enzymes: escape from death row. *Annu Ver Microbiol* 2008;62:171-92.

11- Bohm BA, Loo KW, Nicholls KW, Plowman T. Flavonoid variation in *Erythroxylum*. *Phytochemistry* 1988;27(3):833-37.

12- Boleti APA, Ventura CA, Justo GZ, Silva RA, Sousa ACT, Ferreira CV, Yano T, Macedo MLR. Pouterin, a novel potencial cytotoxic lectin-like protein with apoptosis-inducing activity in tumorigenic mammalian cells. *Toxicon* 2008;51:1321-30.

13- Boubaker J, Bhourri W, Sghaier MB, Bouhlel I, Skandrani I, Ghedira K, Ghedira LC. Leaf extracts from *Nitraria retusa* promote cell population growth of human cancer cells y inducing apoptosis. *Cancer Cell Int.* 2011; 31;11(1):37.

14- Bourhis J, Overgaard J, Audry H, et al. Hyperfractionated or accelerateradiotherapy in head and neck cancer: a meta-analysis. *Lancet* 2006;368:843-54.

15- Brand TM, Iida M, Wheeler DL. Molecular mechanisms of resistance to the EGFR monoclonal antibody cetuximab. *Cancer Biol Ther* 2011;11(9):777-92.

16- Brandão MGL, Cosenza GP, Moreira RA, Monte-Mor RLM. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian official pharmacopeia. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 2006;16(3):408-20.

17- Carnero A. Targeting the cell cycle for cancer therapy. *Br J Cancer.* 2002; 87(2): 129-33.

18- Castro CFS, Silva CAM, Perfeito JPS, Santos ML, Resck IS, Paula JE, Silveira D. Avaliação da atividade antioxidante de algumas espécies de Pouteria. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). 29° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.

19- Chan LP, Chou TH, Ding HY, Chen PR, Chiang FY, Kuo PL, Liang CH. Apigenin induces apoptosis via tumor necrosis factor receptor and Bcl2- mediated

pathway and enhances susceptibility of head and neck squamous cell carcinoma to 5-fluorouracil and cisplatin. *Biochimica and Biophysica Acta* 2012;1820:1081-90.

20- Chandel N. Four Key question about metformin and cancer. *BMC Biol* 2014;12(1):85.

21- Chatelain K, Phippen S, McCabe J, Teeters CA, O'Malley S, Kingsley K. Cranberry and Grape Seed Extracts Inhibit the Proliferative Phenotype of Oral Squamous Cell Carcinomas. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011;2011:467691 Epub 2010 Oct 18.

22- Chia YC, Rajbanshi R, Calhoun C, Chiu RH. Anti-neoplastic effects of gallic acid, a major component of *Toona Sinensis* leaf extract, on oral squamous carcinoma cells. *Molecules* 2010;15:8377-89.

23- Cho YS, McQuade T, Zhang H, Zhang J, Chan FKM. RIP1-Dependent and Independent effect of necrostatin 1 in necrosis and T cell activation. *Plos one* 2011;6(8):e23209.

24- Cognatti DM, Weber RS, Lai SY. Head and neck cancer: an evolving treatment paradigm. *Cancer* 2008;113(7):1911-32.

25- Dalponte JC, Lima ES. Disponibilidade de frutos e a dieta da *Pseudalopex vetulus* (Carnívora-Canidae) em um cerrado de Mato Grosso. *Revista Brasileira de Botânica* 1999;22:326-32.

26- Daly D, Smith EN, Mori SA, Henderson D, Heald SS in *Flowering Plants of Neotropics*. The New York Botanical Garden, 2004:143-45.

27- Elias ST, Diniz J, Almeida RSS, *et al*. Cytotoxic effect of tobacco extracts on human oral squamous cell carcinoma cell line. *Oral Oncol* 2010;46:869-73.

28- Elias ST, Salles PM, De Paula JE, Simeoni LA, Silveira D, Guerra ENS, Motoyama AB. Cytotoxic effect of *Pouteria torta* leaf extracts on human oral and breast carcinomas cell lines. *J. Cancer Res.Ther.* 2013;9(4):601-06.

29- Elias ST, Borges GA, Amorim DA, Rêgo DF, Simeoni LA, Silveira D, Fonseca-Bazzo YM, Paula JE, Fagg CW, Barros IMC, Abreu WC, Pinto-Júnior DS, Magalhães PO, Neves FAR, Porto AL, Guerra ENS. Radiation induced a supra-addictive cytotoxic effect in head and neck carcinoma cell lines when combined with plant extracts from Brazilian Cerrado biome. *Clin Oral Investiation* 2014; Agos. 7.

30 - Endringer DC, Valadares YM, Campana PRV, Campos JJ, Guimarães KG, Pezzuto JM, Braga FC. Evaluation of Brazilian plants on cancer chemoprevention targets in vitro. *Phytother Res* 2010;24:928-33.

31- Espinosa E, Zamora P, Feliu J, González Báron M. Classification of anticancer drugs – a new system based on therapeutic targets. *Cancer Treat Rev* 2003;29(6):515-23.

32- Florea AM & Busselberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers* 2011;3: 1351-71.

33- Foster DA, Yellen P, Xu L, Saqcena M. Regulation of G1 cell cycle progression: Distinguishing the restriction point from a nutrient-sensing growth checkpoint(s). *Genes & Cancer* 2011; 11(1):1124-31.

34- Freudlsperger C, Burnett JR, Friedman JA, Kannabiran VR, Chen ZC, Waes CV. EGFR-PI3K-AKT-mTOR Signaling in head and neck squamous cell carcinomas – attractive targets for molecular-oriented therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2011;15(1): 63-74.

35- Friedman JA, Wise SC, Hu M, Gouveia C, Vander Broek R, Freudlsperger C, Kannabiran VR, Arun P, Mitchell JB, Chen Z, Van Waes C. HSP90 inhibitor SNX5422/2112 targets the dysregulated signal and transcriptional factor network and malignant phenotype of head and neck squamous cell carcinoma. *Translational Oncol* 2013;6(4): 429 -41.

36- Gandini S, Puntoni M, Heckman Stoddard BM, Dunn BK, Ford L, De Censi A, Szabo E. Metformin and cancer risk and mortality: a systematic review and meta-analysis taking into account biases and confounders. *Cancer Prev. Res (Phila)* 2014;7(9):867-85.

37- Girard E, Strathdee C, Trueblood E, Quéva C. Macrophage migration inhibitory factor produced by the tumour stroma but not by tumour cells regulated angiogenesis in the BI6-F10 melanoma model. *British Journal of Cancer* 2012; 107: 1498 – 05.

38- Gupta SC, Prasad S, Sethumadhavan DR. Nimbolide, a limonoid triterpene, inhibits growth of human colorectal cancer xenografts by suppressing the proinflammatory microenvironment. *Clin Canc. Res* 2013;19:4465-76.

39- Hawley TS, Hawley RG. Flow cytometry protocols (second edition). *Methods in molecular biology. Immunology and cell biology* 2004;82: 555.

40- Henning SM, Wang P, Heber D. Chemopreventive effects of tea in prostate cancer: green tea versus black tea. *Mol. Nut. Food Res.* 2011;55:1-16.

41- Henrique AT, Simões CM. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, 1999;29:641.

42- Horri H, Suzuki R, Sakagami H, Umemura N, Ueda JY, Shirataki Y. Induction of non apoptotic cell death in human oral squamous cell carcinoma cell lines by *Rhinacanthus nasutus* extracts. *In Vivo* 2012;16:305-10.

43- Howard JD, Lu B, Chung CH. Therapeutic targets in head and neck squamous cell carcinoma: identification, evaluation, and clinical translation. *Oral Oncology* 2012 Jan;48(1):10-7. Epub 2011 Oct 22.

44- Hosseinimehr SJ. Flavonoids and genomic instability induced by ionizing radiation. *Drug Discov Today* 2010;15:907-18.

45- Hsu HF, Chen ZH, Chang SF, Wang CP, Chou SJ, Yen JH, Chang CC, Tsai YD, Fang LW, Hwang JY. Evaluation the anti-metastasis potential of *Anisomeles indica* extract by using human oral squamous carcinoma FaDu cells. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2012;6(24):1782-91.

46- Huang GC, Liu SY, Lin MH, Kuo YY, Liu YC. The synergistic cytotoxicity of cisplatin and taxol in killing oral squamous cell carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2004; 34 (8):499-04.

47- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer Journal for Clinicians* 2009;59 (4):225-49.

48- Kandaswami C, Perkins E, Soloniuk DS, Drzewiecki G, Middleton EJr. Antiproliferative effects of citrus flavonoids on a human squamous cell carcinoma in vitro. *Cancer Lett* 1991; 56(2):147-52.

49- Kanwar JR, Kamalapuram SK, Kanwar RK. Survivin signaling in clinical oncology: A multifaceted dragon. *Med. Research Reviews* 2012;0:1-25.

50- Khattak KF, Atta-ur-Rahman, Choudhary MI, Hemalal KD, Tillekeratne LM. J.Nat. Prod. 2002;25:929.

51- Kim HJ, Park JHY, Kim JK. Curcubitacin-I, a natural cell permeable triterpenoid isolated from Curcubitaceae, exerts potent anticancer effect in colon cancer. Chemio-Biological Int. 2014;219:1-8.

52- Klug C, Berzaczy B, Voracek M, Millesi W. Preoperative chemotherapy in the management of oral cancer: A review. J.of Cranio-Maxillofacial Surg 2008;36:75-88.

53- Knowles JA, Golden B, Yan L, Carrol WR, Helman EE, Rosenthal EL. Disruption of the AKT pathway inhibits metastasis in an orthotopic model of head and neck squamous cell carcinoma . Laryngoscopi 2011; 121(11):2359-65.

54- Kotowski U, Heiduschka G, Brunner M, *et al.* Radiosensitization of head and neck cancer cells by the phytochemical agent sulforaphane. *Strahlenther Onkol* 2011;187:575-80.

55- Kwiecinski MR, Felipe KB, Schoenfelder T, Wiese LPL, Rossi MH, Gonçalez E, Felicio J, Filho DW, Pedrosa RC. Study of the antitumor potential of *Bidens pilosa* (Asteraceae) used in Brazilian folk medicine. Journal of Ethnopharm. 2008;117:69-75.

56- Leemans CR, BJM Braakhuis, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. Nature Reviews, Cancer Volume 2011;11:9-22.

57- Loiola MIB, Agra MF, Baracho GS, Queiroz RT. Flora da Paraíba, Brasil: Erytroxylacea Kunth. Act.Bot. Brás. 2007;21(2):473-87.

58- Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. Nat Rev Cancer. 2001; 1(3): 222-31.

59- Martelli AM, Chiarini F, Evangelisti C, Grimaldi C, Ognibene A, Manzoli L, Billi AM, McCubrey IA. The phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT mammalian target of rapamycin signaling network and the control of normal myelopoiesis. Histol Histopathol, 2010;25(5):669-80.

60- Manosroi A, Jantrawut P, Ogihara E, Yamamoto A, Fukatso M, Yasukawa K, Tokuda H, Suzuki N, Manosroi J, Akihisa T. Biological activities of phenolic compounds and triterpenoids from the galls of *Terminalia chebula*. Chemistry and biodiversity 2013;10:1448-63.

61- Masamha CP, Benbrook DM. Cyclin D1 Degradation Is Sufficient to Induce G1 Cell Cycle Arrest despite Constitutive Expression of Cyclin E2 in Ovarian Cancer Cells. *Cancer Res.* 2009; 69(16): 6565-72.

62- Massa E, Dessi M, Gaspardini G, Saba F, Cherchi V, Mantovani G. Phase II study of vinorelbine/cetuximab in patients with recurrent/metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck progressing after at least two chemotherapy regimens. *Oral Oncology* 2010; 46 :818–21.

63- Melo JG, Santos AG, Amorim ELC, Nascimento SC, Albuquerque UP. Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: an ethnobotanical approach. *Evid Based Complement and Alternat Med* 2011;2011:365359. Epub 2011 Mar 8.

64- Mesquita ML, De Paula JE, Pessoa C, Moraes MO, Costa-Lotufo LV, Grougnet R, Micheld S, Tillequin F, Espindola LS. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology* 2009; 123: 439-45.

65- Mo S, Xiong H, Shu G, Yang X, Wang J, Zheng C, Xiong W, Mei Z. Phaseoloideside E, a novel natural triterpenoid saponin identified from *Entana phaseoloides*, induces apoptosis in EC-109 esophageal cancer cells through reactive oxygen species generation. *J. Pharmacol Sci* 2013;122:163-75.

66- Nascimento CJ, Violante IMP, Garcez WS, Pott A, Garcez FR. Biologically active albiatane and ent-kaurane diterpenoids and other constituents from *Erythroxylum suberosum*. *Phytochemistry Letters* 2012;5(2):401-06.

67- Olden K, Vulimiri SV. Laboratory to community: Chemoprevention is the answer. *Cancer Prev. Res.* 2014;7:648-52.

68- Olea RSG, Roque NF. Análise de misturas de triterpenos por RMN. *Química Nova* 1990;13(4):278-81.

69- Oliveira SL, Silva MS, Tavares JF, Sena-Filho JG., Lucena HFS, Romero MAV, Barbosa-Filho JM. Tropane alkaloids from *Erythroxylum* Genus: distribution and compilation of <sup>13</sup>C-NMR spectral data. *Chem & Biodivers* 2010 Feb;7(2):302-26.

70- Ota I, Okamoto N, Yane K, Takahashi A, Masui T, Hosol H, Onishi T. Therapeutic strategies for head and neck cancer based on p53 status (review). *Experimental and therapeutic medicine* 2012;3:585-91.

71- Pagedar NA, Gilbert RW. Selective neck dissection: a review of the evidence. *Oral Oncology*, 2009;45(4-5):416-20.

72- Panghal M, Kaushal V, Yadav JP. In vitro antimicrobial activity of ten medicinal plants against clinical isolates of oral cancer cases. *Ann Clin Microbiol and Antimicrob* 2011 Maio 20;10 -21.

73- Parra A, Fonseca SM, Rivas F, Zurita FJR, O'Donnell MM, Palomares EEF, Martínez A, Granados AC, Lupianez JA, Albericio F. Solid phase library synthesis of bi-functional derivatives of oleanolic and maslinic acids and their cytotoxicity on three cancer cell lines. *ACS Combinatorial Science* 2014;16(8):428-47.

74- Park HH. Structural features of caspase-activating complexes. *Int. J. Mol. Sci.* 2012;13:4807-18.

75- Peres LAB, Cunha Júnior AD. Nefrotoxicidade aguda da cisplatina: Mecanismos moleculares. *J Bras. Nefrol* 2013;35(4):332-40.

76- Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 2000;63:1035-42.

77- Pignon JP, Maitre AI, Maillard E, Bourhis J and behalf of the MACH-NC Collaborative group. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,342 patients. *Radiotherapy and Oncology* 2009;92:4-14.

78- Ratter JA, Ribeiro JF, Bridgewater S. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Annals of Botany* 1997; 80: 223-30.

79- RIAC Assentamento Monjolo 2009; set: 49-146.

80- Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev* 2004;5:897-07.

81- Sakagami H, Kobayashi M, Chien CH, Kanegae H, Kawase M. Selective toxicity and type of cell death induced by various natural and synthetic compounds in oral squamous cell carcinoma in vivo 2007;21:311-20.

82- Santana DG, Ranal MA, Oliveira MC. Despolpamento e reguladores de crescimento na emergência de plântulas de duas espécies do gênero *Pouteria*. IX Simpósio Nacional Cerrado 2008 – Brasília- DF.

83- Santos Junior HM, Oliveira DF, Carvalho DA, Pinto JMA, Campos VAP, Moura ARB, Pessoa C, Moraes MO, Costa-Lotufo LV. Evaluation of native and exotic Brazilian plants for anticancer activity. *J. Nat. Med.* 2010;64:231-38.

84- Schlumpf M, Fischer C, Naehrig D, Rochlitz C, Buen M. Results of concurrent radio-chemotherapy for the treatment of head and neck squamous cell carcinoma in everyday clinical practice with special reference to early mortality. *BMC Cancer* 2013;13:610-17.

85- Scully C, Bagan J. Recent advance in oral oncology. *Oral Oncol* 2007;43:107-15.

86- Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncol* 2009;45:301-08.

87- Shah JP, Gil Z. Current concepts in management of oral cancer-surgery. *Oral Oncol* 2009;45(4-5):394-01.

88- Shi LS, Wu CH, Yang TC, Yao CW, Lin HC, Chan WL. Cytotoxic effect of triterpenoids from the root bark of *Hibiscus syriacus*. *Fitoterapia* 2014;97:184-91.

89- Shimoi K, Masuda S, Furugori M, *et al.* Radioprotective effect of antioxidative flavonoids in  $\gamma$ -ray irradiated mice. *Carcinogenesis* 1994;15:2669-72.

90- Sikka A, Kaur M, Agarwal C, Deep G, Agarwal R. Metformin suppresses growth of human head and neck squamous cell carcinoma via global inhibition of protein translation. *Cell Cycle* 2012;11(7):1374-82.

91- Silva CAM, Simeoni LA, Silveira D. Genus *Pouteria*: Chemistry and biological activity. *Rev. bras. farmacogn.* 2009;19:501-09.

92- Sobolewski C, Cerella C, Dicato M, Ghibelli L, Duderich M. The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies. *International Journal of Cell Biology* 2010;2010:2151158.

93- Specenier PM, Vermoken JB. Current concepts for the management of head and neck cancer: Chemotherapy. *Oral Oncology* 2009;45:409-15.

94- Srivastava V, Negi AS, Kumar JK, Gupta MM, Khanuja SPS. Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2005;13:5892-08.

95- Suffredini IB, Paciencia MLB, Varella AD, Younes RN. In vitro cytotoxic activity of Brazilian plant extracts against human lung, colon and CNS solid cancers and leukemia. *Fitoterapia* 2007;78:223-26.

96- Thavaraj S, Stokes A, Guerra E, Bible J, Halligan E, Long A, Okpokam A, Sloan P, Odell E, Robinson M. Evaluation of human papillomavirus testing for squamous cell carcinoma of the tonsil in clinical practice. *J Clin Pathol* 2011 Abril;64(4):308-12.

97- Toledo CEM, Britta EA, Ceole LF, Silva ER, Mello JCP, Dias Filho BP, Nakamura CV, Ueda-Nakamura T. Antimicrobial and cytotoxic activities of medicinal plants of the Brazilian cerrado, using Brazilian cachaça as extractor liquid. *Journal of Ethnopharmacology* 2010;133, 420-25.

98- Vissink A, Burlage FR, Spijkervet FKL, Jansma J, Coppes RP. Prevention and treatment of the consequences of head and neck radiotherapy. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med* 2003; 14(3):213-25.

99- Wang GH, Chou TH, Lin RJ, Sheu JH, Wang SH, Liang CH. Cytotoxic effect of the genus *Sinularia* extracts on human SCC-25 and HaCat cells. *Journal of Toxicology* 2009;2009:634868.

100- Wani WC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, Mc Phail. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc* 1971;93(9):23257.

101- Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology* 2009;45:309-16.

102- Williams MD. Integration of biomarkers including molecular targeted therapies in head and neck cancer. *Head and Neck Pathol* 2010;4:62-9.

103- [www.inca.gov.br/estimativa2014](http://www.inca.gov.br/estimativa2014). Acessado em 12 de setembro de 2014 às 8:18h .

104- [www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira](http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira). Acesado em 09 de setembro de 2012 às 10:07h.

105- [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/). Acessado em 18 de setembro de 2014 às 8:30h

106- Yang CC, Zu LF, Xu XH, Ning TY, Ye JW, Liu LK. Membrane type 1 matrix metalloproteinase induces an epithelial to mesenchymal transition and cancer stem cell-like properties in SCC-9 cells. *BMC Cancer* 2013;13:171.

107- Zabolli D, Tan M, Goginenin H, Lake S, Fan K, Zahurak ML, Messing B, Ulmer K, Zinreich ES, Levini MA, Tang M, Pai SI, Blanco RG, Saunderson JR, Best SR, Califano JA, Ha PK. Hyperfractionated radiotherapy with concurrent cisplatin/5-fluorouracil for locoregional advanced head and neck cancer: Analysis of 105 consecutive patients. *Int J of Otolaryngol* 2012;2012:754191.

108- Zhang N, Erjala K, Kulmala J, Qiu X, Sundvall M, Elenius K, Grénman R. Concurrent cetuximab, cisplatin, and radiation for squamous cell carcinoma of the head and neck in vitro. *Radiother Oncol* 2009;92:388-92.

109- Zheng XK, Chen LH, Wang WJ, Ye F, Liu JB, Li QS, Sun HW. Impact of prolonged fraction delivery times simulating IMRT in cultured nasopharyngeal carcinoma cell killing. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 2010;78 (5), 1541-47

110- Zhou X, Zhu H, Liu L, Lin J, Tang K. A review: recent advances and future prospects of taxol-producing endophytic fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010;86:1707-17.

**APÊNDICE A - RADIATION INDUCED A SUPRA-ADDITIVE CYTOTOXIC  
EFFECT IN HEAD AND NECK CARCINOMA CELL LINES WHEN COMBINED WITH  
PLANT EXTRACTS FROM BRAZILIAN CERRADO BIOME**